



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA - UNIPAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MAYARA ARAMBURÚ PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA ANÁLISE DE TADALAFILA E SILDENAFILA
ASSOCIADOS, CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO E ESTUDO TOXICOLÓGICO**

Uruguaiana

2018

MAYARA ARAMBURÚ PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA ANÁLISE DE TADALAFILA E SILDENAFILA
ASSOCIADOS, CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO E ESTUDO TOXICOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

Coorientador: Prof^ª. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

Uruguiana

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

P659d Pinto, Mayara

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA ANÁLISE DE TADALAFILA E SILDENAFILA
ASSOCIADOS, CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO E ESTUDO TOXICOLÓGICO /
Mayara Pinto.

77 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2018.

"Orientação: Marcelo Malesuik".

1. falsificação de medicamentos. 2. tadalafila. 3.
sildenafil. 4. estabilidade. 5. toxicidade. I. Título.

MAYARA ARAMBURÚ PINTO

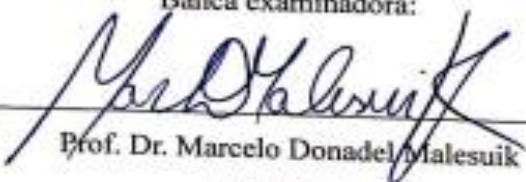
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA ANÁLISE DE TADALAFILA E SILDENAFILA
ASSOCIADOS, CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO E ESTUDO TOXICOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Dissertação defendida e aprovada em 29/03/2018.

Banca examinadora:

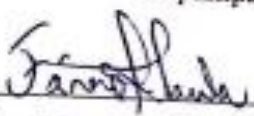

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

Orientador

Unipampa


Prof. Dra. Lisiane Bajerski

Unipampa


Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

Unipampa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as formas nas quais se fez presente no meu dia-a-dia, me dando forças para seguir em frente apesar das adversidades encontradas no caminho.

A minha família, em especial meu saudoso pai Caco, minha mãe Ligia e meu irmão Enrique pelo amor, colo e por fazerem com que a palavra lar tenha sentido e referência para mim.

Ao meu amor, Leonardo que nunca mediu esforços para me ajudar, participando dos bons e maus momentos com a maior paciência do mundo.

As minhas amigas presentes fisicamente Raíra e Camila, pelos momentos de ombro amigo e descontração. Vocês representaram muito de quando estamos todas as cinco juntas e isso foi imprescindível para manter meu equilíbrio mental.

Aos amigos Ricardo e Maurício contemporâneos de pesquisa na UFSM, por sempre atenderem meus pedidos de socorro por mais que fossem bobas as minhas dúvidas. Serão sempre meus “best’s”.

Às queridas colegas Camila, Silvana, Emanoeli e Isadora, presentes que ganhei do PPGCF, obrigada pelos momentos felizes, galhos quebrados, dilemas acadêmicos e pessoais compartilhados, cada uma do seu jeito tem um espaço especial no meu coração.

Aos professores e colegas do LDCQ, em especial minha amada e eterna IC Karine por ser tão carinhosa, amiga e responsável desde o princípio. Ao amigo Hemersom pelos cafés, experiências científicas e também de vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo D. Malesuik, por todo conhecimento compartilhado comigo, pela disponibilidade e sobretudo, compreensão ao decorrer desse período turbulento e tão importante da minha vida. A minha querida coorientadora Prof^a. Dr^a. Fabiana E. Barcellos da Silva pelos ensinamentos, colaborações ao trabalho e sensibilidade que sempre demonstrou ter comigo.

Aos professores Dr. Michel Mansur Machado e Dr. Luis Flávio Souza de Oliveira pela gentileza e disponibilidade que tiveram juntamente aos integrantes do laboratório TOXCEL os quais foram muito prestativos, profissionais e atenciosos na realização dos testes de citotoxicidade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que por meio de ações ou pensamentos contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os medicamentos com maior índice de falsificação, segundo dados oficiais, são os utilizados para o tratamento da disfunção erétil (DE), dentre eles tadalafila (TAD) e sildenafil (SIL). Associações desses fármacos são disponibilizadas no comércio ilegal em concentrações diferentes das autorizadas pelas agências regulatórias, sem qualquer estudo farmacológico ou cumprimento das Boas Práticas de Fabricação durante sua produção, o que acarreta sérios riscos à saúde do usuário. Além disso, condições ambientais inadequadas no transporte e armazenamento podem levar à formação de produtos de degradação tóxicos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologia indicativa de estabilidade por cromatografia líquida para determinação destes fármacos, avaliar sua cinética de fotodegradação e a segurança biológica em suas formas isoladas e associadas, degradados e não degradados. A separação cromatográfica utilizou coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5µm) e fase móvel composta pela combinação da Solução A e solução B (30:70, v/v). A solução A foi composta por: acetonitrila:água (80:20, v/v) e a solução B por metanol:triethylamina 0,3% pH 7,5, ajustado com ácido o-fosfórico (57:43, v/v). A eluição foi isocrática com vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e temperatura de análise em 25 °C. A detecção ocorreu em 284 nm para TAD e 292 nm para SIL. O método foi validado de acordo com guias internacionais. A cinética de fotodegradação foi avaliada utilizando os solventes metanol e a mistura de metanol:acetonitrila (50:50, v/v), em câmara de fotoestabilidade equipada com lâmpada UVA (360 nm), por um período de 275 min. Os estudos de toxicidade dos fármacos degradados e não degradados foram realizados por meio dos testes *in vitro* de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade. O método foi considerado específico, linear, preciso, exato, robusto e sensível para a determinação de TAD e SIL isoladas ou em associação. Os fármacos apresentaram cinética de fotodegradação de primeira ordem, quando isolados, e reação de ordem zero, quando associados em ambos os solventes. Os ensaios toxicológicos demonstraram que os fármacos fotodegradados apresentam viabilidade celular diminuída em comparação aos não degradados, sugerindo atividade citotóxica. Não foi observada atividade mutagênica nas condições testadas. Sugere-se atividade genotóxica nos fármacos associados quando fotodegradados. Os estudos desenvolvidos podem colaborar com análises forenses e trazer informação para conscientizar a população quanto aos riscos de consumir produtos sem procedência.

Palavras-chave: falsificação de medicamentos, tadalafila, sildenafil, estabilidade, toxicidade.

ABSTRACT

Nowadays, tadalafil (TAD) and sildenafil (SIL) are counterfeit medicines with the highest incidence in the illegal market. Associations of these drugs are available in different concentrations from those authorized by regulatory agencies, without any pharmacological study or compliance with Good Manufacturing Practices (GMP) during their production. Likewise, inadequate environmental conditions in transportation and storage can lead to the formation of toxic degradation products. Thus, this work aims to develop and validate a stability-indicating method for TAD and SIL simultaneous determination, to evaluate the photodegradation kinetics and the biological safety of the associated drugs, degraded and not degraded. Chromatographic separation used C₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 μ m) and the mobile phase was performed using Solution A and Solution B (30:70, v/v). The solution A contains acetonitrile:water (80:20, v/v) and solution B methanol:0.3% triethylamine pH 7.5, adjusted with o-phosphoric acid (57:43, v/v). The elution was isocratic with flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injection volume of 20 μ L and temperature at 25 °C. Detection was achieved at 284 nm for TAD and 292 nm for SIL. The method was validated according to international guidelines. The photodegradation kinetics were evaluated using the solvents methanol and methanol:acetonitrile (50:50, v/v), in a photostability chamber equipped with a UVA lamp, for 275 min. Toxicity studies of photodegraded and non-degraded drugs were performed by *in vitro* cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity tests. The method was considered specific, linear, precise, accurate, robust and sensitive. The drugs presented first-order photodegradation kinetics when isolated and zero-order when associated. Toxicological tests demonstrated that the photodegraded drugs decreased cell viability in compared to non-degraded drugs, suggesting cytotoxic activity. It was not observed mutagenic activity under the conditions tested. Photodegraded drugs when associated showed DNA damage index, suggesting genotoxic effects. The studies developed can collaborate with forensic analysis and bring information to raise the awareness of the population about the risks of consuming counterfeit products.

Key words: drug counterfeiting, tadalafil, sildenafil, stability, toxicity.

LISTA DE FIGURAS DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Estrutura química da sildenafil.....	20
Figura 2 - Estrutura química da tadalafila.....	21

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

Figura 1 - Estruturas químicas de tadalafila (A) e sildenafil (B).....	36
Figura 2 - Cromatogramas obtidos para TAD (I) e SIL (II) no desenvolvimento do método em diferentes fases móveis, onde: (A) metanol:água (70:30, v/v); (B) acetonitrila:água pH 3,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (C) acetonitrila:água pH 4,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (D) acetonitrila:água pH 5,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (E) acetonitrila:água pH 7,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (F) solução A:Solução B (30:70, v/v); Solução A é composta por acetonitrila:água (80:20, v/v) e solução B por metanol:triethylamina 0,3% pH 7,5 (57:43, v/v). Detecção realizada em 284 nm.....	47
Figura 3 - Cromatogramas obtidos no ensaio de seletividade para solução de TAD SQR (a) e SIL SQR (b) com detecção em 284 nm (I) e 292 nm (II); solução da ASE com detecção em 284 nm (III) e 292 nm (IV).....	49
Figura 4 - Degradação forçada de TAD (I) e SIL (II). Os cromatogramas apresentados foram obtidos em comprimento de onda de 284nm. A: cromatograma da degradação ácida; B: cromatograma da degradação alcalina; C: cromatograma da degradação oxidativa; D: cromatograma da degradação fotolítica; PD: prováveis produtos de degradação formados.....	51
Figura 5 - Avaliação de viabilidade celular de leucócitos pelo corante azul de Tripan nos fármacos TAD e SIL isolados, associados, não degradados e fotodegradados.....	59
Figura 6 - Efeitos de TAD e SIL isolados, associados, não degradados e fotodegradados no índice de divisão celular em cultura de células.....	60
Figura 7 - Índice de Dano ao DNA de células expostas a TAD e SIL isolados, associados, não degradados e fotodegradados.....	61

LISTA DE TABELAS DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Doenças que podem causar DE.....	18
---	----

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Tabela 1 - Representação de três níveis diferentes de concentração para o ensaio de exatidão.....	41
Tabela 2 - Deliberadas modificações nas condições cromatográficas seguindo delineamento fatorial de Placket-Burman para o parâmetro de robustez.....	42
Tabela 3 - Estudo da degradação forçada para TAD e SIL.....	50
Tabela 4 - Valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária.....	53
Tabeça 5 - Resultados do delineamento fatorial na análise da robustez do método para a determinação da tadalafila.....	54
Tabeça 6 - Resultados do delineamento fatorial na análise da robustez do método para a determinação da sildenafil.....	55
Tabela 7 - Resultados obtidos a partir dos parâmetros cinéticos para fotodegradação dos fármacos em diferentes solventes.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AMB – Ambrisentana

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DE – Disfunção Erétil

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, inglês “*Deoxyribonucleic Acid*”

DPR – Desvio Padrão Relativo

FDA – Food and Drug Administration

GMPc – Monofosfato de Guanosina Cíclico, do inglês “*Guanosine Monophosphate Cyclic*”

HAP – Hipertensão Arterial Pulmonar

HSD – Homosildenafil

ICH – International Conference on Harmonisation

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”

INTERPOL – Organização Internacional de Polícia Criminal, do inglês “*International Criminal Police Organization*”

IV – Infravermelho

k – Constante de velocidade de reação

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MP – Matéria-Prima

MS – Espectrometria de Massa

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Princípio Ativo

PBS – Solução Tampão Fosfato, do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”

PDE5 – Fosfodiesterase Tipo 5, do inglês “*Phosphodiesterase Type 5*”

r – Coeficiente de Correlação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SIL – Sildenafil

SQR – Substância Química de Referência

$t_{50\%}$ – Tempo Necessário Para que o Fármaco Atinja 50% de Seu Teor Declarado

$t_{90\%}$ – Tempo Necessário Para que o Fármaco Atinja 90% de Seu Teor Declarado

TAD – Tadalafila

TEA – Trietilamina

UV – Ultravioleta

UV/VIS – Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1	Disfunção Erétil.....	17
3.2	Sildenafil.....	18
3.2.1	Propriedades Físico-Químicas Sildenafil.....	19
3.3	Tadalafila.....	20
3.3.1	Propriedades Físico-Químicas Tadalafila.....	21
3.4	Falsificação de Medicamentos.....	21
3.5	Métodos de Determinação da Tadalafila e Sildenafil.....	23
3.6	Validação de Método Analítica.....	26
3.7	Estabilidade de Medicamentos.....	26
3.8	Degradação Forçada.....	28
3.9	Degradação Fotolítica em TAD e SIL.....	28
3.10	Cinética de Degradação.....	30
3.11	Estudos de Toxicidade.....	31
4	ARTIGO.....	33
5	DISCUSSÃO GERAL.....	64
6	CONCLUSÃO.....	68
7	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXO I.....	77

1 INTRODUÇÃO

A Disfunção Erétil (DE), que representa, a incapacidade persistente que impossibilita a ereção peniana impedindo o indivíduo de realizar um desempenho sexual satisfatório, e sua importância atinge uma grande parcela da população mundial. Estudos epidemiológicos baseados na realidade comunitária sugerem que a DE é uma desordem comum em 52% dos homens com idade entre 40 e 70 anos, afetando a qualidade de vida desses pacientes, assim como, sua autoestima e a capacidade de manter relações sexuais (Martino *et al.*, 2010; McMahon, 2014).

Apesar de ainda existir muitos questionamentos acerca do tema, o entendimento e gestão da DE tem evoluído muito devido ao maior reconhecimento das suas etiologias orgânicas. Esta complicação é cada vez mais reconhecida como um problema de saúde pública com diversas correlações e associações psicossociais e morbidades clínicas, como, por exemplo, sua relação com a diabetes, doenças vasculares, dislipidemia, hipertensão e tabagismo (Burnett, 2006; McMahon, 2014).

O tratamento farmacológico envolve o emprego de agentes inibidores da Fosfodiesterase do tipo 5, do inglês *Phosphodiesterase Type 5* (PDE5). Estes fármacos promovem a inibição da PDE5, levando ao aumento da quantidade de Monofosfato Cíclico de Guanina, do inglês *Guanosine Monophosphate Cyclic* (GMPc), disponível para que ocorra o relaxamento do músculo liso, implicando em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, ereção. Os medicamentos PDE5 comercializados atualmente são: Sildenafil – SIL (Viagra[®], Pfizer), Tadalafila – TAD (Cialis[®], Lilly Eli and Company), Vardenafila (Levitra[®], Bayer Schering) e Carbonato de Lodenafila (Helleva[®], Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda.) e o Avanafil (Stendra[®], Vivus) recentemente disponível no mercado (Goldstein *et al.*, 1998; Porst *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008; FDA, 2012; McMahon, 2014).

Em virtude dos fatos relatados, percebe-se a necessidade de produtos farmacêuticos para atender a essa grande parcela da população. Nesse contexto, as indústrias farmacêuticas trabalham como grandes potências globais ao produzir medicamentos para suprir essa demanda, gerando um grandioso e rentável comércio farmacêutico mundial. Ao mesmo tempo, redes criminosas atuam em busca de uma fatia desse mercado lucrativo, visto que os medicamentos de maior volume de vendas são os principais alvos de falsificação. Este fato pode ser evidenciado pelo crescimento exponencial nos últimos anos de produtos ilícitos apreendidos pelos órgãos oficiais de combate a estes crimes, como por exemplo, a Organização Internacional de Polícia Criminal, do inglês *International Criminal Police Organization* (INTERPOL). Segundo dados oficiais, os medicamentos com maior

índice de falsificação em 21 países, incluindo o Brasil, são os utilizados para o tratamento da DE (Fernandez *et al.*, 2011; Nogueira e Neto, 2011; Ames e Souza, 2012).

Além da face criminal que envolve este tema, registrado pela legislação brasileira como crime hediondo contra a saúde pública (Lei 9677/98), cabe ressaltar que a prática de comércio ilegal destes produtos pode resultar em sérios problemas de saúde pública (Brasil, 1998).

O alto risco é resultante de diversos fatores, visto que a produção é realizada sem o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF), e os locais onde ocorre a produção não oferecem qualquer condição para o desenvolvimento de medicamentos com o mínimo da qualidade requerida. Adicionalmente, os componentes dessas formulações possuem natureza duvidosa, uma vez que o princípio ativo (PA), e os excipientes não possuem procedência ou fornecedor qualificado. Existe, ainda, a problemática envolvendo o modo como o produto final é transportado e armazenado, sem qualquer controle de temperatura, luz ou umidade, o que pode degradar os fármacos em questão.

Nos Laboratórios de Criminalística do Departamento da Polícia Federal Brasileira, o Viagra® e o Cialis® são as substâncias que apresentam os maiores índices de falsificação. Tal fato coincide com informações apresentadas pelos órgãos regulatórios, onde, entre os anos de 2007 e 2011, 78% dos medicamentos falsificados e contrabandeados apreendidos se tratavam de Viagra® e Cialis® (Ames e Souza, 2012; Hurtado e Lasmar, 2014).

De acordo com estudos realizados por Ortiz (2010) e Park e Ahn (2012), foram encontrados produtos falsificados contendo TAD e SIL com concentrações de PA muito superiores ou inferiores às farmacologicamente usuais. Outro dado encontrado nestes estudos é a substituição e/ou adição de outro PA, como, por exemplo, ioimbina, hidroxi-homildenafil, tiosildenafil, dimetilsildenafil, hidroxivardenafil e aminotadalafil, em concentrações elevadas para potencialização do efeito desejado. Associações entre TAD e SIL são, simplesmente, criadas sem qualquer estudo farmacológico ou embasamento científico, o que pode refletir em sérios riscos de intoxicação ou interação medicamentosa (Jung *et al.*, 2012; Park e Ahn, 2012). Além do mencionado anteriormente, deve-se destacar que em nenhum momento da vida desses produtos falsificados são conduzidos estudos de estabilidade. Neste sentido, pode ocorrer a degradação dos ativos que compõem a formulação, formando produtos de degradação tóxicos.

Nesse contexto, existe grande necessidade de métodos que permitam avaliar esses produtos, para fins de análise forense e, também, com o intuito de informar o potencial risco aos consumidores que utilizam medicamentos sem procedência. Os trabalhos encontrados na literatura relatam métodos de quantificação para TAD e SIL na forma associada (Ortiz *et al.*, 2010; Park e Ahn, 2012), havendo, portanto, a possibilidade de expandir esses estudos no sentido de desenvolver

metodologia indicativa de estabilidade para determinação desses dois fármacos. Tornam-se, também, necessários estudos referentes ao perfil de degradação dos fármacos associados frente a diferentes condições de armazenamento, bem como, de dados sobre a segurança biológica dos fármacos degradados, visto que a literatura atual carece de informações sobre a toxicidade desses dois fármacos associados e de seus produtos de degradação.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver método indicativo de estabilidade, verificar a degradação dos fármacos em diferentes condições, estudar a cinética de degradação e, também, avaliar preliminarmente a segurança biológica dos fármacos não degradados e degradados, em associação e isolados. Os resultados obtidos poderão servir de fomento para os laboratórios de inteligência forense, bem como, alertar a população sobre o risco que existe em consumir produtos sem procedência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver método analítico indicativo da estabilidade por CLAE para a determinação simultânea de TAD e SIL, avaliar a cinética de fotodegradação dos fármacos associados e realizar estudos preliminares de segurança biológica dos fármacos isolados e associados, não degradados e degradados.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método analítico quantitativo indicativo da estabilidade por CLAE para determinação simultânea de TAD e SIL;
- Realizar estudos de degradação forçada de TAD e SIL, isolados e em associação, em meio ácido, básico, oxidativo e fotolítico;
- Avaliar a cinética de fotodegradação desses fármacos isoladamente e associados;
- Realizar estudo preliminar de segurança biológica dos fármacos isolados e associados, não degradados e degradados utilizando os testes de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Disfunção Erétil

A DE é definida como a incapacidade de atingir ou manter ereção peniana suficiente para uma relação sexual bem-sucedida. Esta complicação é considerada comum, afetando até 52% dos homens com idade superior a 40 anos (Shamloul e Ghanem, 2013; McMahon, 2014).

Além das causas clássicas tais como diabetes mellitus e hipertensão arterial, estilos de vida inadequados como obesidade, ausência de exercícios físicos e, ainda, sintomas do trato urinário inferior, têm sido ligados ao desenvolvimento de DE. Destacam-se os estudos realizados sobre a associação entre DE e doenças cardiovasculares, visto que o problema em estudo é um forte preditor de doença arterial coronariana (Dong *et al.*, 2011; Shamloul e Ghanem, 2013).

Existem algumas substâncias que, também, podem estar envolvidas no desenvolvimento da DE. Entre as principais destacam-se certos medicamentos que atuam no sistema nervoso central, como, por exemplo, alguns antidepressivos e antipsicóticos; medicamentos utilizados para o tratamento da hipertensão, como diuréticos tiazídicos e beta-bloqueadores; além de substâncias psicotrópicas como a maconha, cocaína, opióides, álcool e nicotina (Shamloul e Ghanem, 2013).

A ereção peniana consiste em um fenômeno neurovascular que exige a dilatação dos vasos penianos, além do relaxamento de músculo liso, aumento do fluxo sanguíneo intracavernoso e função veno-oclusiva normal. Apesar de não representar risco letal, a DE pode comprometer o bem-estar do homem e, por consequência, sua qualidade de vida (Shah, 2002; Shamloul e Ghanem, 2013).

O desconforto e constrangimento, assim como o abalo da autoestima causados pela DE na população masculina, faz com que o uso de medicamentos sirva como auxílio necessário para que uma ereção suficiente seja mantida e a relação sexual realize-se de forma satisfatória. Contudo, vale ressaltar que, antes de administrar qualquer medicação para este fim, é recomendável a realização de uma avaliação clínica para que as causas reais sejam elucidadas e, com isto, a terapia mais adequada seja aplicada para cada paciente (Freitas *et al.*, 2008). A DE pode ser ocasionada por diferentes causas, como podemos verificar na Tabela 1.

Tabela 1 - Doenças que podem causar disfunção erétil

Causas da DE	
Psicológico	<ul style="list-style-type: none"> • Ansiedade do desempenho • Perda de atração ao parceiro (a) • Dificuldade no relacionamento • Estresse
Psiquiátrico	<ul style="list-style-type: none"> • Depressão
Neurológico	<ul style="list-style-type: none"> • Lesão da medula espinhal • Cirurgia pélvica • Esclerose múltipla • Diabetes <i>mellitus</i> • Lesão no disco intervertebral • Álcool
Endócrino	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiência hormonal • Deficiência de testosterona • Globulina de ligação do hormônio aumentada • Hiperprolactinemia
Arteriogênico	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensão • Fumante • Diabetes <i>mellitus</i> • Hiperlipidemia • Doença vascular periférica • Síndrome metabólica
Venoso	<ul style="list-style-type: none"> • Comprometimento funcional do mecanismo veno-oclusivo
Fármacos com efeito central e/ou direto	<ul style="list-style-type: none"> • Antihipertensivos • Antidepressivos • Hormônios luteinizantes ou liberação de análogos

Fonte: McMahon, 2014.

Atualmente, os medicamentos utilizados no tratamento da DE são os PDE5, citados como os de primeira escolha. Os principais representantes dessa classe são: SIL (Viagra[®], Pfizer), Lodenafil (Helleva[®], Cristália), TAD (Cialis[®], Eli Lilly), Vardenafil (Levitra[®], Bayer) e Avanafil (Stendra[®], Vivus), sendo todos administrados por via oral (Wright, 2006; Ravipati *et al.*, 2007).

3.2 Sildenafil

A SIL é a representante pioneira da classe dos inibidores da PDE5 para o tratamento da DE. Seu registro na União Européia ocorreu no ano de 1991 e, desde então, tornou-se um dos medicamentos mais prescritos mundialmente. O mecanismo de ação ocorre pela inibição da PDE5, ocasionando aumento de GMPc disponível, levando ao relaxamento do músculo liso e consequente aumento de fluxo sanguíneo para os corpos cavernosos. Desta maneira, ocorre intensificação na

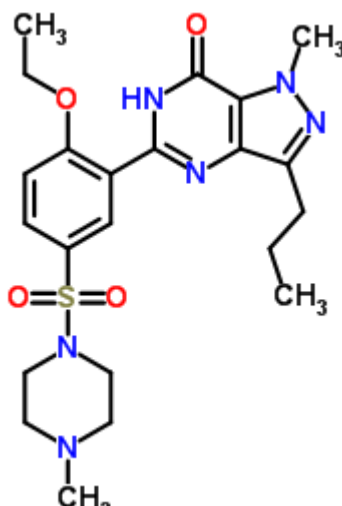
resposta erétil, a partir da realização de estimulação sexual (Rao *et al.*, 2008). A SIL é comercializada na forma farmacêutica de comprimidos pela indústria farmacêutica *Pfizer*, recebendo o nome comercial de Viagra[®], nas doses de 25, 50 e 100 mg a partir de 1998. Contudo, a partir do término da patente do medicamento referência no ano de 2010, as demais indústrias farmacêuticas, também, começaram a produzir e comercializar similares e genéricos no mercado nacional (Sabin *et al.*, 2013).

No ano de 2005, o FDA aprovou o uso da SIL para o tratamento de outra patologia, a hipertensão arterial pulmonar (HAP). Esta apresentação farmacêutica começou a ser comercializada com o nome comercial Revatio[®] 20 mg pela indústria farmacêutica *Pfizer*, na forma farmacêutica de comprimidos. Após alguns anos, foi lançada no mercado Revatio[®] 10 mg/12,5mL na forma farmacêutica de solução intravenosa e Revatio[®] 10 mg/mL na forma farmacêutica de suspensão oral. Entretanto, estas formas farmacêuticas são restritas apenas para o tratamento da HAP em adultos. Estudos demonstraram que pessoas com idades entre 1 e 17 anos que administraram altas doses de Revatio[®] apresentaram maior risco de morte, quando comparados aos que administraram baixas doses. Entretanto os indivíduos que administraram doses baixas não apresentaram melhoras no seu estado clínico. Dessa forma, em comunicado realizado em 2014, o FDA relatou que se deve avaliar o risco-benefício, quanto ao uso desse medicamento no tratamento para a HAP, pois estudos realizados demonstram resultados limitados para jovens (FDA, 2014).

3.2.1 Propriedades Físico-Químicas da Sildenafil

O fármaco SIL (C₂₂H₃₀N₆O₄S) apresenta nomenclatura de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): 1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl sulfonyl]-4-ethylpiperazine, Figura 1. A substância consiste em um pó de aparência cristalina e branca, apresentando-se na forma de sal citrato. Possui fator de equivalência sal/base de 1,40, com massa molecular de 474,5764 g/mol e pKa de 5,99. É solúvel em Dimetilsulfóxido, do inglês *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (23 mg/mL), metanol e dimetilformamida (14 mg/mL), água (3,5 mg/mL) e etanol (mg/mL) (O'neil *et al.*, 2001).

Figura 1 – Estrutura química da sildenafil



Fonte: ChemSpider, 2015

3.3 Tadalafila

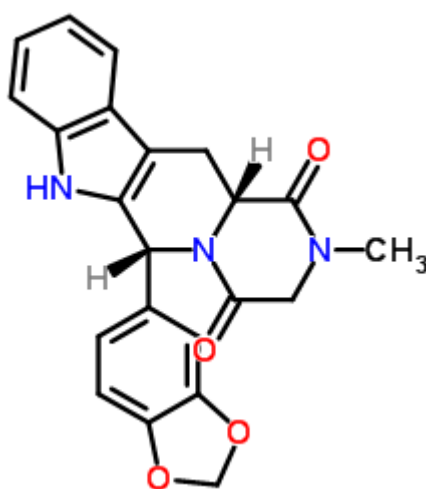
A TAD pertencente à classe dos inibidores da PDE5, atuando de forma seletiva nesta enzima. Seu mecanismo dá-se a partir da inibição da PDE5, onde ocorre aumento de GMPc disponível, implicando no relaxamento do músculo liso e consequente aumento de fluxo sanguíneo para os corpos cavernosos. Como resultado, obtém-se uma intensificação na resposta erétil, seguido de estimulação sexual apropriada (Rao *et al.*, 2008). Este fármaco é comercializado na forma farmacêutica de comprimidos revestidos pela indústria farmacêutica *Eli Lilly and Company*, recebendo o nome comercial de Cialis[®], nas doses de 5, 10 e 20 mg.

A TAD também é empregada para tratar os sintomas da hiperplasia prostática benigna, que incluem dificuldade em urinar (fluxo fraco e esvaziamento incompleto da bexiga), dor ao urinar e frequência/urgência de urinar em homens adultos. Outra aplicação de TAD está relacionada à melhora da capacidade da realização de exercícios em pessoas com HAP (pressão arterial elevada nos vasos que transportam sangue para os pulmões, causando falta de ar, tonturas e cansaço). Sendo assim, constata-se que a TAD trata a HAP pelo relaxamento dos vasos sanguíneos dos pulmões para permitir que o sangue flua mais facilmente (Mcvary *et al.*, 2007).

3.3.1 Propriedades Físico-Químicas de Tadalafila

O fármaco TAD ($C_{22}H_{19}N_3O_4$), apresenta nomenclatura de acordo com a IUPAC: (6Rtrans)-6-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2metilpirazino(1',2':1,6)pirido(3,4b)in-dol-1,4-diona, e estrutura química expressa na Figura 2. Possui massa molecular de 389,404 g/mol, pKa de 0,85, com solubilidade em clorofórmio, metanol, benzeno e nos demais solventes como em água, apresenta solubilidade de 0,25 mg/mL, DMSO de 78 mg/mL, etanol < 1 mg/mL (Eardley e Cartledge, 2002; Pub Chem, 2005).

Figura 2 – Estrutura química da tadalafila



Fonte: ChemSpider, 2015

3.4 Falsificação de Medicamentos

O tema que engloba fármacos e a criminalidade vem sendo abordado por vários autores, visto que o comércio ilícito de medicamentos seja por falsificação, adulteração ou contrabando é considerado um problema mundial (Santamaria-Fernandez *et al.*, 2008; Rodionova *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2006; De Peinder *et al.*, 2008; OMS, 2008; Anderson, 2009; Van Beek e Montoro, 2009; Ortiz *et al.*, 2013).

O termo “medicamento falsificado”, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ser utilizado para descrever o medicamento produzido por alguém, que não seja o fabricante original, plagiando ou imitando um produto autêntico sem autoridade ou direito, visando enganar ou fraudar a comercialização do original. A OMS define como medicamento falsificado aquele no qual possui alguma alteração, de forma deliberada ou fraudulenta, em relação a sua origem. A

falsificação aplica-se tanto aos produtos de referência quanto aos genéricos, podendo apresentar sua composição correta, alterada ou não conter nenhum princípio ativo, além de possuir embalagens falsificadas (Hurtado e Lasmar, 2014; OMS, 2017).

Em regra, tem-se como objeto material do crime de contrabando e/ou falsificação a mercadoria proibida, portanto, em face disso é válido afirmar que tal delito pode ser considerado pluriofensivo, posto que afetará todos aqueles que se inserirem no conceito de interesse público: a saúde, a indústria nacional, o meio ambiente e o mercado nacional de bens e serviços (Pólvora, 2013).

Segundo os órgãos regulatórios, vários fatores podem contribuir para a proliferação dos medicamentos falsificados, entre eles:

- A falta de uma legislação adequada;
- Autoridade regulatória de medicamentos nacional ausente ou com escasso poder;
- Não cumprimento da legislação existente;
- Sanções penais ineficazes;
- Corrupção e conflitos de interesses;
- Transações que incluem muitos intermediários;
- Demanda superior à oferta;
- Preços altos;
- Falta de regulamentação nos países exportadores e dentro das zonas de livre comércio.

Segundo Ortiz e colaboradores (2013), a verificação da falsificação de um medicamento trata-se basicamente da comparação entre o produto original ou dados da literatura e o produto questionado. A falsificação é detectada a partir de análise detalhada de diferentes elementos presentes nas embalagens e na forma farmacêutica, incluindo, assim:

“(1) Exames macroscópicos das embalagens e bulas, referentes aos padrões de impressão, incluindo fontes e figuras, hologramas e existência de tinta reativa. Trata-se de uma avaliação muitas vezes subjetiva e que pode estar prejudicada pelo fato de não haver embalagem em determinada apreensão;

(2) Avaliação externa da forma farmacêutica, referentes aos aspectos visuais – podendo incluir o auxílio de equipamentos de ampliação e imageamento – e aspectos tecnológicos – para o caso de comprimidos incluindo medidas de dimensões e massa, gerando um perfil dos aspectos físicos;

(3) Análises químicas para caracterização da formulação visando identificar ou quantificar fármacos e adjuvantes tecnológicos por sistemáticas e técnicas clássicas de separação e identificação de substâncias.

Estes exames são executados cronologicamente nesta sequência, com comparação dos resultados com o padrão de referência ou dados da literatura” (Ortiz *et al.*, 2013, p. 10).

Após a apreensão, a análise química para fins forenses dos medicamentos suspeitos de serem falsos está se tornando cada vez mais essencial, pois devido ao cuidado dos falsificadores em deixar o medicamento o mais parecido com o original, apenas a análise visual torna-se insuficiente. Para assegurar a identificação é importante realizar testes laboratoriais que podem ser não instrumentais, como testes colorimétricos e cromatografia em camada delgada, e instrumentais, como CLAE, Cromatografia Gasosa (CG), Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry* (MS), espectroscopia de Infravermelho (IV), de Ultravioleta (UV) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Martino *et al.*, 2010).

Os medicamentos para DE estão entre as versões que são mais falsificadas. Isto pode ser justificado devido ao sucesso no mercado, o alto custo e o constrangimento associado com a patologia subjacente, o que acaba levando muitas vezes as pessoas a recorrerem até à internet para realizar a compra desses produtos, anonimamente (Holzgrabe e Malet-Martino, 2011).

Similares de SIL estrangeiros, sem registro para comercialização em território nacional, também são alvo de apreensões e perícia por parte das forças policiais, como as amostras uruguaias Plenovit[®], Maxfil[®], Sildenafil Lazer[®] e Libiden[®] e as paraguaias da linha Pramil[®] e Erofast[®] (Ortiz *et al.*, 2010).

Nesse sentido, Ortiz e colaboradores (2013) e Park e Ahn (2012) relataram em seus estudos a análise dos produtos farmacêuticos TAD e SIL falsificados, apreendidos pelas autoridades locais de seus respectivos países. Ortiz e colaboradores (2013) realizaram análise envolvendo 39 amostras falsificadas de Cialis[®], onde ficou comprovada a presença exclusiva de TAD em 9 dessas amostras, além de 14 conter TAD e SIL simultaneamente, em diferentes proporções. Outras 14 amostras apresentaram apenas SIL e em suas amostras a associação de SIL e Homosildenafil (HSD). Park e Ahn quantificaram TAD e SIL em 105 amostras apreendidas para avaliar as concentrações dos dois fármacos em medicamentos falsificados. A partir das análises detectaram que cerca de 25% possuíam tanto TAD quanto SIL na formulação e mais da metade destas continham quantidade maior do que a declarada em suas respectivas embalagens.

3.5 Métodos de determinação para Tadalafila e Sildenafil

Na literatura podem ser encontrados estudos de determinação qualitativa ou quantitativa relacionados aos compostos TAD e SIL em associação. No que diz respeito ao desenvolvimento de método indicativos de estabilidade, encontram-se apenas trabalhos que abordam os fármacos de maneira isolada ou associadas a outros fármacos. Os principais métodos indicativos de estabilidade

desenvolvidos para determinar TAD e SIL isoladamente presentes na literatura estão apresentados a seguir.

Dinesh e colaboradores (2002), desenvolveram método indicativo de estabilidade considerado simples, preciso e sensível, utilizando CLAE para determinar SIL na matéria-prima (MP) e na forma farmacêutica comprimidos. O método empregou as seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de água e acetonitrila na proporção de 48:52 (v/v); fluxo de 1 mL/min; coluna cromatográfica C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); detecção UV no comprimento de onda 245 nm.

Outra metodologia indicativa de estabilidade por CLAE foi desenvolvida por Reddy e Reddy (2008) para a determinação de SIL em formulações farmacêuticas e plasma humano. A separação cromatográfica foi obtida isocraticamente utilizando coluna cromatográfica C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel constituída de acetonitrila e tampão fosfato pH 7,0 (70:30, v/v), fluxo de 0,8 mL/min e detecção UV a 228 nm. O método desenvolvido apresentou ser preciso, linear, sensível, específico e robusto, demonstrando capacidade para ser aplicado em análises de rotina que envolvem SIL tanto em formas farmacêuticas, quanto em plasma humano.

Um método analítico indicativo de estabilidade por CLAE desenvolvido por Rao *et al.* (2008) foi empregado para determinar quantitativamente TAD em MP e em formas farmacêuticas, na presença de produtos de degradação. Os autores utilizaram as seguintes condições cromatográficas: coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel constituída pela mistura da solução A e B (solução A – tampão fosfato pH 2,5 e acetonitrila 20:80, (v/v); solução B – água e acetonitrila 20:80, (v/v)), eluída em gradiente definido como: tempo (minuto)/% de solução B: 0/20, 5/20, 30/90, 32/90 e 35/20, com o fluxo de 1,0 mL/min e o comprimento de onda para detecção de 220 nm. TAD foi submetida a diferentes condições de estresse conforme os parâmetros descritos no *International Conference on Harmonisation (ICH)*. Verificou-se degradação na condição hidrolítica e em certa medida em condições de estresse oxidativo, enquanto que o fármaco foi considerado estável ao estresse térmico e fotolítico, quando exposto à luz UV (1,2 milhões de lux/h). O comprimento de onda utilizado não foi descrito pelos autores. O fármaco foi particularmente lábil sob condições hidrolíticas alcalinas. O método cromatográfico comprovou ser simples, linear, preciso, exato e específico.

Reddy e colaboradores (2010) desenvolveram metodologia indicativa de estabilidade para determinação de TAD em formulações farmacêuticas utilizando CLAE. Foram empregadas as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel contendo acetonitrila e tampão de fosfato (pH 7,0) na proporção 60:40 (v/v), à temperatura

ambiente. A taxa de fluxo foi mantida a 0,8 mL/min e o comprimento de onda para determinação foi de 262 nm. O método descrito foi linear, preciso, robusto, sensível e específico.

Além dos métodos desenvolvidos para determinação dos fármacos isolados, encontram-se na literatura algumas técnicas para avaliação de TAD e SIL em associação ou associação com outros ativos. Ortiz e colaboradores (2010) desenvolveu e validou método envolvendo cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) para a determinação simultânea de TAD e SIL. As condições cromatográficas utilizadas no estudo foram as seguintes: coluna cromatográfica Acquity® UPLC BEH C₁₈ (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm), eluição isocrática com fase móvel composta por tampão de fosfato de pH 2,3 e acetonitrila na proporção de 65:35 (v/v) e fluxo de 0,7 mL/min. O método também foi considerado rápido, bem como específico, linear, preciso e exato na determinação dos fármacos em comprimidos.

Park e Ahn (2012) desenvolveram metodologia por CLAE para análise simultânea de SIL e TAD em amostras falsificadas. Os seguintes parâmetros cromatográficos foram empregados: coluna cromatográfica C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel constituída por acetonitrila e ácido fosfórico a 0,1% contendo ácido hexanosulfônico de sódio a 0,1%, na proporção de 30:70 (v/v). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e detecção em 294 e 285 nm para SIL e TAD, respectivamente.

Ortiz e colaboradores (2013) realizaram trabalho traçando o perfil químico qualitativo e quantitativo para 65 amostras de medicamentos falsificados (Viagra® e Cialis®). As amostras foram analisadas em CLUE-DAD e acoplado a espectrômetro de massas com ionização por *eletrospray*. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna C₁₈ (2,1 µm x 50 mm x 1,7 µm); fase móvel composta por ácido fórmico 0,1% e acetonitrila, na proporção de 70:30 (v/v); o fluxo isocrático com eluição de 0,7 mL/min. Na maioria dos casos ficou evidente a presença de TAD e SIL em concentrações além das especificadas nas embalagens.

Patel e Patel (2014) desenvolveram metodologia por CLAE simples, rápida e seletiva, com o objetivo de determinar, simultaneamente, Ambrisentana (AMB) e TAD nas dosagens de 10 mg e 40 mg, respectivamente, em amostras comerciais. A separação cromatográfica ocorreu nas seguintes condições: coluna C₁₈ Hypersil GOLD (150 mm x 4,6 mm, 5 µm); fluxo de 0,5 mL/min, fase móvel composta por metanol, água e acetonitrila nas proporções 40:40:20 (v/v/v); a detecção foi obtida através do comprimento de onda de 260 nm. AMB apresentou tempo de retenção em 2,80 minutos, enquanto que TAD em 7,10 minutos. O estudo de degradação forçada foi realizado da seguinte maneira: degradação ácida utilizando HCl 1 mol/L em refluxo durante 6 h; degradação básica com NaOH 1 mol/L com o tempo de exposição de 24 h; degradação hidrolítica utilizando água em refluxo por 12 h; degradação oxidativa utilizando H₂O₂ 30% durante 3 dias; e a degradação

fotolítica realizada por exposição ao sol do verão ao longo de 6 h. A confiabilidade e desempenho analítico do método proposto foram validados com relação à linearidade, precisão, exatidão, especificidade, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. O método mostrou ser indicativo da estabilidade, apresentando a capacidade em determinar os fármacos na presença dos produtos de degradação formados a partir da degradação forçada em condições ácida, básica, oxidativa e fotolítica.

Outro método analítico foi desenvolvido por Fidan e Bakirdere (2016) para a determinação qualitativa e quantitativa simultânea de SIL e TAD em produtos lícitos, falsificados e amostras de águas residuais. A separação cromatográfica dos dois analitos foi obtida em coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel constituída por tampão fosfato pH 6,0 e acetonitrila (35:65, v/v), fluxo isocrático de 1,0 mL/min. O método desenvolvido cumpriu com todos os parâmetros de validação, além de ser considerado simples, rápido, sensível e barato, podendo ser utilizado no controle de qualidade de rotina.

3.6 Validação de Métodos Analíticos

A validação de metodologias analíticas trata-se de um processo que possui uma grande importância no que diz respeito ao controle de qualidade de medicamentos, pois a partir dela pode-se garantir que o novo método desenvolvido fornece informações confiáveis sobre a amostra em estudo (Da Silva *et al.*, 2007). O processo de validação tem a finalidade de demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida, devendo garantir, por meio de estudos experimentais, o cumprimento das exigências de aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Brasil, 2017).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da RDC nº 166/2017 determina que, no caso de metodologia analítica não descrita em Farmacopéias ou formulários oficiais devidamente reconhecidos, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados e observados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (Brasil, 2017).

3.7 Estabilidade de Medicamentos

O produto farmacêutico é considerado estável durante o período no qual mantém as características físicas e químicas correspondentes à etapa de sua produção. Contudo, alguns fatores

ambientais como temperatura, umidade e luz, bem como, aspectos oriundos das propriedades físico-químicas de todas as substâncias envolvidas tanto na composição da forma farmacêutica, como nos materiais de embalagem, podem influenciar na estabilidade de um medicamento (Carstensen e Rhodes, 2000; Gennaro, 2000; Brasil, 2005).

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser diretamente afetada a partir da degradação dos compostos presentes em sua formulação, o que pode ocasionar várias alterações em suas propriedades físico-químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas, assim como pode levar também à redução ou aumento da sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de dose, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de degradação tóxicos ou potencialmente nocivos (Carstensen e Rhodes, 2000; Brasil, 2005).

Os estudos de estabilidade são realizados com o objetivo de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade de produtos farmacêuticos, além de serem utilizados para que seja obtida uma melhor compreensão em relação ao mecanismo de degradação e estimativa da data de validade das substâncias. Nesse sentido, a função atribuída aos estudos de estabilidade de medicamentos e insumos é de grande importância, visto que eles contribuem diretamente na qualidade dos produtos farmacêuticos desde o processo de produção até o produto final (ICH, 2003; Brasil, 2005; Malesuik *et al.*, 2007; Sinko e Gonzales Ortega, 2008). No Brasil, os estudos de estabilidade são regulamentados pela ANVISA, através da RE nº 1 de 2005, onde são classificados como: acelerado, de longa duração e de acompanhamento. Os estudos de estabilidade acelerada são praticados sob condições forçadas de armazenamento, durante 6 meses; os de longa duração realizados sob condições de armazenamento, por um período de 2 anos; e os estudos de acompanhamento visam evidenciar a integridade físico-química e microbiológica do medicamento, por um período maior que 2 anos (Brasil, 2005). Para a realização de estudos de estabilidade os produtos farmacêuticos são colocados em câmaras climáticas sob condições que obedecem as normas internacionais (controle de temperatura, umidade e intensidade luminosa). As amostras são analisadas em diferentes tempos de exposição, sendo possível realizar os ensaios de doseamento, quantificação de impurezas conhecidas e desconhecidas, dissolução e pH, entre outros (ICH, 2003; Brasil, 2005).

Afim de avaliar os resultados oriundos dos testes de estabilidade, deve-se utilizar um método indicativo de estabilidade. Sabe-se que atualmente não existem estudos registrados na literatura relacionados a métodos indicativos de estabilidade de TAD e SIL associados, visto que essa combinação não é autorizada para o consumo. Os principais estudos abordam os fármacos de maneira isolada, ou em associação com um composto diferente, portanto, há uma grande necessidade em desenvolver metodologias para TAD e SIL associados na formulação, visto que esta

situação é comumente evidenciada em medicamentos falsificados (Ortiz *et al.*, 2010; Park e Ahn, 2012).

3.8 Degradação Forçada

Com o objetivo de propor metodologias analíticas in-dicativas de estabilidade, bem como avaliar a estabilidade do produto farmacêutico durante seu desenvolvimento, são realizados testes de degradação forçada. O intuito destes testes é avaliar a exposição do fármaco sob condições extremas (estresse térmico, hidrólise em meio alcalino e ácido, oxidação, exposições a íons metálicos e fotólise), colaborando para identificação de prováveis produtos de degradação dos fármacos e suas possíveis rotas de degradação (ICH, 2003; Brasil, 2012).

A ANVISA por meio da RDC nº 53 de 2015, regulariza a verificação de produtos de degradação em medicamentos, na qual estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do produto farmacêutico (Brasil, 2005). Além disso, os estudos de degradação forçada contribuem para a obtenção de dados cinéticos a respeito da decomposição do fármaco (Sinko e Gonzales Ortega, 2008).

3.9 Degradação Fotolítica da Tadalafila e Sildenafil

O uso de energia luminosa como fator desencadeante de reações químicas é uma condição utilizada em estudos de degradação forçada em medicamentos. As reações fotolíticas ou fotodegradações têm início após a absorção da radiação Ultravioleta/Visível (UV/VIS), que devido à alta energia luminosa, pode ocasionar na clivagem de muitas ligações químicas promovendo a ativação de reações de degradação de fármacos (Moriwaki *et al.*, 2001).

De acordo com Carstensen e Rhodes (2000), as substâncias cujos máximos de absorção encontram-se mais próximo à luz visível serão mais fotolábeis, como por exemplo, fármacos que possuem oxigênio, nitrogênio ou enxofre em suas moléculas. Compostos que apresentam grupos cromóforos como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações também serão mais sensíveis à radiação luminosa, sendo diretamente proporcional ao número de grupos presentes na molécula. Nas estruturas químicas de TAD e SIL estão presentes alguns elementos como oxigênio, nitrogênio e ligações duplas. Esses fatores sugerem predisposição dos fármacos em estudo à fotodegradação.

Alguns estudos encontrados na literatura avaliaram o comportamento de TAD e SIL na presença da luz como parte do desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade.

Reddy e colaboradores (2008) desenvolveram metodologia indicativa de estabilidade para determinação de TAD utilizando CLAE em formulações farmacêuticas e plasma humano, onde foram realizados estudos de hidrólise, oxidação, fotólise e degradação térmica. Para o teste de estresse fotolítico, a solução de TAD dissolvida em metanol foi exposta diretamente à luz solar, durante 8 horas. Os autores verificaram que o fármaco quando exposto à luz solar e ao estresse térmico não apresentou degradação, nas condições testadas. Porém quando submetido às situações de hidrólise ácida e básica houve degradação de 25 a 30% do fármaco.

No estudo realizado por Rao e colaboradores (2008) a TAD foi submetida a variadas condições de estresse (oxidação, hidrólise em meio alcalino e em meio ácido, fotólise e calor). No teste de estresse fotolítico a TAD, solubilizada em água:acetoneitrila 1:1 (v/v), foi exposta à luz UVA (1,2 milhões de lux/h) e não apresentou formação de produtos de degradação.

Satheesh e colaboradores (2013) realizaram estudo para a determinação simultânea da TAD e suas impurezas de degradação por CLUE. O fármaco foi exposto a diferentes condições de estresse, entre elas a exposição à radiação luminosa UV. Não ocorreu degradação fotolítica da TAD, nas condições testadas.

Patel e colaboradores (2014) desenvolveram estudo indicativo de estabilidade para determinação de TAD e AMB por CLAE. O método demonstrou ser indicativo da estabilidade, apresentando a capacidade em determinar os fármacos na presença dos produtos de degradação formados em condições ácida, básica e oxidativa. Na condição fotolítica, os fármacos foram expostos à luz solar por 6 horas, onde não foi observada degradação.

Rajyalakshimi e colaboradores (2013) efetuaram estudo de método indicativo de estabilidade para determinação simultânea de SIL e Duloxetina em comprimidos por CLAE. Os fármacos foram submetidos a diferentes condições de estresse (oxidação, hidrólise em meio alcalino e ácido, fotodegradação e degradação térmica). Para o teste de fotodegradação, as amostras de SIL e Duloxetina foram expostas à radiação UVA (354 nm), durante 1 hora. Nesta condição ocorreu degradação de 11% para ambos os fármacos.

Almeida (2016) desenvolveu estudo indicativo da estabilidade de SIL por CLUE. O fármaco foi submetido às seguintes condições de estresse: degradação fotolítica, térmica, oxidativa, ácida e básica. Na degradação fotolítica, a SIL foi exposta à radiação UVC (254nm), após ser solubilizada em água e metanol. Verificou-se que a solução aquosa de SIL, quando exposta à radiação durante 5 horas apresentou degradação de 63% do fármaco. Porém, quando a solução metanólica foi exposta à radiação, durante 2 horas, o fármaco degradou 76,3%. Os autores constataram que a fotodegradação

da SIL é influenciada pelo solvente utilizado e que a velocidade de degradação da solução metanólica de SIL foi maior do que a solução aquosa.

Tambe e colaboradores (2016) realizaram estudo para determinação simultânea de SIL e Dapoxetina por CLUE-MS. Os estudos de degradação foram utilizados para demonstrar a especificidade do método, onde os fármacos foram submetidos ao estresse ácido, básico, térmico e fotolítico. Os fármacos em solução metanólica foram expostos à radiação UV a intensidade de 1,2 mLux.h, não ocorrendo degradação do fármaco.

3.10 Cinética de Degradação

Os produtos farmacêuticos sofrem reações de degradação as quais ocorrem em velocidades definidas e são, em sua maioria, de natureza química podendo ser aceleradas pelo aumento da temperatura. Este processo faz com que a avaliação da cinética de degradação de fármacos se trate de um estudo importante, pois é a partir dele que será possível propor um mecanismo de reação, assim como estabelecer condições para auxiliar na obtenção de formulações mais estáveis (Carstensen e Rhodes, 2000).

Em relação aos estudos sobre a velocidade de uma reação, sabe-se que ela é expressa como a descrição da concentração do fármaco com relação ao tempo. Os estudos de cinética de reação tem como o objetivo a avaliação da velocidade de alteração química e a forma pela qual a mesma é influenciada (Ansel *et al.*, 2007).

As reações de degradação de produtos farmacêuticos geralmente são determinadas graficamente e expressas como sendo de ordem zero, as quais relacionam a concentração do fármaco em função do tempo, onde a taxa de degradação é independente da concentração dos reagentes e constante em relação ao tempo. As reações de primeira ordem associam o logaritmo da concentração em função do tempo, onde a degradação do fármaco é diretamente proporcional à concentração do reagente. Nas reações de segunda ordem considera-se o inverso da concentração em função do tempo e a velocidade de reação química é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes ou a segunda potência de um deles. A representação gráfica que fornecer o coeficiente de correlação mais próximo à unidade é a que define a ordem de reação (Carstensen e Rhodes, 2000; Lachman *et al.*, 2001; Aulton, 2005; Watson, 2005; Ansel *et al.*, 2007).

Os resultados dos estudos cinéticos podem ser expressos em termos de constante de reação (k), a qual proporciona uma relação entre a velocidade e concentração, dependendo também da ordem de reação e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), isto é, o tempo necessário pra que a concentração do fármaco se reduza à metade do valor inicial. O $t_{90\%}$ indica o tempo necessário para que ocorra uma

redução de 10% da concentração inicial do fármaco. (Carstensen e Rhodes, 2000; Gennaro, 2000; Sinko e Gonzales Ortega, 2008).

Os modelos cinéticos que expressam os estudos cinéticos de degradação, são representados pelas equações descritas a seguir:

$$\text{Reação de ordem zero} \quad C = C_0 - k \cdot t \quad t_{90\%} = 0,1 C_0/k \quad t_{1/2} = C_0/2 \cdot k \quad (1)$$

$$\text{Reação de primeira ordem} \quad \ln C = -k \cdot t + \ln C_0 \quad t_{90\%} = \ln 0,90/k \quad t_{1/2} = \ln C_0 \cdot 2/k \quad (2)$$

$$\text{Reação de segunda ordem} \quad 1/C = 1/C_0 + k \cdot t \quad t_{90\%} = 1/9 \cdot k C_0 \quad t_{1/2} = 1/k \cdot C_0 \quad (3)$$

Onde: (C_0) é a concentração dos regentes no tempo zero, (C) é a concentração após o tempo de reação (t) e (k) é a constante de velocidade de reação (Gennaro, 2000; Aulton, 2005).

3.11 Estudos de Toxicidade

Os órgãos regulatórios nacionais e internacionais recomendam a avaliação do potencial genotóxico/mutagênico para análise e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, visto que estes testes são capazes de detectar compostos que induzem danos genéticos de forma direta ou indireta por diversos mecanismos (Ribeiro, 2003; Aquino, 2010).

Os estudos de toxicidade se fazem necessários para que sejam investigados os efeitos que as substâncias analisadas podem vir a oferecer à saúde da população. Assim, testes *in vitro* que avaliem a citotoxicidade (Viabilidade Celular – Teste de Azul de Tripán), a genotoxicidade (Índice de Dano ao DNA – Ensaio Cometa) e a mutagenicidade (Índice de Divisão Celular – Teste de Micronúcleo) são fundamentais no sentido de averiguar preliminarmente o potencial toxicológico de determinada substância (Aquino, 2010).

Ensaio que estudam a viabilidade celular, como Teste de Azul de Tripán, são muito empregados para avaliar a citotoxicidade de determinado produto. O teste se baseia na capacidade do corante utilizado corar apenas células mortas pelo agente em teste. As células apresentam as membranas danificadas pelo agente e assim o fluxo de corante ocorre para o interior da célula, apresentando coloração azul. Já as células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem coloração (Alves *et al.*, 2010).

O Teste do Micronúcleo consiste em um teste rápido e simples que detecta perdas e quebras cromossômicas, sendo, desta forma, indicado para avaliar efeito mutagênico (Ribeiro, 2003). Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incorporados no núcleo da célula filha durante a divisão celular, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Encontram-se no citoplasma como um fragmento redondo ou oval como um pequeno micronúcleo contendo DNA, no entanto, sem qualquer relação com o núcleo principal, mas que

indica fortes evidências de genotoxicidade, ou seja, capacidade do agente testado de induzir danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos, os quais estão associados com o surgimento e/ou progressão de tumores e com efeitos reprodutivos adversos (Ribeiro, 2003; Jacobowski, 2009). O teste do micronúcleo difere do ensaio cometa no tipo de alteração detectada no DNA. O primeiro detecta lesões irreparáveis, enquanto o segundo detecta lesões primárias, que são passíveis de correção (Valentin-Severin *et al.*, 2003).

O Ensaio Cometa é um método bastante simples, sensível, rápido e de baixo custo para detecção de quebras nas fitas de DNA e estudos de reparo do DNA. O princípio do método proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA sendo organizado em grandes estruturas enoveladas quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, migram para o ânodo através da eletroforese. O termo cometa refere-se justamente a este procedimento, que envolve a aplicação de corrente elétrica nas células e resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora dos núcleos, lembrando um cometa com uma cabeça e cauda. Em resumo, esta técnica permite avaliar os danos no DNA de células individuais causados pela substância teste (Tice *et al.*, 2000; Freitas, 2007; Aquino, 2010).

Apesar de TAD e SIL estarem presentes há muito tempo no mercado farmacêutico, com os seus respectivos potenciais tóxicos devidamente conhecidos, é de grande importância avaliar o comportamento de ambos quando associados e, ainda, na presença de seus produtos de degradação.

4 ARTIGO

Os resultados e discussões serão apresentados de acordo com as normas da revista científica Química Nova, apresentadas em anexo.

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE
PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE TADALAFILA E SILDENAFILA, CINÉTICA DE
FOTODEGRADAÇÃO E ESTUDO TOXICOLÓGICO**

**DEVELOPMENT OF A STABILITY-INDICATING LC METHOD FOR SIMULTANEOUS
DETERMINATION OF TADALAFIL AND SILDENAFIL, PHOTODEGRADATION KINETIC
AND TOXICOLOGY STUDIES**

A stability-indicating HPLC method was developed for the simultaneous determination of tadalafil (TAD) and sildenafil (SIL) using C₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was composed of Solution A and Solution B (30:70, v/v). The solution A contains acetonitrile:water (80:20, v/v) and solution B methanol:0.3% triethylamine, pH 7.5 (57:43, v/v). Detection was achieved at 284 nm, for TAD, and 292 nm, for SIL. The photodegradation kinetics were evaluated using the solvents methanol and methanol:acetonitrile (50:50, v/v), in a photostability chamber equipped with a UVA lamp, for 275 min. Toxicity studies of photodegraded and non-degraded drugs were performed by *in vitro* cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity tests. The method was considered specific, linear, precise, accurate, robust, and sensitive. In the photodegradation kinetic studies, the drugs showed a first-order reaction when isolated, and zero-order when associated. Toxicological tests demonstrated that the photodegraded drugs decreased cell viability in compared to non-degraded drugs, suggesting cytotoxic activity. It was not observed mutagenic activity under the conditions tested. Photodegraded drugs when associated showed DNA damage index, suggesting genotoxic effects.

Key words: drug counterfeiting, tadalafil, sildenafil, stability, toxicity.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), medicamento falsificado consiste em um produto embalado e etiquetado indevidamente de maneira deliberada e fraudulenta, o qual pode apresentar sua identidade e/ou origem alterada. Essa prática de contrafação engloba tanto produtos de referência quanto similares ou genéricos, podendo inclusive ocorrer casos de produção com composição similar aos autênticos, sem componentes ativos, com componentes ativos insuficientes ou outros fármacos no lugar dos ativos adequados.¹

Entre os anos 2000 e 2006, casos de falsificação de medicamentos apresentaram aumento de aproximadamente 800%. Dentre os medicamentos comercializados mundialmente 10% são falsificados, evidenciando o crescimento exponencial de 13% desse mercado ilícito que possui receitas de 75 bilhões de dólares. De acordo com a OMS, a falsificação de produtos farmacêuticos pode atingir 20% em países da extinta União Soviética e mais de 30% em algumas localidades da América Latina, Sudeste Asiático e África Subsaariana. O índice de medicamentos falsos apreendidos no Brasil cresceu de 500 mil unidades em 2008, para 18 milhões de unidades em 2010.^{2,3} O fato de gerar muito lucro torna essa atividade ilegal presente nos países em desenvolvimento e, também, nos desenvolvidos. Isso pode ocasionar prejuízos para saúde da população, visto que a utilização desses produtos pode resultar em um tratamento ineficaz ou, ainda, propagar a resistência microbiana e parasitária podendo levar à morte nesses casos.^{3,4}

A falsificação de medicamentos abrange uma ampla gama de classes terapêuticas como antimaláricos, antibióticos, antineoplásicos, entre outros. Em geral, os produtos farmacêuticos com maiores índices de falsificação, também, são os mais requisitados pela população. Dentre os medicamentos apreendidos no Brasil encontram-se os anabolizantes, anorexígenos, os citostáticos e, em sua maioria, os utilizados no combate à disfunção erétil (DE), mais especificamente, a tadalafila – TAD (Cialis[®]) e a sildenafil – SIL (Viagra[®]), representados pelas suas estruturas químicas na Figura 1.^{3,5}

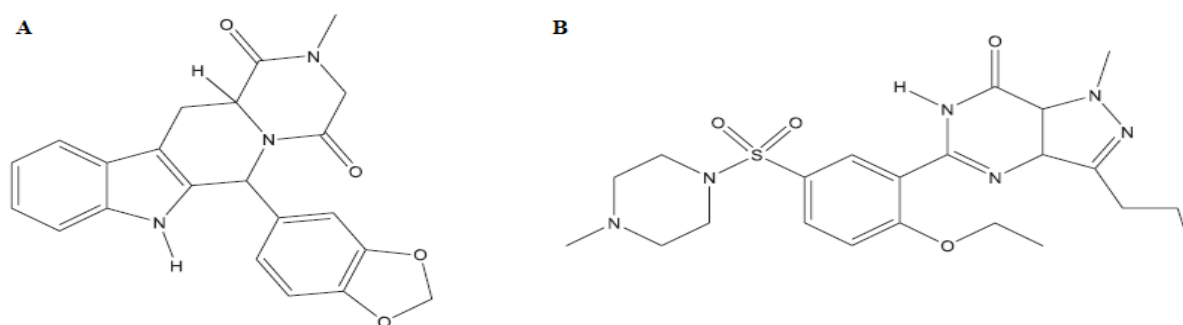


Figura 1. Estruturas químicas de tadalafila (A) e sildenafil (B).

Segundo a OMS, são muitos os riscos inerentes aos produtos falsificados que podem acarretar em intoxicações e ações farmacológicas desconhecidas.³³ O fato das normas preconizadas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) não serem seguidas em nenhum momento da obtenção desses produtos, o desconhecimento de procedência das matérias-primas e a falta de controle da produção, aliado ao transporte e armazenamento inadequados, aumentam a probabilidade de riscos à saúde da população. Os métodos utilizados para transportar mercadorias clandestinas consistem nos mais variados, porém sabe-se que é pouco provável que haja qualquer controle de temperatura, luz e umidade que possam assegurar a integridade dessas substâncias. Com isso, as chances de que ocorram degradações nos componentes dessas formulações são maiores, além de aumentar a preocupação com a toxicidade dos prováveis produtos de degradação que possam se formar nessas composições falsificadas.³³

Estudos realizados por diferentes autores relatam a presença simultânea de TAD e SIL em amostras falsificadas de Cialis®.⁵⁻⁷ No entanto, o foco principal desses trabalhos foi o desenvolvimento de métodos de quantificação para os compostos em associação, havendo, portanto, a possibilidade de expandir esses estudos no sentido de desenvolver um método indicativo de estabilidade para TAD e SIL associadas.

Tornam-se, também, necessários estudos referentes ao perfil de degradação dos fármacos frente a diferentes condições de armazenamento, bem como, dados sobre a segurança biológica dos fármacos degradados, visto que a literatura atual carece de informações sobre a toxicidade desses dois fármacos associados e de seus produtos de degradação.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método indicativo da estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para determinação simultânea de TAD e SIL, avaliar a cinética de fotodegradação e realizar estudos toxicológicos preliminares sobre a segurança biológica dos fármacos isolados e associados, não degradados e

fotodegradados. Os resultados obtidos poderão servir de suporte para os laboratórios de inteligência forense, bem como, alertar a população sobre o risco que existe em consumir produtos falsificados.

EXPERIMENTAL

Produtos químicos e reagentes

TAD usada como substância química de referência (SQR), com teor declarado de 98%, foi gentilmente cedida pela indústria farmacêutica Multilab® - Takeda Company (São Jerônimo - Brasil). SIL utilizada como SQR, com teor declarado de 98% foi adquirida comercialmente (Galena Química e Farmacêutica Ltda., Brasil). Os reagentes utilizados foram acetonitrila (grau CLAE, Tedia, Estados Unidos da América), ácido o-fosfórico (Merck, Alemanha), trietilamina (Merck, Alemanha), álcool metílico (grau CLAE, Merck, Alemanha), álcool metílico (Neon Comercial Ltda., Brasil), ácido clorídrico 37% (Neon Comercial Ltda., Brasil), peróxido de hidrogênio 30% (Fmaia Indústria e Comércio Ltda., Brasil), hidróxido de sódio (grau P.A., Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brasil) e água ultra-pura, obtida pelo sistema Direct-Q UV 3 Milli-Q® (Merck Millipore, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Equipamentos e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-20AT Prominence), com sistema dotado de bomba quaternária, amostrador automático, detector de arranjo de fotodiodo (DAD), degaseificador e controlador (Shimadzu, Kyoto, Japan). Coluna *Hypersil*® C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) foi utilizada para as separações cromatográficas. A fase móvel foi composta por solução **A** e Solução **B** (30:70, v/v). A solução **A** compreende acetonitrila:água (80:20, v/v) e a solução **B** metanol:trietilamina 0,3% pH 7,5, ajustado com ácido o-fosfórico (57:43, v/v). A eluição foi isocrática com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e o volume de injeção empregado foi de 20 µL. Os componentes da fase móvel foram filtrados sob vácuo, através de membrana de nylon com diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA). A temperatura de análise foi de 25 °C, com detecção em 284 nm para TAD e 292 nm para SIL.

O estudo de fotodegradação foi realizado em câmara de fotoestabilidade espelhada internamente (0,16 x 0,16 x 1 m – largura x altura x comprimento), com fonte de luz UVA (360 nm 30W/G30 T8, Philips, Amsterdam, Holanda). As amostras foram expostas em cubetas descartáveis

de quartzo com 1 cm de percurso óptico, a distância de 10 cm da fonte de luz, com temperatura controlada.

Preparo da solução SQR de TAD e SIL

Transferiram-se 12,5 mg de TAD SQR e 50 mg de SIL SQR para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 40 mL de metanol. A mistura resultante foi sonicada durante 20 minutos, e o volume final completado com o mesmo solvente, seguido de homogeneização. Retirou-se alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente, a fim de obter-se concentrações finais de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TAD e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de SIL.

Preparo das soluções amostra

A amostra simulada de excipientes (ASE) foi composta do pool dos excipientes descritos na formulação comercial de comprimidos de Viagra[®] e Cialis[®]. As concentrações de cada excipiente foram determinadas conforme as porcentagens usuais descritas na literatura.¹⁰

Para o preparo das amostras simuladas de trabalho (AST) pesaram-se o equivalente a 12,5 mg de TAD, 50 mg de SIL e 220 mg ASE e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 40 mL de metanol. Submetu-se a banho ultrassônico por 20 minutos, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Filtrou-se a solução resultante em papel filtro, retirou-se alíquota de 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol para a obtenção de concentração final de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para TAD, e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para SIL.

Validação do Método Cromatográfico

A validação do método analítico foi realizada conforme a *The United States Pharmacopoeia* (USP 36), *International Conference on Harmonisation* (ICH) e ANVISA (RDC nº 166/2017),¹¹⁻¹³ nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

Seletividade

A seletividade frente aos excipientes e a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto foram determinadas através da avaliação de possível interferência da ASE, bem como dos prováveis produtos de degradação formados na degradação forçada, na detecção dos fármacos.

Para avaliar a especificidade do método frente a possíveis interferências, utilizou-se ASE obtida conforme descrito no subitem *Preparo da solução amostra*.

A capacidade indicativa de estabilidade do método foi realizada avaliando-se a solução amostra em relação à hidrólise ácida, básica, oxidativa e por fotodegradação.

Na hidrólise ácida, pesaram-se 6,25 mg de TAD SQR e 25 mg de SIL SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL, com o auxílio de 15 mL de metanol. Sonicou-se a mistura durante 20 minutos e completou-se o volume com HCl 1 mol L⁻¹. A solução obtida foi homogeneizada e armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após 24 h, transferiu-se 1 mL da solução para balão volumétrico de 10 mL, neutralizou-se com NaOH 1 mol L⁻¹ e completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução com a concentração final de 25 µg mL⁻¹ de TAD e 100 µg mL⁻¹ de SIL.

Na hidrólise alcalina, 6,25 mg de TAD e 25 mg de SIL foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de 15 mL de metanol. Sonicou-se durante 20 minutos e completou-se o volume com NaOH 1 mol L⁻¹. A solução obtida foi homogeneizada e armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 24h. Alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, neutralizada com HCl 1 mol L⁻¹ e o volume completado com metanol, obtendo-se solução com concentração final de 25 µg mL⁻¹ de TAD e 100 µg mL⁻¹ de SIL.

Para avaliar o comportamento dos fármacos frente à oxidação, pesaram-se 6,25 mg de TAD e 25 mg de SIL e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 15 mL de metanol. Sonicou-se essa mistura durante 20 minutos e completou-se o volume com H₂O₂ 10%. A solução resultante foi homogeneizada e armazenada ao abrigo da luz pelo período de 24h em temperatura ambiente. Alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol, obtendo-se solução com concentrações final de 25 µg mL⁻¹ para TAD e 100 µg mL⁻¹ para SIL.

Na fotodegradação, 6,25 mg de TAD e 25 mg de SIL foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, com o auxílio de 15 mL de metanol. Essa mistura foi submetida ao banho ultrassônico durante 20 minutos e seu volume completado com o mesmo solvente. Alíquota de 1 mL foi transferida para cubetas descartáveis e lacradas. As cubetas foram expostas à luz UV 360 nm durante 60 minutos em câmara de fotoestabilidade, à temperatura ambiente. O conteúdo das

cubetas foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol para obtenção de concentração final de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL.

Linearidade

A determinação foi realizada pela construção de curvas de calibração para TAD e SIL. Para o preparo da curva de calibração de TAD pesaram-se 12,5 mg de TAD SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 40 mL de metanol. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se solução na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TAD. Foram transferidas alíquotas para diferentes balões volumétricos, diluiu-se com metanol e obtiveram-se as concentrações finais de 2,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0 e $75,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o preparo da curva de calibração de SIL foram transferidos 25 mg de SIL SQR para balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de 90 mL de metanol. Posteriormente, submeteu-se essa solução ao banho ultrassônico durante 20 min e seu volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram transferidas alíquotas para diferentes balões volumétricos, diluiu-se com metanol e obtiveram-se as concentrações finais de 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados foram plotados em gráficos das áreas obtidas em função das respectivas concentrações de TAD e SIL. A linearidade foi avaliada a partir do coeficiente de correlação (r) e da análise de variância por ANOVA, onde foi verificada a regressão linear e desvio de linearidade de três curvas obtidas em dias diferentes para cada fármaco.

Precisão

A precisão do método foi determinada pelos ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). Para avaliação de repetibilidade foram analisadas seis replicatas da solução amostra, preparada conforme descrito no subitem *Preparo da solução amostra*. Os dados para precisão intermediária foram avaliados em dois dias diferentes e os resultados expressos como DPR de todas as medições realizadas.

Exatidão

A exatidão foi determinada em três níveis de concentração, através de ensaio de recuperação da SQR, ou seja, adicionaram-se quantidades conhecidas da solução de TAD SQR e SIL SQR à ASE com o objetivo de avaliar a porcentagem de recuperação em cada concentração.

Como evidenciado no estudo realizado por Park e Ahn (2012),⁷ a ocorrência simultânea de TAD e SIL em formulações falsificadas apresentam-se em diversos níveis de concentração. Os comprimidos de TAD têm alterações com até ou mais de 100% de SIL. Por esse motivo, foram preparadas soluções que representassem essas adulterações, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Representação de três níveis diferentes de concentração para o ensaio de exatidão.

Solução*	Níveis de concentração	Concentração TAD - SIL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	Baixa – Alta	10 - 200
2	Média – Média	25 - 100
3	Alta - Baixa	50 - 10

*n = 3

Para o preparo da Solução 1, pesaram-se 5 mg de TAD SQR, 100 mg de SIL SQR e 220 mg de ASE, e foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 40 mL de metanol. Essa mistura foi submetida a banho ultrassônico por 20 min, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Filtrou-se a solução resultante em papel filtro, retirou-se alíquota de 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol para a obtenção de concentração final de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TAD e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SIL.

A Solução 2 foi preparada conforme descrito no subitem *Preparo de solução amostra*.

A Solução 3 foi preparada a partir da pesagem de cerca de 25 mg de TAD SQR, 5 mg de SIL SQR e 220 mg de ASE, os quais foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 40 mL de metanol. Essa mistura foi submetida a banho ultrassônico por 20 min, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Filtrou-se a solução resultante em papel filtro, retirou-se alíquota de 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol para a obtenção de concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TAD e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SIL.

Robustez

A robustez do método foi determinada pela análise da solução amostra, porém com mudanças deliberadas nos parâmetros originais do método, como está representado na Tabela 2.

Foram selecionados seis fatores e foram avaliados por delineamento fatorial de Plackett-Burman (n = 12). Calcularam-se o efeito (E) de cada fator e o erro experimental estimado (EE).¹⁴

Tabela 2. Deliberadas modificações nas condições cromatográficas seguindo delineamento fatorial de Placket-Burman para o parâmetro de robustez.

Fatores	Condição cromatográfica normal	(+)*	(-)*
pH	7,5	7,7	7,3
Temperatura	25° C	28° C	22° C
Detector	284 – 292 nm	286 – 294 nm	282 – 290 nm
% Acetonitrila	30%	32%	28%
Coluna	Hypersil C ₁₈	Hypersil C ₁₈	Agilent C ₁₈
Vazão	1,0 mL	1,05 mL	0,95 mL

*Modificação com valores superiores (+) e inferiores (-) aos nominais.

O ensaio de robustez foi realizado a partir da análise da solução da AST, em duplicata, para cada condição estabelecida.

A partir da avaliação estatística obteve-se um valor numérico-limite, o qual define se a modificação efetuada acarretou em interferência na análise quantitativa. Este valor é geralmente derivado do método analítico *teste t*, conforme a Equação 1:

Equação 1:

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_e}$$

Onde :

E_x = efeito de cada fator;

SE_e = erro experimental estimado.

O efeito é considerado significativo se resultar em $t_{calculado} > t_{crítico}$.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A determinação do LD e LQ foi realizada a partir do sinal-ruído da corrida analítica, verificado através da linha de base, onde as soluções foram preparadas nas concentrações calculadas e avaliadas experimentalmente. O LD foi determinado como sendo a concentração correspondente a 3 vezes o sinal-ruído da linha de base. O LQ foi determinado como a concentração correspondente a 10 vezes o sinal-ruído da linha de base apresentando precisão e exatidão.

Estudo de cinética de fotodegradação

A cinética de fotodegradação foi realizada a partir da análise de solução padrão de TAD e SIL em suas formas isoladas e associadas na presença de diferentes composições de solventes (metanol e acetonitrila).

Pesaram-se 12,5 mg de TAD SQR e transferiram-se para dois balões volumétricos de 50 mL. Em ambos acrescentaram-se o volume de 25 mL de metanol e, posteriormente, foram submetidos a banho ultrassônico por 20 minutos. Um dos balões teve o volume completado com metanol e o outro com acetonitrila. Ambos foram homogeneizados, obtendo-se a concentração final de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a obtenção da solução SIL SQR, foi realizado primeiramente o preparo da Solução 1 (S1), onde transferiram-se cerca de 250 mg para balão volumétrico de 50 mL, ao qual foram acrescentados 45 mL de metanol. Submeteu-se ao banho ultrassônico por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiram-se alíquotas de 10 mL de S1 para dois balões volumétricos de 50 mL e adicionou-se 15 mL de metanol. Completou-se o volume de um dos balões com metanol e do outro com acetonitrila, sendo que ambos atingiram a concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O preparo da solução padrão de TAD e SIL em associação foi realizado a partir da transferência de 12,5 mg de TAD SQR para dois balões volumétricos de 50 mL, aos quais também foram acrescentados 15 mL de metanol e 10 mL de S1. As preparações foram submetidas ao ultrassom durante 20 minutos. Completou-se o volume do primeiro balão com metanol e o do segundo com acetonitrila. As concentrações finais obtidas em ambos foram de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL.

A partir de cada solução obtida, transferiram-se alíquotas equivalentes a 1 mL para cubetas descartáveis as quais foram devidamente lacradas e transferidas para câmara de fotoestabilidade.

O valor obtido para o r mais próximo à unidade foi utilizado para determinar a ordem de reação. Avaliou-se, também, o tempo necessário para que o (s) fármaco (s) atingissem 90% do valor declarado ($t_{90\%}$) e, ainda, o tempo necessário para que o (s) fármaco (s) atingissem 50% do teor declarado ($t_{50\%}$).

As soluções foram expostas à radiação UVA nos seguintes intervalos de tempo: 55, 110, 165, 220, 275 minutos ($n= 2$). Após o tempo decorrido, transferiu-se o conteúdo de cada cubeta para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. A concentração teórica final foi de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL.

Estudos de toxicidade

O estudo de toxicidade *in vitro* foram realizados por meio dos testes de citotoxicidade (Viabilidade Celular – Teste de Azul de Tripán), mutagenicidade (Índice de Divisão Celular – Teste de Micronúcleo) e genotoxicidade (Índice de Dano ao DNA – Ensaio Cometa).

As seguintes amostras foram preparadas:

- Solução TAD referência (TR) – 20 mg de TAD SQR foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 25 mL de metanol. Posteriormente, a preparação foi submetida ao ultrassom por 20 minutos e, logo após, o volume foi completado com acetonitrila. Transferiu-se uma alíquota de 6 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente. Retirou-se uma alíquota equivalente a 3 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com Solução Tampão Fosfato, do inglês, *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Transferiram-se alíquotas dessa solução para tubos falcon contendo meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e tratado com estreptomicina, atingindo as concentrações finais de $0,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Solução SIL referência (SR) – primeiramente realizou-se o preparo da solução 1 (S1) de SIL, onde 154 mg de SIL SQR foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 45 mL de metanol. Posteriormente, essa preparação foi submetida a banho ultrassônico e teve seu volume completado com o mesmo solvente. Retirou-se alíquota equivalente a 10 mL de S1 e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, ao qual foram acrescentados 15 mL de metanol e o volume completado com acetonitrila. Uma alíquota equivalente a 6 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e utilizou-se o mesmo solvente para completar o volume. Retirou-se uma alíquota de 3 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com PBS. Retiraram-se alíquotas da solução para tubos falcon contendo meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e tratado com estreptomicina, para se obter as concentrações finais de $1,0944 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Solução TAD e SIL referência (T+S) – 20 mg de TAD SQR foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 15 mL de metanol. Essa preparação foi submetida ao ultrassom durante 20 minutos, acrescentou-se 10 mL de S1 e completou-se o volume com acetonitrila. Transferiu-se uma alíquota de 6 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente. Alíquota equivalente a 3 mL foi retirada para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com PBS. Transferiram-se alíquotas da solução para tubos falcon contendo meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e tratado com estreptomicina, com o objetivo de serem obtidas as concentrações finais de $0,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e $1,0944 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL.

- Solução TAD degradada (TD) – pesaram-se o equivalente a 20 mg de TAD SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 25 mL de metanol. A preparação foi submetida ao ultrassom por 20 minutos e o volume completado com acetonitrila. Transferiram-se alíquotas de 1 mL para seis cubetas descartáveis que foram expostas à luz UV 360 nm (30W/G30 T8), por um período de 275 minutos, em câmara de fotoestabilidade. O conteúdo total das seis cubetas foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com acetonitrila. A partir dessa solução, transferiu-se alíquota equivalente a 3 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com PBS. Retiraram-se alíquotas dessa solução para tubos falcon contendo meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e tratado com estreptomicina, atingindo as concentrações finais de $0,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Solução SIL degradada (SD) – Retirou-se alíquota equivalente a 10 mL de S1 e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, foram acrescentados 15 mL de metanol e completou-se o volume com acetonitrila. Transferiram-se alíquotas de 1 mL para seis cubetas descartáveis que foram expostas à luz UV 360 nm (30W/G30 T8), por um período de 275 minutos, em câmara de fotoestabilidade. O conteúdo total das seis cubetas foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com acetonitrila. A partir dessa solução transferiu-se uma alíquota equivalente a 3 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com PBS. Transferiram-se alíquotas da solução para tubos falcon contendo meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e tratado com estreptomicina, com o objetivo de obter-se as concentrações finais de $1,0944 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Solução TAD e SIL degradada (TD + SD) – 20 mg de TAD SQR foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de 15 mL de metanol. Essa preparação foi submetida ao ultrassom durante 20 minutos, acrescentou-se 10 mL de S1 e completou-se o volume com acetonitrila. Transferiram-se alíquotas de 1 mL para seis cubetas descartáveis que foram expostas à luz UV 360 nm (30W/G30 T8), por um período de 275 minutos, em câmara de fotoestabilidade. O conteúdo total das seis cubetas foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com acetonitrila. A partir dessa solução transferiu-se alíquota equivalente a 3 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com PBS. Alíquotas dessa solução foram transferidas para tubos falcon contendo meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e tratado com estreptomicina, para obter-se as concentrações finais de $0,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e $1,0944 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL.

Neste ensaio, utilizou-se o meio base RPMI 1640 como controle negativo e Bleomicina ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) como controle positivo.

A citotoxicidade foi avaliada através da Viabilidade Celular pela perda da integridade da membrana, utilizando o corante azul de Tripan.¹⁵ A mutagenicidade foi avaliada pelo Teste de Micronúcleo, segundo a técnica descrita por Schmid¹⁶ e a genotoxicidade pelo Ensaio Cometa.¹⁷ As culturas de leucócitos foram preparadas por meio de uma amostra de sangue coletada através da punção venosa de um voluntário. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pampa (Carta de aprovação nº 27045614000005322).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por ANOVA de uma via e Teste de Tukey, empregando nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método cromatográfico

Os métodos cromatográficos são utilizados na rotina de laboratórios analíticos para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, possuindo o objetivo de fornecer informações confiáveis em relação à origem e composição dos materiais analisados. São considerados populares devido à versatilidade que permite quantificar e separar os componentes de uma formulação, podendo, também, ser utilizados na avaliação de estabilidade de fármacos.^{13,18} Os parâmetros analíticos que resultaram nas condições cromatográficas do presente trabalho foram definidos, após testes de variadas composições de fase móvel, pH da fase aquosa e fluxo da fase móvel.

Para a realização dos testes iniciais, levaram-se em consideração trabalhos existentes na literatura, onde se empregaram solventes tais como, acetonitrila, água e/ou metanol.^{7,19} Foram realizados testes com diferentes composições e proporções desses solventes, tais como, metanol:água (70:30, v/v); acetonitrila:água:metanol (30:30:40, v/v/v), com valores de pH na faixa de 3 à 7, ajustados com ácido o-fosfórico, conforme pode ser observado na Figura 2. Avaliou-se o sistema isocrático, analisando a faixa de vazão de 0,5 a 1,5 mL min⁻¹.

A partir da Figura 2 observa-se que o aumento do pH da fase aquosa promoveu a melhora da simetria do pico cromatográfico referente à SIL (pico II). A existência de uma espécie catiônica de SIL, nos valores de pH abaixo do seu pKa (pKa = 5,99), pode estar relacionada com a maneira que a substância interage com a fase estacionária. A predominância de uma espécie neutra ocorre próximo ao pH 7, onde observa-se o melhor formato do pico cromatográfico para SIL.³¹ A adição de um modificador (trietilamina 0,3%) aos solventes corrigiu os efeitos inadequados causados pelos grupamentos silanóis livres da fase estacionária, por exemplo, assimetria de pico.

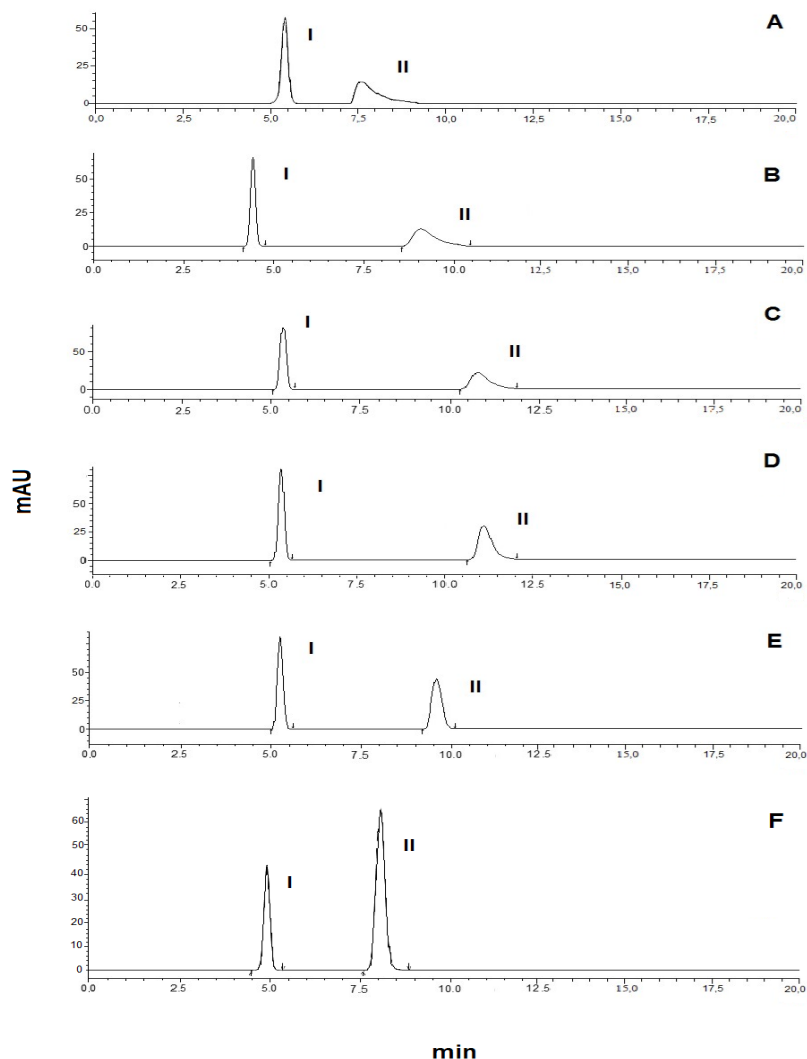


Figura 2. Cromatogramas obtidos para TAD (I) e SIL (II) no desenvolvimento do método em diferentes fases móveis, onde: (A) metanol:água (70:30, v/v); (B) acetonitrila:água pH 3,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (C) acetonitrila:água pH 4,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (D) acetonitrila:água pH 5,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (E) acetonitrila:água pH 7,0:metanol (30:30:40, v/v/v); (F) solução A:Solução B (30:70, v/v); Solução A é composta por acetonitrila:água (80:20, v/v) e solução B por metanol:triethylamina 0,3% pH 7,5 (57:43, v/v). Detecção realizada em 284 nm.

A melhor condição obtida foi com a fase móvel composta pela mistura da solução **A** (acetonitrila:água - 80:20, v/v) e solução **B** (metanol:triethylamina 0,3% pH 7,5, ajustado com ácido o-fosfórico - 57:43, v/v) na proporção de 30:70, (v/v), conforme a Figura 2F. A eluição ocorreu isocriticamente com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A separação cromatográfica ocorreu em coluna *Hypersil*[®] C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em 284 nm, para TAD, e 292 nm, para SIL. Nesta condição foram obtidos os melhores

resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema, tais como: número de pratos teóricos ($N_{TAD} = 4682$ e $N_{SIL} = 6983$), simetria de pico ($T_{TAD} = 1,037$ e $T_{SIL} = 1,084$) e tempo de retenção de 5,2 minutos, para TAD, e 8,7 minutos, para SIL, com resolução de 8,5 entre os picos.

Nas condições experimentais desenvolvidas, o máximo de absorção para TAD foi de 284 nm e para SIL 292 nm. Por esse motivo, empregaram-se dois comprimentos de onda na análise aumentando a sensibilidade do método proposto para quantificação de SIL e TAD. O perfil cromatográfico apresentou-se semelhante em ambos os comprimentos de onda, sendo empregado 284 nm para apresentação dos cromatogramas nas figuras do presente estudo.

A fase móvel proposta neste trabalho apresenta algumas vantagens em relação às descritas anteriormente para quantificação destes fármacos.^{6,7} Como, por exemplo, a ausência de sais em sua composição, o modo isocrático de eluição e o de fácil e rápido preparo, podendo ser utilizada rotineiramente na análise simultânea destas formulações.

Após a otimização das condições cromatográficas, foram definidas as concentrações de trabalho das soluções SQR e amostras de TAD e SIL isoladas e em associação. Estas concentrações de trabalho foram baseadas no estudo realizado por Park e Ahn (2012),⁷ onde foram analisadas 105 amostras apreendidas contendo TAD e SIL associadas. Segundo os autores, cerca de 25% das amostras possuíam tanto TAD quanto SIL e mais da metade continham quantidade muito divergente da descrita em suas respectivas apresentações. Com base nesses resultados, foi determinada faixa linear para TAD e SIL, bem como, a concentração de trabalho de 25 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e SIL, respectivamente.

Validação

Foram analisados os seguintes parâmetros para a realização da validação do método proposto.

Seletividade

A seletividade consiste na capacidade que o método desenvolvido possui em determinar os fármacos em estudo, com a pureza adequada, na presença de interferentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.¹³

A interferência dos excipientes da formulação foi avaliada a partir da análise comparativa dos cromatogramas obtidos com as soluções de ASE e SQR, conforme os cromatogramas apresentados na Figura 3. De acordo com os cromatogramas, observa-se a ausência de picos no

mesmo tempo de retenção de TAD e SIL, demonstrando que não ocorre interferência dos excipientes na determinação dos fármacos em estudo.

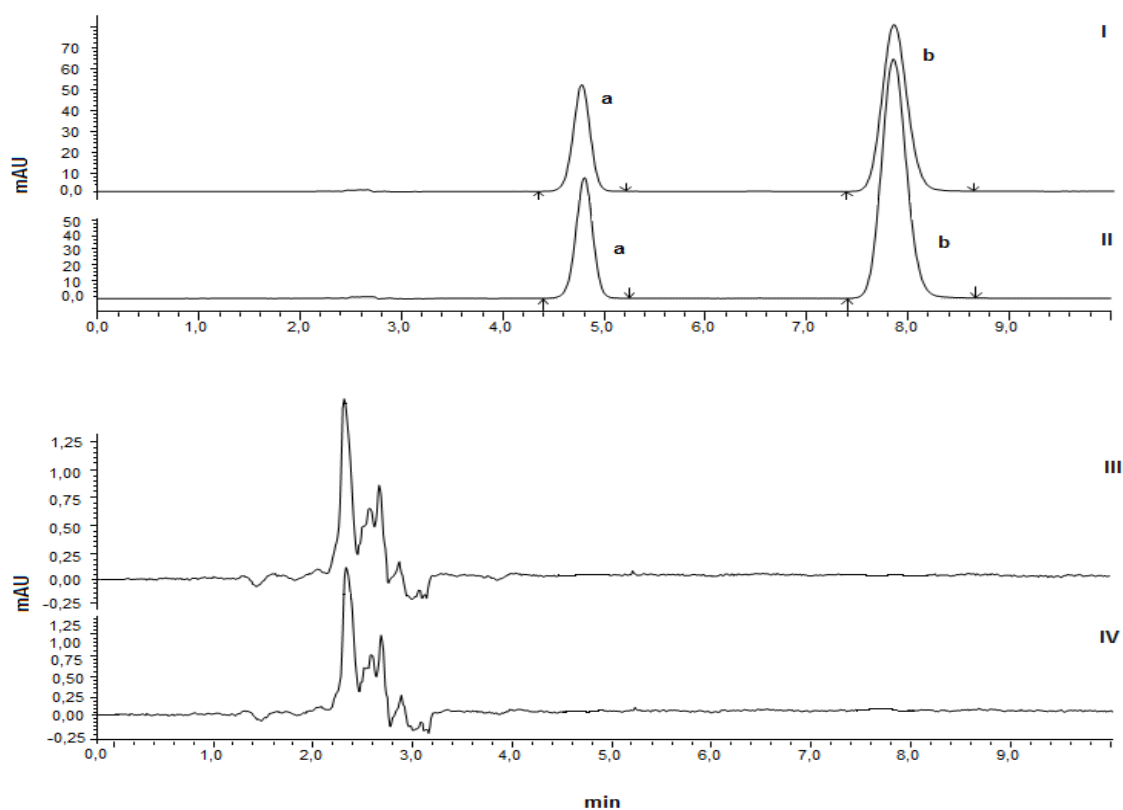


Figura 3. Cromatogramas obtidos no ensaio de seletividade para solução de TAD SQR (a) e SIL SQR (b) com detecção em 284 nm (I) e 292 nm (II); solução da ASE com detecção em 284 nm (III) e 292 nm (IV).

A capacidade de determinar os fármacos na presença dos produtos de degradação foi avaliada pela exposição de TAD e SIL, isolados e associados, a condições de estresse: oxidativo, fotolítico e hidrolítico (alcalino e ácido). O intuito da degradação é induzir a formação de prováveis produtos de degradação e avaliar a capacidade do método em separá-los dos analitos, sem que possam interferir na análise proposta, ou seja, na determinação dos fármacos.^{34,35}

As condições envolvendo a degradação ácida, alcalina e oxidativa foram mais drásticas, ou seja, demandaram maior tempo de exposição (24 h), quando comparadas à fotolítica (1 h). Porém mesmo com maior tempo de exposição, as condições ácida, alcalina e oxidativa não levaram a um percentual de degradação elevado (em torno de 30%). Somente quando expostos à luz UV, os fármacos apresentaram alto percentual de degradação (33,50% para TAD e 22,02% para SIL).

A degradação fotolítica poder ser explicada devido ao fato de TAD e SIL apresentarem em suas estruturas químicas elementos como oxigênio, nitrogênio e ligações duplas. Segundo a literatura, a presença desses grupamentos químicos sugerem maior suscetibilidade dos fármacos à fotodegradação.³⁰ Todas as condições testadas juntamente com os tempos de exposição estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Estudo da degradação forçada da TAD SQR e SIL SQR associadas.

Condição degradativa	Tempo	Degradação (%)	
		TAD	SIL
Ácida - HCl 1 mol L ⁻¹	24 h	9,63	0,76
Alcalina - NaOH 1 mol L ⁻¹	24 h	12,80	2,04
Oxidativa - H ₂ O ₂ 10%	24 h	1,88	7,36
Fotolítica - UV 360 nm	1 h	33,50	22,02

Na degradação ácida, houve um decaimento de 9,63% na área do pico da TAD SQR e 0,76% da SIL, apresentando o surgimento de um produto de degradação em aproximadamente, 5,6 minutos de análise (PD1a), como pode ser observado no cromatograma da Figura 4A. Quando se testou a condição de degradação alcalina, o percentual de degradação foi de cerca de 12,80% para TAD e 2,04% para SIL com o surgimento de um produto de degradação (PD1b) em, aproximadamente 3,2 minutos, como pode ser observado na figura 4B. Em relação à degradação oxidativa o decaimento do pico de TAD foi de, aproximadamente, 1,88% e SIL de 7,36%, com a ocorrência de dois produtos de degradação (PD1c e PD2c) em, aproximadamente, 4,16 e 5,41 minutos, respectivamente, como está representado na Figura 4C. Os resultados obtidos para a fotodegradação estão demonstrados na Figura 4D, onde pode ser observado a ocorrência de produtos de degradação (PD1d, PD2d, PD3d e PD4d) nos tempos de retenção 3,54; 3,84; 4,18; 5,59 minutos.

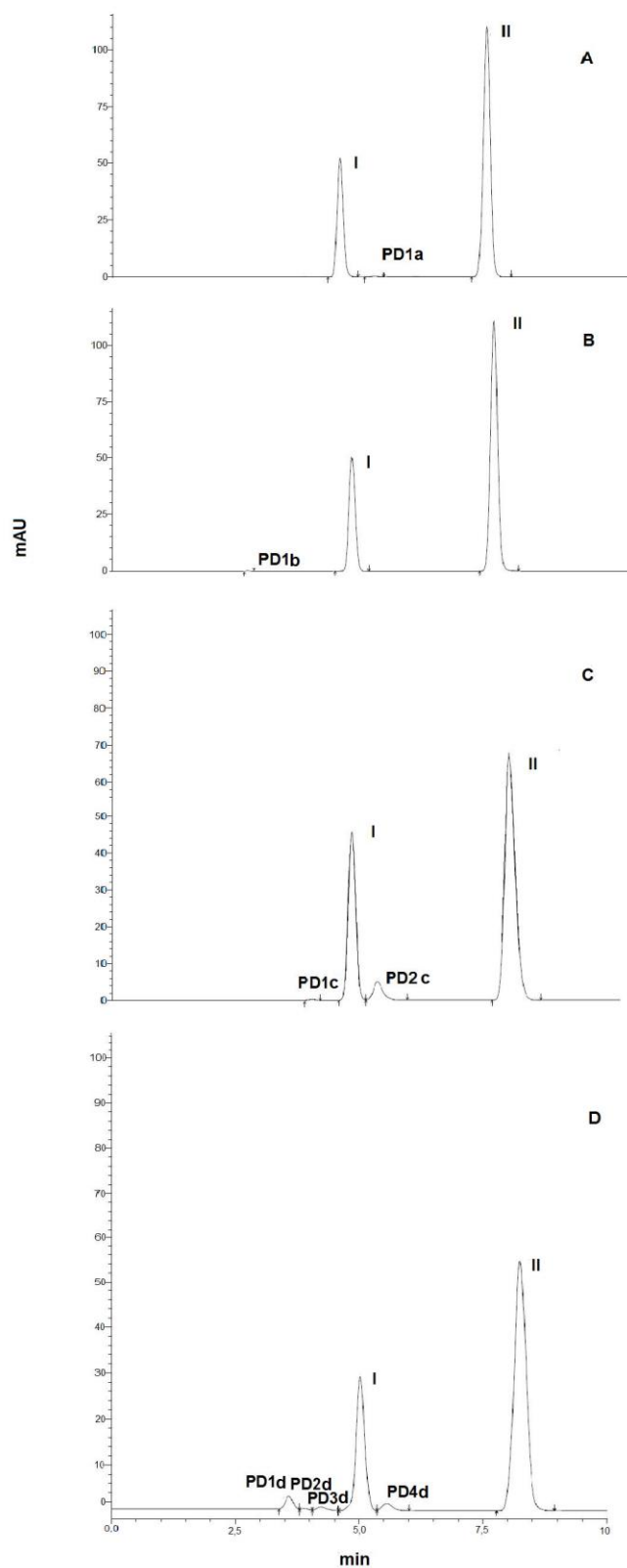


Figura 4. Degradação forçada de TAD (I) e SIL (II). Os cromatogramas apresentados foram obtidos em comprimento de onda de 284nm. **A:** cromatograma da degradação ácida; **B:** cromatograma da degradação alcalina; **C:** cromatograma da degradação oxidativa; **D:** cromatograma da degradação fotolítica; **PD:** prováveis produtos de degradação formados.

Desta forma, é possível observar que o método cromatográfico desenvolvido foi capaz de determinar TAD e SIL na presença dos produtos de degradação em todas as condições testadas. Além disso, sugere-se que os picos dos fármacos em estudo apresentaram pureza adequada.

Os resultados encontrados na avaliação das condições degradativas dos fármacos motivou o estudo da cinética de fotodegradação descrito na sequência deste trabalho.

Linearidade

O parâmetro de linearidade consiste na capacidade do método analítico em demonstrar que seus resultados são diretamente proporcionais à concentração dos analitos contidos na amostra, em um intervalo determinado.¹³

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de curvas de calibração referentes à TAD SQR e SIL SQR. O método demonstrou ser linear na faixa entre 2,5 a 75,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e 5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL.

Os valores de r obtidos foram de 0,9995 e 0,9998 para TAD e SIL, respectivamente, o que demonstra correlação próxima à unidade, indicando que os resultados estão diretamente proporcionais às concentrações dos fármacos. Na análise dos resultados por ANOVA foi possível observar que ocorreu regressão linear significativa para TAD ($F_{\text{calculado}} = 3255 > F_{\text{crítico}} = 4,6$) e SIL ($F_{\text{calculado}} = 10236 > F_{\text{crítico}} = 4,6$), sem desvio da linearidade (TAD $F_{\text{calculado}} = 0,56 < F_{\text{crítico}} = 2,96$; SIL $F_{\text{calculado}} = 0,37 < F_{\text{crítico}} = 2,96$) para um nível de significância de 5%, confirmando a linearidade do método proposto.

Precisão e exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro.¹³

Normalmente para realizar análises de amostras disponíveis comercialmente, existem informações acerca de excipientes e concentrações, por exemplo. No entanto, no que diz respeito às amostras forenses não há padronização em relação a qualquer destes aspectos, de modo que produtos com a mesma origem de apreensão, podem apresentar diferentes componentes como excipientes e impurezas, bem como variações no teor. Sendo assim, as AST foram preparadas conforme descrito na literatura para amostras forenses,^{8,9} com o intuito de reproduzir uma amostra representativa contendo a maior parte de excipientes presentes nos medicamentos comerciais. Além disso, teve-se como simular a concentração média de TAD e SIL em concordância com os teores

encontrados em amostras apreendidas, conforme relatado no trabalho de Park e Ahan (2012).⁷ O fato de serem preparadas em laboratório possibilitou a obtenção de ampla variação na concentração não limitando este estudo ao desenvolvimento de uma metodologia baseada em um determinado produto adulterado.

Visto isso, a precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) a partir da análise de seis soluções de amostras na concentração de 25,0 µg mL⁻¹ TAD e 100 µg mL⁻¹ SIL, no mesmo dia e em dois dias diferentes.

Os resultados encontram-se na Tabela 4 e demonstram que o método foi preciso, com valores de DPR < 2% em todos os casos.

Tabela 4. Valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária.

Fármacos	Repetibilidade	Precisão intermediária
	Média teor (%) ± DPR*	Média teor (%) ± DPR*
TAD	99,95 ± 1,07	100,37 ± 0,59
SIL	100,70 ± 0,54	101,00 ± 0,42

*n = 6

A exatidão do método analítico foi comprovada pela determinação da porcentagem de recuperação avaliada a partir da adição de quantidades conhecidas de TAD SQR e SIL SQR na AST. A porcentagem da faixa de recuperação das quantidades adicionadas foi de 99,86% a 100,36%, para TAD, e 100,45% a 101,59%, para SIL, demonstrando a exatidão do método proposto.

Robustez

A robustez é um parâmetro que indica a capacidade que o método analítico possui em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas.¹³ A resposta utilizada no presente estudo foi o teor de TAD e SIL na AST. A quantificação dos fármacos na solução amostra pode ser considerada robusta, visto que nenhum dos fatores testados apresentou efeito significativo ($t_{calculado} < t_{crítico}$), conforme pode ser observado na Tabela 5 nos resultados obtidos para TAD e na Tabela 6, nos resultados obtidos para SIL. Além disso, em todas as modificações propostas o sistema cromatográfico manteve-se adequado, apresentando simetria de pico, número de pratos teóricos e resolução entre picos satisfatória.

LD e LQ

O LD é demonstrado pela menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectado. Já o LQ corresponde a menor quantidade de analito quantificada com precisão e exatidão.¹³ O LD encontrado para TAD foi de 80 $\eta\text{g mL}^{-1}$ e 180 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para SIL. Em relação ao LQ, os valores encontrados foram de 120 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para TAD e 270 $\eta\text{g mL}^{-1}$ SIL, demonstrando a sensibilidade do método proposto.

Estudo de cinética de fotodegradação

Os estudos de cinética de reação têm como objetivo a avaliação da velocidade e a forma pela qual a mesma é influenciada, para que assim seja possível analisar seu mecanismo e possa ser estabelecida uma relação entre a degradação do fármaco, a possível formação de produtos de degradação e o tempo.²⁰⁻²² De acordo com as condições degradativas testadas, a fotólítica produziu maiores índices percentuais de degradação nos fármacos e, por este motivo, foi escolhida para realização dos estudos de cinética, bem como avaliação de segurança biológica. Foram testados os fármacos isolados e associados, diluídos em metanol e na mistura de metanol e acetonitrila (MeOH + ACN; 50:50; v/v). Empregou-se o solvente aprótico (ACN) no limite da solubilidade para TAD.

Para os fármacos isolados a degradação obedeceu cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de reação foi diretamente proporcional à concentração do reagente. Já para os fármacos em associação a degradação seguiu cinética de ordem zero, isto é, a velocidade de reação independe da concentração do reagente. Os solventes empregados não influenciaram na ordem de reação para os fármacos isolados ou associados.

Na Tabela 7 estão dispostos os valores obtidos a partir dos parâmetros cinéticos para degradação de TAD e SIL, sendo estes calculados de acordo com sua respectiva ordem de reação.²²

Tabela 7. Resultados obtidos a partir dos parâmetros cinéticos para fotodegradação dos fármacos em diferentes solventes.

Condição	Solvente	Fármaco	k*	t _{1/2} (min)	t _{90%} (min)
Isolados	Metanol	TAD	0,003456	200,56	30,48
		SIL	0,003882	191,47	29,10
	MeOH + ACN	TAD	0,003620	191,47	29,10
		SIL	0,003645	190,16	28,90
Associados	Metanol	TAD	0,070791	176,57	35,31
		SIL	0,282364	177,07	35,41
	MeOH + ACN	TAD	0,047741	255,54	51,10
		SIL	0,193826	257,56	51,51

*Unidade ordem zero: $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

*Unidade primeira ordem: min^{-1}

Observa-se que a velocidade de degradação tanto de TAD quanto de SIL em suas formas isoladas mantiveram-se semelhantes, independente do solvente utilizado. Contudo, nota-se a mudança de comportamento na velocidade de degradação quando TAD e SIL estão associados caracterizado pela mudança na ordem de reação. Os fármacos associados apresentaram maior velocidade de degradação na presença de metanol, sugerindo que a fotodegradação possa ser facilitada no meio mais polar e/ou pela influência que os prótons existentes no metanol possam apresentar. De acordo com Ahmad e colaboradores,²³ a polaridade, a constante dielétrica e a viscosidade dos solventes são fatores que podem influenciar na fotodegradação dos fármacos. No entanto, para melhor entendimento, são necessários mais estudos com solventes de diferentes polaridades para avaliar o comportamento da degradação de TAD e SIL em associação.

Estudos de toxicidade

Testes que avaliem a citotoxicidade (Viabilidade Celular – Teste de Azul de Tripán), a genotoxicidade (Índice de Dano ao DNA – Ensaio Cometa) e a mutagenicidade (Índice de Divisão Celular – Teste do Micronúcleo) são fundamentais no sentido de estudar o risco que estas preparações ilícitas podem acarretar à saúde da população.²⁴

Apesar de TAD e SIL estarem presentes há muito tempo no mercado farmacêutico, com os seus respectivos potenciais tóxicos devidamente elucidados, é de grande importância avaliar o

comportamento de ambos quando associados e, também, na presença de seus produtos de degradação. Desta forma, realizaram-se estudos preliminares *in vitro* para avaliação de toxicidade desta associação.

As concentrações das amostras utilizadas neste estudo foram escolhidas levando-se em consideração a concentração plasmática atingida pelos fármacos (378 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para TAD e 560 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para SIL).^{25,26} Deste modo, optou-se por trabalhar a partir de uma concentração considerada intermediária sendo próxima à concentração plasmática (360 $\eta\text{g mL}^{-1}$ TAD e 550 $\eta\text{g mL}^{-1}$ SIL), uma concentração representando o dobro da concentração plasmática (720 $\eta\text{g mL}^{-1}$ TAD e 1094 $\eta\text{g mL}^{-1}$ SIL) e outra que remete à metade da concentração plasmática (180 $\eta\text{g mL}^{-1}$ TAD e 280 $\eta\text{g mL}^{-1}$ SIL).

Viabilidade celular – Teste de Azul de Tripán

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias analisadas empregou-se o ensaio de Viabilidade celular pelo corante azul de Tripán. O número de células viáveis em uma suspensão celular foi determinado pelo princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem determinados corantes, como o azul de tripan. Portanto, as células foram diferenciadas como mortas ou vivas, e determinadas microscopicamente pela coloração azul evidenciada nas células mortas.^{27,28}

Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Figura 5, onde se observa que os fármacos degradados isolados e ou em associação apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo em todas as concentrações testadas, sugerindo atividade citotóxica dos fotoprodutos.

As concentrações mais elevadas de TAD e SIL isolados e não degradados, também, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

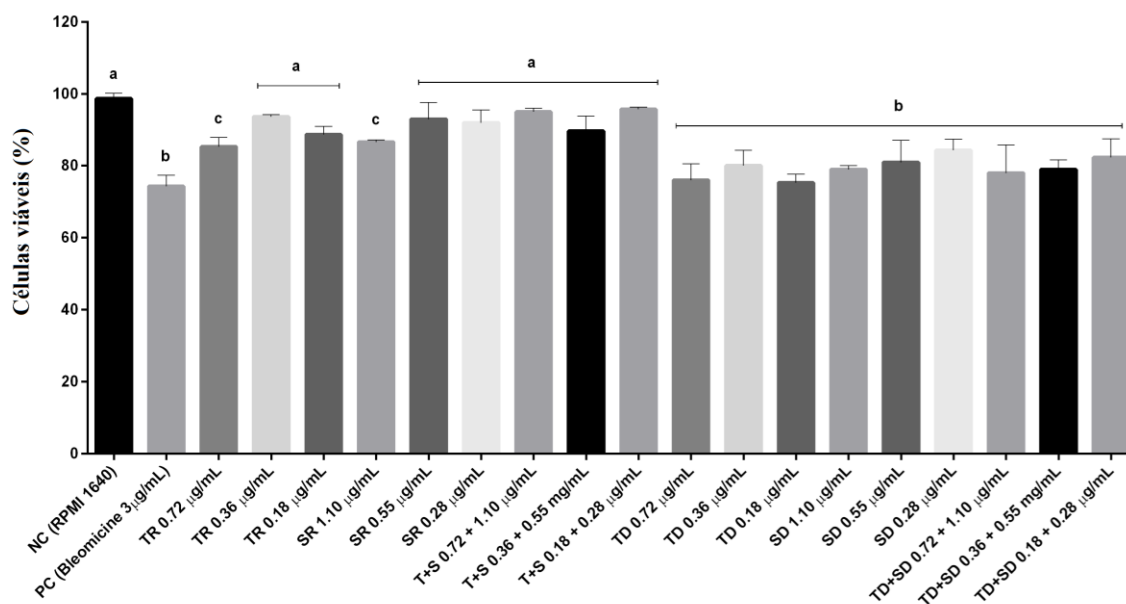


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular de leucócitos pelo corante azul de Tripán nos fármacos TAD e SIL isolados, associados, não degradados e fotodegradados. Siglas: controle negativo (NC), controle positivo (PC), TAD não degradada (TR), SIL não degradada (SR), TAD e SIL associadas e não degradadas (T+S), TAD fotodegradada (TD), SIL fotodegradada (SD), TAD e SIL associadas e fotodegradadas (TD+SD). As letras “a, b, c”, indicam diferença estatística significativa.

Índice de Divisão Celular – Teste de Micronúcleo

O teste do micronúcleo avalia a mutagenicidade detectando processos clastogênicos e também defeitos no fuso da célula. Dessa forma, substâncias que provocam quebras cromossômicas ou que afetam os componentes do fuso ou da região centromérica, podem ser evidenciadas a partir da presença de micronúcleos.²⁹ Os resultados obtidos para o teste de micronúcleo estão representados na Figura 6, onde observa-se que todos os grupos testados apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle negativo. Sendo assim, sugere-se que os fármacos analisados não apresentaram efeito mutagênico nas condições testadas.

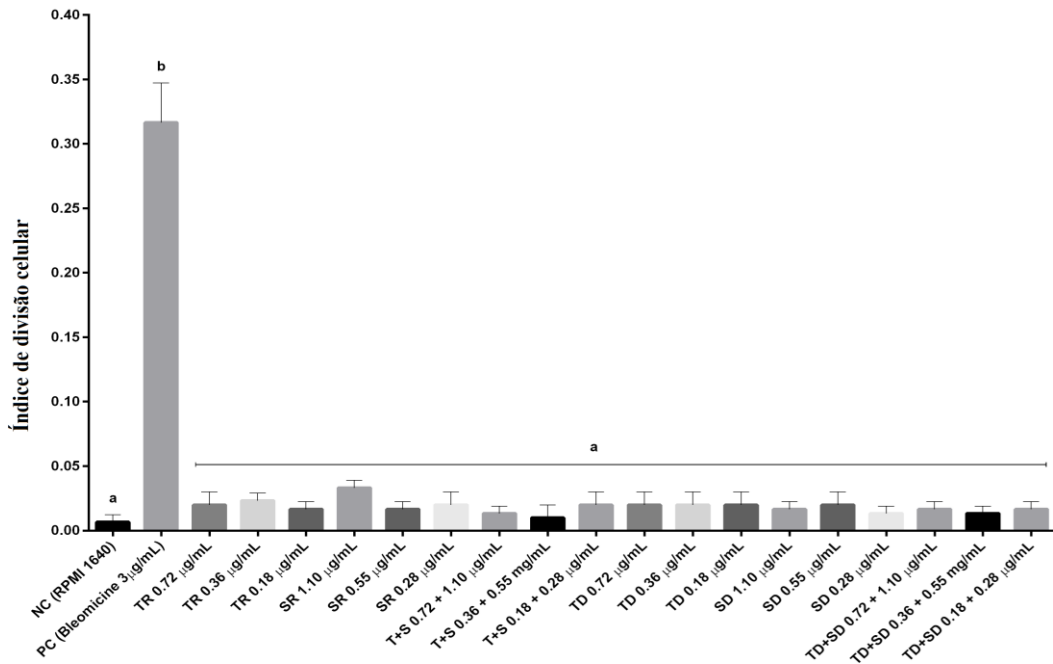


Figura 6. Efeitos de TAD e SIL isolados, associados, não degradados e fotodegradados no índice de divisão celular em culturas de células. Siglas: controle negativo (NC), controle positivo (PC), TAD não degradada (TR), SIL não degradada (SR), TAD e SIL associadas e não degradadas (T+S), TAD fotodegradada (TD), SIL fotodegradada (SD), TAD e SIL associadas e fotodegradadas (TD+SD). As letras “a, b”, indicam diferença estatística significativa.

Índice de Dano ao DNA – Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa é um método genotóxico sensível, que avalia danos no DNA de células individuais.²⁷ De acordo com os resultados obtidos, representados na Figura 7, todas as concentrações de TAD e SIL associadas fotodegradadas apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. Portanto, sugere-se que nessas concentrações testadas as amostras apresentaram atividade genotóxica.

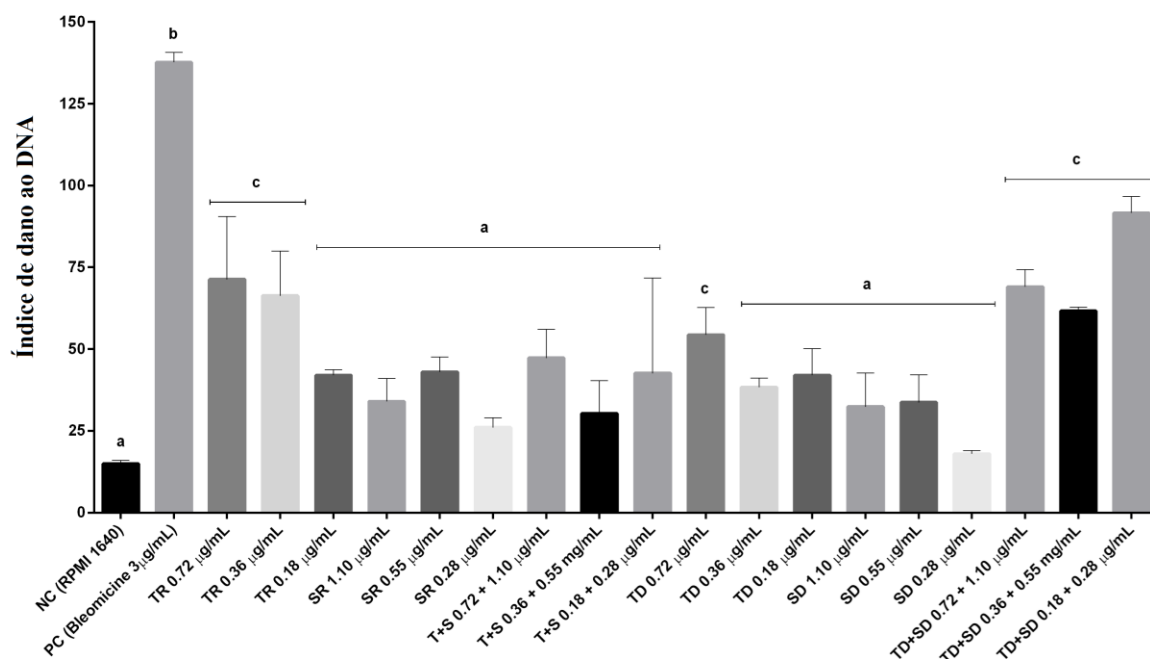


Figura 7. Índice de Dano ao DNA de células expostas a TAD e SIL isolados, associados, não degradados e fotodegradados. Siglas: controle negativo (NC), controle positivo (PC), TAD não degradada (TR), SIL não degradada (SR), TAD e SIL associadas e não degradadas (T+S), TAD fotodegradada (TD), SIL fotodegradada (SD), TAD e SIL associadas e fotodegradadas (TD+SD). As letras “a, b, c”, indicam diferença estatística significativa.

Os testes apresentados no presente trabalho foram realizados *in vitro*, necessitando, ainda, isolar, identificar e avaliar *in vitro* os produtos de degradação, para que seja estudado o dano individual de cada substância.

CONCLUSÃO

Um método indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado para determinação de TAD e SIL isolados e em associação. Na avaliação da cinética de fotodegradação observou-se que os fármacos associados apresentaram diferente ordem de reação, quando comparados aos fármacos isolados. Os estudos toxicológicos *in vitro* demonstraram que os fármacos associados, quando fotodegradados, apresentaram citogenotoxicidade e genotoxicidade, nas condições testadas.

Os estudos desenvolvidos podem vir a colaborar com as análises desses ilícitos na área forense, mas, principalmente, trazem informação para população com intuito de conscientizar quanto aos riscos em consumir produtos sem procedência.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1 Hurtado, R. L. & Lasmar, M. C.; *Cadernos de Saúde Pública* (2014), doi:10.1590/0102-311X00107013.
- 2 Cheng, M. M.. *Journal of diabetes science and technology* **2009**, 3, 1516-1520 .
- 3 Costa, C. R. A. *Trabalho de Conclusão de Curso*, Fundação Osvaldo Cruz, Brasil, 2016.
- 4 Jung, C. R., Ortiz, R. S., Limberger, R. & Mayorga, P. *Forensic Science International* (2012), doi:10.1016/j.forsciint.2011.09.002.
- 5 Ames, J. & Souza, D. Z. *Revista Saúde Pública* (2012), doi:10.1590/S0102-69092008000200009.
- 6 Ortiz, R., Antunes, M. & Linden, R. *Química Nova* (2010), doi:10.1590/S0100-40422010000200028.
- 7 Park, M. & Ahn, S. *Journal of Forensic Sciences* (2012), doi:10.1111/j.1556-4029.2012.02164.x.
- 8 Sacré, P.-Y.; Deconink, E.; Chiap, P.; Crommen, J., Mansion, F.; Rozer, E.; Courselle, P.; De Beer, J. O.; *Journal of Chromatography* **2011**, 1218, 6439-6447.
- 9 El-Bagary, R. I., Elkady, E. F., Mowaka, S. & Attallah, M.; *Journal of AOAC International* **2015**, 98, 1496-1502.
- 10 Kibbe, A. H., Wade, A.; Weller, P. J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **2000**.
- 11 Pharmacopeia; U. S. Ed Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention **2012**.
- 12 ICH.; Internacional Conference on Harmonisation. Ed ICH Steering Committee **2005**.
- 13 Brasil.; *Diário Oficial da União* **2017**.
- 14 Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.; Massart, D.; *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2001**, 24, 723-753.
- 15 Burow, M. E.; Weldon, C.B.; Tang, Y.; Navar, G.L.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Hammond, T.G.; Clejan, S.; Beckman, B.S.; *Cancer research* **1998**, 58, 4940-4946.

- 16 Schmid, W.; *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **1975**, 9-15.
- 17 Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. A. *Experimental cell research* **1988**, 175, 184-191.
- 18 Watson, D. G. *Pharmaceutical Analysis* **2005**.
- 19 Patel, J.; Patel, N.; *Scientia Pharmaceutica* **2014**, 82, 749.
- 20 Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen JR., L. V.; *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos* **2007**.
- 21 Gennaro, A. R.; *Remington - A Ciência e a Prática da Farmácia* **2000**.
- 22 Sinko, P. J.; *Físico- Farmácia e Ciências farmacêuticas*. (2008).
- 23 Ahmad, I.; Bano R.; Sheraz, M.A.; Ahmed, S.; Mirza, T.; Ansari, S.A.; *Acta Pharmaceutica* **2013**, 63, 223-229.
- 24 Aquino, I.; *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biociências, Brasil, 2010.
- 25 Shakya, A. K.; Abu-Awwad, A. N.; Arafat, T. A.; Melhim, M. *Journal of Chromatography* **2007**, 852, 403-408.
- 26 Nichols, D. J.; Muirhead, G. J.; Harness, J. A.; *British journal of clinical pharmacology* **2002**, 53.
- 27 Collins, A. R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R.; *Mutagenesis* **2008**, 23, 143-151.
- 28 Martines, N.; *Dissertação Mestrado*, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, 2003.
- 29 Ferraro, M. V. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2009.
- 30 Carstensen, J. T.; Rhodes, C. T.; *Drug Stability: Principles and Practice*. Marcel Dekker: New York, 2000.
- 31 Gobry., V.; Bouchard, G.; Carrupt, PA.; Testa, B.; Girault, H. H.; *Helvetica Chimica Acta* **2000**, 83, 1465.
- 32 Santos Neto, Á.J.; *Scientia Chromatographica* **2009**, 1, 3, 69-77.
- 33 OMS. Organização Mundial da Saúde, *A study on the public health and socioeconomic impact of substandard and falsified medical products*, **2017**.
- 34 ICH.; Internacional Conference on Harmonisation. *Q1 A (R2): Stability testing of new drug substances and products*.**2003**.
- 35 BRASIL.; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *RDC nº 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos*, **2012**.

5 DISCUSSÃO GERAL

A indústria farmacêutica é conhecida como uma grande potência, pois atua na produção de medicamentos gerando um grandioso e rentável comércio farmacêutico mundial. Fato que acaba chamando a atenção de redes criminosas, que enxergam neste mercado um grande potencial para gerar lucro de forma rápida. A prática ilegal de produção de medicamentos vem crescendo muito, o que pode estar associado à facilidade encontrada pelos falsários em adquirir tecnologias necessárias para copiar produtos farmacêuticos originais (Fernandez *et al.*, 2011).

Dentre os medicamentos apreendidos com maior incidência pela Polícia Federal, destacam-se a SIL e a TAD. Esses compostos são encontrados simultaneamente em quantidades inadequadas em amostras falsificadas de Cialis[®] e Viagra[®], segundo estudos presentes na literatura (Ortiz *et al.*, 2010; Ames e Souza, 2012; Park e Ahn, 2012). Vale ressaltar que a associação desses fármacos não existe no mercado farmacêutico, portanto suas ações farmacológicas e, sobretudo, seus potenciais efeitos tóxicos são desconhecidos (Ortiz *et al.*, 2010; Ames e Souza, 2012; Park e Ahn, 2012).

Além do sentido criminal acerca deste tema, é evidente o risco que a população submete-se ao consumir esse tipo de produto, visto que sua administração pode resultar em sérios problemas de saúde pública. As substâncias presentes nessas formulações são de natureza duvidosa e, ainda, os produtos acabam sendo submetidos a condições adversas na produção, transporte e armazenamento. Não há qualquer acompanhamento durante essas etapas no sentido de assegurar qualidade adequada, podendo ocorrer problemas de perda da estabilidade dos constituintes da formulação. Fato que pode acarretar na formação de produtos de degradação com iminente potencial tóxico, elevando o risco à saúde (Jung *et al.*, 2012).

Devido a essa problemática, existe a grande necessidade de metodologias que venham avaliar não somente a presença e/ou quantidade do fármaco presente nos produtos. Neste caso são necessários métodos que apresentem a capacidade indicativa da estabilidade, ou seja, tenham capacidade de determinar o fármaco na presença dos produtos de degradação. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura métodos desenvolvidos para a determinação de TAD e SIL que apresentem a capacidade indicativa da estabilidade.

Tornam-se, também, necessários estudos que avaliem as principais condições degradativas dos fármacos, bem como, suas cinéticas de degradação. Estes estudos buscam contribuir para o melhor entendimento acerca do comportamento das reações que ocorrem quando os dois fármacos estão associados.

Os resultados obtidos a partir deste estudo poderão servir de fomento para os laboratórios de inteligência forense, pois o método desenvolvido pode colaborar na elucidação de casos onde ocorre

a substituição de fármacos ou exames de produtos farmacêuticos de origem desconhecida, por exemplo. Além disso, servirá de alerta para a população quanto ao risco que existe em consumir produtos falsificados, pois partindo-se do pressuposto que as exigências requeridas pelas Boas Práticas de Fabricação não são seguidas, certamente esses produtos não apresentam qualidade, segurança e eficácia garantidas.

Os parâmetros analíticos que resultaram nas condições cromatográficas do presente trabalho foram escolhidos após a realização de variados testes de composições de fase móvel, pH da fase aquosa e fluxo da fase móvel. As condições cromatográficas definidas apresentaram apropriada adequabilidade do sistema, com números de pratos teóricos satisfatórios, simetria de pico, tempo de corrida curto e boa resolução entre os picos. Essas características proporcionaram o desenvolvimento de um método de simples desempenho, visto que a coluna empregada (C_{18}) é amplamente utilizada em métodos analíticos, a fase móvel é de baixo custo com preparo rápido e simples, atribuindo destaque ao método frente a grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura com o mesmo intuito. Além disso, a fase móvel não apresenta sais na sua composição, que poderiam diminuir a vida útil da coluna e, também, danificar o equipamento utilizado.

A validação do método desenvolvido foi realizada conforme guias nacionais e internacionais, levando-se em consideração os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, LD e LQ (ICH, 2005; Pharmacopeia, 2012; Brasil, 2017).

No parâmetro seletividade avaliou-se a interferência dos excipientes da formulação a partir da análise comparativa dos cromatogramas obtidos com a ASE e a solução SQR de TAD e SIL. Os excipientes empregados estão presentes nos medicamentos comerciais e foram escolhidos com o objetivo de se obter uma amostra representativa dos produtos farmacêuticos adulterados. De acordo com os resultados, observou-se a ausência de picos na análise da ASE no mesmo tempo de retenção dos fármacos. Dessa forma, sugere-se que não há interferência dos excipientes da formulação na quantificação dos fármacos em estudo. Já a capacidade de determinar os fármacos na presença dos produtos de degradação foi realizada a partir da exposição da solução SQR de TAD e SIL a condições de estresse: degradação oxidativa, fotolítica e hidrolítica (alcalina e ácida). Em todos os casos foi possível determinar TAD e SIL, com pureza de pico adequada, na presença dos prováveis produtos de degradação. De acordo com a avaliação realizada em todas as condições degradativas testadas, pode-se afirmar que os fármacos foram mais suscetíveis à fotólise, uma vez que apresentaram percentual de degradação superior a todas as outras condições testadas.

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de curvas de calibração referentes à TAD SQR e SIL SQR. O método demonstrou ser linear na faixa entre 2,5 a 75,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TAD e 5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SIL. Essas concentrações foram utilizadas pelo fato de

existir relatos na literatura evidenciando a presença simultânea de TAD e SIL em ampla faixa (Ortiz *et al.*, 2010; Park e Ahn, 2012). Neste sentido, o método desenvolvido contempla as concentrações relatadas na literatura para produtos falsificados, pois vale ressaltar que estes não possuem padronização no seu preparo, necessitando faixa linear mais abrangente.

Nas análises realizadas em amostras disponíveis no mercado farmacêutico, geralmente, obtêm-se informações quanto às concentrações dos fármacos presentes e excipientes utilizados. Em relação às amostras falsificadas, esses tipos de informações são desconhecidas, pois não existe padronização para essas formulações. Nesse sentido, as AST foram produzidas com objetivo de representar, de uma forma abrangente, os produtos farmacêuticos adulterados apreendidos, conforme relatado no trabalho de Park e Ahan (2012). Sendo assim, a precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) a partir da análise de seis soluções de amostras na concentração de $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ TAD e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ SIL, no mesmo dia e em dias diferentes. Obtiveram-se resultados com valores de DPR inferiores a 2% em todos os casos, demonstrando a precisão do método proposto.

Comprovou-se a exatidão do método pela determinação da porcentagem de recuperação avaliada a partir da adição de quantidades (baixa, média e alta) conhecidas de TAD SQR e SIL SQR na ASE. A faixa de recuperação média das quantidades adicionadas foi de 99,86% a 100,36%, para TAD, e 100,45% a 101,59%, para SIL, demonstram a exatidão do método desenvolvido.

Para avaliar a robustez do método foram realizadas pequenas variações nas condições cromatográficas e posterior determinação do teor dos fármacos. Através do delineamento fatorial proposto foi possível verificar que, apesar das variações impostas, foi possível determinar o fármaco, e nenhuma das modificações apresentou efeito significativo sob a análise de teor dos fármacos nas condições testadas. Também, em todos os casos os parâmetros de adequabilidade do sistema foram respeitados.

A sensibilidade do método foi avaliada através dos LD e LQ, os quais foram calculados a partir do sinal-ruído da corrida analítica e suas soluções preparadas nas concentrações calculadas e avaliadas experimentalmente. O LD encontrado para TAD foi de 80 ng mL^{-1} e 180 ng mL^{-1} para SIL. Em relação ao LQ os valores encontrados foram de 120 ng mL^{-1} para TAD e 270 ng mL^{-1} SIL, demonstrando a sensibilidade do método desenvolvido.

Como evidenciado no estudo de seletividade, os fármacos são mais suscetíveis à degradação pela ação da luz. Neste contexto, foram realizados estudos da cinética de fotodegradação dos fármacos, isolados e em associação, solubilizados em metanol e, também, na mistura de metanol e acetonitrila (MeOH + ACN, 50:50 *v/v*).

De acordo com a cinética de fotodegradação foi possível observar a alteração do comportamento da ordem de reação para os fármacos isolados e associados. Em relação aos fármacos isolados a degradação obedeceu cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do reagente. Quanto aos fármacos em associação, a degradação seguiu cinética de ordem zero, isto é, a velocidade de reação independe da concentração do reagente. A partir dos estudos da cinética de fotodegradação em diferentes composições de solventes dos fármacos isolados e associados, foi possível demonstrar a ocorrência da modificação na velocidade de degradação dos fármacos, sugerindo que a fotodegradação pode ser facilitada no meio mais polar e/ou pela influência que os prótons existentes no metanol possam apresentar. Segundo Ahmad e colaboradores (2013) além da polaridade, aspectos como constante dielétrica e viscosidade também devem ser considerados.

Sabe-se que os compostos TAD e SIL estão há muito tempo no mercado farmacêutico. Portanto, seus respectivos potenciais tóxicos estão devidamente elucidados. Porém, existe uma grande necessidade de avaliar o comportamento de ambos quando associados e, também, na presença de seus produtos de degradação, tendo em vista a quantidade de evidências presentes na literatura que relatam a falsificação desses medicamentos. Desta forma, realizaram-se estudos preliminares *in vitro* para avaliação de toxicidade desta associação.

Os resultados obtidos no teste de Viabilidade Celular pelo corante azul de Tripan para a avaliação da citotoxicidade, demonstraram que as amostras fotodegradadas isoladas e em associação apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo em todas as concentrações testadas, sugerindo atividade citotóxica dos fotoprodutos.

Na avaliação da mutagenicidade o Teste de Micronúcleo evidenciou que todos os grupos testados apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao controle negativo, sugerindo-se que os fármacos isolados e associados, não degradados e fotodegradados não apresentaram efeito mutagênico nas condições testadas.

O estudo de genotoxicidade foi realizado pelo Ensaio Cometa, onde verificou-se todas as concentrações de TAD e SIL associadas fotodegradadas apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. Portanto, sugere-se que nessas concentrações testadas as amostras apresentaram atividade genotóxica. Os testes toxicológicos foram realizados *in vitro*, havendo necessidade análise *in vitro* no sentido de avaliar a segurança biológica de TAD e SIL associados, ou ainda, isolar os produtos de degradação para que seja estudado o dano individual.

6 CONCLUSÃO

- O método indicativo da estabilidade por cromatografia líquida foi validado e demonstrou ser adequado para determinação simultânea de TAD e SIL em análise forense;
- A fotodegradação da TAD e SIL isoladas apresentou reação de primeira ordem e quando associadas seguiram reação de ordem zero.
- Os fármacos quando degradados, isolados ou associados, apresentaram viabilidade celular diminuída, sugerindo atividade citotóxica nas condições testadas.
- Os fármacos não apresentaram atividade mutagênica nas condições testadas.
- Os fármacos apresentaram atividade genotóxica em associação, quando fotodegradados nas concentrações testadas.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. R. R. **Desenvolvimento de metodologia por UFLC, estudos de estabilidade e avaliação tecnológica de comprimidos de sildenafila.**, 2016

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. IN: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.** v. 2, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

AMES, J.; SOUZA, D. Z. Falsificação de medicamentos no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 46, n. 1, p. 154-159, 2012.

ANDERSON, T. **Confusion over counterfeit drugs in uganda**, 2009.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** Porto Alegre: Artmed: 2007.

AQUINO, I. **Efeito genotóxico da Artemisinina e do Artesunato em células de mamíferos.** Botucatu, São Paulo. 2010

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed: 2005.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Brasília, DF 2005.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.** UNIÃO, D. O. D. Brasília, DF 2012.

_____. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** UNIÃO, D. O. D. Diário Oficial da União 2017.

BRASIL. **Presidência da República. LEI Nº 9.677, DE 2 DE JULHO DE 1998.** Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências. Brasília, DF, 1998;

BROCK, G. B. et al. Efficacy and Safety of Tadalafil for the Treatment of Erectile Dysfunction: Results of Integrated Analyses. **The Journal of Urology**, v. 168, n. 4, p. 1332-1336, 2002. ISSN 0022-5347. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64442-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64442-4) >. Acesso em: 24/02/2018.

BURNETT, A. L. Erectile Dysfunction. **THE JOURNAL OF UROLOGY**, v. 175, p. 25-31, 2006.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker: 2000.

CHEMSPIDER. **Royal Society of Chemistry**, 2015. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5023.html?rid=0421a398-6f3b-47bc-9ac0-906c7f2a08c4>>. Acesso em: 20/01/2018.

CHEMSPIDER. **Royal Society of Chemistry**, 2015 Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.99301.html?rid=6a0d9ee2-4203-4894-a760-d436b145f5dc&page_num=0>. Acesso em: 20/01/2018.

DA SILVA, A. L. M. et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163, 2007. ISSN 0100-4042.

DE PEINDER, P. et al. Detection of Lipitor® counterfeits: A comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4, p. 688-694, 2008. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708508001155> >. Acesso em: 26/02/018.

DINESH, N. D. et al. Stability indicating RP-LC determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 743-748, 2002. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708502001231> >. Acesso em: 26/02/018.

DONG, J.-Y.; ZHANG, Y.-H.; QIN, L.-Q. Erectile Dysfunction and Risk of Cardiovascular Disease: Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 13, p. 1378-1385, 2011. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109711024223> >. Acesso em: 26/02/018.

EARDLEY, I.; CARTLEDGE, J. Tadalafil (Cialis) for men with erectile dysfunction. **International journal of clinical practice**, v. 56, n. 4, p. 300-304, 2002. ISSN 1368-5031.

EL-BAGARY, R. I. et al. Validated HPLC and Ultra-HPLC Methods for Determination of Dronedarone and Amiodarone Application for Counterfeit Drug Analysis. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 6, p. 1496-1502, 2015. ISSN 1060-3271.

FDA. **Food and Drug Administration Approved Drug Products**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=202276>>. Acesso em: 20/10/2017.

FDA. **FDA Drug Safety Communication: FDA clarifies Warning about Pediatric Use of Revatio (sildenafil) for Pulmonary Arterial Hypertension**. COMMUNICATION, F. D. S. 2014.

FERNANDEZ, F. M. et al. Poor quality drugs: grand challenges in high throughput detection, countrywide sampling, and forensics in developing countries. **Analyst**, v. 136, n. 15, p. 3073-3082, 2011. ISSN 0003-2654. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C0AN00627K>>.

FIDAN, A. K.; BAKIRDERE, S. Simultaneous Determination of Sildenafil and Tadalafil in Legal Drugs, Illicit/Counterfeit Drugs, and Wastewater Samples by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 923-928, 2016. ISSN 1060-3271.

FREITAS, P. S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de Vaccinium corymbosum (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss in vivo**, 2007.

FREITAS, V. M. D. et al. Frequência de uso de inibidores de fosfodiesterase-5 por estudantes universitários. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, p. 965-967, 2008. ISSN 0034-8910. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102008000500024&nrm=iso>. Acesso em: 26/02/018.

GENNARO, A. R. **Remington - A Ciência e a Prática da Farmácia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.: 2000.

GOLDSTEIN, I. et al. Oral Sildenafil in the Treatment of Erectile Dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 20, p. 1397-1404, 1998. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199805143382001>>.

HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification The NMR approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 679-687, 2011. ISSN 0731-7085. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708510007223>>. Acesso em: 26/02/018.

HURTADO, R. L.; LASMAR, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. . **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 4, p. 891-895, 2014. ISSN 1678-4464. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0102-311X00107013>> Acesso em: 26/02/2018.

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

_____. **International Conference on Harmonisation. Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure–Methodology.** COMMITTEE, I. S., 2005.

JACOBOWSKI, A. C. **Avaliação do potencial efeito genotóxico de quelato de cobre nano e microencapsulado**, 2009

JUNG, C. R. et al. A new methodology for detection of counterfeit Viagra® and Cialis® tablets by image processing and statistical analysis. **Forensic Science International**, v. 216, n. 1, p. 92-96, 2012. ISSN 0379-0738. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037907381100449X>>.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

MALESUIK, M. D.; CARDOSO, S. G.; STEPPE, M. . **Chromatographia**, v. 67, n. 1, p. 131, 2007. ISSN 1612-1112. Disponível em: <<https://doi.org/10.1365/s10337-007-0454-9>>.

MARTINO, R. et al. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 77-92, 2010. ISSN 1618-2650. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3748-y>>.

MCMAHON, C. G. Erectile dysfunction. **Internal Medicine Journal** v. 44, n. 1, p. 18–26, 2014.

MCVARY, K. T. et al. Tadalafil relieves lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 177, n. 4, p. 1401-1407, 2007. ISSN 0022-5347.

MORIWAKI, C. et al. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 23, p. 651-654, 2001. ISSN 1807-8648.

NEWTON, P. N. et al. Counterfeit anti-infective drugs. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 602-613, 2006. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309906705813> >.

NOGUEIRA, E.; NETO, G. V. Falsificação de medicamentos e a lei n. 11.903/09: aspectos legais e principais implicações. **Revista de Direito Sanitário**, v. 12, n. 2, p. 112-139, 2011.

OMS. **A study on the public health and socioeconomic impact of substandard and falsified medical products**, 2017.

OMS. **World Health Organization. General information on counterfeit medicines**, 2008.

O'NEIL, M. J. et al. **The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals 13th edition**, 2001.

ORTIZ, R.; ANTUNES, M.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Química Nova**, v. 33, 2010.

ORTIZ, R. S. et al. Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogs by UPLC–MS. **Forensic Science International**, v. 229, n. 1, p. 13-20, 2013. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073813001801> >.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X8490411X> >.

PARK, M.; AHN, S. Quantitative Analysis of Sildenafil and Tadalafil in Various Fake Drugs Recently Distributed in Korea. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 6, p. 1637-1640, 2012. ISSN 1556-4029. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02164.x> >.

PATEL, J.; PATEL, N. Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Ambrisentan and Tadalafil in Pharmaceutical Dosage Form. **Scientia Pharmaceutica**, v. 82, n. 4, p. 749, 2014. ISSN 2218-0532. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2218-0532/82/4/749> >.

PHARMACOPEIA, U. S. **USP 35/NF30**. CONVENTION, R. U. S. P., 2012.

PÓLVORA, E. P. Aspectos polêmicos do crime de contrabando na importação. **Revista Jus Navigandi**, Terezina, 2013. Disponível em: <<https://jus.com.br/artigos/24022>>. Acesso em: 06/06/2017.

PORST, H. et al. The efficacy and tolerability of vardenafil, a new, oral, selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, in patients with erectile dysfunction: the first at-home clinical trial. **International Journal Of Impotence Research**, v. 13, p. 192, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijir.3900713>>. Acesso em: 26/02/018.

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Database**; CID=110635; Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/110635>>. Acesso em : 08/03/2018.

RAJYALAKSHMI, C.; BENJAMIN, T.; RAMBABU, C. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of sildenafil and duloxetine in pharmaceutical dosage form. **Journal Pharm Tech Res**, v. 3, p. 249-3387, 2013. ISSN 2249-3387.

RAO, D. V. S.; RADHAKRISHNANAND, P.; HIMABINDU, V. Stress Degradation Studies on Tadalafil and Development of a Validated Stability-Indicating LC Assay for Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Form. **Chromatographia**, v. 67, n. 1, p. 183-188, 2008. ISSN 1612-1112. Disponível em: <<https://doi.org/10.1365/s10337-007-0478-1>>.

RAVIPATI, G. et al. Type 5 Phosphodiesterase Inhibitors in the Treatment of Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease. **Cardiology in Review**, v. 15, n. 2, p. 76-86, 2007. ISSN 1061-5377. Disponível em: <https://journals.lww.com/cardiologyinreview/Fulltext/2007/03000/Type_5_Phosphodiesterase_Inhibitors_in_the.4.aspx>.

REDDY, B. P.; REDDY, K. A.; REDDY, M. Validation and stability indicating RP-HPLC method for the determination of tadalafil API in pharmaceutical formulations. **Research in Pharmaceutical Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 001-006, 2010. ISSN 2141-2324.

REDDY, B. P. K.; REDDY, Y. R. Validation and Stability Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Sildenafil Citrate in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma. **E-Journal of Chemistry**, v. 5, n. S2, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2008/682924>>.

RIBEIRO, R. L. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo***. Canoas: Editora ULBRA., 2003.

RODIONOVA, O. Y. et al. NIR spectrometry for counterfeit drug detection: A feasibility study. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, n. 1, p. 151-158, 2005. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005009979> >.

SABIN, G. P. et al. Characterization of sildenafil citrate tablets of different sources by near infrared chemical imaging and chemometric tools. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 207-212, 2013. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513003427> >.

SACRÉ, P.-Y. et al. Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6439-6447, 2011. ISSN 0021-9673.

SANTAMARIA-FERNANDEZ, R.; HEARN, R.; WOLFF, J.-C. Detection of counterfeit antiviral drug Heptodin; and classification of counterfeits using isotope amount ratio measurements by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) and isotope ratio mass spectrometry (IRMS). **Science and Justice**, v. 49, n. 2, p. 102-106, ISSN 1355-0306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2008.12.003> >. Acesso em: 26/02/018.

SATHEESH, B.; SREE GANESH, K.; SARAVANAN, D.; Simultaneous Determination of Tadalafil and its Related Compounds in Pharmaceutical Dosage Forms By UPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 10, p. 1451-1465, 2013. ISSN 1082-6076.

SHAH, J. Erectile dysfunction through the ages. **BJU International**, v. 90, n. 4, p. 433-441, 2002. ISSN 1464-410X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-410X.2002.02911.x> >.

SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 153-165, 2013. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612605200>>. Acesso em: 26/02/018.

SILVA, A.C.; TOFFOLETTO, O.; LUCIO, L.A.G.; DOS SANTOS, P.F.; AFIUNE, J.B.; FILHO, J.M.; TUFIK, S.; Repercussão Cardiovascular, com e sem Álcool, do Carbonato de Lodenafila, um Novo Inibidor da PDE5. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v.94, n.2, p.160-167, 2010.

SINKO, Patrick J., GONZALES ORTEGA, George. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TAMBE, V. S.; DEODHAR, M. N.; PRAKYA, V. Stability-indicating UPLC-MS/UV Method for Simultaneous Determination of Sildenafil Citrate and Dapoxetine Hydrochloride from Bulk and Formulation. **Indian Journal of Pharmacy Sciences**, v. 78, p. 663-672, 2016.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. ISSN 1098-2280.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1, p. 79-90, 2003. ISSN 1383-5718. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571803000317>>. Acesso em: 26/02/018.

VAN BEEK, T. A.; MONTORO, P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 11, p. 2002-2032, 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730900051X>>. Acesso em: 26/02/018.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.** Elsevier Churchill Livingstone., 2005.

WRIGHT, P. J. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 8, p. 967-975, 2006. ISSN 1742-1241. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01049.x> >.

ANEXO I

Normas para publicação na revista Química Nova, disponível em:

< <http://quimicanova.sbq.org.br/conteudo.asp?page=2> >