

IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS SEMIVOLÁTEIS PRESENTES NOS COMPONENTES INDIVIDUAIS DO MATERIAL DE EMBALAGEM DE UM SPRAY NASAL

Ângela Oliveira Francisco ^{1,2*}, Celso Blatt ³, Lourdes Marcela Yataco ², Ana Lúcia Borges Shimada ², Daniele de Souza Freitas ², Paulo R. H. Moreno ^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Ache Laboratórios Farmacêuticos

3 – Agilent Technologies do Brasil

prmoreno@iq.usp.br; angela.francisco@ache.com.br

Resumo: Extraíveis correspondem a quaisquer analitos passíveis de serem extraídos, os quais podem ser substâncias orgânicas e inorgânicas liberadas de um sistema de embalagem de um medicamento, em condições de laboratório. Essas substâncias têm o potencial de lixiviar para um produto farmacêutico nas condições normais de armazenamento durante seu período de validade, sendo denominadas lixiviáveis. Este trabalho investigou a composição química de origem semi-volátil presente no extrato de isopropanol dos componentes individuais do material de embalagem de um spray nasal analisados em cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM). A identificação destes compostos foi obtida através da comparação dos índices de retenção linear, dos espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento e da literatura. Foram identificados 55 compostos no total, sendo os principais hidrocarbonetos alifáticos, como hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano, hexacosano e octacosano, seguidos dos ácidos graxos, ácido palmítico e ácido esteárico, e um oligômero cíclico do Nylon-6, 1,8-diaza-ciclotetradecano-2,7-diona. Estes resultados possibilitam determinar os potenciais lixiviáveis e estabelecer um protocolo para o acompanhamento destas substâncias no medicamento. Esse controle aumenta a segurança do usuário, por meio da avaliação da toxicidade e determinação dos limites permitidos para esses compostos, quando presentes no medicamento.

Palavras-chave: *spray nasal, compostos semivoláteis, extraíveis, índice de retenção linear.*

IDENTIFICATION OF SEMI VOLATILE EXTRACTABLES FOUND IN THE INDIVIDUAL COMPONENTS OF A NASAL SPRAY PACKAGING MATERIAL

Abstract: Extractables correspond to any analytes that can be extracted, which can be organic and inorganic substances that are released from a medicine packaging system, under laboratory conditions. These substances have the potential to leach into a pharmaceutical product under the standard storage conditions during its shelf life, so they are called leachables. This work investigated the semi volatile compounds present in the 2-propanol extracts of individual components from a nasal spray packaging material which were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The compound identification was done by comparing the linear retention indexes and mass spectra obtained with libraries and the literature. A total of 55 compounds were identified, the main compounds present in all extracts were aliphatic hydrocarbons such as hexadecane, octadecane, eicosane, docosane, tetracosane, hexacosane and octacosane, followed by the fatty acids, palmitic acid and stearic acid, and a Nylon-6 cyclic oligomer, 1,8-diazacyclotetradecane-2,7-dione. These results enable to determine potential leachables, and to establish a protocol for monitoring these substances in the medicine. This control increases the user safety, through the assessment of toxicity and determination of allowed limits for these compounds, when present in the medicine.

Keywords: *nasal spray, semi-volatile compounds, extractables, linear retention index.*

Introdução

Medicamentos utilizam um sistema de embalagem para preservar e proteger o produto após sua fabricação, durante sua distribuição, armazenamento e uso. Alguns componentes provenientes do processo de manufatura do material de embalagem podem migrar para o produto farmacêutico, formando uma classe de impurezas conhecidas como lixiviáveis¹.

Uma gama de materiais, como vidro, metais, materiais sintéticos ou polímeros naturais são usados para fabricar componentes de embalagens e dispositivos médicos. Os plásticos usados em sistemas de embalagem de medicamentos são compostos por polímeros com uma ampla estrutura de massa molecular e incluem aditivos como plastificantes, estabilizantes, lubrificantes, antioxidantes, corantes entre outros, incorporados para produzir as propriedades necessárias para um fim específico².

Interações entre o produto e o sistema de embalagem podem afetar a qualidade e segurança do medicamento, sendo estas aditivas, quando um constituinte da embalagem é adicionado ao produto, ou redutoras, se o constituinte do produto é reduzido em qualquer nível devido à interação. A interação aditiva ocorre quando extraíveis orgânicos e/ou inorgânicos do sistema de embalagem migram para fora do sistema e acumulam como lixiviáveis no produto³.

O primeiro passo para avaliar os lixiviáveis é realizar estudos de extração, sendo estes de dois tipos, os de extração controladas e extração de uso simulado, que podem ser feitos em série ou em paralelo. Um estudo de extração controlada, também chamado de estudo de caracterização de materiais, envolve a extração do sistema de embalagem em dois ou três solventes de polaridades diferentes. Os solventes são selecionados com base nas características do medicamento, com um dos solventes sendo mais agressivo e representativo de pior caso. Uma extração de uso simulado é projetada para ser menos agressiva, desta forma menos extraíveis são identificados, no entanto neste estudo é mais provável identificar apenas os extraíveis que se tornarão lixiviáveis, em comparação com o estudo de extração controlada⁴.

Após a conclusão de um estudo de caracterização de extraíveis ou um estudo de lixiviáveis, uma lista de substâncias químicas é identificada, compondo assim o perfil dos extraíveis ou o perfil de lixiviáveis. Seguindo a metodologia proposta pelo *Product Quality Research Institute* (PQRI), qualquer composto acima de um limiar de avaliação denominado *Analytical Evaluation Threshold* (AET), que deve ser identificado e relatado ao toxicologista para avaliação específica de impacto ao produto⁵.

Experimental

O sistema de embalagem completo, e a nomenclatura referente a cada componente do material de embalagem analisado, são indicados na Figura 1.

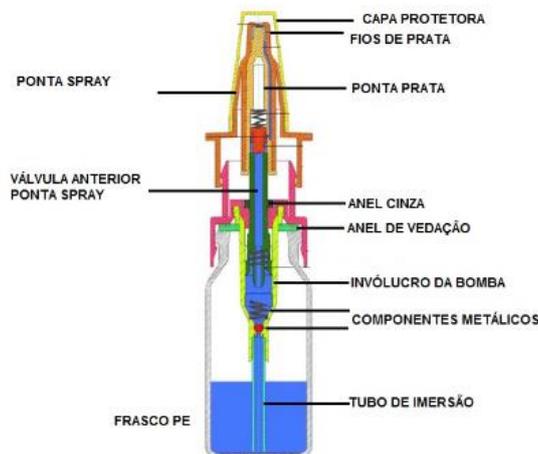


Figura 1 – Sistema de embalagem do spray nasal, adaptado ⁶

As vidrarias empregadas para preparação e análise dos extratos foram previamente descontaminadas em solução de ácido nítrico 5%. Os extratos foram obtidos por refluxo em carrossel (Radleys12 Plus) acoplado à banho termostático (Alpha RA8) a 90°C durante 3 horas, a partir dos componentes individuais em 20mL de isopropanol, sendo 1 componente inteiro por frasco e um branco para controle, conforme figura 2. Após término da extração, os extratos foram concentrados até *secura* e diluídos em 1mL de solução padrão de Bisfenol A com concentrações entre 1,5 e 67 µg/mL, de acordo com o AET requerido para cada componente.

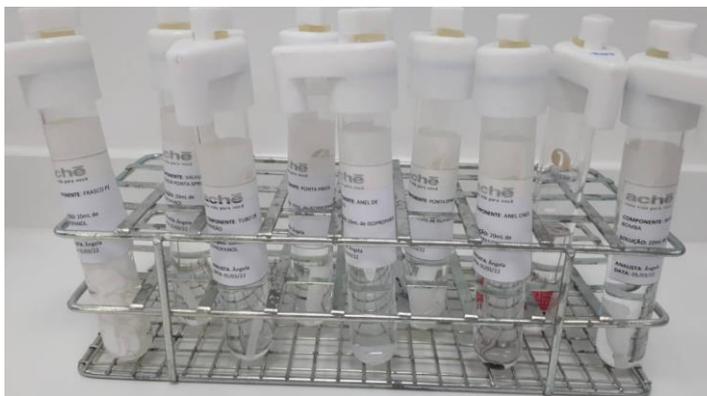
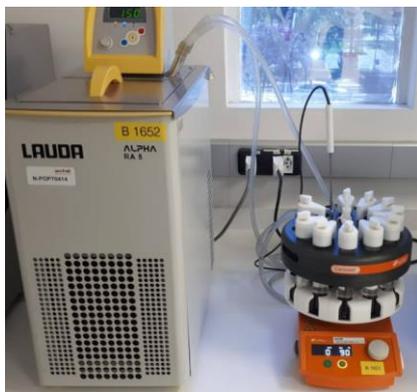


Figura 2 – Preparação dos extratos em carrossel dos componentes individuais da embalagem primária de um spray nasal em isopropanol

Cada extrato foi analisado individualmente por injeção direta em Cromatógrafo a gás Agilent 7890B Series GC (Agilent Santa Clara, CA, USA) acoplado a detector de massas 5977B Quadrupolo (Agilent Santa Clara, CA, USA) e equipado com coluna HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). As condições cromatográficas seguiram conforme descrito: 40°C por 1 minuto, com aquecimento subsequente de 12°C/minuto até 320°C, manteve-se esta temperatura final por 15 minutos; gás de arraste Hélio fluxo de 1,2 mL/minuto; temperatura do injetor de 300°C; modo *splitless*, *liner* 250µL, temperatura da linha de transferência 320°C, fonte de ionização por

elétrons 70 eV, temperatura da fonte 300°C, temperatura do quadrupolo 150°C, intervalo de detecção do MS 33-650 (m/z).

O índice de retenção de linear (IR) foi calculado de acordo com Dool e Kratz⁷, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma Aldrich, C8-C40) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras. A identificação dos compostos semivoláteis foi realizada através da comparação dos índices de retenção, espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento (NIST 08/Willey 2014) e literatura^{8,9}.

A avaliação de toxicidade para os compostos identificados foi feita através do software de predição *in silico* Derek e Sarah Nexus[®] da Lhasa Limited (Leeds, Reino Unido, Nexus 2.3.0).

Resultados e discussão

A Tabela 1 contém a composição química e a classificação atribuída pelo *International Council for Harmonisation* guia M7 (ICH M7), que trata da avaliação e controle de impurezas reativas de DNA (mutagênicas) em produtos farmacêuticos para limitar o potencial cancerígeno¹⁰.

As substâncias semivoláteis estão presentes no extrato de isopropanol, dos componentes individuais do material de embalagem, reportadas acima do AET, considerando-se o *Safety Concern Threshold* (SCT) de 0,15 µg/dia.

Os compostos majoritários presentes na maioria dos componentes individuais do sistema de embalagem são hidrocarbonetos alifáticos hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano, hexacosano e octacosano, seguidos dos ácidos graxos, ácido palmítico e ácido esteárico, e um monômero cíclico do Nylon-6, 1,8-diaza-ciclotetradecano-2,7-diona.

Tabela 1. Compostos semivoláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear.

Composto	IR ^a	IR _{Lit.} ^b	Classe ICH M7	Parte da Embalagem							
				% Área							
				PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	PS
Dietilenoglicol	969	941	*	0,84	-	-	-	-	-	-	-
Tetradecano	1402	1400	5	6,24	-	-	-	-	-	-	-
Pentadecano	1501	1500	5	0,72	-	-	-	-	-	-	-
NI	1544	-	-	-	1,66	-	-	-	-	-	1,04
Hexadecano	1601	1600	5	11,71	-	3,20	2,98	-	2,92	-	2,96
Heptadecano	1701	1700	5	0,81	-	-	-	-	-	-	-
NI	1715	-	-	-	1,35	-	-	-	-	-	1,44
NI	1745	-	5	-	-	-	-	-	-	-	1,25
NI	1758	-	-	-	2,19	-	-	-	-	1,70	3,19
NI	1773	-	5	0,57	-	-	-	-	-	-	0,56
NI	1781	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,59
Octadecano	1802	1800	5	11,70	3,98	8,84	4,29	-	10,80	-	3,12
Palmitato metila	1929	1925	5	-	-	-	-	-	0,56	-	-

^aÍndice de Retenção Calculado, ^bÍndice de Retenção da Literatura, PE: frasco de polietileno, TI: tubo de imersão, IB: invólucro da bomba, AV: anel de vedação, AC: anel cinza, VPS: válvula da ponta do spray, PP: ponta próxima ao fio de prata, PS: ponta spray, NI: não identificado, *Não se enquadra no escopo do ICH M7 (*International Council for Harmonisation*), para avaliação e controle de impurezas reativas de DNA (mutagênicas) em produtos farmacêuticos para limitar o potencial cancerígeno.

Tabela 1. Compostos semivoláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear. (Cont.)

Composto	IR ^a	IRLit. ^b	Classe ICH M7	Parte da Embalagem								
				% Área								
				PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	OS	
2,6,10,15-tetrametil-heptadecano	1930	1914	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,15
7,9-Di- <i>terc</i> -butil-1-oxaspiro(4.5)deca-6,9-dieno-2,8-diona	1934	1929	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55
3-[3,5- <i>bis</i> (1,1-dimetiletil)-4-hidróxi-fenil]-propionato de metila	1954	1943	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,58
Ácido palmítico	1961	1962	5	2,86	1,67	1,53	-	-	-	-	1,99	7,60
NI	1972	-	5	-	-	-	-	-	-	-	2,05	-
NI	1974	-	-	0,58	3,60	1,19	-	-	-	-	-	3,11
NI	1988	-	-	-	1,81	-	-	-	-	-	-	1,80
NI	1997	-	-	0,68	-	1,32	-	-	-	-	1,90	0,91
Eicosano	2002	2000	5	9,00	2,19	11,34	-	-	-	13,92	-	1,65
NI	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74
NI	2020	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83
2-metil-eicosano	2066	2063	5	-	1,60	-	-	-	-	-	-	-
NI	2082	-	-	3,02	-	-	-	-	-	-	-	-
Estearato de metila	2131	2130	5	-	-	0,99	-	-	-	1,04	-	-
NI	2145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,39
Ácido esteárico	2169	2180	5	4,04	-	1,99	-	-	-	-	-	11,23
NI	2177	2171	-	-	1,44	-	-	-	-	-	-	0,72
NI	2187	-	-	-	2,15	-	-	-	-	-	-	2,84
Docosano	2201	2200	5	6,46	2,05	10,11	-	-	-	14,11	-	1,86
NI	2209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,69
2-Hidroxi- <i>etil</i> -palmitato	2245	2220	5	-	-	-	-	-	-	-	-	3,99
NI	2258	-	-	-	-	-	-	-	-	2,32	-	-
1,8-Diaza-ciclotetradecano-2,7-diona	2278	-	3	1,96	20,16	4,95	10,57	-	-	-	23,38	6,04
Tricosano	2300	2300	5	-	2,72	1,27	-	-	-	-	-	0,55
7-hexil-eicosano	2359	2542	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,72
NI	2375	-	-	-	-	-	-	-	-	0,85	-	-
NI	2391	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,58
Tetracosano	2404	2400	5	6,44	-	11,16	-	-	-	14,01	-	1,59
NI	2415	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83
NI	2429	-	-	3,08	-	-	-	-	-	-	-	0,55
NI	2443	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,79	-
NI	2449	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,43
7-hexil-docosano	2465	2542	5	-	-	-	2,91	-	-	-	-	-

Tabela 1. Compostos semivoláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear. (Cont.)

Composto	IR ^a	IRLit. ^b	Classe ICH M7	Parte da Embalagem							
				% Área							
				PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	PS
NI	2539	-	-	-	-	-	-	-	-	1,69	-
NI	2576	-	-	-	-	-	-	-	0,86	-	-
Hexacosano	2604	2600	5	3,86	-	8,08	-	-	11,68	-	-
NI	2611	-	-	-	2,94	-	-	-	-	-	0,85
NI	2630	-	-	-	-	-	-	-	-	1,97	-
11-decil-tetracosano	2667	-	5	-	1,38	-	3,13	-	-	-	-
Heptacosano	2706	2700	5	2,35	-	-	-	-	-	-	-
β-monoestearato de glicerila	2727	2697	5	-	-	0,83	-	-	-	-	-
NI	2777	-	-	-	-	-	-	-	0,69	-	-
Octacosano	2803	2800	5	3,13	-	5,94	-	-	8,87	-	-
NI	2815	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-
NI	2828	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,70
NI	2856	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,81
NI	2911	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50
NI	2947	-	-	1,65	-	-	-	-	-	-	-
NI	2978	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-
Triacotano	3005	3000	5	2,16	-	4,10	-	-	6,36	1,78	-
NI	3042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,58
NI	3070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,16
NI	3172	-	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-
Dotriacontano	3205	3200	5	1,42	-	2,59	-	-	4,30	-	-
NI	3385	-	-	0,68	-	-	-	-	-	-	-
Tetriacontano	3405	3400	5	0,83	-	1,20	-	-	2,28	-	-
Fosfito de tris(2,4-terc-butilfenila)	3453	3397	5	-	-	-	-	-	-	11,87	-
Hexatriacontano	3602	3600	5	-	-	-	-	-	1,19	-	-
NI	3609	-	-	0,54	-	-	-	-	-	-	-
NI	3614	-	-	0,61	4,97	1,59	6,51	-	-	2,77	-
NI	3619	-	-	-	-	1,37	-	-	-	1,84	-

A predição toxicológica *in silico* permite uma classificação dos diferentes compostos com respeito ao potencial mutagênico e carcinogênico, baseada nas diretrizes do ICH M7¹⁰. Nesta avaliação, todos os compostos encontrados foram classificados como classe 5, exceto para 1,8-Diazaciclodecane-2,7-diona, pertencente à classe 3, e dietilenoglicol que é conhecido carcinogênico, mas não mutagênico, ou seja, não se enquadra no escopo do ICH M7 e deve ser controlado no limite da dose tóxica mediana (TD₅₀) de 849 mg/Kg/dia¹¹. Todos os compostos devem ser investigados no medicamento como potenciais lixiviáveis, levando-se em conta que os dados obtidos são provenientes de um estudo de extração controlada representativo de pior caso.

Conclusões

A análise dos compostos semivoláteis presentes no material de embalagem primária de um spray nasal, identificou a presença de 55 compostos, sendo majoritários os hidrocarbonetos alifáticos, seguidos de ácidos graxos e um monômero cíclico do Nylon-6.

A avaliação de toxicidade dos compostos semivoláteis identificados, foi obtida através da predição *in silico*, indicando que a maioria dos compostos não possuem alerta estrutural para mutagenicidade, ou seja, classe 5. O composto 1,8-diaza-ciclotetradecano-2,7-diona, foi classificado como classe 3 e o composto dietilenoglicol é conhecido como carcinogênico, mas não mutagênico, ou seja, não se enquadra no escopo do ICH M7 e deve ser controlado no limite de TD₅₀ 849 mg/Kg/dia, sendo a dose administrada capaz de provocar toxicidade em 50% dos casos. Todos os compostos serão investigados no medicamento como potenciais lixiviáveis, uma vez que os dados obtidos são provenientes de um estudo de extração controlada, sendo neste estudo um extrato orgânico representativo de pior caso.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio do Aché Laboratórios Farmacêuticos, Agilent Technologies do Brasil e Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Referências

1. Jenke, D. et al. *PDA J Pharm Sci and Tech* **2017**, 71, 68.
2. Rodriguez, L. C. et al. *Int. J. Pharm.* **2020**, 583. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119332>.
3. Jenke, D. et al. *PDA J Pharm Sci and Tech* **2013**, 67, 448-511.
4. Moyer, K. L., et al. *Specification of Drug Substances and Products : Extractables and Leachables*. Oxford : Elsevier **2020**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102824-7.00020-8>
5. Broschard, T. et al. *Regul Toxicol.. Pharmacol.* **2016**, 81, 201-211
6. Klocker, N., et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 489-493.
7. Dool, V. D. H., Kratz, P. D. *J. Chromatogr. A* **1963**, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
8. Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectrometry*. Academic Press: New York **2007**. ISBN 978-1-932633-21-4
9. NIST. National Institute of Standards and Technology. US. Department of Commerce. <https://webbook.nist.gov>, disponível em outubro de 2022.
10. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>, disponível em outubro de 2022.
11. Fitzhugh, O. G., Nelson A. A. *J. Ind. Hyg Toxicol.* **1946**, 28, 40-43.