

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO**

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO EM FOSAMPRENAVIR**

**Alfenas/MG**

**2017**

**CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO**

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO EM FOSAMPRENAVIR**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.  
Orientador: Marcello Garcia Trevisan

**Alfenas/MG**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Cordeiro, Cleudson Finotti.

Estudos de pré-formulação em fosamprenavir / Cleudson Finotti  
Cordeiro. – Alfenas - MG, 2017.  
126 f.

Orientadora: Marcello Garcia Trevisan.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade  
Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Estabilidade de Medicamentos. I. Trevisan, Marcello Garcia.  
II. Título.

CDD-543.8

**CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO**

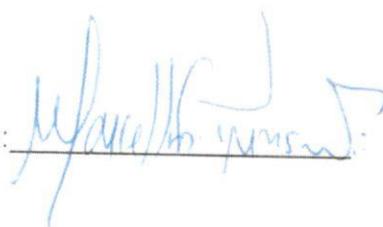
**“ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO EM FOSAMPRENAVIR”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 28/04/2019

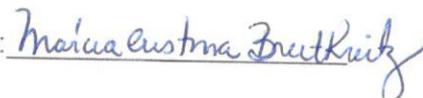
Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



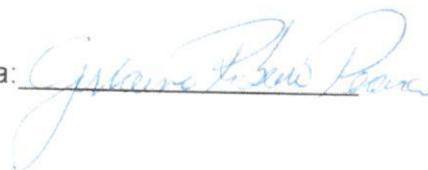
Profa. Dra. Márcia Cristina Bretkreitz  
UNICAMP

Assinatura:



Profa. Dra. Gislaíne Ribeiro Pereira  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



*Á Daniela pelo apoio, companheirismo,  
amor e cumplicidade e à pequena Manuela  
que há 3 anos completa nossas vidas com  
seus sorrisos, encantos e magia.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as pessoas especiais que coloca ao longo do meu caminho.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e que nunca mediram esforços para ajudar no que fosse preciso. Agradeço pelo amor, carinho, dedicação, paciência e por estarem sempre ao meu lado.

A toda a minha família, tios, primos, sobrinhos e agregados por fazerem parte da minha caminhada. Tio Edinho e Pretinha, como vocês fazem falta. Estejam em paz.

Aos meus irmãos, que mesmo distantes, estão sempre presentes.

À Daniela, por compreender minhas ausências, pela paciência, companheirismo, carinho e amor. Obrigado por sempre me apoiar e incentivar. Sem você esta etapa não seria possível.

Aos colegas do LACFar por toda ajuda e apoio.

Aos colegas do LTA pelo incentivo e ajuda nos momentos em que precisei.

A todos os professores, dessa e de tantas outras jornadas, pelos conhecimentos passados, pela paciência e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan por toda ajuda na execução desse trabalho.

À FAPEMIG e CNPQ pelo suporte financeiro e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao Instituto de Química da Unicamp e aos laboratórios de cristalografia da UNIFAL e UFJF pelas análises realizadas.

Aos membros da banca pela disponibilidade, correções e críticas.

## RESUMO

Estudos de pré-formulação compreendem uma etapa relevante do processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Englobam ensaios de caracterização físico-química e avaliação da estabilidade do fármaco. No presente trabalho foram avaliadas a estabilidade polimórfica do fármaco fosamprenavir cálcio e sua estabilidade química através de ensaios de degradação forçada e estudos de compatibilidade fármaco-excipiente. O fosamprenavir cálcio foi obtido a partir do medicamento Telzir® e caracterizado pelas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia no infravermelho (FTIR), espectrometria de massas (EM), difratometria de raios X em pó (PXRD), difratometria de raios X em monocristal (SXRD), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em seguida foi desenvolvido um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificar a pureza do fármaco obtido, avaliar sua estabilidade intrínseca através de estudos de degradação forçada e ser utilizado nos ensaios de compatibilidade. O fármaco obtido apresentou pureza cromatográfica de 99,95%, compatível para ser utilizado como padrão de trabalho. Nos estudos de degradação forçada, o fosamprenavir demonstrou ser estável às condições avaliadas de calor, umidade, luz e hidrólise neutra. Apresentou degradação significativa quando submetido à hidrólise ácida, básica e solução oxidativa. Dentre os produtos de degradação detectados, dois tiveram suas estruturas determinadas através de experimentos de espectrometria de massas sequencial e seus mecanismos reacionais foram propostos. Nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente as amostras foram analisadas imediatamente após o seu preparo empregando as técnicas de FTIR e CLAE. Posteriormente foram incubadas em câmara de estabilidade a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa e analisadas novamente após 3 e 6 meses de incubação. O fosamprenavir cálcico demonstrou ser compatível quimicamente com os excipientes povidona K-30, crospovidona, croscarmelose sódica, opadry rosa, amido glicolato de sódio, estearato de magnésio e sílica anidra coloidal. Na avaliação da estabilidade polimórfica do fármaco, os resultados das amostras 3 e 6 meses de incubação foram comparados com os resultados iniciais. Foram empregadas as técnicas de FTIR e PXRD. Os resultados demonstraram que a forma cristalina I do fosamprenavir cálcico é estável nas condições avaliadas.

Palavras chave: Fosamprenavir. Compatibilidade. Estabilidade. Produtos de degradação.

## ABSTRACT

Preformulation studies comprise a relevant stage of the drug research and development process. They include solid-state physical-chemical characterization and evaluation of drug stability. The present study evaluated the polymorphic stability of the drug fosamprenavir calcium and its chemical stability through forced degradation tests and drug-excipient compatibility studies. Fosamprenavir calcium was obtained from Telzir® and characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), spectroscopy Fourier Transform infrared (FTIR), mass spectrometry (MS), powder X-ray diffraction (PXRD), single X-ray diffraction (SXRD), thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM). A stability indicating high performance liquid chromatography (HPLC) method was development and used to verify the purity of fosamprenavir calcium obtained, to evaluate its intrinsic stability through forced degradation studies and to be employed in the compatibility tests. The obtained drug showed a chromatographic purity of 99.95%, compatible to be used as working standard. On forced degradation studies, fosamprenavir was stable under thermal, humidity, photolysis and neutral hydrolysis. Significant degradation was observed when the drug was subject to acid and base hydrolysis and oxidative conditions. Two degradation products were characterized by tandem mass spectrometry and their reactional mechanisms were proposed. On the drug-excipient compatibility studies the samples were analyzed immediately after preparation using FTIR and HPLC. Afterwards they were incubated in a stability chamber at  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $75\% \pm 5\%$  of relative humidity and analyzed again after 3 and 6 months of incubation. Fosamprenavir calcium has shown to be chemically compatible with the excipients povidone K-30, crospovidone, croscarmellose sodium, opadry, starch, magnesium stearate and colloidal anhydrous silica. For the evaluation of the polymorphic stability of the drug, the results of incubated samples were compared with the initial results by FTIR and PXRD. The results demonstrated that the crystalline form I of fosamprenavir calcium is stable under the conditions evaluated.

Key words: Fosamprenavir. Compatibility. Stability. Degradation products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação dos inibidores de protease .....	22
Figura 2 - Estrutura química do fosamprenavir cálcico .....	23
Figura 3 - Proposta de classificação das formas no estado sólido para insumos farmacêuticos ativos - IFA`s .....	29
Figura 4 - Fatores que afetam a compatibilidade fármaco-excipiente .....	45
Figura 5 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para o fármaco extraído do medicamento .....	65
Figura 6 - Espectro DEPT-135 obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir® .....	66
Figura 7 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir® .....	67
Figura 8 - Mapa HSQC (extensão 1) obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir® .....	68
Figura 9 - Mapa HSQC (extensão 2) obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir® .....	69
Figura 10 - Espectro de infravermelho descrito para a forma cristalina I do fármaco fosamprenavir cálcico .....	71
Figura 11 - Espectro de absorção no infravermelho na faixa de $4000$ a $400\text{ cm}^{-1}$ obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir® .....	71
Figura 12 - Espectro de íons produto obtido para o fosamprenavir cálcico extraído do medicamento Telzir® .....	73
Figura 13 - Perfil de fragmentação do fosamprenavir baseado nos estudos MS/MS .....	73
Figura 14 - Difrátogramas fosamprenavir cálcico na formulação do medicamento Telzir® e após o procedimento de extração. Medidas de $2\theta$ entre $3^\circ$ e $40^\circ$ , $40\text{ KV}$ , $30\text{ mA}$ e $\text{Cu-K}\alpha$ ( $1,54178$ ) .....	74
Figura 15 - Difrátograma fosamprenavir cálcico forma I. Medidas de $2\theta$ entre $3^\circ$ e $40^\circ$ , $45\text{ KV}$ , $40\text{ mA}$ , $\text{K}\alpha\text{ Cu}$ ( $1,54$ ), detector Xceletor .....	75
Figura 16 - Representação da unidade assimétrica do fosamprenavir cálcico com átomos identificados. Moléculas de água, íon cálcio e átomos de hidrogênio omitidos .....	77
Figura 17 - Representação da unidade assimétrica do fosamprenavir cálcico .....	77

Figura 18 - Visualização da estrutura cristalina do fosamprenavir cálcico, evidenciando a presença de duas moléculas de água de coordenação terminais e uma em ponte conectando dois átomos de cálcio.....	78
Figura 19 - Representação do empacotamento do fosamprenavir cálcico evidenciando a presença de vacâncias no interior da cela unitária .....	78
Figura 20 - Representação do empacotamento do fosamprenavir cálcico evidenciando a presença de moléculas de água de hidratação ocupando as vacâncias no interior da cela unitária .....	79
Figura 21 - Representação da operação de simetria entorno do eixo helicoidal de ordem 3 evidenciando as rotações de 120°.....	79
Figura 22 - Visualização do polímero de coordenação ao longo do eixo c da cela unitária, evidenciando o crescimento da cadeia na direção [001].....	80
Figura 23 - Comparação entre o difratograma obtido experimentalmente por PXRD para o fosamprenavir cálcico e o difratograma simulado pelo software MERCURY para a estrutura determinada do fármaco.....	81
Figura 24 - Curvas térmicas. TG e DTG na faixa de 30°C a 600°C e DSC na faixa de 30°C a 350°C. Ambos com razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min <sup>-1</sup> .....	82
Figura 25 - Curvas térmicas obtidas para a forma I do fosamprenavir cálcico submetida à temperatura de 100°C por 5 horas em vácuo. TG na faixa de 30°C a 500°C e DSC na faixa de 30°C a 350°C. Ambos com razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min <sup>-1</sup> .....	83
Figura 26 - Eletrofotomicrografias do fosamprenavir cálcico extraído do medicamento Telzir®.....	84
Figura 27 - Cromatogramas da solução amostra (0,2 mg.mL <sup>-1</sup> ) e Branco. Fase móvel tampão acetato 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20 µL, fluxo de 1,1 mL.min <sup>-1</sup> e detecção em 266 nm.....	86
Figura 28 - Curva analítica para o fosamprenavir construída com 7 pontos em triplicata de injeção. Fase móvel tampão acetato 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20 µL, fluxo de 1,1 mL.min <sup>-1</sup> e detecção em 266 nm.....	89

Figura 29 - Gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente para avaliação do modelo de regressão obtido.....	89
Figura 30 - Cromatogramas dos perfis de degradação do fosamprenavir. Fase móvel tampão acetato 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, fluxo de 1,1 mL.min <sup>-1</sup> e detecção em 266 nm.....	94
Figura 31 - Espectro de íons produto obtido para o íon m/z 472. Ionização por electrospray, modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização (100 L.h <sup>-1</sup> ) e gás de secagem (200 L.h <sup>-1</sup> ), temperatura da linha de dessolvatação 250°C, temperatura da fonte 120°C, tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV.....	95
Figura 32 - Perfil de fragmentação do íon m/z 472 baseado nos estudos MS/MS .....	96
Figura 33 - Espectro de íons produto obtido para o íon m/z 530. Ionização por electrospray, modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização (100 L.h <sup>-1</sup> ) e gás de secagem (200 L.h <sup>-1</sup> ), temperatura da linha de dessolvatação 250°C, temperatura da fonte 120°C, tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV.....	96
Figura 34 - Perfil de fragmentação do íon m/z 530 baseado nos estudos MS/MS .....	97
Figura 35 - Espectro de íons produto obtido para o íon m/z 584. Ionização por electrospray, modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização (100 L.h <sup>-1</sup> ) e gás de secagem (200 L.h <sup>-1</sup> ), temperatura da linha de dessolvatação 250°C, temperatura da fonte 120°C, tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV .....	97
Figura 36 - Mecanismo proposto para formação do íon de m/z 472: Hidrólise do grupo carbamato em meio básico - mecanismo E1cb .....	99
Figura 37 - Mecanismo proposto para formação do íon de m/z 472: Hidrólise do grupo carbamato em meio ácido .....	100
Figura 38 - Mecanismo proposto para formação do íon de m/z 530: Reação de transesterificação do tipo alcoólise catalisada por base. ....	101
Figura 39 - Comparação entre os espectros de absorção no infravermelho para amostras de tempo inicial em temperatura ambiente. ....	102
Figura 40 - Cromatogramas das amostras de tempo inicial (não submetidas às condições de estresse). Fase móvel tampão acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna	

	C8, volume de injeção 20 $\mu\text{L}$ , fluxo de 1,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 266 nm. Resultados: Média (%) $\pm$ coeficiente de variação entre as injeções.....	103
Figura 41 -	Espectros de absorção no infravermelho para fármaco fosamprenavir cálcico. Amostras de tempo inicial, 3 e 6 meses de incubação a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Espectros em temperatura ambiente. ....	104
Figura 42 -	Comparação entre os espectros de absorção no infravermelho para amostras de 3 meses de incubação a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Espectros em temperatura ambiente.....	106
Figura 43 -	Comparação entre os espectros de absorção no infravermelho para amostras de 6 meses de incubação a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Espectros em temperatura ambiente.....	107
Figura 44 -	Cromatogramas das amostras de 3 meses de incubação a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Fase móvel tampão acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20 $\mu\text{L}$ , fluxo de 1,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 266 nm. Resultados: Média (%) $\pm$ coeficiente de variação entre as injeções.....	108
Figura 45 -	Cromatogramas das amostras de 6 meses de incubação à $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Fase móvel tampão acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20 $\mu\text{L}$ , fluxo de 1,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 266 nm. Resultados: Média (%) $\pm$ coeficiente de variação entre as injeções.....	109
Figura 46 -	Representação gráfica dos resultados finais do estudo de estabilidade acelerada, evidenciando uma possível interseção entre os intervalos de confiança de todas as amostras, indicando ausência de diferenças significativas.....	111
Figura 47 -	Difratogramas fosamprenavir cálcico. Amostra de tempo inicial, 3 e 6 meses de incubação a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Medidas de $2\theta$ entre $3^{\circ}$ e $40^{\circ}$ , 40 KV, 30 mA e Cu-K $\alpha$ (1,54178).....	112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aspectos relacionados à estabilidade de fármacos e medicamentos.....	40
Tabela 2 - Condições de degradação utilizadas na avaliação da estabilidade intrínseca do fosamprenavir cálcico .....	60
Tabela 3 - Atribuições dos mapas HSQC obtidos para o fármaco extraído do medicamento Telzir®.....	69
Tabela 4 - Atribuições das bandas do espectro infravermelho aos grupos correspondentes na molécula de fosamprenavir cálcico .....	72
Tabela 5 - Principais dados cristalográficos do fosamprenavir cálcico .....	75
Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos da solução amostra de fosamprenavir (0,2 mg.mL <sup>-1</sup> ) .....	86
Tabela 7 - Resultados dos parâmetros de precisão e exatidão.....	90
Tabela 8 - Variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez .....	92
Tabela 9 - Efeitos das variáveis temperatura da coluna, fluxo, pH, comprimento de onda, fornecedor de acetonitrila, conteúdo de acetonitrila e concentração de tampão na fase móvel na quantificação do fosamprenavir.....	93
Tabela 10 - Resultados finais estudo de estabilidade acelerada .....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	-Ácido desoxirribonucleico
AIDS	-Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> )
ANVISA	-Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	-Ácido ribonucleico
ATR	- <i>Attenuated total reflectance</i>
CLAE	-Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	-Coeficiente de variação
DEPT	-Intensificação sem distorção por transferência de polarização (do inglês: <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> )
DSC	-Calorimetria exploratória diferencial (do inglês: <i>Differential scanning calorimetry</i> )
DMSO	-Dimetilssulfóxido
EM	-Espectrometria de massas
EMA	- <i>European Medicines Agency</i>
eV	-elétron-volt
E1cb	-Eliminação unimolecular com base conjugada
FAR	-Infravermelho distante
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	-Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transform infrared</i> )
HIV	-Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HSQC	-Correlação heteronuclear de um único quantum (do inglês: <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> )
IC	-Intervalo de confiança
ICH	- <i>International Conference on Harmonization</i>

IFA	-Insumo farmacêutico ativo
IP	-Inibidores de protease
K'	-Fator de retenção
KV	-Quilovolt
Labic	-Laboratório interdisciplinar de química
LACFar	-Laboratório de análise e caracterização de fármacos
MEV	-Microscopia eletrônica de varredura
MID	-Infravermelho médio
MRM	-Monitoramento de reações múltiplas (do inglês: <i>Multiple reaction monitoring</i> )
MS/MS	-Espectrometria de massas sequencial
<i>m/z</i>	-Relação massa carga
NIR	-Infravermelho próximo
PA	- <i>pro analyse</i>
PD	-Produto de degradação
PR	-Protease reversa
PXRD	-Difratometria de raios X em pó (do inglês: <i>Powder X-ray diffraction</i> )
QSAR	- <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>
RDC	-Resolução da diretoria colegiada
RE	-Resolução
RMN	-Ressonância magnética nuclear
rpm	-Rotações por minuto
SXRD	-Difratometria de raios X por monocristal (do inglês: <i>Single X-ray Diffraction</i> )
TG	-Termogravimetria (do inglês: <i>Thermogravimetry</i> )
TR	-Transcriptase reversa
TRR	-Tempo de retenção relativo

UHPLC	-Cromatografia líquida de ultra e alta performance (do inglês: <i>Ultra and High Performance Liquid Chromatography</i> )
UV	-Ultravioleta
v/v	-volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA.....	20
2.2	FOSAMPRENAVIR CÁLCICO .....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Revisão sobre métodos analíticos relacionados ao fosamprenavir</b> .....	24
<b>2.2.2</b>	<b>Polimorfismo e formas sólidas do fosamprenavir cálcico</b> .....	27
2.3	ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	31
<b>2.3.1</b>	<b>Caracterização físico-química</b> .....	32
2.3.1.1	Análises térmicas .....	33
2.3.1.1.1	<i>Termogravimetria</i> .....	34
2.3.1.1.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i> .....	35
2.3.1.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	36
2.3.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	38
2.3.1.4	Difratometria de raios X em pó.....	39
<b>2.3.2</b>	<b>Estabilidade intrínseca de fármacos e produtos de degradação</b> .....	39
<b>2.3.3</b>	<b>Compatibilidade fármaco-excipiente</b> .....	44
<b>2.3.4</b>	<b>Desenvolvimento de método analítico</b> .....	46
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	50
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS .....	52
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	52
4.3	REAGENTES .....	53
4.4	EXTRAÇÃO DO FÁRMACO FOSAMPRENAVIR CÁLCICO .....	54
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO.....	55
<b>4.5.1</b>	<b>Ressonância magnética nuclear</b> .....	55
<b>4.5.2</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier</b> .....	55
<b>4.5.3</b>	<b>Espectrometria de massas</b> .....	55
<b>4.5.4</b>	<b>Difratometria de raios X em pó</b> .....	56

4.5.5	<b>Difratometria de raios X em monocristal</b> .....	56
4.5.6	<b>Caracterização térmica</b> .....	57
4.5.7	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	58
4.6	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO FOSAMPRENAVIR POR CLAE.....	58
4.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE INTRÍNSECA .....	60
4.7.1	<b>Caracterização estrutural dos produtos de degradação</b> .....	61
4.8	ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE .....	62
4.9	ESTUDO DA ESTABILIDADE POLIMÓRFICA DO FÁRMACO .....	62
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
5.1	EXTRAÇÃO DO FÁRMACO FOSAMPRENAVIR CÁLCICO .....	63
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO.....	64
5.2.1	<b>Ressonância magnética nuclear</b> .....	64
5.2.1.1	Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de <sup>13</sup> C).....	64
5.2.1.2	DEPT-135 .....	65
5.2.1.3	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup> H).....	66
5.2.1.4	Correlação heteronuclear de um único quantum (HSQC) .....	67
5.2.2	<b>Espectroscopia no infravermelho</b> .....	70
5.2.3	<b>Espectrometria de massas</b> .....	72
5.2.4	<b>Difração de raios X em pó</b> .....	74
5.2.5.	<b>Determinação estrutural por difração de raios X em monocristal</b> .....	75
5.2.6.	<b>Análise térmica</b> .....	81
5.2.7	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	83
5.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO FOSAMPRENAVIR POR CLAE.....	84
5.3.1	<b>Seletividade</b> .....	86
5.3.2	<b>Limite de quantificação</b> .....	87
5.3.3	<b>Linearidade</b> .....	88
5.3.4	<b>Estabilidade da solução analítica</b> .....	89
5.3.5	<b>Precisão e exatidão</b> .....	90
5.3.6	<b>Intervalo</b> .....	91
5.3.7	<b>Robustez</b> .....	91
5.4	ESTABILIDADE INTRÍNSECA DO FÁRMACO .....	93
5.4.1	<b>Elucidação estrutural dos produtos de degradação</b> .....	94

<b>5.4.2</b>	<b>Predição dos mecanismos reacionais</b> .....	98
5.5	ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE .....	101
<b>5.5.1</b>	<b>Amostras de tempo inicial</b> .....	101
5.5.1.1	Análise por espectroscopia no infravermelho .....	101
5.5.1.2	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência .....	103
<b>5.5.2</b>	<b>Análise das amostras de 3 e 6 meses de incubação</b> .....	104
5.5.2.1	Análise por espectroscopia no infravermelho .....	104
5.5.2.2	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência .....	108
5.6	ESTUDO DA ESTABILIDADE POLIMÓRFICA .....	111
<b>5.6.1</b>	<b>Análise por espectroscopia no infravermelho</b> .....	111
<b>5.6.2</b>	<b>Análise por difratometria de raios X em pó</b> .....	112
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	113
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 36,7 milhões de pessoas em todo o mundo sejam portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Tais estimativas revelam um crescente aumento do número de infecções e, conseqüentemente, uma maior demanda à terapia antirretroviral de combate à síndrome. Entretanto, a mortalidade relacionada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) sofreu uma redução significativa nos últimos anos. Tal declínio pode ser atribuído parcialmente ao desenvolvimento de novos agentes antirretrovirais (RAO et al., 2014; UNAIDS/WHO, 2016).

Dentre estes, destaca-se o fosamprenavir cálcico, um pró-fármaco pertencente à classe dos inibidores da protease reversa, o qual é hidrolisado à sua forma ativa, o amprenavir. O fosamprenavir possui vantagens farmacocinéticas em relação ao amprenavir, como a elevada biodisponibilidade e maior solubilidade em água. Tais vantagens permitem uma melhor posologia e menores doses, facilitando a aderência dos pacientes ao tratamento (CORBETT; KASHUBA, 2002; GOODMAN; GILMAN, 2015).

Paralelamente ao desenvolvimento de novos fármacos, verifica-se nos últimos anos uma maior severidade das agências reguladoras quanto aos aspectos científicos e técnicos relacionados ao registro de medicamentos, de forma a garantir os parâmetros de segurança, eficácia e qualidade das preparações farmacêuticas (SINGH et al., 2012).

Um ponto crucial referente à qualidade dos produtos farmacêuticos é a estabilidade de fármacos. Estudos de estabilidade compreendem uma etapa relevante do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Iniciam-se nas fases de desenvolvimento de uma molécula candidata a fármaco e estendem-se por toda a vida de prateleira da formulação final (ABDALLAH; AL-GHOBASHY; LOTFY, 2015; ICH, 2003).

No início do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica, a estabilidade de fármacos deve ser avaliada através dos chamados estudos de pré-formulação. Estes estudos abrangem ensaios de caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de uma molécula sob diferentes aspectos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011; ICH, 2003).

Dentre os aspectos relacionados à estabilidade física de um fármaco, é relevante a avaliação de sua estabilidade polimórfica. Diferentes polimorfos de um mesmo composto podem apresentar propriedades físico-químicas distintas, as quais impactam diretamente nas características do fármaco e podem ser decisivas para o sucesso terapêutico de uma formulação. Sendo assim, a seleção de uma fase cristalina estável e com propriedades

adequadas é fundamental para a qualidade de uma preparação farmacêutica (SANTOS et al., 2016).

Do ponto de vista químico, a estabilidade de fármacos está relacionada à manutenção de sua integridade química e potência declarada. A decomposição do fármaco, causada por fatores intrínsecos ou extrínsecos, acarreta na diminuição da dose destinada ao paciente e na formação de produtos de degradação, os quais podem apresentar elevada toxicidade. Sendo assim, em estudos de pré-formulação, é fundamental a avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco objetivando conhecer seus subprodutos e determinar suas vias de degradação (BRASIL, 2012a). Além disso, a avaliação da estabilidade do fármaco na presença dos excipientes que se pretende utilizar consiste em uma etapa importante para a obtenção de uma formulação segura e eficaz (CARSTENSEN, 2002; KAUR; GOINDI; KATARE, 2016).

Embora aprovado e comercializado desde 2003, não foram encontrados artigos referentes à caracterização de polimorfos ou ensaios de pré-formulação para o fosamprenavir cálcico. Além disso, não foram verificados estudos abordando a determinação da estrutura cristalográfica das diferentes formas cristalinas do fármaco, o que consiste em uma importante ferramenta para o entendimento de suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou realizar estudos de pré-formulação com o fármaco fosamprenavir cálcico, abordando ensaios de caracterização físico-química e avaliação de sua estabilidade polimórfica e química. Esta última avaliada através de ensaios de degradação forçada e estudos de compatibilidade fármaco-excipiente.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Nos itens a seguir, é apresentada uma breve revisão dos tópicos abordados neste trabalho.

### 2.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida foi descrita inicialmente na década de 80. Em aproximadamente 37 anos, significativos avanços foram obtidos no combate à sua proliferação. Entretanto, a AIDS continua sendo um dos maiores problemas mundiais em saúde pública, comprometendo a saúde de milhões de pessoas em todo mundo, das quais 1,8 milhões são crianças (GRANICH et al., 2015; UNAIDS/WHO, 2016).

A AIDS constitui um conjunto de infecções e doenças oportunistas que podem se manifestar após a contaminação do organismo pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. O HIV é um retrovírus que apresenta predileção por glicoproteínas do tipo CD4 presentes na superfície de linfócitos, macrófagos e células dendríticas. Dentre os linfócitos T existe uma classe denominada T4 (T CD4+), que tem um papel de extrema importância no desencadear da resposta imunitária e na sua coordenação. Esse tipo de célula constitui o principal alvo do HIV e a sua destruição leva ao colapso do sistema imunológico e, conseqüentemente, ao aparecimento de doenças oportunistas, neurológicas, depressão da medula óssea, cânceres, lesões cardiovasculares, danos renais e, finalmente, a morte do paciente (KATZUNG, 2003; RANG; DALE; RITTER, 2001).

Dois tipos de retrovírus estão associados ao desenvolvimento da AIDS, o HIV tipo I (HIV-I) e o HIV tipo II (HIV-II). Ambos são semelhantes quanto à morfologia e tropismo celular, entretanto diferem principalmente quanto à virulência e transmissibilidade. O primeiro apresenta maiores taxas de viremia, sendo o responsável pela pandemia da AIDS. Já o segundo leva a uma evolução lenta da síndrome e está relacionado a casos esporádicos (SILVEIRA, 2011).

Na etapa inicial de replicação viral, o HIV liga-se aos receptores CD4 das células alvo utilizando glicoproteínas presentes no envelope do vírus e funde-se à célula hospedeira. Após a fusão, a enzima transcriptase reversa (TR) promove a transcrição de uma cadeia de ácido

desoxirribonucleico (ADN) a partir do ácido ribonucleico (ARN) viral. Além disso, a TR atua como uma enzima polimerase, produzindo uma segunda cadeia de ADN. A dupla fita de ADN penetra no núcleo da célula hospedeira e por ação da enzima integrase é incorporada ao genoma da célula. Utilizando os constituintes da célula hospedeira, proteínas virais são traduzidas e vírions imaturos são produzidos. Os vírions imaturos são liberados por brotamento. Durante essa etapa, a enzima protease cliva e estrutura as proteínas virais GAG e GAG-POL, tornando a partícula viral madura e capaz de infectar novas células (RANG; DALE; RITTER, 2001; ROSSI, 2011).

Em função do compartilhamento de diversos processos metabólitos da célula hospedeira, tornar-se difícil encontrar fármacos seletivos para o patógeno. Entretanto, existem algumas enzimas que são específicas do vírus, sendo utilizadas como alvos potenciais para fármacos (KATZUNG, 2003).

Atualmente seis diferentes classes de fármacos têm sido empregados no combate à AIDS, atuando em diferentes etapas do ciclo de replicação viral. Estes são classificados em inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa, inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa, inibidores de protease (IP), inibidores de fusão, inibidores de entrada antagonista do co-receptor CCR5 e inibidores da integrase (ROSSI, 2011).

A combinação de diferentes agentes antirretrovirais é recomendada para o tratamento de pacientes já nas etapas iniciais da infecção pelo HIV. Isso permite aumentar a potência dos fármacos e retardar o desenvolvimento de resistência do vírus (KATZUNG, 2003; UNAIDS/WHO, 2016). A terapia antirretroviral combinada foi introduzida em 1996, permitindo uma redução significativa da mortalidade e morbidade associadas à AIDS. Atualmente, devido às campanhas de conscientização e políticas de saúde pública mais efetivas, estima-se que aproximadamente 18 milhões de pessoas portadoras do vírus têm acesso a esse tipo de terapia (UNAIDS/WHO, 2016).

## 2.2 FOSAMPRENAVIR CÁLCICO

A elucidação das etapas de replicação do HIV permitiu um grande avanço no desenvolvimento de fármacos mais efetivos no combate à AIDS. Dentre esses, os inibidores de protease. A determinação da conformação gráfica tridimensional da protease reversa (PR) permitiu o desenvolvimento de moléculas capazes de interagir e ocupar de forma competitiva

o sítio ativo da enzima (FIGURA 1). Sendo assim, o excesso de fármaco no interior da célula em relação ao substrato natural, as poliproteínas virais, faz com que este ocupe os sítios ativos da PR, impedindo a replicação viral (SILVEIRA, 2011).

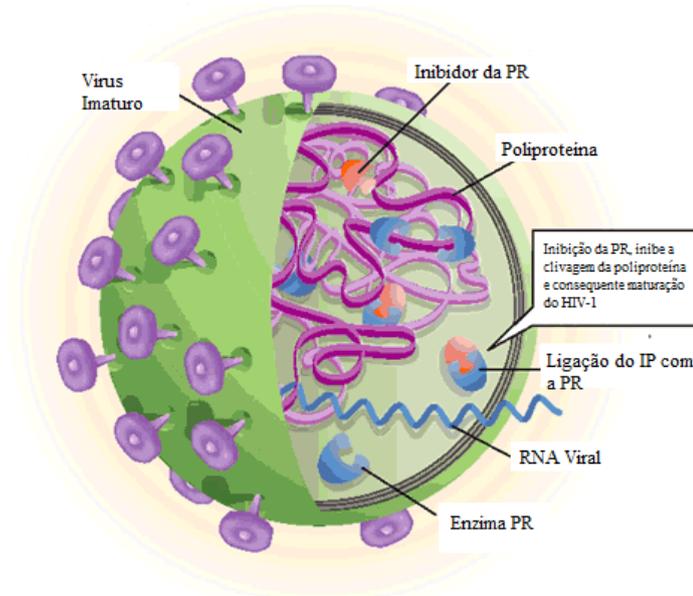


Figura 1 - Mecanismo de ação dos inibidores de protease.  
Fonte: Adaptada de [www.medscape.com](http://www.medscape.com)

O pró-fármaco fosamprenavir é um sal cálcico do éster de fosfato do inibidor de protease amprenavir. É produzido pelas indústrias *Vertex Pharmaceutical* e *GlaxoSmithKline*, sendo comercializado na forma de comprimidos e suspensão oral. O fosamprenavir é obtido a partir da fosforilação de uma hidroxila presente na molécula do amprenavir, objetivando aumentar a solubilidade do fármaco original (EMA, 2010; FURFUINE et al., 2004; GOODMAN; GILMAN, 2015).

O amprenavir é um fármaco de baixa solubilidade aquosa ( $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e alta permeabilidade. É comercializado sob o nome *Agenerase®*, o qual apresenta-se na forma de cápsulas gelatinosas contendo o amprenavir solubilizado em excipientes oleosos. Em função da baixa concentração da substância ativa (150 mg) por cápsula do *Agenerase®* e do regime posológico recomendado de 1200 mg, são necessárias 8 cápsulas do medicamento duas vezes ao dia, gerando grande desconforto por parte dos pacientes e falta de adesão ao tratamento (EMA, 2005).

A descoberta do fosamprenavir, um pró-fármaco do amprenavir, possibilitou uma redução no regime de dosagem (2 comprimidos/dia), uma vez que este possui solubilidade cerca de 10 vezes maior que o fármaco original (ROSSI, 2011). Além disso, sua utilização

não requer restrições alimentares conforme exigido para outros inibidores da protease previamente aprovados (GOODMAN; GILMAN, 2015; WIRE; SHELTON; STUDENBERG, 2006).

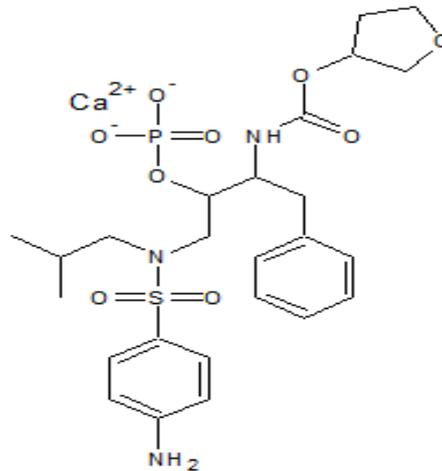


Figura 2 - Estrutura química do fosamprenavir cálcico.  
Fonte: Do autor.

O fosamprenavir cálcico é um dos mais recentes inibidores da protease viral utilizado para tratamento de pacientes infectados pelo HIV-1 (WIRE; SHELTON; STUDENBERG, 2006). Aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2003 e pela *European Medicines Agency* (EMA) em 2004, o fármaco passou a ser distribuído no Brasil a partir de 2007 (ROSSI, 2011).

A solubilidade do fosamprenavir cálcico em água é extremamente dependente do pH do meio. Apresenta baixa solubilidade em pH 7,0 ( $0,31 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e máxima em pH entre 3,0 e 4,0 ( $54 \text{ mg.mL}^{-1}$  em pH 3,3). Em função de sua baixa solubilidade aquosa em pH 7,0, o sal cálcico do fosamprenavir é denominado como tipo II na classificação bio-farmacêutica, caracterizada por fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade (FURFINE et al., 2004; ROSSI et al., 2011).

Assim como os demais inibidores de protease, a forma ativa do fosamprenavir liga-se ao sítio ativo da enzima do HIV-1, impedindo o processamento dos precursores virais das poliproteínas Gag e Gag-Pol e resultando na formação de vírions imaturos não infecciosos. Tal ação retarda o progresso da infecção pelo HIV e reduz a quantidade de vírus no corpo, melhorando o sistema imunológico e reduzindo o risco de desenvolver complicações associadas à infecção (CORBETT; KASHUBA, 2002).

Após administração oral, o fosamprenavir é rapidamente hidrolisado a amprenavir e fosfato inorgânico antes de atingir a circulação sistêmica. A conversão do fosamprenavir em amprenavir aparentemente ocorre no epitélio intestinal (FURFINE et al., 2004). O amprenavir possui alta ligação às proteínas plasmáticas (90%), ligando-se principalmente à glicoproteína- $\alpha 1$  ácida. O pico máximo de concentração plasmática é atingido entre 1,5 e 2,5 horas, apresentando tempo de meia-vida de eliminação de 7,7 horas (EMA, 2010; GOODMAN; GILMAN, 2015).

O fosamprenavir é utilizado normalmente em associação com outros antirretrovirais para ter seus efeitos farmacológicos amplificados. A co-administração fosamprenavir (700 mg) e ritonavir (100 mg), duas vezes ao dia, é indicada. Estudos farmacocinéticos demonstraram um aumento na concentração plasmática máxima de aproximadamente 51% e um aumento de 3 a 4 vezes na área sob a curva no intervalo entre doses, quando comparado à administração isolada do fármaco. Além disso, uma diminuição de 40% no volume aparente de distribuição foi observada, provavelmente devido ao aumento da biodisponibilidade do amprenavir (EMA, 2010; WIRE; SHELTON; STUDENBERG, 2006).

A principal via de eliminação da forma ativa do fármaco é a hepática, através do sistema enzimático CYP450, por oxidação e conjugação. Os metabólitos são excretados na urina (14%) e nas fezes (75%). Apenas 1% de amprenavir é excretado na urina na forma inalterada (CORBETT; KASHUDA, 2002; EMA, 2010; WIRE; SHELTON; STUDENBERG, 2006).

A maioria das interações medicamentosas clinicamente relevantes é devida à inibição da CYP450 pelo amprenavir (TORRES; ARDUINO, 2007). Dentre as reações adversas oriundas do uso do fármaco, destaca-se a ocorrência de náusea, diarreia, dor abdominal, vômitos e dor de cabeça. A maioria das reações adversas associadas com terapias de combinação, fosamprenavir/ritonavir, são ligeiras a moderadas em gravidade, precoces na manifestação e raramente limitantes quanto à adesão à terapêutica. As reações adversas mais graves, como erupções cutâneas, icterícia, hipersensibilidade e elevações das transaminases hepáticas, também são observadas (GOODMAN; GILMAN, 2015; MOTA et al., 2004).

### **2.2.1 Revisão sobre métodos analíticos relacionados ao fosamprenavir**

Diversos métodos são descritos na literatura para a análise do fosamprenavir. Os objetivos da quantificação do fármaco nos estudos e as técnicas analíticas empregadas são variados. A seguir são descritos alguns exemplos.

Furfine et al. (2004) realizaram estudos farmacocinéticos empregando sais de sódio e cálcio do fosamprenavir. Os autores concluíram que a forma sódica do fármaco não era adequada para formulações farmacêuticas por ser amorfa e higroscópica. O sal cálcico do fosamprenavir mostrou-se adequado, apresentando biodisponibilidade semelhante à do amprenavir quando administrado concomitantemente com acidificadores estomacais. Além disso, os autores verificaram que o fosamprenavir cálcico é hidrolisado em amprenavir e fosfato inorgânico antes de ser absorvido. Para a quantificação dos fármacos em plasma, foram utilizados diversos métodos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa associada a detectores do tipo fluorescência, ultravioleta e espectrometria de massas.

Rebiere et al. (2007) desenvolveram dois métodos por CLAE, empregando uma coluna C-18 e detecção por ultravioleta, para a quantificação do fosamprenavir juntamente com outros antirretrovirais de diferentes classes terapêuticas. Os autores concluíram que os métodos, quando empregados paralelamente, poderiam ser usados no controle de qualidade dos principais antirretrovirais disponíveis na época, sendo capazes de detectar adulterações em produtos farmacêuticos.

Gumustas e Ozkan (2010) desenvolveram dois métodos para quantificação do fosamprenavir por voltametria. Foram utilizados eletrodos de carbono vítreo e de diamante dopado com boro para avaliação do comportamento oxidativo do fármaco e quantificação do fosamprenavir em preparações farmacêuticas e amostras biológicas. Os métodos foram validados e os resultados comparados com os obtidos por outro método empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a detector do tipo ultravioleta. Não foram verificadas diferenças significativas entre os resultados. Os métodos eletroquímicos foram aplicados em amostras de plasma, urina e preparações farmacêuticas contendo o fosamprenavir. Os autores concluíram que os métodos desenvolvidos constituem uma boa alternativa para análise do fármaco, pois não requerem pré-tratamento da amostra e não sofrem interferência das matrizes avaliadas.

Rossi et al. (2011) desenvolveram um método discriminativo para a dissolução do fosamprenavir em comprimidos do medicamento Telzir®, baseando-se em dados *in vivo*. Para a formulação avaliada, a melhor condição obtida foi: cestos a 75 rpm e 900 ml de HCl 0,01 M. Utilizando essas condições, uma correlação nível A foi estabelecida ( $R^2 = 0,984$ ). A

cinética de dissolução foi determinada utilizando métodos de modelos-dependentes, sendo o modelo de liberação proposto por Hixson-Crowell o mais adequado. O ensaio de dissolução foi validado e segundo os autores pode ser aplicado para avaliar o perfil de dissolução de comprimidos contendo o fosamprenavir. Os autores quantificaram o fármaco pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Foi empregada uma coluna C-18 e fase móvel composta por tampão acetato de amônio e acetonitrila na razão 75: 25 v/v. O cromatógrafo foi operado com fluxo de  $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ . A detecção foi realizada em ultravioleta a  $264 \text{ nm}$ .

Chilukuri; Narayanareddy e Hussianreddy (2013) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação do fosamprenavir. Foi utilizada uma coluna YMC Pack ODS AQ ( $150 \times 4,6$ ) mm, partícula de  $3,0 \mu\text{m}$ , fase móvel composta por tampão fosfato de potássio  $0,05\text{M}$  (pH 6,8) e acetonitrila 60:40 (v/v), fluxo de  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , detecção em  $265 \text{ nm}$  e temperatura da coluna  $40^\circ\text{C}$ . Os autores avaliaram a estabilidade intrínseca do fármaco através de estudos de degradação forçada. Foram verificadas degradações significativas do fosamprenavir exposto à hidrólise ácida, básica e soluções oxidativas. No desenvolvimento do método analítico, foram utilizadas duas impurezas conhecidas do fármaco, as impurezas A e B. A primeira foi relatada como uma impureza de degradação. Já a segunda, uma impureza de síntese, correspondendo ao amprenavir. Os autores concluíram que o método apresentou resultados satisfatórios para todos os parâmetros analíticos validados, podendo ser aplicado no controle de qualidade de preparações contendo o fosamprenavir.

Ashrafi et al. (2013) desenvolveram um método eletroquímico para quantificação do fosamprenavir em meio hidroalcoólico e elucidaram seu mecanismo de oxidação. O comportamento eletroquímico do fármaco foi avaliado na presença e ausência do surfactante Triton X-100. Os autores verificaram que a amina aromática presente na molécula do fosamprenavir está relacionada com a oxidação do fármaco e que na presença de Triton X-100 os sinais eletroquímicos são amplificados em aproximadamente 5 vezes. O método desenvolvido foi aplicado satisfatoriamente na quantificação do fosamprenavir em amostras farmacêuticas.

Jacobs et al. (2014) avaliaram a interferência da combinação fosamprenavir/ritonavir nas propriedades farmacocinéticas do fármaco olanzapina, um antipsicótico utilizado normalmente por pacientes portadores do HIV. Segundo os autores, estudos realizados anteriormente demonstraram que o ritonavir, em altas dosagens, aumentava a taxa de eliminação da olanzapina. Entretanto, não se sabia o efeito do ritonavir quando administrado

em baixas dosagens e concomitantemente com o fosamprenavir nesses pacientes. Amostras de plasma foram analisadas por cromatografia líquida de ultra performance para quantificação dos fármacos envolvidos no estudo. Os autores concluíram que a administração de fosamprenavir 700 mg/ritonavir 100 mg induz o metabolismo da olanzapina e sugeriram um aumento de 50% na dose do antipsicótico quando administrado juntamente com inibidores de protease.

Não foram encontrados métodos descritos em compêndios oficiais para o fármaco fosamprenavir cálcico, nem tampouco artigos referentes a ensaios de pré-formulação.

### **2.2.2 Polimorfismo e formas sólidas do fosamprenavir cálcico**

O polimorfismo é definido como a capacidade de um determinado composto existir no estado sólido em mais de uma fase cristalina com diferentes arranjos e conformações de átomos, íons ou moléculas (ATICI; KARLIGA, 2015; BROG et al., 2013). Um ponto fundamental relacionado ao desenvolvimento de novos medicamentos é a determinação de qual estrutura cristalina do fármaco apresenta características adequadas para ser utilizada em uma preparação farmacêutica (PINDELSKA et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

Apesar do conceito de polimorfismo existir desde o século XVIII, o setor farmacêutico começou a estudá-lo com mais ênfase somente nas últimas décadas (ARAUJO et al., 2012; BROG et al., 2013). O assunto ganhou grande destaque após a descoberta de uma segunda forma cristalina do antirretroviral ritonavir em 1998. Apenas uma forma cristalina do fármaco, comercializado pela empresa *Abbott Laboratories* sob o nome de Norvir®, era conhecida. Entretanto, diversos lotes do medicamento apresentaram problemas no ensaio de dissolução. A investigação revelou a presença de um segundo polimorfo. A nova estrutura cristalina apresentava solubilidade reduzida em relação à primeira, afetando a biodisponibilidade do fármaco. A empresa suspendeu a produção do medicamento até a conclusão das investigações, implicando em grande prejuízo financeiro e comprometendo o tratamento de diversos pacientes que faziam uso do produto (BAUER et al., 2001).

Devido às diferenças estruturais, polimorfos de um mesmo composto podem apresentar propriedades físico-químicas distintas. Podem ser observadas diferenças de ponto de fusão, propriedades mecânicas, elétricas e ópticas, dureza, pressão de vapor, solubilidade, densidade, higroscopicidade, reatividade no estado sólido, estabilidade física, estabilidade

química e comportamento térmico. Como consequência, diversas características do fármaco podem ser afetadas, como por exemplo, a velocidade de dissolução, a morfologia do cristal, a compactação e o escoamento do pó (ATICI; KARLIGA, 2015; SILVA; SILVA; PEREIRA, 2017).

A influência do polimorfismo na solubilidade e, conseqüentemente, na biodisponibilidade do fármaco, é considerada a consequência mais relevante do fenômeno na área farmacêutica. Apresenta grandes impactos principalmente em fármacos das classes II e IV da classificação biofarmacêutica, os quais possuem baixa solubilidade (ARAUJO et al., 2012; SANTOS et al., 2016).

Mudanças em variáveis termodinâmicas tais como, pressão e temperatura, podem provocar alterações na forma cristalina de determinados fármacos. Além disso, formas polimórficas metaestáveis podem se converter em estruturas mais estáveis espontaneamente ou devido ao contato com excipientes (RENUKA; GULATI, 2014). Dessa forma, é relevante a avaliação da estabilidade polimórfica do fármaco em estudos de estabilidade e compatibilidade, tanto na matéria prima, para avaliar a influência das condições de estocagem, como na formulação, para avaliar a influência da presença de outros componentes.

Diante dos impactos que o polimorfismo pode acarretar na qualidade, eficácia e segurança de medicamentos, os órgãos reguladores têm atuado de modo a minimizar os riscos à população. Sendo assim, para o registro de medicamentos estão sendo exigidos estudos que comprovem o monitoramento e o controle de qualidade de formas cristalinas existentes (FDA, 2007; ICH, 1999).

Diferentes técnicas analíticas capazes de detectar alterações físico-químicas e espectroscópicas do fármaco no estado sólido têm sido empregadas na avaliação de possíveis alterações da estrutura cristalina (ZHAO; ZHENG; LI, 2016). As análises térmicas são capazes de detectar diferenças na estabilidade térmica e na temperatura e entalpia de fusão que podem existir entre diferentes formas polimórficas. A espectroscopia de absorção no infravermelho permite verificar alterações nos modos de frequência vibracional dos grupos funcionais de diferentes polimorfos. A microscopia óptica e a ressonância magnética nuclear (RMN) também são utilizadas (AYALA et al., 2010). Além dessas, destacam-se as técnicas de difração de raios X. Essas são capazes de determinar a estrutura cristalina de um composto pelo espalhamento elástico de fótons de raios X. Quando raios X de mesmo comprimento de onda se encontram em fase, ocorre uma interferência construtiva, a qual constitui um padrão difratométrico específico para cada estrutura cristalina (KARABAS; ORKOULA; KONTOYANNIS, 2007).

Apesar da importância do fenômeno, até o momento não existe um sistema internacional de nomenclatura para polimorfos. Além disso, grande divergência é observada quanto à definição de termos como polimorfo, sólido amorfo, hidratos e solvatos. Os guias da FDA e da *International Conference on Harmonization* (ICH) consideram, de modo geral, o termo polimorfismo como a ocorrência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco, abrangendo dentro do termo polimorfo, os solvatos, hidratos e substâncias amorfas (FDA, 2007; ICH, 1999). Uma crítica a essa terminologia foi realizada por Aitipamula et al. (2012) e uma nova proposta para definição das formas do estado sólido foi apresentada conforme a Figura 3.

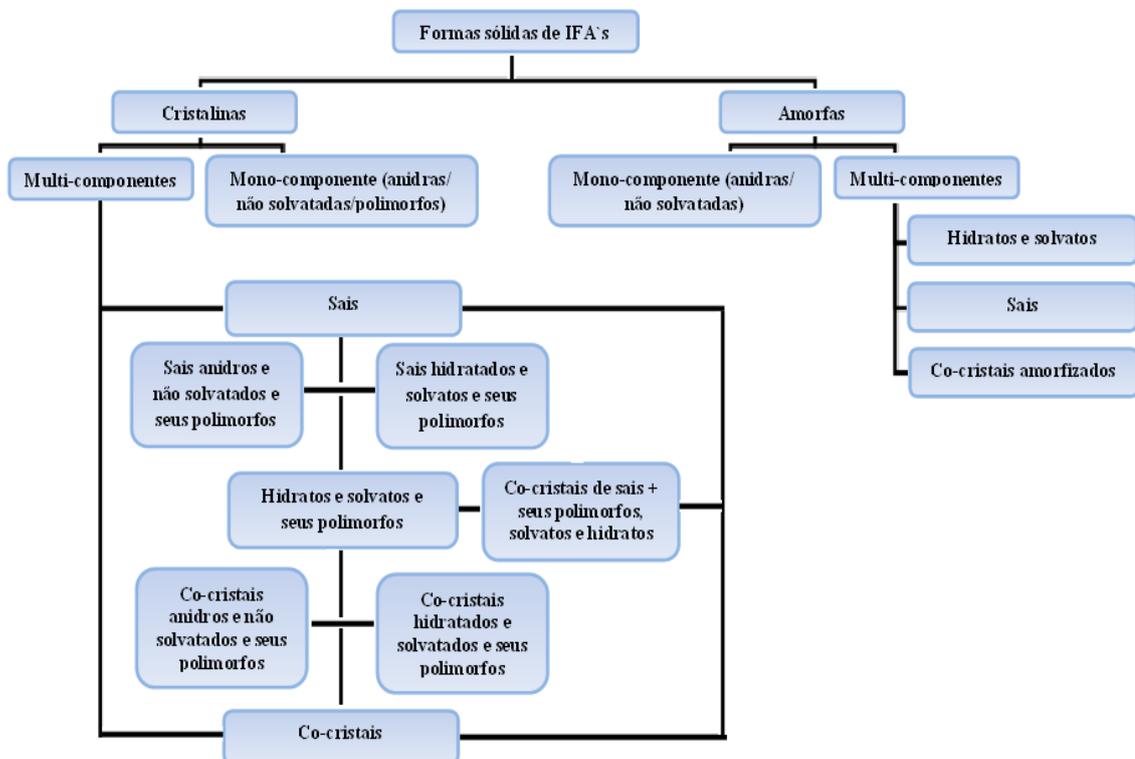


Figura 3 -Proposta de classificação das formas no estado sólido para insumos farmacêuticos ativos - IFA's.

Fonte: AITIPAMULA et al., 2012.

A nova terminologia separa o estado sólido em substâncias cristalinas e amorfas, as quais, por sua vez, são divididas em formas mono-componente e multi-componentes, englobando todas as possíveis combinações que fármacos no estado sólido apresentam. A terminologia proposta considera o termo polimorfismo somente entre substâncias de mesma composição química (AITIPAMULA et al., 2012).

Enquanto não se obtém um consenso quanto às terminologias e definições a serem adotadas, as companhias farmacêuticas enxergam no fenômeno do polimorfismo uma oportunidade para a obtenção de formas sólidas com características mais favoráveis, além da propriedade intelectual relacionada às novas descobertas. Nesse sentido, diferentes formas sólidas de fármacos já comercializados estão sendo constantemente descobertas (LEKSIC; SEPAC; PAVLICIC, 2011; SILVA; SILVA; PEREIRA, 2017).

Para o fármaco fosamprenavir cálcico, a primeira forma cristalina, denominada de forma I, é descrita na patente US6514953 B1 por Armitage, Searle e Singh (2003). Segundo os autores, diversos sais do fosamprenavir foram obtidos, entretanto somente o sal cálcico apresentou características adequadas para ser empregado em preparações farmacêuticas. Os autores descreveram o processo de síntese do fármaco e realizaram ensaios de caracterização pelas técnicas de RMN e difratometria de raios X por policristais (PXRD). Além disso, avaliaram a solubilidade do fosamprenavir cálcico em diferentes faixas de pH e concluíram que o mesmo apresenta solubilidade maior que o amprenavir.

A forma II do fármaco é descrita na patente US20120208787 A1 por Bhoge et al. (2012). Os autores descrevem o método de obtenção da nova forma cristalina e apresentam os difratogramas e espectros de absorção no infravermelho para as formas I e II do fosamprenavir cálcico.

Diferentes formas sólidas do fosamprenavir cálcico são descritas Leksic; Sepac e Pavlicic (2011) na patente US20110165202 A1. São apresentados os métodos de cristalização das formas denominadas de III, IV e P e seus respectivos difratogramas. A forma IV é descrita como um solvato de acetona. Além disso, os autores relatam a existência de duas formas amorfas do fármaco. Uma de formato esférico e outra apresentando estruturas alongadas, conforme as microfotografias apresentadas. De acordo com os autores, a forma amorfa alongada apresenta características semelhantes às estruturas cristalinas, maior solubilidade do que estas e ausência de problemas relacionados ao desenvolvimento farmacotécnico.

Jetti, Bhagavatula e Gorantla (2013) relatam na patente US 0317236 A1 a existência de outra forma sólida do fosamprenavir cálcico, denominada de forma A, a qual corresponde a um hidrato contendo de 2% a 7% de água. Os autores descrevem os métodos de cristalização utilizados e apresentam os difratogramas, espectros no infravermelho e curvas térmicas obtidas para a nova forma sólida do fármaco.

Outra forma cristalina do fosamprenavir cálcio, denominada de H1, é apresentada na patente US 0025040 A1 por Reddy et al. (2015). Os autores descrevem os métodos de

cristalização empregados e apresentam os difratogramas e microfotografias da nova forma cristalina. Também é descrito um método de obtenção da forma amorfa do fármaco. Na comparação visual entre os difratogramas apresentados para a forma H1 e a forma A (descrita na patente US 0317236 A1) não são observadas diferenças entre os picos de Bragg. Entretanto, os autores descrevem a forma H1 como uma nova forma sólida do fosamprenavir cálcico.

Embora as patentes demonstrem a existência de diversas formas sólidas do fosamprenavir cálcico, não foram encontrados artigos referentes à caracterização ou determinação estrutural dessas formas, nem tampouco ensaios de estabilidade sob condições variadas de temperatura e umidade.

### 2.3 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

O aparecimento de novos fármacos implicou no desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de determinar com precisão suas características físico-químicas. Dessa forma, tornou-se possível a seleção de moléculas com propriedades adequadas para serem utilizadas nas diversas formas farmacêuticas, de modo a exercerem uma ação terapêutica eficiente. O conhecimento prévio das propriedades físico-químicas de moléculas candidatas a fármacos passou a representar um passo fundamental e obrigatório para o desenvolvimento de preparações farmacêuticas adequadas. Este procedimento, denominado de etapa de pré-formulação, surgiu nos finais dos anos 50 e início da década de 60 e resultou em uma mudança na política de desenvolvimento de medicamentos (CARSTENSEN, 2002).

Os estudos de pré-formulação permitem revelar instabilidades não previamente conhecidas e também a reformulação de medicamentos sempre que necessário, objetivando assegurar um produto final com características de qualidade. A seleção de moléculas com propriedades adequadas para uma formulação, bem como o conhecimento prévio de suas compatibilidades e incompatibilidades, são fatores relevantes para a obtenção de produtos farmacêuticos eficazes. Dessa forma, os estudos de pré-formulação, ao considerarem as propriedades físico-químicas do fármaco, o seu perfil farmacocinético e suas compatibilidades e incompatibilidades, possibilitam o desenvolvimento de formulações onde é maximizada a qualidade, eficácia e segurança do medicamento (DANIEL et al., 2013; GIBSON, 2009; VERONEZ et al., 2013).

Os estudos de pré-formulação podem ser definidos como uma etapa que antecede a formulação, onde um fármaco, com determinadas propriedades físico-químicas, é avaliado quanto à sua viabilidade terapêutica na forma farmacêutica pretendida. Constituem uma avaliação minuciosa das características dos insumos farmacêuticos (ativos e excipientes) e dos impactos que essas características podem ocasionar na formulação e na via de administração do fármaco (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011).

Os estudos de pré-formulação são uma etapa fundamental para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Englobam testes de caracterização físico-química do fármaco e excipientes, estudos de estabilidade intrínseca e ensaios de compatibilidade fármaco-excipiente (CHADHA; BHANDARI, 2014; JACKSON; YOUNG; PANT, 2000; VERONEZ et al., 2013).

### **2.3.1 Caracterização físico-química**

Os fármacos são normalmente administrados como parte de uma formulação, contendo diferentes componentes com funções variadas e especializadas. Para o desenvolvimento de uma preparação farmacêutica segura, eficaz e estável é necessário considerar as características físicas, químicas e biológicas de todos os ingredientes utilizados na fabricação do produto final. A caracterização de fármacos e excipientes é a primeira etapa de um estudo de pré-formulação. Permite criar uma gama de informações úteis no desenvolvimento de produtos, as quais podem ser utilizadas também para a seleção de fornecedores com qualidade desejada (MATOS, 2014).

A caracterização de fármacos e de suas estruturas cristalinas constitui uma área de intensa atividade de pesquisa nas indústrias farmacêuticas. Tal fato deve-se às exigências das agências reguladoras nos processos de aquisição de patentes e registro, além do atendimento às normas para aprovação de novos produtos para o mercado (FDA, 2007; ICH, 1999).

O conhecimento das características físico-químicas de um fármaco e de seu padrão de liberação da forma farmacêutica está intimamente relacionado à sua quantidade e velocidade de absorção pelo organismo. Dessa forma torna-se imperativo selecionar os tipos de excipientes mais adequados, prever a inclusão de aditivos específicos e selecionar embalagens apropriadas, os quais são fatores decisivos para a integridade do fármaco no produto final. As propriedades físico-químicas de fármacos e excipientes constituem um fator essencial no

desenvolvimento de formulações farmacêuticas, uma vez que aspectos como a biodisponibilidade, solubilidade e condições de administração estão intimamente relacionados a essas características (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011; BISSA, 2013).

Diferentes propriedades devem ser avaliadas nessa etapa dos estudos de pré-formulação. Dentre essas, podemos citar: a verificação da forma polimórfica, tamanho de partículas, morfologia do pó, ponto de fusão, cristalinidade, estabilidade térmica, transição vítrea, calor específico, escoamento dos pós, coeficiente de partição, solubilidade, constante de dissociação, permeabilidade cutânea e área de superfície (DANIEL et al., 2013; VERONEZ et al., 2013).

Conforme dito anteriormente, nos estudos de caracterização é essencial a determinação das propriedades físico-químicas dos fármacos e excipientes que se pretende utilizar na formulação do produto final, uma vez que variações dessas propriedades podem estar relacionadas a alterações na segurança e eficácia do fármaco. Dessa forma, devem ser utilizadas técnicas analíticas apropriadas para obtenção de informações sobre essas características ainda no estágio inicial de desenvolvimento. Essas mesmas técnicas devem ser utilizadas nos estudos de compatibilidade para verificar se o fármaco mantém as suas propriedades ao longo do estudo. Dessa forma, pode-se prever a estabilidade do produto final e garantir que o fármaco mantém suas propriedades iniciais durante todo o tempo de prateleira até chegar ao consumidor (DANIEL, et al., 2013).

Diferentes técnicas analíticas têm sido empregadas na caracterização de fármacos e excipientes. Dentre essas, destacam-se as técnicas termoanalíticas e métodos espectroscópicos, pois são relativamente simples e fornecem resultados imediatos (CHADHA; BHANDARI, 2014).

Nos itens a seguir serão descritas as técnicas empregadas neste estudo para a caracterização físico-química do fármaco fosamprenavir cálcico.

#### 2.3.1.1 Análises térmicas

Aquecer uma amostra e observar o seu comportamento é uma maneira simples de se estudar um material, uma vez que as propriedades termodinâmicas, como a capacidade calorífica, entalpia e entropia, são características individuais de cada substância (HAINES, 2002). Em função disso, os métodos de análise térmica objetivam estudar o comportamento

termodinâmico de uma amostra, cujas propriedades físicas são medidas em função da temperatura ou do tempo, constituindo uma valiosa ferramenta para a caracterização e análise de fármacos e medicamentos (COLMAN et al., 2016; GIRON, 1998).

A caracterização de um sólido puro em determinada fase cristalina fornece curvas termoanalíticas características, permitindo obter informações como a temperatura de fusão, entalpia de mudança de fase e temperatura de decomposição. Em misturas de sólidos, como no caso de estudos de compatibilidade ou em uma formulação, onde o fármaco está associado a um ou mais excipientes, podem ocorrer interações entre as substâncias, as quais podem provocar alterações nas propriedades do fármaco que são reveladas por mudanças nas curvas termoanalíticas. Dessa forma, as análises térmicas permitem o estudo dessas interações, as quais podem impactar na qualidade do produto final (BISSA, 2013; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

A aplicação das análises térmicas em estudos de pré-formulação vem ganhando importância entre os pesquisadores. Destacam-se as técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), as quais normalmente são utilizadas em estudos de caracterização e compatibilidade por fornecerem informações imediatas, com baixo custo e consumo mínimo de amostra (ALVES-SILVA et al., 2014; CHADHA; BHANDARI, 2014; COSTA et al., 2013).

#### *2.3.1.1.1 Termogravimetria*

A termogravimetria ou análise termogravimétrica baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação), determinada por uma termobalança, em função da temperatura ou do tempo (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). A variação de massa pode ser estudada a uma temperatura constante, sob aquecimento ou resfriamento. Além disso, pode-se empregar uma combinação desses métodos. A variação mais comumente observada é a perda de massa devido à decomposição térmica da amostra. Entretanto, ganhos de massa podem ocorrer quando a amostra reage com algum componente da atmosfera (HAINES, 2002).

A técnica tem sido utilizada em estudos diversos, objetivando avaliar a decomposição térmica de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos, determinação de umidade e em

estudos de corrosão de materiais sob diferentes atmosferas (CHADHA; BHANDARI, 2014; COLMAN et al., 2016; HAINES, 2002).

Em estudos de caracterização de fármacos, a TG tem sido amplamente utilizada para determinação da estabilidade da molécula em temperaturas elevadas, avaliação da presença de água de adsorção ou cristalização na amostra, determinação de parâmetros cinéticos e caracterização de polimorfos. Além disso, a técnica tem sido empregada em estudos de compatibilidade, uma vez que alteração de parâmetros como a temperatura de decomposição, pode estar associada a uma interação entre o fármaco e excipientes (CORRÊA et al., 2015; DANIEL et al., 2013; PAISANA; WAHL; PINTO, 2016; VERONEZ et al., 2013).

#### *2.3.1.1.2 Calorimetria exploratória diferencial*

Quando uma determinada substância é aquecida, diferentes transformações físicas ou químicas envolvendo processos de absorção (endotérmicos) ou de liberação de calor (exotérmicos) podem ocorrer. Em geral, eventos como fusão, desidratação e redução são endotérmicos; enquanto cristalizações, oxidações e condensações são exotérmicos. Já processos de decomposição podem absorver ou liberar calor (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

A técnica de DSC pode ser usada para detectar as transformações físicas e químicas de substâncias quando aquecidas e estimar suas propriedades térmicas, sendo utilizada na caracterização de materiais orgânicos, inorgânicos, biológicos, poliméricos, fármacos, aditivos alimentares, entre outros. Além disso, pode ser empregada para estimar a pureza de substâncias químicas e na determinação qualitativa e quantitativa de transições de fase, tais como a temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão, temperatura e tempo de cristalização, calor específico, estabilidade térmica e cinética de reação (CHADHA; BHANDARI, 2014; CORRÊA et al., 2015; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; PAISANA; WAHL; PINTO, 2016).

A técnica de calorimetria exploratória diferencial mede a diferença de energia cedida a uma amostra e a um material de referência, quando estes são submetidos a um programa controlado de temperatura (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999). Dois tipos de equipamentos são encontrados no mercado: DSC por compensação de potência e DSC por fluxo de calor. Ambas as técnicas apresentam sensibilidade e exatidão semelhantes. A escolha

normalmente depende dos objetivos da análise. Equipamentos de fluxo de calor fornecem uma linha de base mais estável, enquanto os de compensação de potência possibilitam a aplicação de fluxos de aquecimento e resfriamento maiores (CRAIG, 2007). As análises apresentadas nessa dissertação foram realizadas em um DSC por fluxo de calor.

De modo geral, os resultados obtidos para uma análise por DSC são apresentados na forma de curvas térmicas, as quais apresentam uma linha de base enquanto não há variação de calor ou potência entre a amostra e o material de referência. A ocorrência de um evento térmico na amostra é registrada na curva térmica na forma de um pico. Por convenção, eventos endotérmicos são representados por picos abaixo da linha de base, enquanto eventos exotérmicos, representados por picos acima. Entretanto, dependendo da configuração do equipamento, essa convenção pode apresentar-se invertida. Além disso, a DSC permite verificar mudanças na capacidade calorífica da amostra, as quais são denominadas de transições vítreas e são representadas por alterações na linearidade da linha de base, semelhantes a degraus (BROWN, 2001; DANIEL et al., 2013; HAINES, 2002).

A calorimetria exploratória diferencial tem se mostrado uma importante ferramenta em estudos de pré-formulação. A comparação das temperaturas dos eventos endotérmicos e exotérmicos e valores de entalpia, obtidos para o fármaco e excipientes isolados durante a caracterização, com os valores verificados para as misturas binárias, permite a detecção precoce de incompatibilidades, reduzindo o tempo para se alcançar uma formulação segura e estável. Entretanto, a DSC apresenta algumas limitações, as quais exigem uma interpretação cuidadosa dos resultados (CHADHA; BHANDARI, 2014; DANIEL et al., 2013; VERONEZ et al., 2013). Apesar das inúmeras vantagens, diversos autores destacam a necessidade de interpretar os dados das análises térmicas com cautela. Segundo esses autores, algumas reações observadas podem ser causadas pelo aquecimento das amostras a elevadas temperaturas, não reproduzindo o ambiente real do fármaco na formulação. Além disso, o emprego de atmosferas inertes durante as análises, devido utilização de gases como o nitrogênio, não refletem as condições ambientais. Dessa forma, para uma interpretação correta dos dados, torna-se relevante o emprego de técnicas complementares como a espectroscopia no infravermelho, microscopia, cromatografia e difratometria de raios X, a fim de evitar conclusões errôneas (JÚLIO et al., 2015; LI et al., 2016; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

#### 2.3.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica não destrutiva amplamente utilizada na caracterização de substâncias químicas, fornecendo resultados imediatos e com baixo consumo de amostra (ROJEK; WESOLOWSKI, 2016). Fundamenta-se na interação da energia eletromagnética com o movimento vibracional dos átomos em uma molécula. Apenas ligações que têm um momento de dipolo que muda em função do tempo podem ser detectadas. Quando a molécula apresenta variação de momento de dipolo devido à vibração, as cargas em movimento geram um campo eletromagnético que pode acoplar-se com o campo eletromagnético da radiação incidente, absorvendo um fóton e promovendo uma transição para níveis vibracionais mais energéticos. No processo de absorção, somente as frequências de radiação no infravermelho que equivalem às frequências vibracionais naturais da molécula são absorvidas. A energia absorvida aumenta a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula. (PAVIA et al., 2013; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Uma vez que cada frequência vibracional está relacionada a um grupo funcional específico, a espectroscopia no infravermelho permite obter informações sobre a estrutura química de um composto. Embora diferentes substâncias apresentem os mesmos grupos funcionais, o ambiente químico no qual os átomos de uma molécula se encontram, nunca será idêntico ao de outra molécula. Sendo assim, o espectro no infravermelho pode ser considerado como uma impressão digital da molécula, permitindo a sua identificação (PAVIA et al., 2013).

A região do espectro eletromagnético correspondente à região do infravermelho pode ser dividida em 3 partes: o infravermelho próximo (NIR) com número de onda entre 15.000 e 4.000  $\text{cm}^{-1}$ , o infravermelho médio (MID) entre 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  e o infravermelho distante (FAR) entre 400 e 10  $\text{cm}^{-1}$  (SKOOG et al., 2006).

O infravermelho médio é a região do espectro onde se encontra o maior número de aplicações para a análise qualitativa de compostos orgânicos. Embora vários grupos funcionais também absorvam na região do NIR, essas absorções são menos intensas quando comparadas às absorções no MID. Já a região do FAR tem uso restrito devido às limitações instrumentais, pois são poucas as fontes para este tipo de radiação (SKOOG et al., 2006).

A espectroscopia no infravermelho é uma importante ferramenta utilizada para a caracterização de fármacos e excipientes, fornecendo informações complementares para os estudos de estabilidade e compatibilidade. Isso ocorre porque uma molécula intacta apresenta um perfil de bandas em seu espectro diretamente relacionado com sua estrutura química e com as interações intermoleculares características de sua estrutura cristalina. Sendo assim,

alterações no perfil de bandas verificadas na espectroscopia no infravermelho permitem uma rápida detecção de interações entre os componentes de uma mistura, ocorrência de processos de hidratação, desidratação, mudanças de fase cristalina ou amorfização de fármacos (CHADHA; BHANDARI, 2014; DANIEL et al., 2013; JULIO et al., 2015; SILVA; SILVA; PEREIRA, 2017).

### 2.3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica versátil, sendo empregada rotineiramente para a análise e caracterização de materiais sólidos, permitindo uma avaliação precisa de suas formas morfológicas (MALISKA, 2012).

A imagem obtida é resultante da interação de um feixe de elétrons com a amostra analisada. O microscópio eletrônico de varredura gera esse feixe de elétrons a partir de um filamento de tungstênio, por exemplo, o qual passa por lentes condensadoras tendo seu diâmetro reduzido. Posteriormente, os elétrons, com auxílio de uma lente objetiva, são focalizados sobre a amostra. O sinal que é detectado resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra e é utilizado para a formação da imagem. O resultado é uma imagem de fácil interpretação, apresentando elevada profundidade de foco, ou seja, com aparência tridimensional (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; MALISKA, 2012).

A caracterização morfológica de fármacos e excipientes é importante nas etapas de pré-formulação. Diferenças na estrutura morfológica externa podem influenciar e modificar importantes propriedades relacionadas com o processo de fabricação de um medicamento e com a eficácia da formulação final. Dentre essas propriedades podemos citar a fluidez, compressibilidade, seringabilidade, estabilidade em suspensão e a dissolução. Além disso, a microscopia eletrônica de varredura permite verificar transformações polimórficas de fármacos e a avaliação da qualidade de medicamentos por meio da identificação e detecção de componentes individuais presentes em uma mistura (ARAÚJO et al., 2012; BISSA, 2013).

Embora a técnica não forneça informações sobre a estrutura química ou o comportamento térmico dos materiais analisados, a combinação da microscopia eletrônica de varredura com as técnicas termoanalíticas e espectroscópicas constitui uma importante ferramenta em estudos de caracterização e verificação de incompatibilidades entre fármacos e excipientes (CHADHA; BHANDARI, 2014).

#### 2.3.1.4 Difractometria de raios X em pó

Os raios X correspondem a fótons com energias intermediárias entre os raios gama e os raios ultravioleta. A técnica de difração de raios X em pó é relativamente simples e direta, não necessitando, na maioria das vezes, de etapas de preparo de amostra. Fundamenta-se no espalhamento elástico de fótons de raios X quando estes incidem sobre a estrutura ordenada de um composto cristalino. A interação real ocorre entre os raios X e os elétrons no cristal. O campo elétrico oscilante dos raios X faz com que as partículas carregadas no átomo oscilem na mesma frequência. O choque do raio X com o elétron faz com que este seja ejetado da eletrosfera do átomo. Elétrons de camadas superiores ocupam o espaço deixado, emitindo fótons de raios X na mesma frequência do fóton incidente e retornando ao estado fundamental. Os fótons de raios X podem ser emitidos em qualquer direção, entretanto quando estes se encontram em fase, ocorre uma interferência construtiva, a qual constitui um padrão difratométrico específico para cada estrutura cristalina (CHATTERJEE, 2001).

A difratometria de raios X em pó consiste em uma ferramenta importante na etapa de caracterização físico-química de fármacos. Ao fornecer informações específicas sobre a estrutura cristalina de um determinado composto, permite a seleção de formas sólidas com características adequadas para uso farmacêutico. Além disso, pode ser empregada para a detecção e quantificação de transformações polimórficas que podem comprometer a segurança e eficácia de um medicamento. Outra aplicação da técnica consiste em estabelecer o grau de cristalinidade de fármacos no decorrer do tempo e em função do estresse aplicado ao mesmo. Dessa forma, permite o acompanhamento das transformações de uma forma polimórfica em outra ou em formas amorfas (BERALDI et al., 2014; GIRON, 2001; HENRIET et al., 2016; ZHAO; ZHENG; LI, 2016).

A difratometria de raios X em pó também tem sido aplicada em estudos de compatibilidade, permitindo a verificação de transições de fase ou amorfização de fármacos devido ao contato com excipientes. A possibilidade de utilização da técnica para verificar a estabilidade cristalina de fármacos nas diferentes etapas do processo de fabricação de medicamentos, como por exemplo, na compressão ou granulação úmida, apresenta grande relevância para a qualidade da formulação final (JÚLIO et al., 2015).

#### **2.3.2 Estabilidade intrínseca de fármacos e produtos de degradação**

A estabilidade pode ser definida como o tempo no qual um produto mantém, dentro dos limites especificados e sob determinadas condições de estocagem, as mesmas propriedades e características que possuía na ocasião em que foi fabricado (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011; ICH, 2003). A estabilidade interfere diretamente na qualidade de um produto farmacêutico, impactando em sua eficácia e segurança ao ser administrado a um paciente. Para que esses parâmetros não sofram alterações, é fundamental a realização de estudos de estabilidade de fármacos nas etapas de pré-formulação (KAMBERI; RAPOSA, 2016).

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser estudada sob cinco diferentes aspectos: químico, físico, microbiológico, terapêutico e toxicológico. Os parâmetros de qualidade relacionados a cada um desses aspectos são descritos na Tabela 1. Alterações das características e propriedades de um produto farmacêutico que extrapolem os limites aceitáveis e pré-estabelecidos colocam em risco a segurança e eficácia desses produtos (BRASIL, 2012a; ICH, 2003).

Tabela 1 - Aspectos relacionados à estabilidade de fármacos e medicamentos

<b>Aspectos</b>	<b>Parâmetros de qualidade</b>
Químico	Integridade química, potência e produtos de degradação dentro dos limites pré-estabelecidos.
Físico	Manutenção das propriedades físicas originais (aparência, cor, palatabilidade, forma polimórfica, solubilidade, suspensibilidade...).
Microbiológico	Esterilidade ou resistência ao crescimento microbiológico.
Terapêutico	Manutenção do efeito terapêutico.
Toxicológico	Não deve ocorrer aumento da toxicidade.

Fonte: BRASIL, 2012a.

A estabilidade de fármacos depende de fatores relacionados ao próprio produto, denominados de fatores intrínsecos, como por exemplo, a presença de impurezas, propriedades físico-químicas e processo de obtenção. Além disso, a estabilidade também é influenciada por fatores relacionados ao ambiente, denominados de fatores extrínsecos. Dentre esses, destacam-se a temperatura, umidade, gases (oxigênio e dióxido de carbono) e luz. O impacto dos fatores extrínsecos pode ser minimizado com o uso de excipientes

específicos, embalagens apropriadas e condições adequadas de armazenamento (BRASIL, 2012).

A temperatura é o fator extrínseco mais relevante para a estabilidade de fármacos. O seu aumento está relacionado, na maioria das vezes, com um incremento na velocidade de degradação química. Em geral, a velocidade de uma reação aumenta exponencialmente com o aumento de temperatura. Essa relação é normalmente verificada para reações de hidrólise de fármacos e algumas reações de oxidação. Por outro lado, o congelamento pode resultar na formação de polimorfos menos solúveis. A influência da temperatura pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento (BRASIL, 2012a; BISSA, 2013).

A umidade é outro fator extrínseco de grande relevância para a estabilidade de fármacos e produtos farmacêuticos. Está relacionada às reações de degradação química catalisadas por moléculas de água. Reações de hidrólise, hidratação, isomerização podem conduzir à decomposição de fármacos. Além disso, a água pode ser adsorvida à superfície do produto, formando uma camada de hidratação na qual o fármaco é dissolvido e degradado. Reações de hidrólise são normalmente observadas em produtos farmacêuticos, uma vez que muitos insumos ativos apresentam em sua estrutura grupamentos funcionais como ésteres, amidas secundárias, lactonas e lactamas. A influência da umidade na estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser minimizada pela utilização de embalagens impermeáveis (LEITE, 2006; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

A luz e o oxigênio também são fatores ambientais que podem impactar na estabilidade de produtos farmacêuticos. A luz pode fornecer a energia de ativação necessária para iniciar reações de oxidação, redução, rearranjo de anéis, polimerização, rupturas de ligações, isomerizações e racemizações. Já o oxigênio, por sua vez, além das reações de oxidação de fármacos, pode estar envolvido em reações de fotodegradação. As vias de degradação química envolvendo gases atmosféricos normalmente são bem estabelecidas, uma vez que estes são abundantes no ambiente onde os produtos farmacêuticos são processados e armazenados (LEITE, 2006; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

As razões para a determinação da estabilidade de produtos farmacêuticos fundamentam-se, entre outras, na preocupação com a saúde pública. A perda da estabilidade de um fármaco ou medicamento pode estar diretamente relacionada com a ausência do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (ABDALLAH; AL-GHOBASHY; LOTFY, 2015).

Dentre os estudos de estabilidade recomendados pelos órgãos reguladores nas etapas de pré-formulação estão a avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco e também a

avaliação de sua estabilidade na presença dos excipientes que se pretende utilizar na formulação final, o que caracteriza os estudos de compatibilidade fármaco-excipiente (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011; BRASIL, 2012; ICH, 2003).

A avaliação da estabilidade intrínseca de fármacos constitui uma das etapas mais importantes dos estudos de pré-formulação. Este tipo de estabilidade está relacionado exclusivamente à própria molécula do fármaco. Independe da presença de outros componentes que serão usados na formulação do medicamento. É realizada através de estudos de degradação forçada, também chamados de testes de estresse. Nestes ocorre a exposição do fármaco à condições severas, como por exemplo, meios oxidativos, temperatura e umidade elevadas e ampla faixa de pH (ICH, 2003). As condições de estresse são variáveis de acordo com a estrutura química de cada fármaco (SILVA et al., 2009). Posteriormente, deve-se desenvolver um método analítico capaz de separar os produtos de degradação formados do fármaco de origem. Geralmente, são empregadas as técnicas de cromatografia líquida ou gasosa a fim de se determinar a extensão de degradação do fármaco em cada um dos ambientes em que foi submetido (SINGH et al., 2012).

A identificação e caracterização estrutural dos produtos de degradação oriundos do teste de estresse constitui uma etapa crucial para o controle desses subprodutos na formulação final do medicamento. A partir da elucidação estrutural é possível determinar o perfil de degradação do fármaco e propor reações que conduzam a formação de seus subprodutos (ABDALLAH; AL-GHOBASHY; LOTFY, 2015; NARAYANAM et al., 2014; RAO et al., 2014; SINGH et al., 2012).

A avaliação da estabilidade intrínseca de fármacos através de estudos de degradação forçada é recomendada por agências reguladoras internacionais e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como forma de avaliação da estabilidade química de fármacos. Além disso, esses estudos permitem identificar os produtos de degradação formados e determinar as condições ambientais que poderiam proporcionar sua formação. Dessa forma, fornecem informações extremamente úteis sobre as vias de degradação do fármaco e permitem elaborar alternativas farmacotécnicas, logísticas e de embalagem que possam prolongar a vida de prateleira da formulação final (BRASIL, 2013; ICH, 2003).

Os produtos de degradação são definidos como impurezas orgânicas, quimicamente derivadas do fármaco, que podem ser formadas durante o processo de fabricação ou período de estocagem (ICH, 2003). Podem ocorrer devido à instabilidade intrínseca do fármaco à condições adversas ou devido ao contato direto com excipientes utilizados na formulação. A

sua presença na formulação final compromete a qualidade do medicamento e pode significar risco à saúde dos pacientes (NARAYANAM et al., 2014).

Estudos indicam que alguns produtos de degradação estão relacionados com efeitos adversos causados pelo uso de medicamentos. Além disso, suas moléculas podem apresentar potencial carcinogênico e genotóxico, causando mutações genéticas, quebra e rearranjo de cromossomos e efeitos tóxicos variados (SINGH et al., 2012). Na década de sessenta, Gross (1963) relatou que a 4-epianidrotetraciclina, subproduto da tetraciclina, está associada ao desenvolvimento da síndrome de Fanconi, caracterizada pela falência renal de pacientes. Em outros estudos, Betto et al., (1989) e Romano et al., (1997) concluíram que produtos de degradação poliméricos da ampicilina estão associados ao desenvolvimento de reações alérgicas ao uso do medicamento (SINGH et al., 2012).

Em função do potencial risco à saúde humana, as agências reguladoras de diversos países têm elaborado guias e resoluções que visam controlar a presença dos produtos de degradação em medicamentos. Os primeiros guias foram publicados pela ICH, uma organização composta por autoridades reguladoras e representantes da indústria farmacêutica da Europa, Japão e Estados Unidos, com a intenção de discutir aspectos científicos e técnicos, além de elaborar guias objetivando a harmonização no desenvolvimento de medicamentos seguros, eficazes e de qualidade. (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION RESEARCH, 2015; SINGH et al., 2012).

Dentre as diretrizes da ICH relacionadas ao tema, destacam-se os guias Q3A(R2) e Q3B(R2), os quais abordam a identificação, caracterização e qualificação de impurezas para o registro de novos fármacos e medicamentos sintéticos, respectivamente. Além disso, estabelecem parâmetros para a condução dos estudos de estresse.

Paralelamente a estes, o guia ICH M7 estabelece diretrizes para a verificação do potencial mutagênico de impurezas de síntese ou degradação, objetivando controlar os riscos carcinogênicos destes subprodutos. Estudos de toxicidade “*in silico*”, utilizando a técnica *Quantitative Structure-Activity Relationships* (QSAR) são sugeridos, podendo substituir os convencionais ensaios em animais. Neste sentido, a elucidação estrutural de impurezas e produtos de degradação assume papel fundamental na segurança e eficácia de medicamentos.

Os guias publicados pela ICH influenciaram as agências reguladoras de diversos países. No Brasil, a ANVISA publicou em 2005 a resolução RE número 1, a qual preconiza a quantificação dos produtos de degradação como parte integrante do relatório de estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005). Em 2008, foi lançado um informe técnico complementando a RE nº 1. Este trazia diretrizes de como proceder aos estudos de

degradação forçada, a concentração dos degradantes empregados e a faixa de degradação do fármaco a ser obtida (BRASIL, 2008). Entretanto, este informe foi revogado no mesmo ano de sua publicação. Em 2012, foi publicada a resolução RE número 45, a qual preconiza a realização de testes de degradação forçada em fármacos (BRASIL, 2012). Em dezembro de 2013, inspirada nos guias da ICH, a ANVISA lançou a resolução RDC número 58. Esta estabelecia os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos novos, genéricos e similares. Também preconizava a realização de ensaios de degradação forçada em fármacos como método de avaliação da sua estabilidade intrínseca (BRASIL, 2013). Entretanto, atendendo às solicitações das indústrias farmacêuticas nacionais, as quais reivindicaram mais tempo para adequação às novas diretrizes, a RDC 58 foi revogada. Em seu lugar, a ANVISA publicou a resolução RDC número 53 de 04 de dezembro de 2015, a qual também estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos novos, genéricos e similares. Esta norma atualiza e harmoniza as terminologias utilizadas, além disso, estabelece novos prazos para adequação dos produtos já registrados conforme categorias de uso (BRASIL, 2015).

### **2.3.3 Compatibilidade fármaco-excipiente**

Os estudos de compatibilidade fármaco-excipiente avaliam a estabilidade do fármaco na presença dos excipientes que se pretende utilizar na formulação final do medicamento. A avaliação de interações fármaco-excipiente constitui uma etapa crucial dos estudos de pré-formulação, de modo a se obter uma forma farmacêutica estável e de qualidade (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011; CARSTENSEN, 2002; KAUR; GOINDI; KATARE, 2016).

A maioria dos fármacos é administrada juntamente com outras substâncias denominadas de excipientes. Estes podem apresentar diferentes funções na formulação, como por exemplo, facilitar a elaboração da forma farmacêutica, aumentar a estabilidade do fármaco, conferir características estéticas ao medicamento, promover a liberação e biodisponibilidade do princípio ativo. Embora sejam farmacologicamente inertes, os excipientes podem interferir na estabilidade do fármaco. Sendo assim, uma seleção criteriosa deve ser realizada objetivando uma formulação adequada (JACKSON; YOUNG; PANT, 2000).

Os estudos de compatibilidade permitem uma seleção ideal dos componentes de uma formulação e de suas quantidades. Além disso, permitem a identificação de produtos de degradação e compreensão das reações entre fármacos e excipientes. Diversos fatores afetam a compatibilidade entre os componentes de uma formulação. Esses fatores, apresentados esquematicamente na Figura 4, podem estar relacionados à própria natureza do fármaco, às propriedades dos excipientes ou da formulação e também às condições ambientais (SCHMITT et al., 2001).

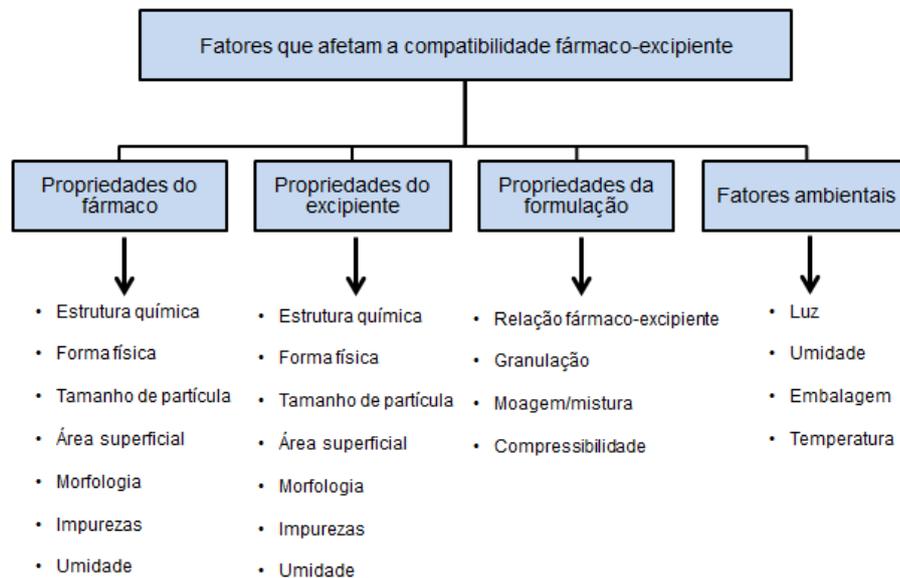


Figura 4 - Fatores que afetam a compatibilidade fármaco-excipiente.  
Fonte: Adaptado de Schmitt et al., 2001.

As interações entre fármaco e excipientes podem ser de natureza física ou química. Interações físicas são caracterizadas pela não ocorrência de reações químicas e nem sempre significam uma incompatibilidade. Entretanto, em certos casos, podem alterar as características físico-químicas do fármaco e interferir na sua solubilidade, dissolução e biodisponibilidade. Estão relacionadas com mudanças de cor, odor, paladar e forma polimórfica. Já as interações químicas envolvem a ocorrência de reações químicas entre o fármaco e excipientes. Caracterizam uma incompatibilidade, pois conduzem à formação de produtos de degradação e, conseqüentemente, comprometimento da segurança e eficácia da formulação (CHADA; BHANDARI, 2014; MAROTHU et al., 2015; VERONEZ et al., 2013).

Em estudos de compatibilidade geralmente são utilizadas misturas binárias do fármaco com um excipiente na proporção 1:1 (m/m). Estas misturas objetivam maximizar a proporção

de excipientes em relação ao fármaco quando comparadas à formulação final. Desta forma, há maior probabilidade de identificação de incompatibilidades. As misturas são armazenadas em câmara de estabilidade, com temperatura e umidade controladas. Amostras-controle do fármaco e dos excipientes isolados também são estocadas sob as mesmas condições. As condições de estocagem são determinadas pela ICH de acordo com a zona climática de cada país e em conformidade com os objetivos do estudo (DANIEL et al., 2013; ICH, 2003).

Antes de serem submetidas à câmara de estabilidade, as amostras devem ter o seu teor de fármaco e suas propriedades físico-químicas determinadas por meio de técnicas adequadas. Após determinado período de incubação, essas mesmas amostras são novamente avaliadas, sob as mesmas condições de análise, para observar se houve alguma alteração no perfil físico-químico, no teor do fármaco ou formação de produtos de degradação (ICH, 2003).

Diferentes técnicas analíticas vêm sendo utilizadas em estudos de compatibilidade fármaco-excipiente. Dentre essas, as análises térmicas e métodos espectroscópicos vêm recebendo atenção especial por parte dos pesquisadores, pois são técnicas relativamente simples e que fornecem resultados imediatos. Dessa forma, permitem uma rápida triagem, monitoramento e verificação de incompatibilidades (CHADA; BHANDARI, 2014; MAROTHU et al., 2015).

Rojek, Wesolowski e Suchacz (2013) avaliaram a compatibilidade do fármaco baclofeno com sete diferentes excipientes farmacêuticos utilizando as técnicas de análise térmica (DSC e TG), PXRD, infravermelho e métodos quimiométricos. Os autores concluíram que o fármaco apresenta incompatibilidades com os excipientes lactose,  $\beta$ -ciclodextrina e meglumina.

Rojek e Wesolowski (2016) avaliaram a compatibilidade do anti-hipertensivo Atenolol com os excipientes  $\beta$ -ciclodextrina, metilcelulose, talco e quitosana. Os autores utilizaram a técnica de FTIR e métodos quimiométricos. O fármaco demonstrou ser compatível com todos os excipientes, exceto a  $\beta$ -ciclodextrina. Os resultados foram comprovados pelas técnicas de TG, DSC e PXRD.

#### **2.3.4 Desenvolvimento de método analítico**

A verificação de alterações na estabilidade química do fármaco durante os estudos de pré-formulação deve ser determinada através do desenvolvimento de métodos analíticos

adequados. Estes métodos, denominados de indicativos de estabilidade, devem ser capazes de mensurar com exatidão o insumo farmacêutico ativo e seus produtos de degradação, contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos seguros e de qualidade (BRASIL, 2015).

Um método analítico consiste nas condições de aplicação de uma ou mais técnicas objetivando a determinação dos componentes de uma amostra. Essa determinação pode ser ao nível qualitativo ou quantitativo. Análises qualitativas objetivam identificar uma espécie ou elemento químico presentes na amostra. Já as análises quantitativas buscam identificar e quantificar os analitos de interesse (SKOOG et al., 2006).

A seleção do método analítico a ser empregado é influenciada por diversos fatores, tais como, o objetivo da análise, as características físico-químicas dos analitos, a faixa de concentração da espécie a ser analisada, o nível de exatidão desejado, o tipo de matriz e presença de interferentes. O método escolhido deve priorizar a eficiência, rapidez e simplicidade, não deve causar a perda dos analitos de interesse ou ser fonte de contaminantes. Além disso, deve apresentar máxima segurança operacional (SKOOG et al., 2006).

Para garantir que o método analítico produza informações confiáveis sobre a amostra que está sendo analisada, este deve ser avaliado através de um processo denominado de validação analítica. A validação de um método fornece evidências de que este cumpre o objetivo a que se destina, sendo exigida pela ANVISA e por agências reguladoras internacionais para o registro de novos medicamentos. Diferentes parâmetros analíticos devem ser avaliados durante a validação, tais como a linearidade do método, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez e seletividade. A escolha de quais parâmetros serão avaliados dependerá da finalidade a que o método se destina (BRASIL, 2003; ICH, 2005; RIBANI, 2004).

Em análises com fins quantitativos, os métodos instrumentais destacam-se pela maior sensibilidade em relação às análises clássicas. Entre as principais técnicas utilizadas para análises de doseamento, destacam-se a espectroscopia de absorção no visível e no ultravioleta, a espectroscopia de fluorescência, técnicas eletroanalíticas, a espectroscopia de absorção atômica, eletroforese capilar, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (GIL, 2010).

Em estudos de pré-formulação, a cromatografia líquida de alta eficiência, especialmente o modo em fase reversa, é considerada a técnica mais eficiente para investigar a presença de produtos de degradação em fármacos e determinar as interações fármaco-

excipiente. É considerada uma técnica de referência em estudos de estabilidade (AHUJA, 2005; MAROTHU, 2015).

A CLAE é uma evolução da cromatografia líquida clássica, empregando como fase estacionária partículas de tamanho reduzido localizadas dentro de colunas cromatográficas, através das quais uma fase móvel é bombeada sob altas pressões. A CLAE é uma técnica de separação e devido aos avanços obtidos, hoje é utilizada rotineiramente para fins qualitativos e quantitativos. Pode ser empregada para análise de diversos compostos químicos presentes em diferentes tipos de matrizes, fornecendo respostas rápidas, precisas, exatas, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida é uma técnica físico-química de separação, fundamentada na distribuição dos componentes de uma amostra entre duas fases imiscíveis. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra desloca-se através dela. Os componentes de uma amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, gerando a migração diferenciada dos analitos. As separações podem ocorrer por mecanismos de adsorção, partição, exclusão, troca iônica, interações estereoquímicas e por bioafinidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG et al., 2006).

No caso particular da separação por partição, dois tipos de cromatografia líquida podem ser definidos baseados nas polaridades das fases móvel e estacionária: a cromatografia por partição no modo normal e no modo reverso. No primeiro caso, a fase estacionária apresenta caráter polar e a fase móvel, caráter apolar. No modo reverso, as polaridades das fases são invertidas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG et al., 2006).

Após a eluição dos analitos da coluna cromatográfica, estes são detectados por um detector fornecendo sinais na forma de picos. Diversos tipos de detectores podem ser empregados: detector de ultravioleta, espectrometria de massas, fluorescência, arranjo de diodos, corona CAD, entre outros. A escolha do detector depende da natureza da amostra e dos objetivos da análise. Deve apresentar ampla faixa de linearidade, ser resistente a variações de temperatura ou solvente e capaz de detectar os analitos na presença de possíveis interferentes (CORRADINI, 2011; GORECKI et al., 2006).

Ao iniciar o desenvolvimento de um método por CLAE, é imprescindível obter informações sobre a composição da amostra e suas propriedades. Deve-se pesquisar as estruturas químicas dos compostos presentes, massas molares, valores de pKa, espectros de absorção no ultravioleta, concentração dos compostos de interesse e a solubilidade da amostra. Amostras neutras normalmente não requerem a utilização de fases móveis

tamponadas ou a utilização de pareadores iônicos e aminas. Já para amostras ácidas ou básicas, o emprego de soluções tampão na fase móvel quase sempre é necessário. No caso particular de analitos básicos, o emprego de colunas capeadas é recomendado e a utilização de aminas na fase móvel pode ser necessária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A amostra deve ser totalmente solúvel e estável na fase móvel para que possa ser transportada através da coluna sem que haja decomposição dos analitos. Sempre que possível, o solvente da amostra deve ser a própria fase móvel ou um de seus componentes. Dessa forma, evita-se uma possível precipitação no interior da coluna ou do cromatógrafo, o que pode gerar danos ao equipamento (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os solventes orgânicos acetonitrila e metanol, associados com água ou soluções tampão, são os reagentes mais utilizados em CLAE no modo reverso. A acetonitrila apresenta como vantagens a baixa viscosidade, o que permite reduzir a pressão no sistema e prolongar a vida útil das colunas cromatográficas. Além disso, sua detecção no ultravioleta ocorre em comprimentos de onda inferiores ao do metanol e possui maior poder eluente do que este. Já o metanol apresenta menor custo e é menos tóxico à saúde humana. Por ser mais polar, quando utilizado em combinação com tampões, há menor risco de precipitação de sais no sistema (DONG, 2006; KROMIDAS, 2005).

Como evolução da CLAE, observa-se o direcionamento da técnica para a realização de análises mais rápidas, sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. Essa evolução, denominada de cromatografia líquida de ultra performance, emprega pressões ainda maiores para o bombeamento da fase móvel, permitindo o uso de fases estacionárias com partículas inferiores a 2  $\mu\text{m}$ . Em função disso, há uma redução no tempo de análise, menor consumo de reagentes químicos, melhor resolução entre picos e maior sensibilidade na detecção. Essas vantagens, desejáveis para os diversos fins a que a cromatografia se aplica, inclusive em estudos de pré-formulação, têm contribuído para a expansão da nova técnica (NALWADE et al., 2012).

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são:

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho objetiva realizar estudos de pré-formulação com o fármaco fosamprenavir cálcico, abordando sua caracterização físico-química e avaliação de sua estabilidade química e polimórfica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São os objetivos específicos:

- a) obter o fármaco fosamprenavir cálcico a partir preparações comerciais;
- b) realizar a caracterização físico-química e estrutural do fármaco por meio das técnicas de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas (EM), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, difratometria de raios X em pó, difratometria de raios X em monocristal (SXRD), termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial;
- c) avaliar a estabilidade intrínseca do fármaco através de estudos de degradação forçada;
- d) desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para identificação e quantificação dos produtos de degradação;
- e) elucidar a estrutura química dos produtos de degradação encontrados empregando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas;
- f) realizar estudos de compatibilidade fármaco-excipientes empregando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier;

- g) avaliar a estabilidade polimórfica do fármaco empregando as técnicas de difratometria de raios X em pó e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados os materiais e métodos descritos abaixo:

### 4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

Devido ao alto custo de aquisição da substância química de referência do fosamprenavir cálcico, optou-se por obter o fármaco a partir de amostras do produto comercial Telzir®. Foram utilizados os lotes 7262 e 3R9G produzidos pelo laboratório *Glaxo Operations UK Limited*. Este medicamento apresenta-se na forma de comprimidos revestidos, possuindo em sua formulação os excipientes celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, sílica anidra coloidal, opadry rosa e povidona K-30.

Após a extração, o fármaco foi caracterizado e teve sua pureza determinada, sendo utilizado como padrão de trabalho.

Para os estudos de compatibilidade foram utilizados os excipientes de grau farmacêutico encontrados na formulação comercial e outros comumente empregados. São eles: celulose microcristalina (lote: 15010075), croscarmelose sódica (lote: 15005893), estearato de magnésio (lote: 15007050), sílica anidra coloidal (lote: 15006800), povidona K30 (lote: 14007282), crospovidona (lote: 15003185), amido glicolato de sódio (lote: 15005134) e opadry rosa (lote: 15005945).

### 4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Foram utilizados na execução deste trabalho:

- a) sistema UHPLC (*Shimadzu*, Japão) equipado com detector UV acoplado ao LC/MS/MS com analisador de massas tipo triplo quadrupolo, modelo LCMS-8030 - Laboratório de Toxicologia, UNIFAL;

- b) sistema UHPLC *Ultimate 3000 LC system* (*Thermo Scientific, USA*), equipado com bomba LPG-3400RS, degaseificador a vácuo integrado, auto amostrador WPS-3000RS com injetor de 100 µL, forno de coluna TCC-3000RS, detector DAD-3000RS e Corona Ultra, *software Chromeleon 6.8* - Laboratório de análise e caracterização de fármacos (LACFar), UNIFAL;
- c) sistema HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters, USA*), acoplado a um espectrômetro de massas, modelo quatromicro (*Micromass*), com analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de electrospray – *LabMass Laboratories* – Campinas-SP;
- d) microscópio eletrônico de varredura JSM-6340F *Field Emission*-JEOL - Laboratório de microscopia óptica e eletrônica do instituto de química da Unicamp – Campinas - SP;
- e) espectrômetro de infravermelho *Nicolet iS50 FTIR* (*Thermo Scientific, USA*) acoplado a *Pike Gladi ATR Techinologies* - LACFar, UNIFAL;
- f) espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Brucker AC-300* - Laboratório de ressonância magnética nuclear, UNIFAL;
- g) pHmetro MS Tecnopon, modelo mPA210 - LACFar, UNIFAL;
- h) balança analítica Shimadzu, modelo AY220 - LACFar, UNIFAL;
- i) câmara de estabilidade Biopar, modelo S150 - LACFar, UNIFAL;
- j) termobalança TG/DTA7300 (SII Nano Technology, Japão) - LACFar, UNIFAL;
- k) DSC Q20 (TA Instruments) - Laboratório interdisciplinar de química (Labic), UNIFAL;
- l) difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku diffractometer, Japão) - Laboratório de Cristalografia, UNIFAL;
- m) difratômetro de raios X SuperNova (Agilent Technologies Singapore International) equipado com um detector Atlas CCD, monocromador de grafite e tubos de raios X em cobre ou molibdênio – Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química da UFJF;
- n) agitador de tubos tipo vórtex, marca: Labnet, modelo: S0200- LACFar, UNIFAL;
- o) agitador magnético, marca: Nova Ética, modelo: 114 - LACFar, UNIFAL;
- p) banho-maria, marca: Cientec, modelo: CT 226 - LACFar, UNIFAL;
- q) filtro de papel Whatman;
- r) vidrarias de grau analítico.

#### 4.3 REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido clorídrico (HCl) P.A., hidróxido de sódio (NaOH) P.A., peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) P.A., água milli-Q, acetonitrila grau HPLC, trietilamina P.A., metanol grau HPLC, dimetilssulfóxido (DMSO) deuterado, etanol P.A., acetato de amônio P.A. e ácido acético P.A.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO FÁRMACO FOSAMPRENAVIR CÁLCICO

A extração do fosamprenavir cálcico a partir do medicamento Telzir® foi realizada baseando-se no método descrito na patente US20120208787 A1 para a cristalização da forma polimórfica I do fármaco (BHOGE et al., 2012). Foram feitas adaptações necessárias.

Segundo a bula do produto comercial, cada comprimido revestido contém 853,2 mg de fosamprenavir cálcico, equivalentes a 700 mg de fosamprenavir.

Para realizar a extração do fármaco, inicialmente determinou-se o peso médio de 20 comprimidos do medicamento Telzir®. Foi verificado um valor de aproximadamente 1163,9 mg. Posteriormente o revestimento dos comprimidos foi removido e estes triturados até obtenção de pó fino e homogêneo. Quantidade de amostra equivalente a cinco gramas do fármaco (aproximadamente 6820,9 mg) foi pesada e transferida para um balão de fundo redondo com auxílio de uma espátula. Foram adicionados à amostra 100 mL de uma solução de etanol e metanol na razão 95:5 (v/v).

A amostra foi colocada em banho de ultrassom por vinte minutos com agitação intermitente e posteriormente aquecida em banho-maria a 70°C até obtenção de sobrenadante límpido. Os produtos insolúveis foram removidos através de filtração utilizando papel de filtro Whatman e lavados com 25 mL da solução de etanol e metanol.

O resfriamento da amostra devido ao procedimento de filtração gerou a precipitação parcial do fármaco. Sendo assim, o filtrado foi aquecido novamente a 70°C até obtenção de solução límpida e 15 mL de água milli-Q foram adicionados. Após isso, a amostra foi resfriada lentamente até 25°C e mantida sob agitação por 3 horas.

O produto resultante foi filtrado em papel Whatman, lavado com 20 mL de solução de etanol e água milli-Q na razão 50:50 (v/v) e submetido ao mesmo procedimento de extração por mais duas vezes. Em seguida, foi seco em estufa à 40°C até peso constante e caracterizado pelas técnicas de RMN, FTIR, EM, PXR, SXRD, TG, DSC e MEV.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO

O fármaco obtido a partir do medicamento Telzir® foi caracterizado estruturalmente e físico-quimicamente de acordo com as técnicas a seguir.

### 4.5.1 Ressonância magnética nuclear

A caracterização por RMN foi realizada no laboratório de ressonância magnética nuclear da UNIFAL utilizando um espectrômetro Bruker AC-300. As amostras foram solubilizadas em DMSO deuterado e foram obtidos espectros de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , DEPT-135 e mapas HSQC.

### 4.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As análises realizadas no infravermelho sob as condições descritas abaixo foram utilizadas para a confirmação estrutural do fármaco extraído a partir do medicamento Telzir® e também nos estudos de compatibilidade e avaliação da estabilidade polimórfica do fármaco.

As bandas de absorção características da estrutura química do fosamprenavir cálcico foram obtidas por FTIR na faixa de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , utilizando 32 scans e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . As análises foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho *Nicolet iS50 FTIR (Thermo Scientific, USA)* acoplado a *Pike Gladi Attenuated Total Reflectance (ATR) Technologies*, disponível no laboratório de análise e caracterização de fármacos da UNIFAL.

### 4.5.3 Espectrometria de massas

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um sistema UHPLC *Shimadzu* acoplado a um analisador de massas triplo quadrupolo, modelo LCMS-8030, disponível no

laboratório de toxicologia da UNIFAL. As amostras foram injetadas diretamente no espectrômetro sem a utilização de coluna cromatográfica. Foram realizados experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) operando o equipamento no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A ionização por electrospray no modo positivo mostrou-se mais adequada à análise, operando nas seguintes condições: nitrogênio como gás de nebulização (2 L.min<sup>-1</sup>), gás de secagem (15 L.min<sup>-1</sup>) e gás de colisão; temperatura da linha de dessolvatação 250°C, temperatura do bloco de secagem 400°C, tensão no capilar 4 kV e tensão no cone 30 V. Para obtenção dos íons filho de relação  $m/z$  418, 245 e 156 foram empregadas energias de colisão de 15eV, 25eV e 30eV, respectivamente. As amostras foram preparadas na concentração de 10 ppm em fase móvel e injetadas através do cromatógrafo operando a uma vazão de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. Foi empregado um tempo de corrida de 2 minutos para cada injeção de amostra.

#### **4.5.4 Difratometria de raios X em pó**

O padrão difratométrico da estrutura cristalina do fármaco foi obtido por PXRD com varredura angular de  $2\theta$  entre 3° e 40°, utilizando 40 KV e 30 mA. O difratômetro foi operado no modo *Step Scan*, com passo de 0,02° e tempo de contagem de 0,5 segundo por passo. Foi empregado cobre como fonte de raios X ( $K\alpha$  médio: 1,54178). As análises foram realizadas em um difratômetro de raios X Ultima IV (*Rigaku diffractometer*, Japão) disponível no Laboratório de Cristalografia da UNIFAL.

#### **4.5.5 Difratometria de raios X em monocristal**

Os cristais do fosamprenavir cálcico foram obtidos pela técnica de evaporação lenta do solvente. Aproximadamente 10 mg do fármaco foram dissolvidos em 30 mL de uma solução de metanol e água milli-Q na razão 9:1 (v/v). Após 7 dias à temperatura ambiente, foi verificada a formação de cristais semelhantes à agulhas finas microcristalinas. Os cristais foram retirados da solução e analisados pela técnica de difratometria de raios X em monocristal.

As medidas de SXRD foram realizadas à temperatura de 25°C (298 K) em um difratômetro *Agilent SuperNova* equipado com um detector Atlas CCD e um monocromador de grafite para obtenção de raios X monocromáticos de cobre ou molibdênio ( $K\alpha$  Cu ou  $K\alpha$  Mo). Na análise descrita nesta dissertação foi empregado o cobre como fonte de raios X.

Foram utilizados os programas CrysAlis CCD e CrysAlis RED (CRYALIS PRO, 2006) para a coleta de dados, refinamento de célula, redução de dados e correção de absorção pelo método *mult-scan*. A estrutura foi resolvida por métodos diretos e refinada pelo método dos mínimos quadrados da matriz completa em  $F^2$  empregando os *softwares* SHELXS-2013 e SHELXL-2013, respectivamente (SHELDRICK, 2008). As posições dos átomos não hidrogenóides na molécula do fármaco foram determinadas a partir de um mapa de densidade eletrônica construído por síntese de Fourier e refinadas com parâmetros térmicos anisotrópicos.

O *software* SHELXL-2013 (SHELDRICK, 2008) também foi utilizado para o posicionamento estequiométrico dos átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono. Foi utilizado um modelo rígido com comprimentos de ligação C-H fixos de 0,93; 0,96; 0,97 e 0,98Å para as ligações dos grupos aromáticos, metilas, metilênicos e metínicos, respectivamente. Já os átomos de hidrogênio das moléculas de água, da amina aromática e do grupo carbamato foram livremente refinados após atribuição a partir de mapas de diferença de Fourier. Os parâmetros térmicos isotrópicos de todos os hidrogênios foram restringidos ao deslocamento térmico isotrópico equivalente dos átomos a que estão ligados. Foram utilizados os seguintes valores:  $U_{iso}(H) = 1,2$  Ueq (N-amina, N-amida, C-aromático, C-metilênico, C-metínico) ou 1,5 Ueq (O-água e C-metila).

Os dados cristalográficos foram tratados empregando o *software* WingX (FARRUGIA, 1999), o qual também foi utilizado para gerar as tabelas cristalográficas. O programa MERCURY (MACRAE et al., 2008) foi usado na análise cristalográfica e na elaboração das figuras e representações gráficas.

#### 4.5.6 Caracterização térmica

A caracterização térmica foi realizada utilizando as técnicas de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.

A estabilidade térmica do fármaco foi avaliada em equipamento de TG. Foi empregado um intervalo de aquecimento de 30°C a 600°C e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> em atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL.min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em uma Termobalança TG/DTA 7300 (SII *Nano Technology*, Japão) empregando cadinhos de alumínio abertos contendo aproximadamente 3 mg de amostra.

Na análise por DSC também foram utilizadas cerca de 3 mg de amostra, as quais foram colocadas em cadinhos de alumínio abertos e analisadas no intervalo de aquecimento de 30°C a 350°C, com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL.min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em um equipamento DSC Q20 (*TA Instruments*).

#### **4.5.7 Microscopia eletrônica de varredura**

Eletromicrofotografias do fármaco foram obtidas em vácuo por microscopia eletrônica de varredura com tensão de aceleração variando entre 3 kV e 6 kV. As amostras foram recobertas com filme de ouro. As imagens foram obtidas com aumentos de 4000x, 8000x e 13000x. As análises foram realizadas no laboratório de microscopia óptica e eletrônica do instituto de química da Unicamp – Campinas - SP.

#### **4.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO FOSAMPRENAVIR POR CLAE**

Foi desenvolvido um método analítico empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para doseamento do fármaco e quantificação de seus produtos de degradação. Este método também foi utilizado para determinação da pureza cromatográfica do fármaco extraído a partir do medicamento Telzir®.

As análises foram realizadas em um equipamento UHPLC *Ultimate 3000 LC system* (*Thermo Scientific, USA*) equipado com detector DAD-3000RS e o *software Chromeleon 6.8*, disponível no laboratório de análise e caracterização de fármacos da UNIFAL.

Para a preparação da fase móvel, optou-se por utilizar um sal que possibilitasse o acoplamento da técnica de CLAE com a detecção tanto por ultravioleta quanto por espectrometria de massas. Sendo assim, foi empregada uma solução tampão acetato de amônio na concentração de 20 mM, a qual é volátil e compatível com a detecção pelas técnicas mencionadas. Já a determinação do pH da solução tampão baseou-se nos valores de pKa do fosamprenavir. Segundo Gumustas e Ozkan (2010), as estimativas das constantes de dissociação para o fármaco, denominadas de pKa1 e pKa2, apresentam valores de 1,77 e 8,36, respectivamente. Dessa forma, objetivando a neutralização de cargas parciais na molécula do fármaco e, conseqüentemente, uma maior interação deste com a fase estacionária apolar da coluna cromatográfica, foi utilizado um valor de pH para a solução tampão intermediário aos valores de pKa reportados. Experimentalmente, a solução tampão acetato de amônio pH 6,0 apresentou melhores resultados cromatográficos.

A fase móvel inicialmente proposta para o método empregou solução tampão acetato de amônio pH 6,0 e acetonitrila na razão 60:40 (v/v). Entretanto, o fármaco apresentou um fator de retenção inferior a 2,0, indicando pequena interação com a coluna cromatográfica. Sendo assim, o conteúdo de acetonitrila na fase móvel foi reduzido para 32%. Nestas condições o pico cromatográfico do fosamprenavir apresentou assimetria elevada. Tal fato pode ser atribuído à interação do grupo amino presente na molécula do fármaco com os grupos silanóis livres da fase estacionária. Em função disso, objetivando melhorar os parâmetros cromatográficos, foi adicionado trietilamina à fase móvel, a qual liga-se aos grupos silanóis e reduz a interação destes com as moléculas do analito.

Durante o desenvolvimento do método, a temperatura do forno da coluna demonstrou ser um parâmetro crítico à separação dos picos cromatográficos do fármaco e de seus produtos de degradação. Sendo assim, houve necessidade de alterar a temperatura inicialmente proposta de 30°C para 40°C. Dessa forma obteve-se uma resolução adequada entre todos os picos observados.

A seleção do comprimento de onda empregado na detecção por ultravioleta foi realizada escolhendo-se aquele de máxima absorção do fosamprenavir na fase móvel utilizada. Sendo assim, no método desenvolvido empregou-se a detecção no ultravioleta em 266 nm.

Após a avaliação e otimização das condições de análise descritas acima, o método utilizado para análise do fosamprenavir por CLAE empregou como fase móvel uma mistura de acetato de amônio 20 mM, contendo 0,1 % de trietilamina (pH 6,0 ajustado com ácido acético P.A.) e acetonitrila na proporção de 68:32 (v/v). Após o preparo, a fase móvel foi

filtrada em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e desgaseificada. Foi empregado um fluxo de 1,1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acclaim® 120 C-8, 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partícula de 5  $\mu\text{m}$ . A temperatura do forno da coluna foi mantida em 40°C e o comprimento de onda de 266 nm empregado na detecção por ultravioleta. O tempo de corrida foi definido em 10 minutos.

Foram preparadas soluções estoque do fármaco na concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  utilizando metanol como solvente. As soluções de trabalho foram preparadas na concentração de 0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a partir das soluções estoque, empregando a fase móvel como diluente.

O método analítico foi validado segundo as diretrizes do guia ICH Q2(R1). Após a validação, o método foi utilizado nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE INTRÍNSECA

O perfil de degradação do fármaco foi obtido a partir de amostras submetidas a reações de degradação forçada segundo as condições recomendadas pelos guias Q1A (R2) e Q1B da ICH. O fármaco foi exposto às condições de estresse descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de degradação utilizadas na avaliação da estabilidade intrínseca do fosamprenavir cálcico

<b>Agente degradante</b>	<b>Condição de estresse</b>
Calor	60°C
Umidade	75% de umidade relativa
Hidrólise ácida	HCl 0,1M e HCl 3M
Hidrólise básica	NaOH 0,1M e NaOH 2M
Hidrólise neutra	Água
Solução oxidativa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (v/v) e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 9% (v/v)
Luz	Ultravioleta e fluorescente

Fonte: ICH, 2003; ICH, 1996.

O aquecimento, a exposição à umidade e à luz foram realizados com amostras do fármaco no estado sólido por um período de 10 dias. Posteriormente, essas amostras foram dissolvidas em metanol e diluídas com fase móvel para a concentração de trabalho do método

analítico (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>). O estresse por oxidação, hidrólise ácida, básica e neutra foram realizados com o fármaco em solução. Nestas condições, as amostras foram dissolvidas em 5 mL de metanol e posteriormente foram adicionados os agentes degradantes de modo a obter as concentrações descritas na Tabela 2 e soluções estoque de 1 mg.mL<sup>-1</sup> do fármaco. As hidrólises básica, ácida e neutra foram realizadas em refluxo a 60°C por um período de 12 horas, 6 horas e 18 horas, respectivamente. A exposição do fármaco às condições oxidativas foi realizada à temperatura ambiente por um período de 5 dias. Após o período de estresse, as amostras foram diluídas em fase móvel para a concentração de trabalho do método cromatográfico.

As amostras submetidas às condições de degradação forçada foram utilizadas na validação do método desenvolvido por CLAE e os produtos de degradação encontrados foram caracterizados estruturalmente pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

#### **4.7.1 Caracterização estrutural dos produtos de degradação**

A caracterização estrutural dos produtos de degradação verificados no estudo da estabilidade intrínseca do fosamprenavir cálcico foi realizada empregando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. As análises foram realizadas no laboratório *LabMass*, em Campinas-SP, empregando um cromatógrafo líquido de alta performance *Alliance*, modelo 2695 (*Waters, USA*), acoplado a um espectrômetro de massas, modelo quatromicro (*Micromass*), com analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de electrospray.

As amostras foram injetadas no espectrômetro através do cromatógrafo operando segundo às condições descritas no item 4.6. Foi realizada uma varredura de cada amostra objetivando determinar o modo de ionização mais adequado e a relação  $m/z$  dos subprodutos. Os espectros de fragmentação dos íons correspondentes a cada um dos produtos de degradação foram obtidos por espectrometria de massas sequencial, utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas. A ionização no modo positivo foi mais adequada às análises, sendo utilizada nas seguintes condições: nitrogênio como gás de nebulização (100 L.h<sup>-1</sup>) e gás de secagem (200 L.h<sup>-1</sup>), temperatura da linha de dessolvatação 250°C, temperatura da fonte 120°C, tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV.

#### 4.8 ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE

Nos estudos de compatibilidade fármaco-excipientes foram utilizadas como amostras o fosamprenavir cálcico e os excipientes celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, sílica anidra coloidal, povidona K30, crospovidona, amido glicolato de sódio e opadry rosa, além de misturas binárias 1:1 m/m do fármaco com cada um dos excipientes. As misturas foram homogeneizadas empregando agitador de tubos tipo vórtex.

As amostras foram analisadas imediatamente após o seu preparo pelas técnicas de CLAE e FTIR segundo as condições descritas nos itens 4.6 e 4.5.2, respectivamente. Em seguida, foram incubadas em câmara de estabilidade a  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa e temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  a fim de avaliar a influência desses parâmetros na estabilidade química do fármaco e das misturas. As análises foram realizadas novamente após 3 e 6 meses de incubação empregando as mesmas técnicas analíticas.

#### 4.9 ESTUDO DA ESTABILIDADE POLIMÓRFICA DO FÁRMACO

A estabilidade polimórfica foi avaliada somente no fármaco isolado. Objetivando verificar possíveis alterações na estrutura cristalina do fosamprenavir cálcio, foram utilizadas as técnicas de PXRD e FTIR conforme as condições descritas nos itens 4.5.4 e 4.5.2, respectivamente.

Após análise do fármaco pelas técnicas descritas, alíquotas do mesmo material foram incubadas em estufa a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa, objetivando avaliar a influência desses parâmetros na estabilidade polimórfica do fosamprenavir cálcico. As análises foram realizadas novamente após 3 e 6 meses de incubação empregando as mesmas técnicas analíticas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados das análises realizadas e a discussão dos mesmos.

### 5.1 EXTRAÇÃO DO FÁRMACO FOSAMPRENAVIR CÁLCICO

A extração do fosamprenavir cálcico a partir do medicamento Telzir® foi realizada objetivando a obtenção do fármaco na sua forma sólida comercial, denominada de forma I, e com pureza adequada para ser utilizado como padrão de trabalho neste estudo. O método descrito por Bhode e colaboradores (2012) para a obtenção dessa forma cristalina do fármaco foi utilizado como referência, sendo realizadas algumas adaptações. Além disso, o método de extração levou em consideração a solubilidade do fármaco e dos excipientes encontrados na formulação. A solubilidade do revestimento dos comprimidos não foi considerada, uma vez que este foi removido antes do preparo da amostra.

A formulação do medicamento Telzir® é composta pelo fármaco fosamprenavir cálcico e os excipientes celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, sílica anidra coloidal e povidona. A celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio e sílica anidra coloidal são descritos como praticamente insolúveis em etanol. Já a povidona e o fosamprenavir cálcico são solúveis nesse solvente (RSC, 2013). Em função disso, no procedimento de extração foi utilizado etanol como solvente (95%) e metanol como co-solvente (5%), a fim de aumentar a solubilidade do fármaco.

A adição de 100 mL da solução de etanol e metanol 95:5 (v/v) à amostra do medicamento Telzir®, equivalente à 5 g do fosamprenavir cálcico, gerou uma suspensão do fármaco e dos excipientes. O banho de ultrassom associado ao aquecimento em banho-maria à 70°C permitiu a solubilização do fármaco presente na suspensão, gerando um sobrenadante límpido e permitindo a retirada dos excipientes insolúveis através de filtração em papel Whatman. Objetivando retirar parte do fármaco que tenha ficado aderido aos excipientes insolúveis e aumentar o rendimento da extração, estes foram lavados com 25 mL da solução de etanol e metanol.

O procedimento de filtração gerou o resfriamento da amostra e a precipitação parcial do fármaco. Em função disso, o filtrado obtido correspondendo à uma solução saturada do fosamprenavir cálcico e contendo a povidona presente na formulação, foi aquecido novamente à 70°C até obtenção de uma solução límpida. A quebra da estabilidade da solução saturada foi realizada pela adição de água, resfriamento e agitação, gerando a precipitação do fármaco. Já a povidona, totalmente solúvel em etanol, metanol e água, permaneceu na fase líquida e foi descartada. Entretanto, objetivando remover uma possível quantidade de povidona que tenha ficado aderida ao fármaco, este foi lavado com 20 ml de uma solução de etanol e água milli-Q na razão 50:50 (v/v).

Para aumentar a pureza do fármaco, o procedimento de extração foi repetido mais duas vezes utilizando o precipitado final. Ao término do processo, o material obtido foi seco em estufa à 40°C até peso constante, gerando um rendimento de aproximadamente 75%. O produto obtido foi caracterizado estruturalmente e físico-quimicamente pelas técnicas de RMN, FTIR, EM, PXRD, SXR, DSC, TG e MEV. A pureza cromatográfica do fármaco foi determinada por CLAE.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO

O fosamprenavir cálcico foi caracterizado pelas técnicas a seguir.

### 5.2.1 Ressonância magnética nuclear

Foram empregadas as técnicas de RMN descritas abaixo:

#### 5.2.1.1 Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de $^{13}\text{C}$ )

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi obtido operando o espectrômetro a 75 MHz. A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado. O espectro obtido é apresentado na Figura 5 e suas respectivas atribuições são descritas a seguir.

O número de sinais observados foi condizente com a quantidade de carbonos presentes na molécula do fosamprenavir. Além disso, os deslocamentos químicos estão em conformidade com os valores esperados (PAVIA et al. 2013).

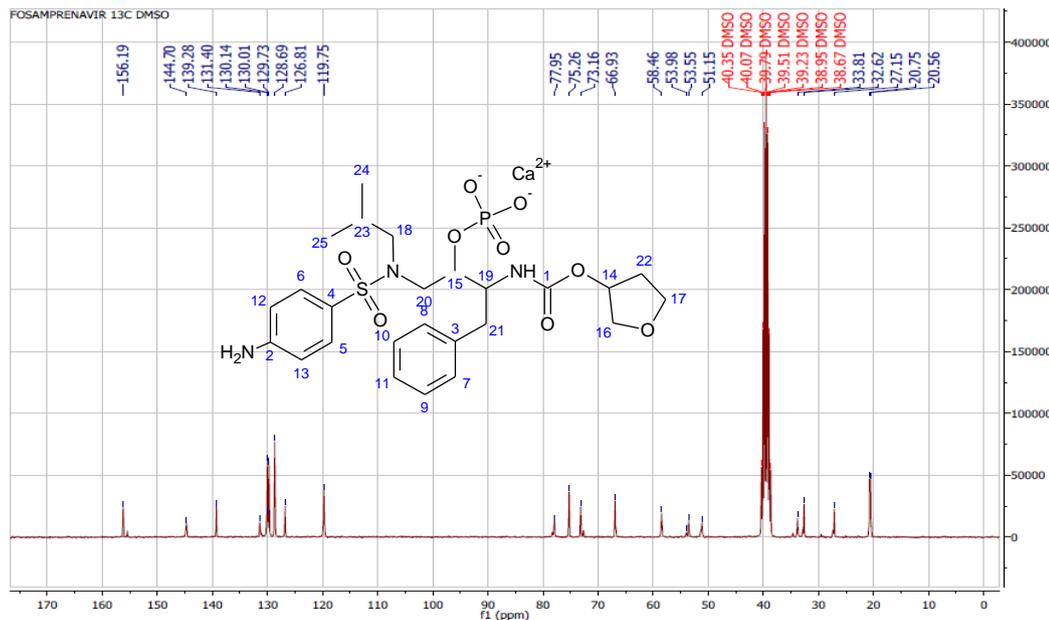


Figura 5 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir®.  
Fonte: Do autor.

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  ppm, DMSO-d, 75 MHz):** 156,19 (C<sub>1</sub>); 144,70 (C<sub>2</sub>); 139,28 (C<sub>3</sub>); 131,40 (C<sub>4</sub>); 130,01 (C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>); 129,73 (C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>); 128,69 (C<sub>9</sub> e C<sub>10</sub>); 126,81 (C<sub>11</sub>); 119,75 (C<sub>12</sub> e C<sub>13</sub>); 77,95 (C<sub>14</sub>); 75,26 (C<sub>15</sub>); 73,16 (C<sub>16</sub>); 66,93 (C<sub>17</sub>); 58,46 (C<sub>18</sub>); 53,55 (C<sub>19</sub>); 51,15 (C<sub>20</sub>); 33,81 (C<sub>21</sub>); 32,62 (C<sub>22</sub>); 27,15 (C<sub>23</sub>); 20,75 (C<sub>24</sub>); 20,56 (C<sub>25</sub>).

### 5.2.1.2 DEPT-135

A técnica de intensificação sem distorção por transferência de polarização (do inglês, “distortionless enhancement by polarization transfer” – DEPT) baseia-se na irradiação da amostra com uma sequência complexa de pulsos. Como resultado, os sinais de  $^{13}\text{C}$  dos átomos

de carbono presentes na molécula apresentam fases diferentes dependendo do número de hidrogênios ligados a cada carbono. No DEPT-135, todos os carbonos hidrogenados produzem um sinal, mas a fase do sinal será distinta, dependendo se o número de hidrogênios ligados é par ou ímpar. Grupos CH e CH<sub>3</sub> dão origem a sinais positivos, enquanto grupos CH<sub>2</sub> originam sinais negativos (PAVIA et al. 2013).

O espectro DEPT-135 obtido para o fármaco extraído da formulação comercial é apresentado na Figura 6. Observa-se que os deslocamentos químicos são semelhantes aos observados no espectro de <sup>13</sup>C e que não são verificados sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados presentes na molécula do fosamprenavir, corroborando com as atribuições previamente realizadas.

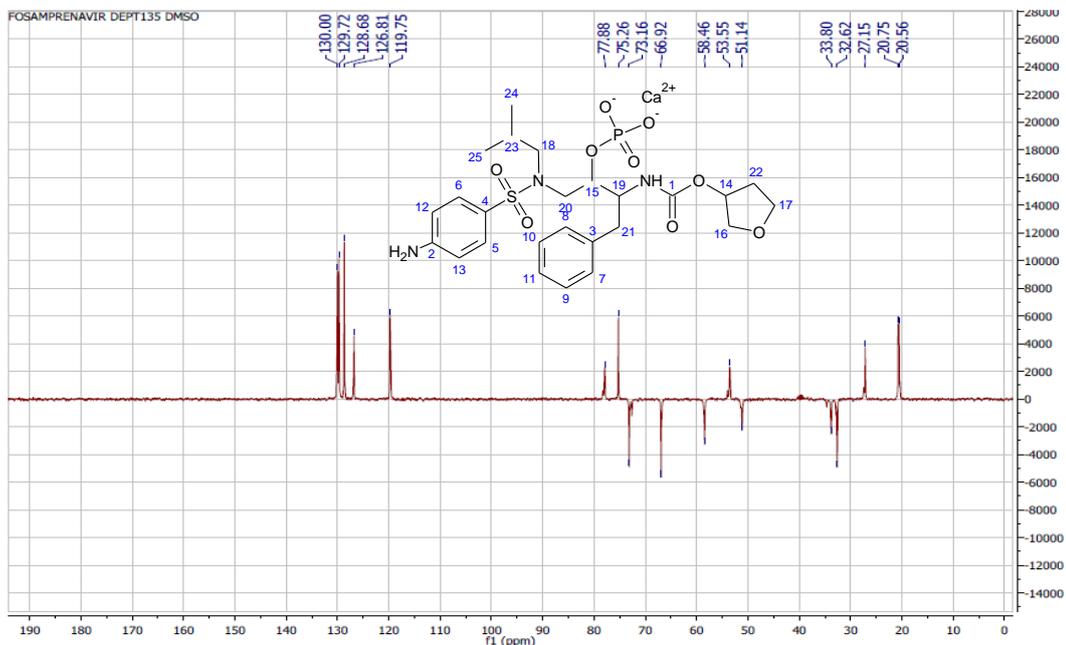


Figura 6 - Espectro DEPT-135 obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir®.  
Fonte: Do autor.

**RMN DEPT-135 ( $\delta$  ppm, DMSO-d):** 130,00 (C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>); 129,72 (C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>); 128,68 (C<sub>9</sub> e C<sub>10</sub>); 126,81 (C<sub>11</sub>); 119,75 (C<sub>12</sub> e C<sub>13</sub>); 77,88 (C<sub>14</sub>); 75,26 (C<sub>15</sub>); 73,16 (C<sub>16</sub>); 66,92 (C<sub>17</sub>); 58,46 (C<sub>18</sub>); 53,55 (C<sub>19</sub>); 51,14 (C<sub>20</sub>); 33,80 (C<sub>21</sub>); 32,62 (C<sub>22</sub>); 27,15 (C<sub>23</sub>); 20,75 (C<sub>24</sub>); 20,56 (C<sub>25</sub>).

### 5.2.1.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , obtido operando o espectrômetro a 300 MHz, é apresentado na Figura 7 e suas respectivas atribuições são descritas a seguir. A integração dos sinais observados foi condizente com a quantidade de hidrogênios presentes na molécula do fosamprenavir cálcico. Além disso, os deslocamentos químicos estão em conformidade com os valores esperados (PAVIA et al. 2013).

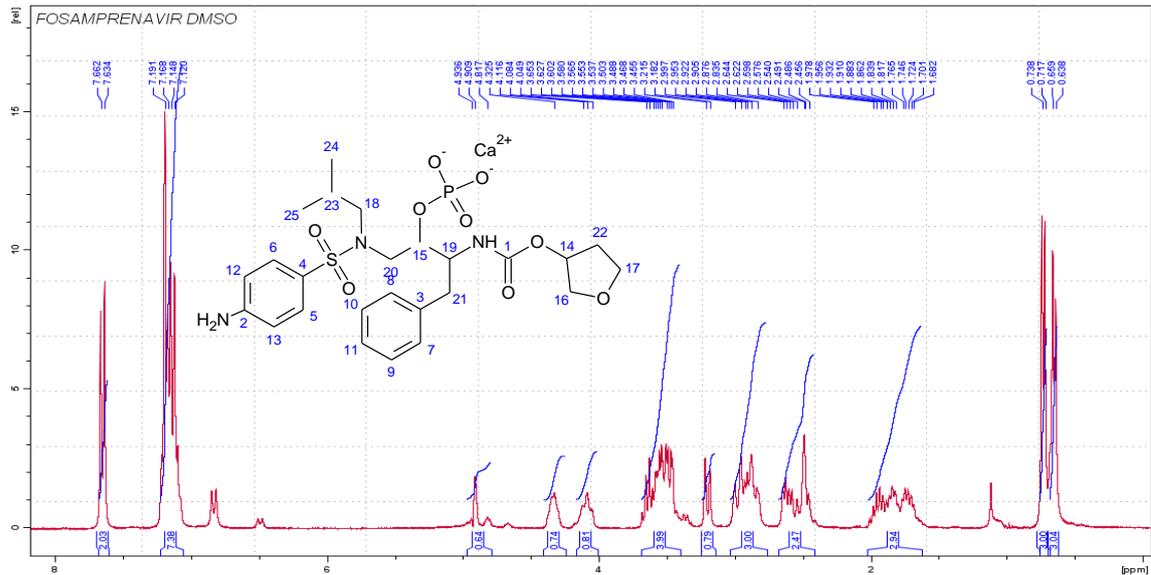


Figura 7 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir®.  
Fonte: Do autor.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  ppm, DMSO-d, 300 MHz):** 7,65 (d, 2H,  $J = 8,63\text{Hz}$ , H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 7,11–7,19 (m, 7H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>); 4,81–4,93 (m, 1H, H<sub>15</sub>); 4,32–4,34 (m, 1H, H<sub>14</sub>); 4,04–4,11 (m, 1H, H<sub>19</sub>); 3,45–3,65 (m, 4H, H<sub>20</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>16</sub>); 3,20 (d, 1H,  $J = 10,0\text{Hz}$ , H<sub>16</sub>); 2,83–2,99 (m, 3H, H<sub>21</sub>, H<sub>20</sub>, H<sub>18</sub>); 2,45–2,64 (m, 2H, H<sub>21</sub>, H<sub>18</sub>); 1,68–1,97 (m, 3H, H<sub>22</sub>, H<sub>23</sub>); 0,74 (d, 3H,  $J = 6,45\text{Hz}$ , H<sub>25</sub>); 0,65 (d, 3H,  $J = 6,45\text{Hz}$ , H<sub>24</sub>)

#### 5.2.1.4 Correlação heteronuclear de um único quantum (HSQC)

Os mapas HSQC, do inglês "*Heteronuclear Single Quantum Correlation*", são experimentos bidimensionais de RMN. Nestes os deslocamentos químicos do espectro de próton são registrados em um eixo e os deslocamentos do espectro de  $^{13}\text{C}$ , da mesma amostra, são apresentados em um segundo eixo. A interação entre os sinais de ambos os eixos permite

determinar a quais átomos de carbono cada hidrogênio está correlacionado (PAVIA et al. 2013).

As Figuras 8 e 9 apresentam os mapas HSQC obtidos para o fármaco extraído do medicamento Telzir®. O experimento foi dividido em duas figuras, extensão 1 e 2, para melhor apresentação gráfica. Os mapas HSQC analisados conjuntamente com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135, demonstraram estar de acordo com as atribuições esperadas para a molécula do fosamprenavir (PAVIA et al. 2013). A interpretação dos resultados é apresentada resumidamente na Tabela 3.

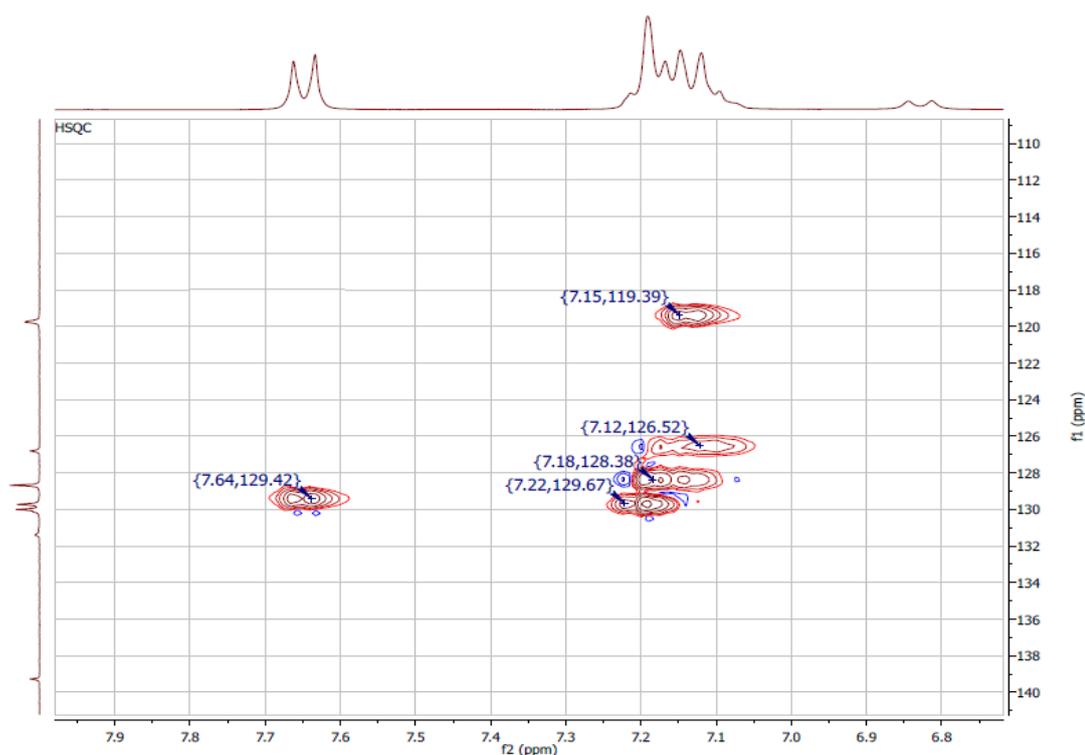


Figura 8 - Mapa HSQC (extensão 1) obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir®. Fonte: Do autor.

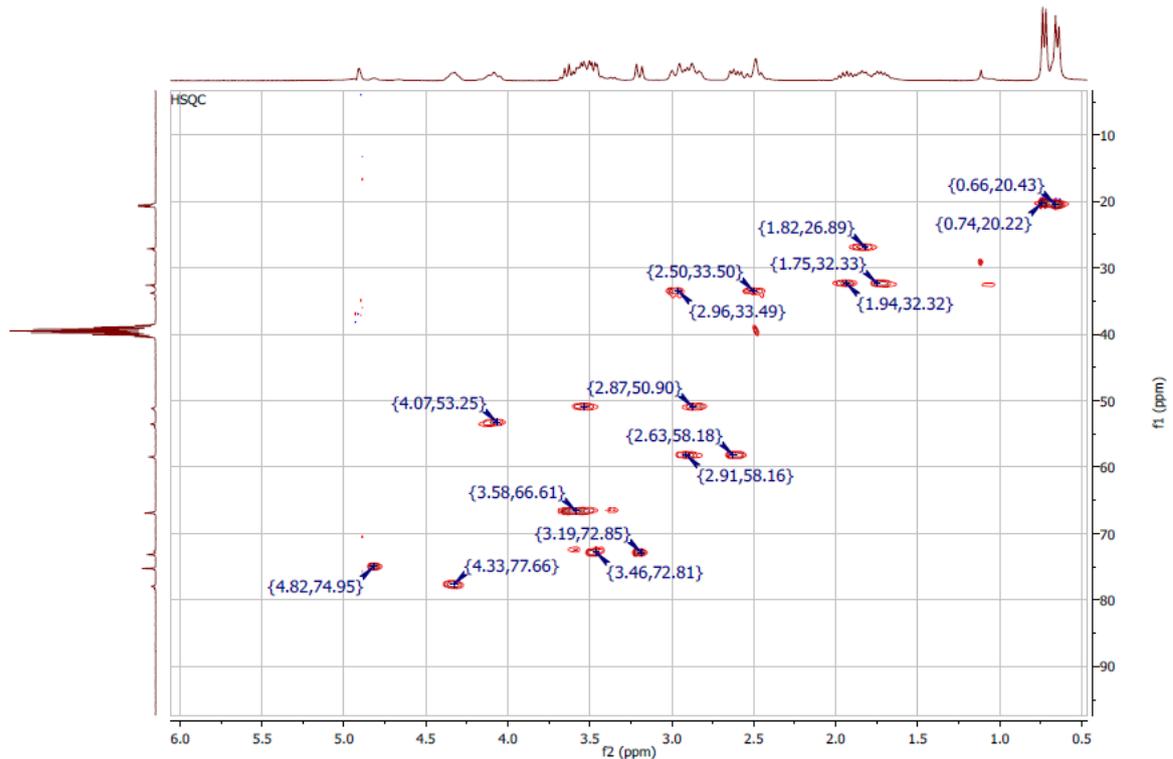


Figura 9 - Mapa HSQC (extensão 2) obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir®.  
Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Atribuições dos mapas HSQC obtidos para o fármaco extraído do medicamento Telzir®  
(Continua)

Posição do carbono	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação
1	Não verificado	C
2	Não verificado	C
3	Não verificado	C
4	Não verificado	C
5 e 6	129,67	CH e CH
7 e 8	129,42	CH e CH
9 e 10	128,38	CH e CH
11	126,52	CH
12 e 13	119,39	CH e CH
14	77,66	CH
15	74,95	CH
16	72,83	CH <sub>2</sub>

Tabela 4 - Atribuições dos mapas HSQC obtidos para o fármaco extraído do medicamento Telzir® (Conclusão)

Posição do carbono	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação
17	66,61	CH2
18	58,17	CH2
19	53,25	CH
20	50,90	CH2
21	33,50	CH2
22	32,33	CH2
23	26,89	CH
24	20,22	CH3
25	20,43	CH3

Fonte: Do autor.

### 5.2.2 Espectroscopia no infravermelho

O espectro no infravermelho descrito na literatura para a forma I do fosamprenavir cálcico é apresentado na Figura 10. Já a Figura 11 mostra o espectro obtido para o fármaco extraído da formulação do medicamento Telzir®. Percebe-se que ambos os espectros apresentam bandas de absorção semelhantes. Sendo assim, uma vez que espectros de infravermelho são únicos para cada substância, pode-se concluir que o produto obtido no procedimento de extração se refere ao fármaco fosamprenavir cálcico.

As principais bandas de absorção características da estrutura do fármaco estão descritas na Tabela 4. As atribuições foram realizadas considerando a região de absorção, o formato e a intensidade, em comparação com dados de literatura tabelados para os respectivos grupos funcionais (PAVIA et al., 2013).

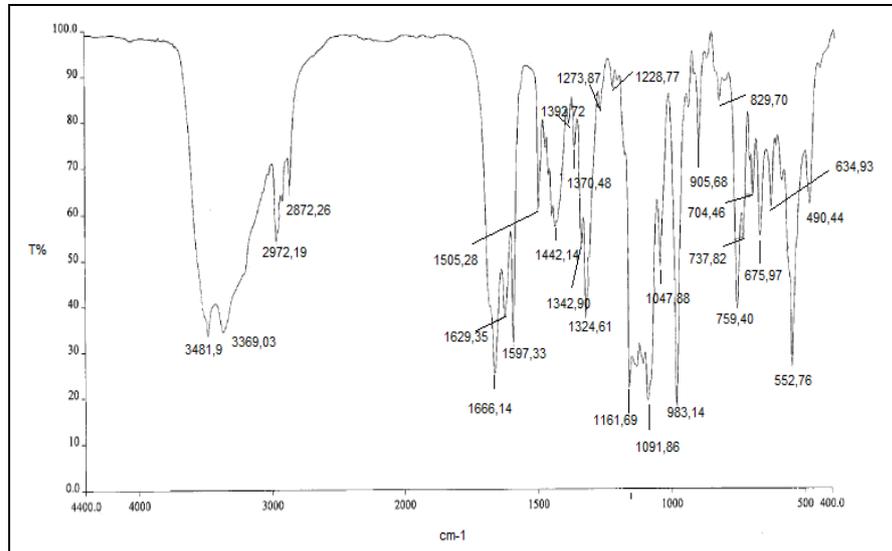


Figura 10 - Espectro de infravermelho descrito para a forma cristalina I do fármaco fosamprenavir cálcico.  
Fonte: Adaptado de: BHOGE et al. 2012.

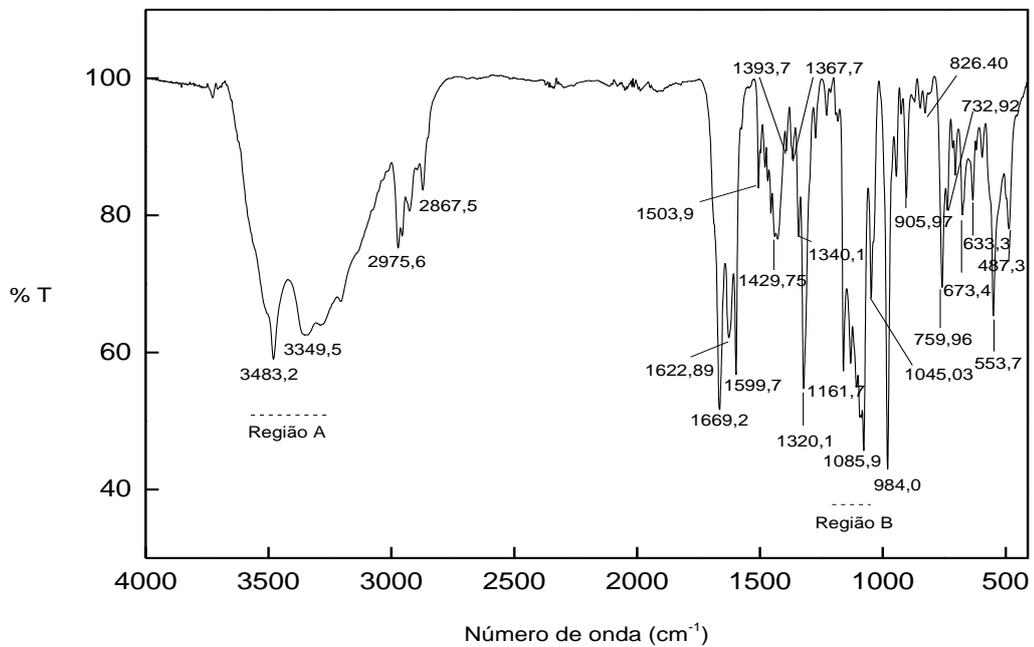


Figura 11 - Espectro de absorção no infravermelho na faixa de 4000 a 400cm<sup>-1</sup> obtido para o fármaco extraído do medicamento Telzir®.  
Fonte: Do autor.

Tabela 5 - Atribuições das bandas do espectro infravermelho aos grupos correspondentes na molécula de fosamprenavir cálcico

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Intensidade	Atribuição
1669,2	Forte	Estiramento C=O carbonila
1599,7 e 1503,9	Média	Estiramento C=C anel aromático
2975,6 e 2867,5	Média-forte	Estiramentos C-H alifáticos
1393,7	Média	Dobramento assimétrico grupo isopropílico
1367,7	Média	Dobramento simétrico grupo isopropílico
Região A	Média	Estiramentos N-H funções amina e amida
1622,89	Forte	Deformação angular grupo NH <sub>2</sub>
1340,1	Média-forte	Estiramento C-N função amina
Região B	Forte	Estiramentos C-O funções éster e éter
1320,1	Forte	Estiramento assimétrico S=O
984	Forte	Estiramento C-O do éster de fosfato

Fonte: Do autor.

### 5.2.3 Espectrometria de massas

A caracterização do fármaco por espectrometria de massas foi realizada através de experimentos de espectrometria de massas sequencial. Inicialmente foi realizada a varredura da amostra a fim de determinar a relação massa/carga ( $m/z$ ) do fármaco e o modo de ionização mais adequado. O íon de  $m/z$  586 foi selecionado e a ionização no modo positivo mostrou-se mais efetiva. O modo de monitoramento de reações múltiplas foi utilizado para obtenção do espectro de íons produto apresentado abaixo (FIGURA 12). As estruturas propostas para os íons estão em conformidade com as relações massa/carga encontradas. Os resultados corroboram com os obtidos por RMN e FTIR, confirmando que o fármaco fosamprenavir cálcico foi eficientemente extraído da formulação do medicamento Telzir®.

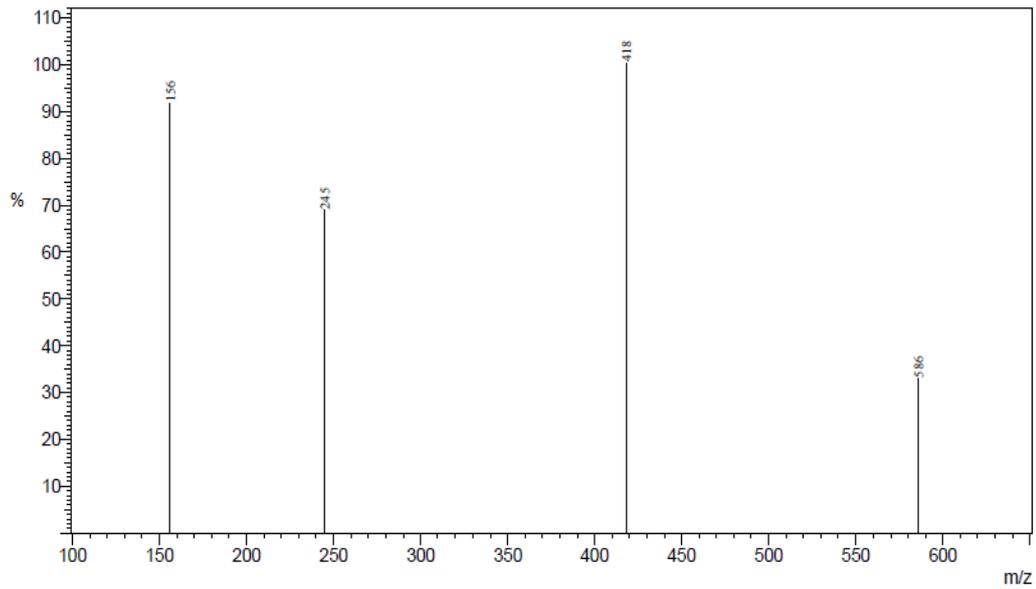


Figura 12 - Espectro de íons produto obtido para o fosamprenavir cálcico extraído do medicamento Telzir®.

Fonte: Do autor.

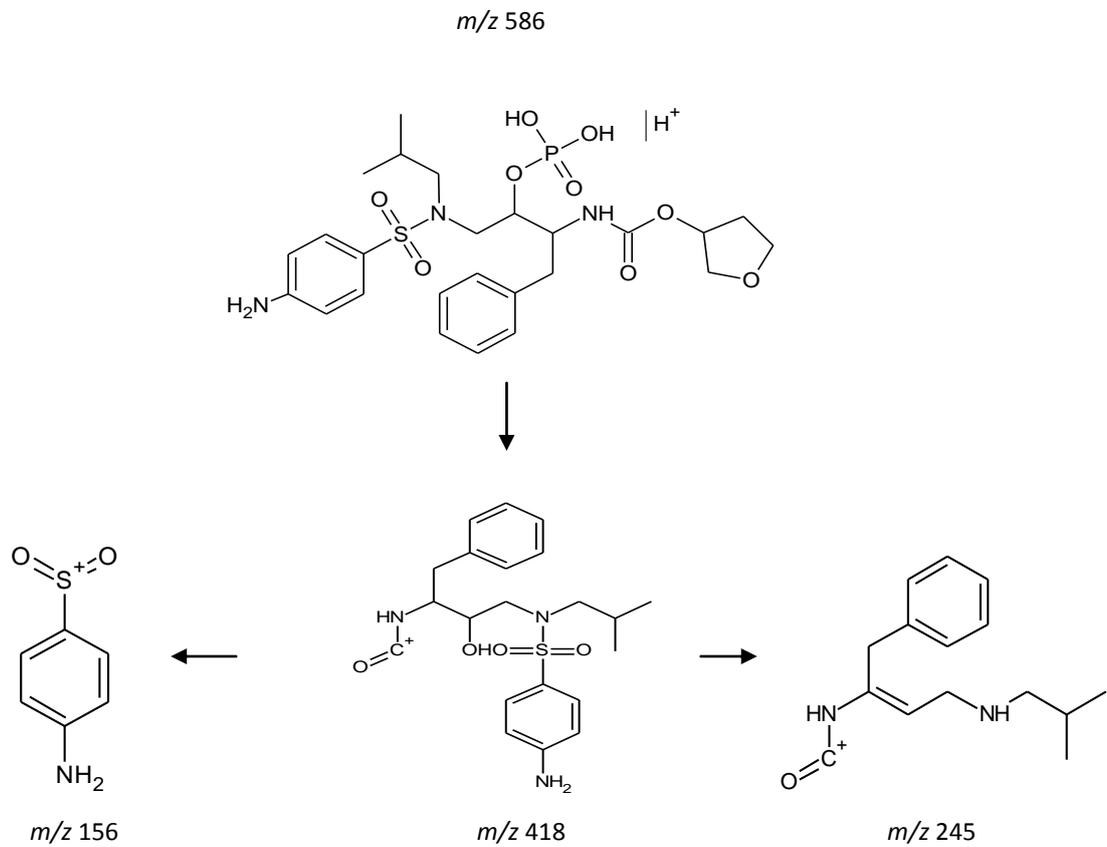


Figura 13 - Perfil de fragmentação do fosamprenavir baseado nos estudos MS/MS.

Fonte: Do autor.

### 5.2.4 Difração de raios X em pó

A análise por difratometria de raios X em pó foi realizada com a formulação do medicamento e com o fármaco isolado após o procedimento de extração. Os padrões difratométricos foram comparados entre si e com os descritos na literatura. Percebe-se que nos difratogramas do medicamento e do fármaco extraído há uma perfeita sobreposição de todos os picos de Bragg, indicando que a recristalização do fármaco quando submetido ao procedimento de extração não alterou sua forma cristalina. Além disso, verifica-se que os ângulos de difração correspondem aos descritos por Bhoge et al. (2012) para a forma I do fármaco, a qual é a sua forma sólida comercial.

A estrutura cristalina do fármaco apresentou picos característicos em 5,74; 9,92; 11,44; 13,78; 15,14; 17,93; 19,70; 20,66; 21,62; 22,06; 22,90; 24,52 e 26,82  $2\theta$ . Os difratogramas obtidos e o descrito para a forma I do fosamprenavir cálcico são apresentados nas Figuras 14 e 15 respectivamente.

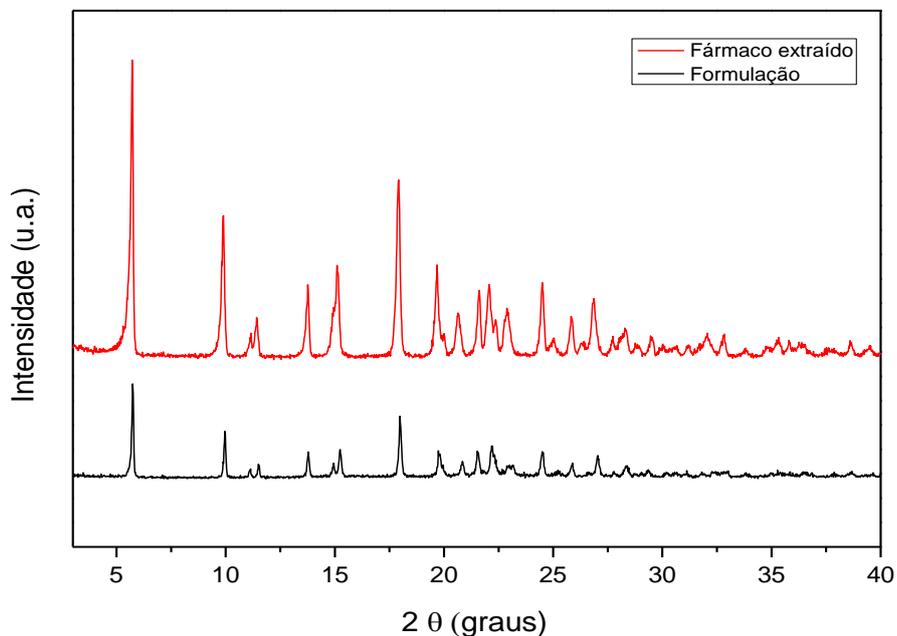


Figura 14 - Difratogramas fosamprenavir cálcico na formulação do medicamento Telzir® e após o procedimento de extração. Medidas de  $2\theta$  entre  $3^\circ$  e  $40^\circ$ , 40 KV, 30 mA e Cu-K $\alpha$  (1,54178).

Fonte: Do autor.

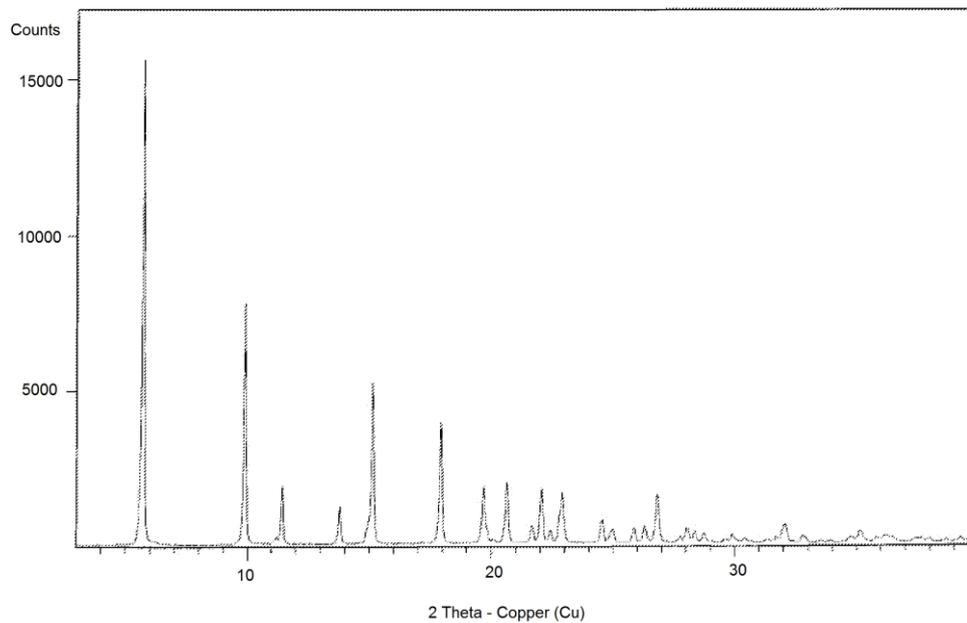


Figura 15 - Difratoograma fosamprenavir cálcico forma I. Medidas de  $2\theta$  entre  $3^\circ$  e  $40^\circ$ , 45 KV, 40 mA,  $K\alpha$  Cu (1,54), detector Xceleto. Fonte: Adaptado de Bhoge et al., 2012.

### 5.2.5. Determinação estrutural por difração de raios X em monocristal

Os principais dados cristalográficos referentes à determinação da estrutura do fosamprenavir cálcico são apresentados na Tabela 5.

Tabela 6 - Principais dados cristalográficos do fosamprenavir cálcico

(Continua)

<b>Forma sólida</b>	<b>Fosamprenavir cálcico</b>
Fórmula empírica	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> Ca N <sub>3</sub> O <sub>14</sub> P S
Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	709,71
Temperatura (K)	298
Comprimento de onda (Å)	1,54184
Sistema cristalino	Trigonal
Grupo de espaço	P 3 <sub>1</sub>
Parâmetros de cela	a = 17,7582 Å; b = 17,7582 Å; c = 9,2948(3) Å $\alpha = 90^\circ$ ; $\beta = 90^\circ$ ; $\gamma = 120^\circ$

Tabela 7 - Principais dados cristalográficos do fosamprenavir cálcico

(Conclusão)	
Forma sólida	Fosamprenavir cálcico
Volume (Å <sup>3</sup> )	2538,45
Z, densidade calculada (mg/m <sup>3</sup> )	3; 1,393
Coeficiente de absorção (mm <sup>-1</sup> )	3,214
F(000)	1122
Faixa teta para a coleção de dados (°)	4,981 a 73,069°
Variação dos índices de Miller	-21<=h<=22, -21<=k<=21, -11<=l<=9
Reflexões coletadas	41212
Grau de completude até o teta máximo (67,684°)	100,0 %
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa
Dados/restrições/parâmetros	6048 / 10 / 430
Qualidade do ajuste em F <sup>2</sup>	1,026
Índices R finais [ $I > 2 \sigma(I)$ ]	R1 = 0,0486, wR2 = 0,1314
Índice R (todos os dados)	R1 = 0,0498, wR2 = 0,1337
Parâmetro de Flack	0,002
Maior diferença pico e vale (Å <sup>-3</sup> )	0,510 e -0,328

Fonte: Do autor.

Em um cristal, a menor unidade repetitiva a partir da qual a estrutura cristalina pode ser formada por operações de simetria e translação é denominada de unidade assimétrica (TILLEY, 2014). Esta pode ser formada por um único átomo, uma fração de uma molécula, uma molécula inteira ou por várias moléculas. A Figura 16 mostra a unidade assimétrica da forma sólida obtida para o fosamprenavir cálcico. Os átomos presentes no esqueleto orgânico da unidade assimétrica foram identificados, o contra-íon cálcio e as moléculas de água omitidas, permitindo dessa forma uma melhor visualização da estrutura. Já na Figura 17, a unidade assimétrica é apresentada no modo elipsoide. Percebe-se que ela é composta por uma molécula do fármaco associada a cinco moléculas de água, sendo duas águas de hidratação e três águas de coordenação ao íon cálcio. A Figura 18 evidencia que, dentre as águas de coordenação, duas são terminais e uma apresenta-se em ponte, conectando dois átomos de cálcio na estrutura cristalina do fármaco.

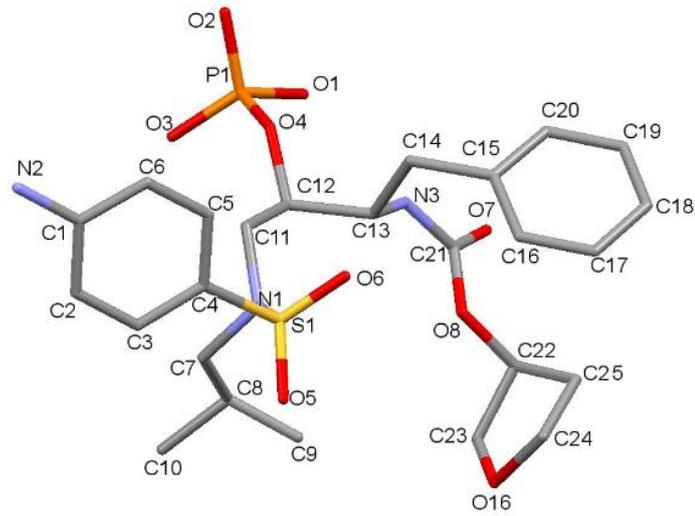


Figura 16 - Representação da unidade assimétrica do fosamprenavir cálcico com átomos identificados. Moléculas de água, íon cálcio e átomos de hidrogênio omitidos.

Fonte: Do autor.

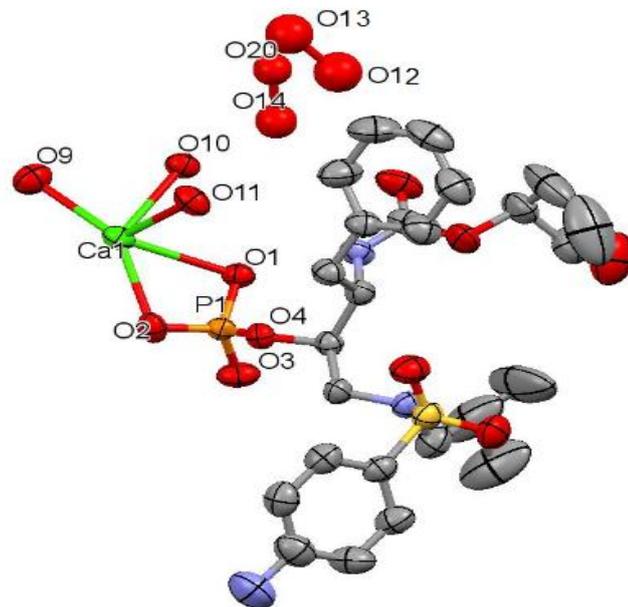


Figura 17 - Representação da unidade assimétrica do fosamprenavir cálcico.

Fonte: Do autor.

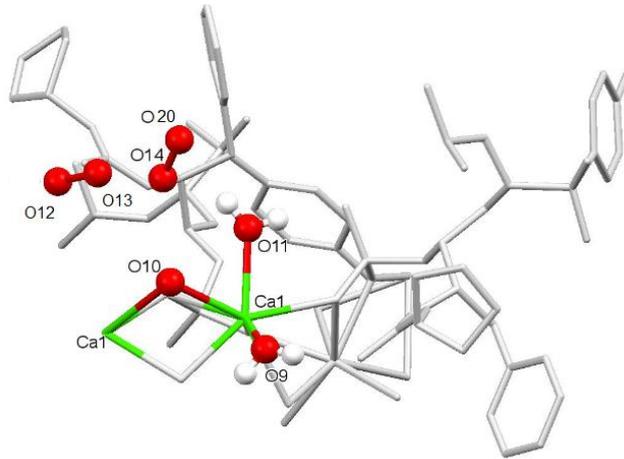


Figura 18 - Visualização da estrutura cristalina do fosamprenavir cálcico, evidenciando a presença de duas moléculas de água de coordenação terminais e uma em ponte conectando dois átomos de cálcio.

Fonte: Do autor.

Na Figura 19 é apresentada a cela unitária da forma sólida obtida para o fosamprenavir cálcico, a partir da qual os cristais do fármaco podem ser formados por simples translação. Percebe-se a existência de vacâncias entre as moléculas do fármaco no interior da cela. A Figura 20 mostra que as moléculas de água de hidratação presentes na estrutura preenchem estas vacâncias, formando um canal hidrofílico paralelo ao eixo c, permitindo dessa forma a estabilização do empacotamento cristalino.

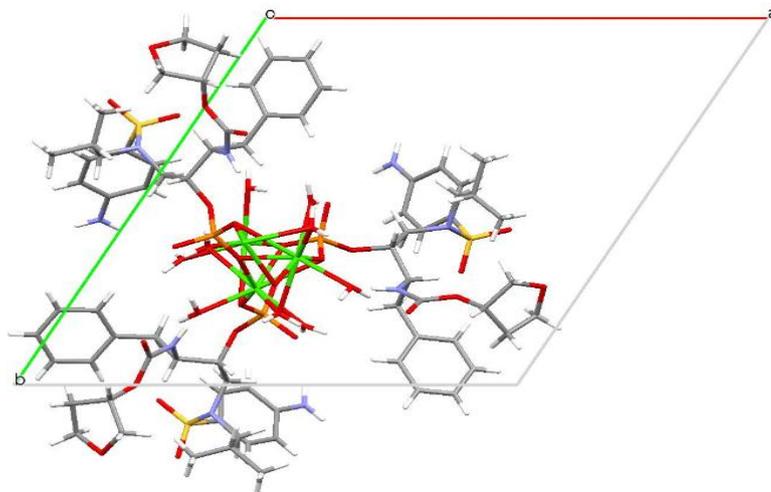


Figura 19 - Representação do empacotamento do fosamprenavir cálcico evidenciando a presença de vacâncias no interior da cela unitária.

Fonte: Do autor.

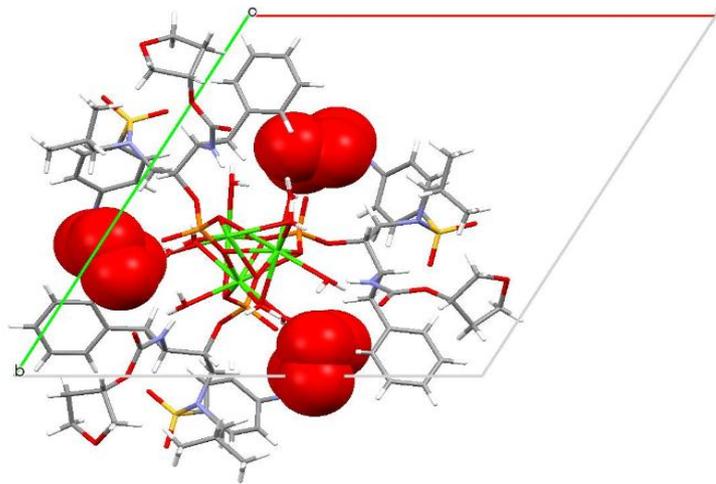


Figura 20 - Representação do empacotamento do fosamprenavir cálcico evidenciando a presença de moléculas de água de hidratação ocupando as vacâncias no interior da cela unitária.

Fonte: Do autor.

As medidas por difratometria de raios X em monocristal demonstraram que a forma sólida analisada do fosamprenavir cálcico pertence ao sistema cristalino trigonal, apresentando os elementos de simetria correspondentes ao grupo de espaço  $P3_1$ . Tal fato revela que a unidade assimétrica forma uma rede primitiva, apresentando um eixo helicoidal de ordem 3 e translação de  $1/3$ , sendo esta paralela ao eixo c da cela unitária. A Figura 21 mostra a operação de simetria da molécula de fosamprenavir cálcico em torno do eixo helicoidal de ordem 3, evidenciando as rotações de  $120^\circ$ .

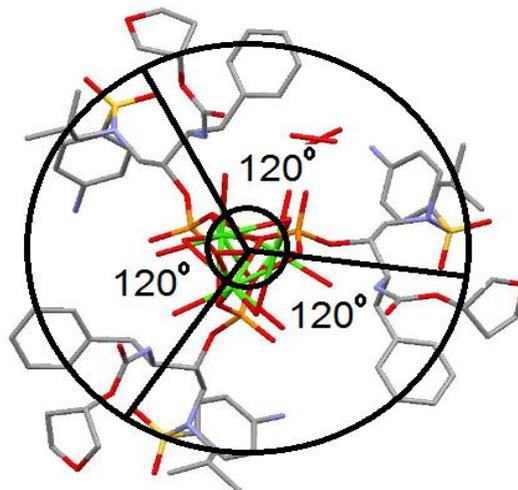


Figura 21 - Representação da operação de simetria entorno do eixo helicoidal de ordem 3 evidenciando as rotações de  $120^\circ$ .

Fonte: Do autor.

A forma comercial do fosamprenavir constitui um composto de coordenação, apresentando uma molécula orgânica associada a um átomo metálico de cálcio. A análise por SXRD permitiu evidenciar que o sal cálcico do fosamprenavir apresenta-se como um polímero de coordenação unidimensional, com crescimento somente ao longo da direção [001], paralela ao eixo c da cela unitária, conforme demonstrado na Figura 22.

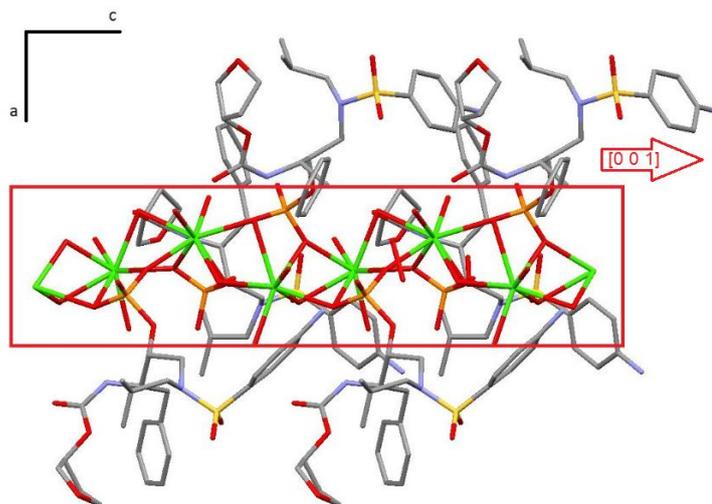


Figura 22 - Visualização do polímero de coordenação ao longo do eixo c da cela unitária, evidenciando o crescimento da cadeia na direção [001].

Fonte: Do autor.

O difratograma de pó simulado pelo software MERCURY para a estrutura cristalina determinada do fosamprenavir cálcio é apresentado na Figura 23. Percebe-se que os picos de Bragg ocorrem nos mesmos ângulos de difração que os verificados para a forma I do fármaco, indicando que na amostra analisada por SXRD, foi obtido um monocristal correspondente à forma sólida comercial do fosamprenavir cálcio, a qual foi empregada nos estudos de compatibilidade e estabilidade desta dissertação.

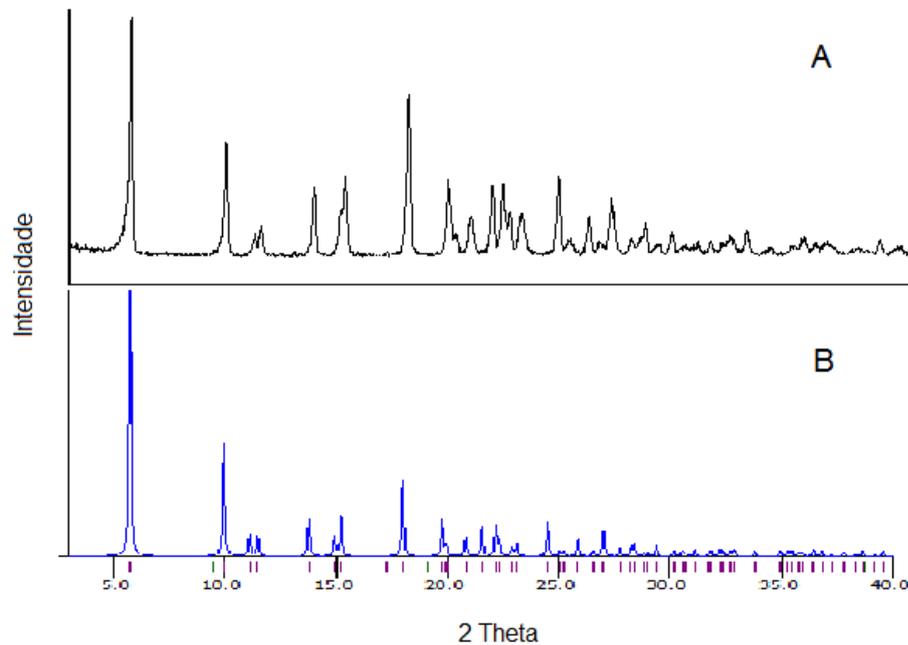


Figura 23 - Comparação entre o difratograma obtido experimentalmente por PXRD para o fosamprenavir cálcico e o difratograma simulado pelo software MERCURY para a estrutura determinada do fármaco.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Difratograma experimental;  
(B) Difratograma simulado.

### 5.2.6. Análise térmica

As curvas térmicas obtidas para o fármaco são apresentadas na Figura 24. A curva DSC apresenta um evento endotérmico na faixa de 30°C a 147,5°C. Nessa mesma faixa de temperatura, a curva TG apresenta uma perda de massa de 13,47%. Esses eventos correspondem à eliminação das 5 moléculas de água presentes na forma I do fosamprenavir cálcico, a qual é descrita na literatura como um hidrato pentahidratado (ARMITAGE; SEARLE; SINGH, 2003). O teor de água no fármaco foi confirmado por análise titulométrica em aparelho de Karl Fischer ( $13,57 \pm 2,1\%$ ) e está em conformidade com os resultados encontrados por SXR. D.

O segundo evento endotérmico na curva DSC inicia-se em aproximadamente 170°C. Nessa temperatura, observa-se nas curvas TG e DTG o início de perda de massa do fármaco, a qual é intensificada a partir de 282°C. Tal fato indica que o fosamprenavir cálcico sofre

degradação térmica antes do seu ponto de fusão descrito na literatura (282°C – 284°C) (RSC, 2013), indicando que o fármaco não apresenta temperatura e entalpia de fusão definidas. Como a temperatura e entalpia de fusão são os principais parâmetros avaliados em estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, o perfil apresentado constituiu uma limitação ao emprego das análises térmicas nos estudos de compatibilidade envolvendo o fosamprenavir cálcico.

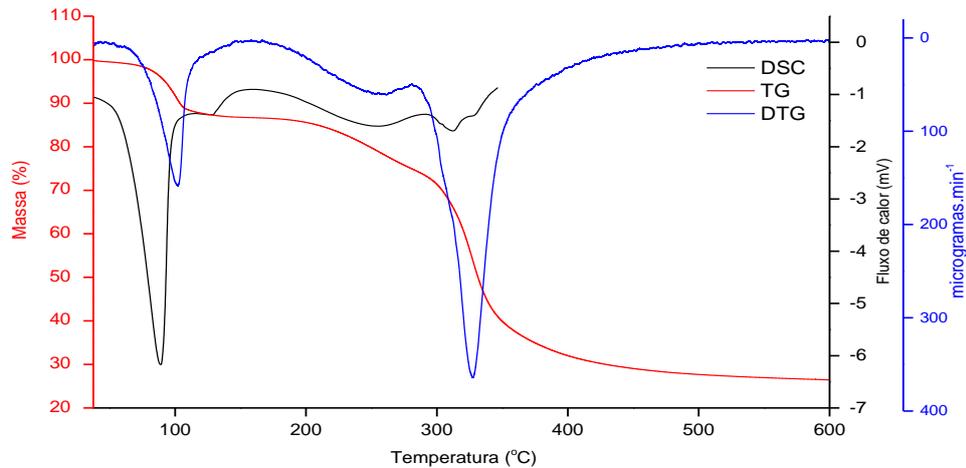


Figura 24 - Curvas térmicas. TG e DTG na faixa de 30°C a 600°C e DSC na faixa de 30°C a 350°C. Ambos com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Fonte: Do autor.

Na curva DSC obtida para a forma cristalina do fármaco, observa-se a ausência do pico de fusão do fosamprenavir cálcico, sugerindo que a perda de água tenha provocado a amorfização do fármaco. Sendo assim, objetivando avaliar a influência da presença de água na manutenção da estrutura cristalina da forma I do fármaco, uma amostra deste material foi mantida à 100°C em estufa a vácuo por 5 horas e posteriormente analisada por DSC, TG e PXRD. Nas curvas térmicas apresentadas na Figura 25, percebe-se uma desidratação parcial do fármaco quando aquecido, correspondendo à perda de 3 a 4 moléculas de água presentes na forma I. Já no difratograma obtido para o fosamprenavir cálcico submetido ao aquecimento, verificou-se a ausência de picos de Bragg, caracterizando uma substância amorfa (dados não apresentados). Tal fato evidencia a necessidade da presença de água para a manutenção da estrutura cristalina da forma I do fármaco.

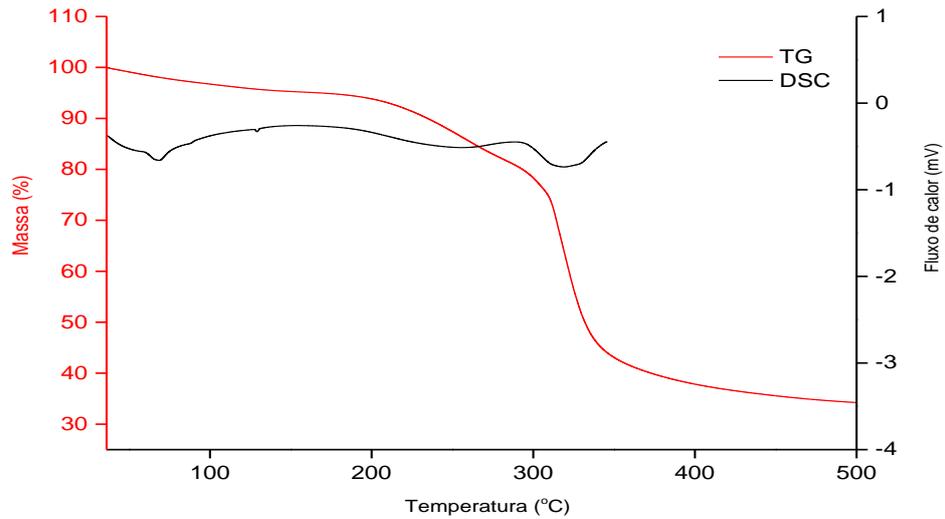


Figura 25 - Curvas térmicas obtidas para a forma I do fosamprenavir cálcico submetida à temperatura de 100°C por 5 horas em vácuo. TG na faixa de 30°C a 500°C e DSC na faixa de 30°C a 350°C. Ambos com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Fonte: Do autor.

### 5.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Análises por MEV foram realizadas com o intuito de avaliar a morfologia das partículas do fármaco. As imagens estão apresentadas na Figura 26. De acordo com a literatura, os cristais de fosamprenavir cálcico apresentam a forma de agulhas microcristalinas de coloração branca (RSC, 2013). Este tipo de hábito cristalino normalmente está relacionado à dificuldades em processos farmacêuticos, tanto para obtenção do insumo ativo, quanto para o desenvolvimento de formulações. Fármacos semelhantes a agulhas podem ser difíceis de filtrar e secar uma vez cristalizados e, em termos de formulação, por apresentarem pequena densidade aparente e baixa fluidez, podem comprometer a etapa de compressão (ARAUJO et al., 2012; GIBSON, 2009).

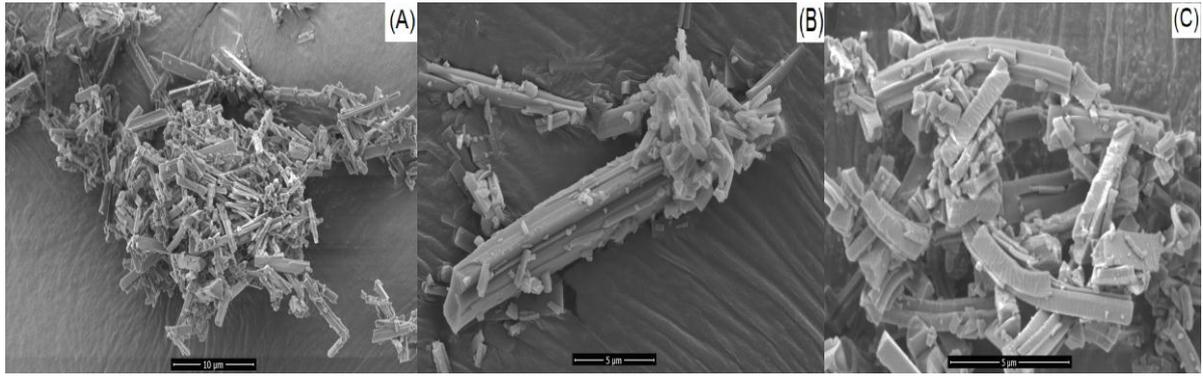


Figura 26 - Eletrofotomicrografias do fosamprenavir cálcico extraído do medicamento Telzir®.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Aumento de 4000x;  
 (B) Aumento de 8000x;  
 (C) Aumento de 13000x.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO FOSAMPRENAVIR POR CLAE

O fosamprenavir foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa de acordo com as condições descritas no item 4.6. O método foi utilizado para verificar a pureza cromatográfica do fármaco extraído e avaliar sua estabilidade intrínseca. Além disso, foi empregado nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente.

Na Figura 27 são apresentados os cromatogramas obtidos para a solução amostra e para o Branco. Observa-se que o fosamprenavir apresentou tempo de retenção de aproximadamente 6,9 minutos e que neste tempo não foram verificados sinais analíticos provenientes do diluente ou fase móvel. Os parâmetros cromatográficos obtidos para a solução amostra são apresentados na Tabela 6.

Foi verificado um fator de retenção ( $K'$ ) igual a 2,61 para o pico do fosamprenavir. Este parâmetro está relacionado à velocidade com a qual o analito migra através da coluna cromatográfica. É o intervalo de tempo em que um soluto permanece na fase estacionária relativo ao tempo em que permanece na fase móvel. Valores entre 1 e 5 são considerados desejáveis, indicando boa interação do analito com a fase estacionária (SKOOG et al., 2006).

O número de pratos teóricos é um parâmetro quantitativo utilizado para expressar a eficiência de uma coluna cromatográfica, sendo que quanto maior o seu valor, maior a eficiência verificada (SKOOG et al., 2006). Para o pico de fosamprenavir na solução amostra

foi obtido um valor de 9516 pratos, indicando uma boa eficiência da coluna utilizada na análise.

O fator de assimetria é outro parâmetro empregado para expressar a qualidade de um resultado cromatográfico. Valores iguais a 1 indicam uma perfeita simetria do pico analisado, entretanto resultados até 2 são aceitáveis. Acima disto, a falta de simetria no pico cromatográfico pode prejudicar sua integração e quantificação (WHO, 2016). Na amostra analisada foi verificado um valor de 1,58. Este resultado pode ser atribuído à presença do grupo amino na molécula do fosamprenavir cálcico, o qual interage com os silanóis livres da fase estacionária, gerando o alargamento do pico. Em função disso, foi adicionado trietilamina à fase móvel do método, a qual tem caráter básico e liga-se aos silanóis ácidos, diminuindo suas interações com o analito e melhorando a performance da coluna.

A pureza do fosamprenavir cálcico obtido a partir do medicamento Telzir® foi determinada empregando o método cromatográfico desenvolvido. Foram preparadas três soluções amostra do fármaco, as quais foram injetadas em duplicata no cromatógrafo. Todos os sinais analíticos detectados e não provenientes da solução Branco foram integrados. Foi determinada a área percentual dos picos observados, a qual indica a pureza cromatográfica dos analitos. Para o fármaco fosamprenavir cálcico foi verificado um valor médio de 99,95%  $\pm$  0,06, indicando que este apresentava pureza adequada para ser empregado como padrão de trabalho.

O método analítico foi validado segundo as diretrizes do guia ICH Q2(R1). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, limite de quantificação, linearidade, estabilidade da solução analítica, precisão, exatidão, intervalo e robustez (ICH, 2005).

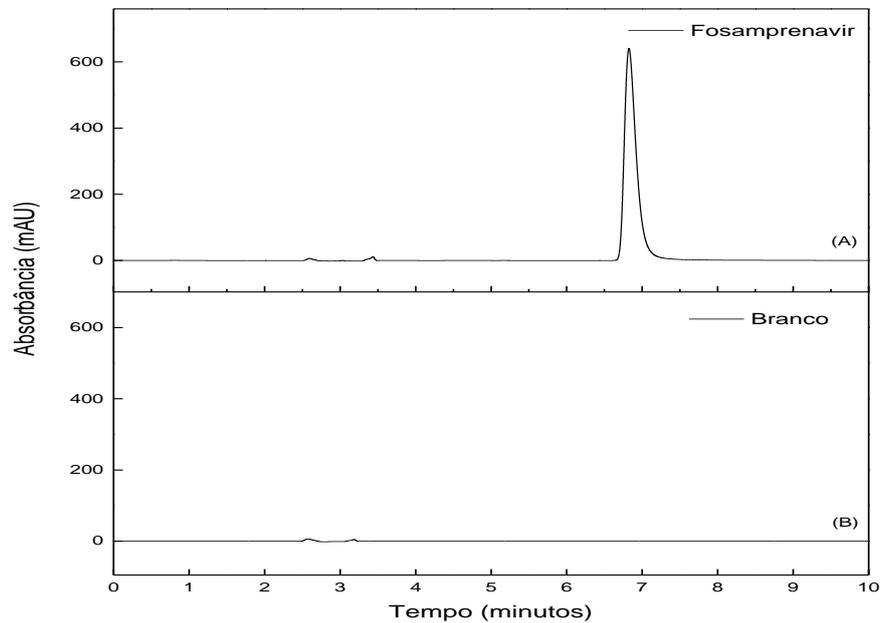


Figura 27 - Cromatogramas da solução amostra ( $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e Branco. Fase móvel tampão acetato  $20 \text{ mM} + 0,1\%$  de trietilamina, pH  $6,0$ /Acetonitrila  $68:32$  (v/v), coluna C8, volume de injeção  $20 \mu\text{L}$ , fluxo de  $1,1 \text{ mL.min}^{-1}$  e detecção em  $266 \text{ nm}$ .

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Solução amostra de fosamprenavir;

(B) Branco (diluíente) com ausência de picos cromatográficos.

Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos da solução amostra de fosamprenavir ( $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ )

Picos	Tempo de Retenção	Área $\text{mAU} \cdot \text{min}$	$K'$	Pratos teóricos (EP)	Assimetria (EP)
Fosamprenavir	6,825	117,262	2,61	9516	1,58

Fonte: Do autor.

### 5.3.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método em determinar de forma inequívoca um analito na presença de outras substâncias potencialmente presentes na solução analisada (ICH, 2005).

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada através da verificação de sinais analíticos provenientes do branco (diluente) e dos excipientes utilizados no tempo de retenção do pico de fosamprenavir. Além disso, soluções do fármaco isolado e das misturas binárias 1:1 m/m do fármaco com cada um dos excipientes foram analisadas utilizando detector de arranjo de diodos, a fim de avaliar a pureza de pico dos sinais observados. De forma complementar, as amostras preparadas no estudo de degradação forçada também foram utilizadas para verificar a seletividade do método em quantificar o fosamprenavir na presença de seus produtos de degradação. Estas últimas foram analisadas empregando detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas.

Não foram verificados sinais analíticos provenientes do diluente ou dos excipientes no tempo de retenção do pico de fosamprenavir. As análises empregando o detector de arranjo de diodos apresentaram valores de pureza de pico superiores a 99,6%, indicando ausência de co-eluição. Além disso, o detector de espectrometria de massas comprovou a seletividade do método em quantificar o fosamprenavir na presença de seus produtos de degradação.

### **5.3.2 Limite de quantificação**

O limite de quantificação consiste na menor concentração do analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis. Concentrações que apresentam relação sinal-ruído de aproximadamente 10:1 podem ser consideradas como estimativas desse parâmetro (BRASIL, 2013; ICH, 2005).

Para a determinação do limite de quantificação do fosamprenavir pelo método cromatográfico desenvolvido foi preparada um solução estoque do fármaco em metanol na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a qual foi posteriormente diluída em fase móvel de modo a obter soluções de fosamprenavir cálcico nas concentrações de  $40 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $80 \text{ ng.mL}^{-1}$ ,  $120 \text{ ng.mL}^{-1}$  e  $160 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Cada solução foi injetada em triplicata no cromatógrafo e calculada a relação sinal-ruído para o pico de fosamprenavir. A solução contendo  $40 \text{ ng.mL}^{-1}$  apresentou relação sinal-ruído de 11:1, sendo considerada como o limite de quantificação do método analítico.

### 5.3.3 Linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método em fornecer respostas diretamente proporcionais à concentração da substância que está sendo analisada (BRASIL, 2013; ICH, 2005).

Para avaliação da linearidade, foi preparada uma solução estoque do fármaco na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em metanol, a qual foi posteriormente diluída em fase móvel de modo a obter as seguintes concentrações:  $0,1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $240 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $300 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A faixa de linearidade foi definida em função do objetivo do método cromatográfico, estando em conformidade com o recomendado pela ICH para métodos destinados à quantificação de impurezas e doseamento de fármacos. Cada solução foi injetada em triplicata no cromatógrafo. O gráfico da resposta do equipamento versus a concentração do analito é mostrado na Figura 28. A curva analítica apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,999954, superior ao recomendado pela ICH. O gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente apresentou os pontos distribuídos aleatoriamente nos 2 lados do eixo X e ausência de um padrão definido (FIGURA 29), indicando a independência entre os resíduos. Além disso, mais de 95% dos resíduos padronizados ficaram com valores entre -2 e +2, indicando uma aparente normalidade residual. O teste de Grubbs para verificação de valores aberrantes demonstrou a ausência de outliers ( $p < 0,05$ ) que poderiam comprometer as estimativas da regressão. Além disso, o teste de Cochran comprovou a igualdade de variância entre os resíduos ( $p < 0,05$ ), indicando um bom ajustamento do modelo.

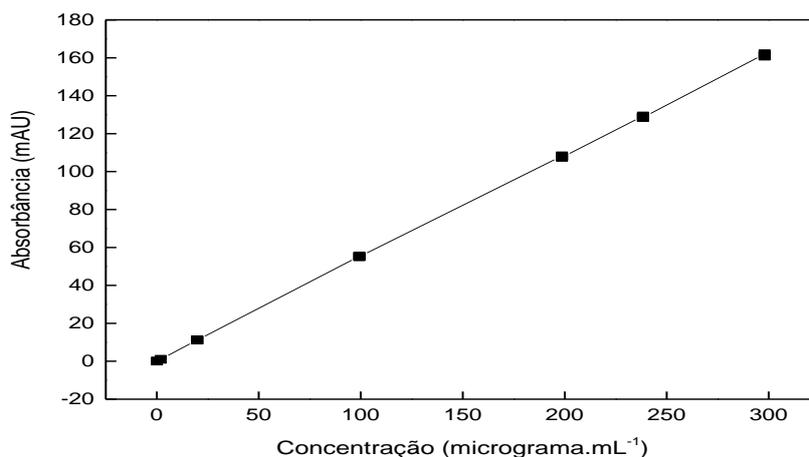


Figura 28 - Curva analítica para o fosamprenavir construída com 7 pontos em triplicata de injeção. Fase móvel tampão acetato 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20  $\mu$ L, fluxo de 1,1 mL.min<sup>-1</sup> e detecção em 266 nm.

Fonte: Do autor.

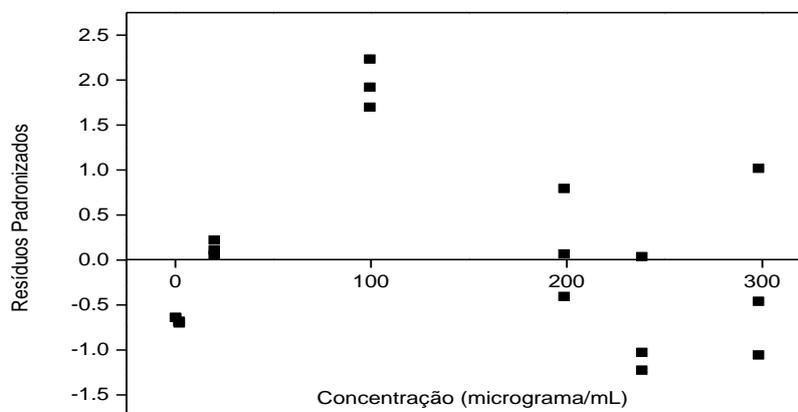


Figura 29 - Gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente para avaliação do modelo de regressão obtido.

Fonte: Do autor.

### 5.3.4 Estabilidade da solução analítica

A estabilidade da solução analítica foi avaliada através do coeficiente de variação (CV %) da área do pico de fosamprenavir ao longo do tempo de estocagem. Foi preparada uma solução do fármaco na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em metanol, a qual foi diluída em fase móvel para a concentração de  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  e estocada em duas condições diferentes: em temperatura ambiente e em geladeira (temperatura entre  $4^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ ). As amostras foram analisadas por um período de 12 dias. Em temperatura ambiente as amostras apresentaram área de  $103,0545 \text{ mAU} \pm 0,72\%$  e em geladeira  $102,7845 \text{ mAU} \pm 0,67\%$ . As variações entre os valores medidos foram relativamente pequenas, indicando que o fármaco permaneceu estável em ambas as condições pelo período analisado.

### 5.3.5 Precisão e exatidão

Foi avaliada a exatidão e precisão intra e inter-dia do método analítico em quatro níveis de concentração do fármaco: no limite de quantificação ( $0,04 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $300 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A precisão foi expressa como o coeficiente de variação entre os resultados e a exatidão como a porcentagem de recuperação do analito.

Foi preparada uma solução estoque do fármaco na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em metanol, a qual foi diluída em fase móvel de modo a obter 3 preparações de amostra para cada um dos níveis de concentração avaliados. Cada amostra foi injetada em duplicata no cromatógrafo e quantificada contra uma curva de calibração preparada a cada dia de análise. Os resultados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 9 - Resultados dos parâmetros de precisão e exatidão

Níveis	Precisão Intra-dia CV(%)	Precisão Inter-dia CV(%)	Recuperação (%)
LQ ( $0,04 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6,15	6,69	$102,7 \pm 7,2$
$100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,70	1,15	$99,9 \pm 1,2$
$200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,40	0,68	$99,3 \pm 0,7$
$300 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,26	0,64	$99,4 \pm 0,7$

Fonte: Do autor.

Notas: Precisão intra-dia:  $n = 3/\text{nível}$ ;

Precisão inter-dia:  $n = 6/\text{nível}$ ;

Resultados da Recuperação: média (%)  $\pm$  intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$  e  $n = 6$ ).

As amostras preparadas no limite de quantificação do método apresentaram resultados entre 112,0% e 94,7% e uma maior variação do que as amostras dos demais níveis. Tais resultados já eram esperados uma vez que foram preparadas soluções do fármaco ao nível de impurezas, onde são aceitos valores de CV de até 20%. Nos demais níveis de concentração avaliados, os resultados variaram entre 101,7% e 98,6%. Os coeficientes de variação de cada nível foram inferiores a 2%, valor considerável como aceitável para analitos em macro quantidades (RIBANI, 2004).

### **5.3.6 Intervalo**

O intervalo corresponde aos valores de maior e menor concentração da substância em exame que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade do método analítico (ICH, 2005). Sendo assim, após avaliação desses parâmetros, definiu-se a faixa de concentração entre  $0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como o intervalo para quantificação do fosamprenavir pelo método cromatográfico desenvolvido.

### **5.3.7 Robustez**

A robustez do método cromatográfico foi avaliada através do teste proposto por Youden e Steiner (AOAC, 1975). Este teste consiste na análise multivariada de sete variáveis que podem impactar no resultado analítico (GEHRING et al., 2011). As variáveis selecionadas foram distribuídas aleatoriamente na Tabela 8. As condições normais das variáveis foram denotadas pelo sinal (+) e seus valores alternativos pelo sinal (-). Um total de oito experimentos foram realizados objetivando verificar a influência das alterações na quantificação do fosamprenavir na presença de seus produtos de degradação. Para isso, uma solução amostra submetida à degradação básica em NaOH 2N por 12 horas foi utilizada. Após o período de estresse, a amostra foi neutralizada com solução de HCl a fim de interromper a degradação do fármaco.

Os resultados das oito combinações foram codificados por letras maiúsculas e estão expressos na Tabela 8. A partir desses resultados, o efeito de cada variável foi estimado pela

diferença entre a média dos resultados das 4 análises em que a variável operou segundo às condições nominais do método (sinalizadas por +) e a média dos resultados das 4 análises em que operou segundo às condições alternativas (sinalizadas pelo sinal -). Sendo assim, o efeito de cada variável na quantificação do fosamprenavir foi estimado pelas fórmulas:

$$\text{Temperatura da coluna} = (A+B+C+D)/4 - (E+F+G+H)/4$$

$$\text{Fluxo} = (A+B+E+F)/4 - (C+D+G+H)/4$$

$$\text{pH} = (A+C+E+G)/4 - (B+D+F+H)/4$$

$$\text{Comprimento de onda} = (A+B+G+H)/4 - (C+D+E+F)/4$$

$$\text{Fornecedor de acetonitrila} = (A+C+F+H)/4 - (B+D+E+G)/4$$

$$\text{Conteúdo de acetonitrila} = (A+D+E+H)/4 - (B+C+F+G)/4$$

$$\text{Concentração do tampão da fase móvel} = (A+D+F+G)/4 - (B+C+E+H)/4$$

Tabela 10 - Variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura coluna (°C)	40	35	+	+	+	+	-	-	-	-
Fluxo (mL/min)	1,1	1,2	+	+	-	-	+	+	-	-
pH	6,00	5,90	+	-	+	-	+	-	+	-
Comprimento de onda (nm)	266	264	+	+	-	-	-	-	+	+
Fornecedor acetonitrila	Sigma	Panreac	+	-	+	-	-	+	-	+
Conteúdo acetonitrila (%)	32	31	+	-	-	+	+	-	-	+
Concentração tampão FM	20 mM	22 mM	+	-	-	+	-	+	+	-
Codificação dos Resultados			A	B	C	D	E	F	G	H
Resultados (%)			92,	90,	87,	91,	88,	92,	91,	86,

Fonte: AOAC, 1975; GEHRING et al., 2011; RIBANI, 2004.

Os resultados das análises foram utilizados para calcular o efeito de cada variável na quantificação do fosamprenavir, os quais estão expressos na Tabela 9. As influências das variáveis nos resultados das análises foram relativamente pequenas, indicando que o método cromatográfico é robusto. A concentração do tampão utilizado na fase móvel foi a variável mais crítica.

Tabela 11 - Efeitos das variáveis temperatura da coluna, fluxo, pH, comprimento de onda, fornecedor de acetonitrila, conteúdo de acetonitrila e concentração de tampão na fase móvel na quantificação do fosamprenavir

Variável	Efeito no resultado (%)
Temperatura coluna	0,91
Fluxo	1,60
pH	0,01
Comprimento de onda	1,40
Fornecedor acetonitrila	0,61
Conteúdo acetonitrila	0,81
Concentração tampão fase móvel	3,81

Fonte: Do autor.

#### 5.4 ESTABILIDADE INTRÍNSECA DO FÁRMACO

A estabilidade intrínseca do fosamprenavir cálcico foi avaliada através de estudos de degradação forçada conforme as condições descritas na Tabela 2.

O fármaco demonstrou ser estável às condições avaliadas de calor, umidade, luz e hidrólise neutra. Além disso, não foram verificadas degradações significativas quando exposto às soluções de HCl 0,1M, NaOH 0,1M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% v/v. Em função disso, foram empregadas concentrações mais elevadas desses agentes degradantes.

O fármaco apresentou degradação de 7,7% quando exposto à solução de NaOH 2M por um período de 12 horas. Nesta condição, foi verificada a formação de dois produtos de degradação (PD) com tempos de retenção relativos (TRR) de 0,64 e 1,09 em relação ao pico de fosamprenavir. Em HCl 3M, foi verificada degradação de 3,5% e o aparecimento de um PD com tempo de retenção relativo de 0,64. Em solução oxidativa, empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9% v/v, o fármaco apresentou degradação de 4,3% e foi verificada a formação de um PD com tempo de retenção relativo de 0,87.

Todos os produtos de degradação eluíram em tempos diferentes ao do fármaco. Além disso, a resolução entre todos os picos foi satisfatória, com valores superiores a 2,0, indicando uma completa separação entre os compostos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

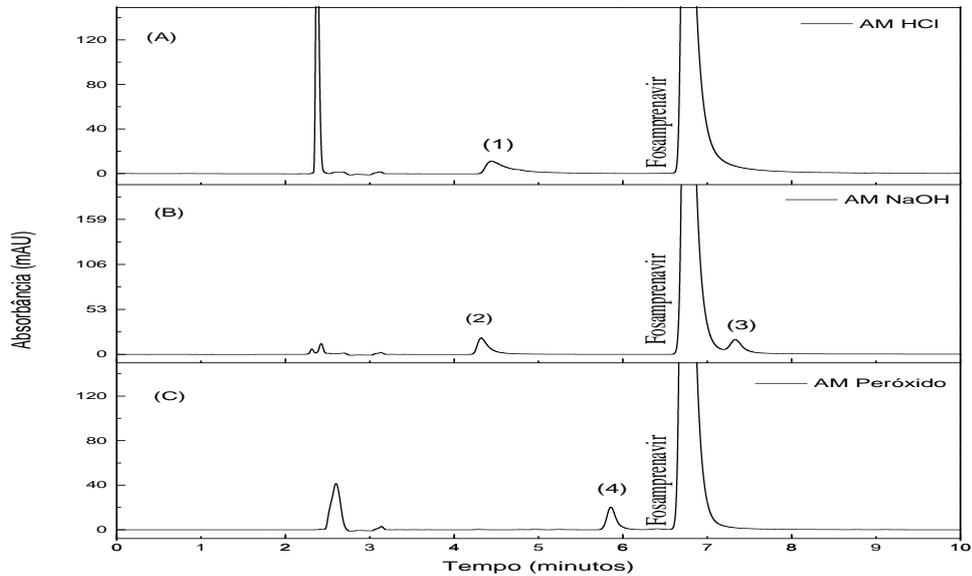


Figura 30 - Cromatogramas dos perfis de degradação do fosamprenavir. Fase móvel tampão acetato 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, fluxo de 1,1 mL.min<sup>-1</sup> e detecção em 266 nm.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Fármaco exposto à hidrólise ácida: (1) PD – TRR: 0,64;  
 (B) Fármaco exposto à hidrólise básica: (2) PD – TRR: 0,64 e (3) PD – TRR: 1,09;  
 (C) Fármaco exposto à solução oxidativa: (4) PD – TRR: 0,87.

#### 5.4.1 Elucidação estrutural dos produtos de degradação

Amostras do fármaco submetidas às condições de degradação por hidrólise ácida, básica e solução oxidativa foram analisadas por espectrometria de massas a fim de determinar as estruturas moleculares dos produtos de degradação encontrados. As análises foram realizadas no laboratório *LabMass* empregando um cromatógrafo HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters, USA*), acoplado a um espectrômetro de massas, modelo quatromicro (*Micromass*), com analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de electrospray.

Foi realizada uma varredura de cada amostra objetivando determinar o modo de ionização mais adequado e a relação  $m/z$  dos subprodutos. Para todas as amostras, o modo de ionização positivo mostrou-se mais eficiente.

Na amostra submetida à hidrólise básica, os produtos de degradação com tempos de retenção relativos de 0,64 e 1,09, em relação ao pico de fosamprenavir, apresentaram  $m/z$  472 e 530, respectivamente. Na amostra exposta à solução de HCL, o PD com tempo de retenção relativo de 0,64 apresentou  $m/z$  472. Já o produto de degradação formado devido a exposição do fosamprenavir à solução oxidativa apresentou  $m/z$  584.

O modo de monitoramento de reações múltiplas foi utilizado para obtenção dos espectros de íons produto apresentados abaixo. Baseando-se nas relações massa/carga e nos experimentos MS/MS, foram propostas as estruturas para os produtos de degradação oriundos da hidrólise básica e ácida. Essas estruturas estão em conformidade com o perfil de fragmentação de cada íon. Já para o íon de  $m/z$  584, originário da exposição do fosamprenavir à solução de peróxido de hidrogênio, não foi encontrada uma estrutura coerente com a relação massa/carga determinada e com o perfil de fragmentação obtido. Para a elucidação estrutural desse produto de degradação novos experimentos devem ser realizados e, caso necessário, técnicas convencionais de isolamento e caracterização devem ser empregadas.

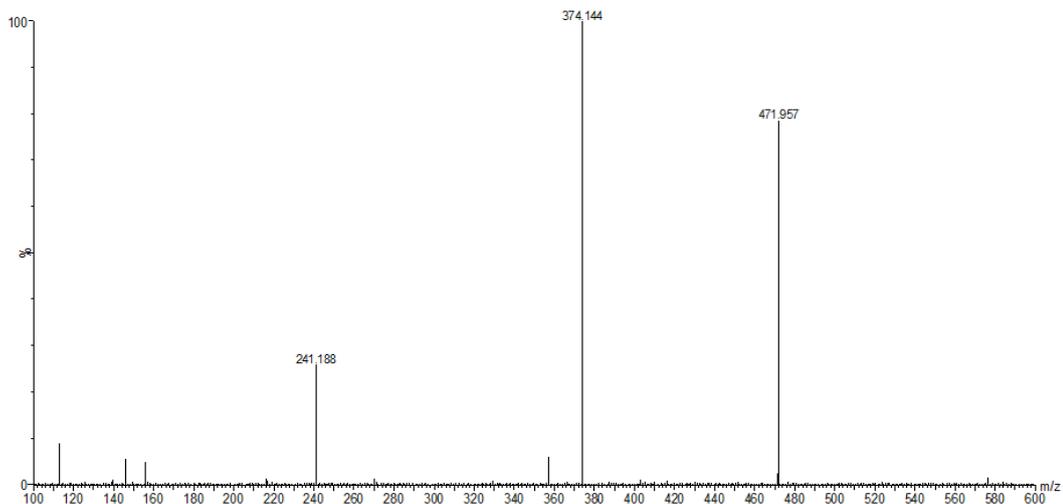


Figura 31 - Espectro de íons produto obtido para o íon  $m/z$  472. Ionização por electrospray, modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização ( $100 \text{ L.h}^{-1}$ ) e gás de secagem ( $200 \text{ L.h}^{-1}$ ), temperatura da linha de dessolvatação  $250^\circ\text{C}$ , temperatura da fonte  $120^\circ\text{C}$ , tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV.

Fonte: Do autor.

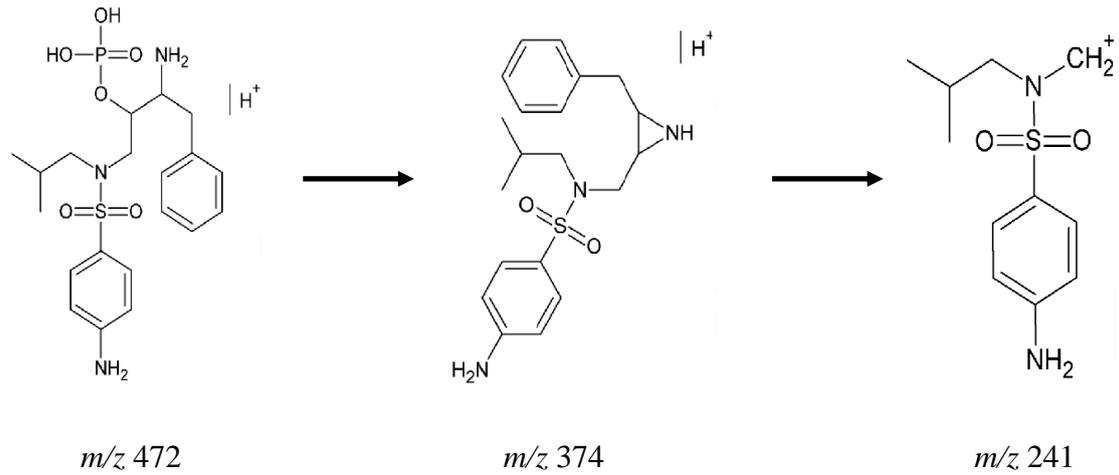


Figura 32 - Perfil de fragmentação do íon  $m/z$  472 baseado nos estudos MS/MS.  
Fonte: Do autor.

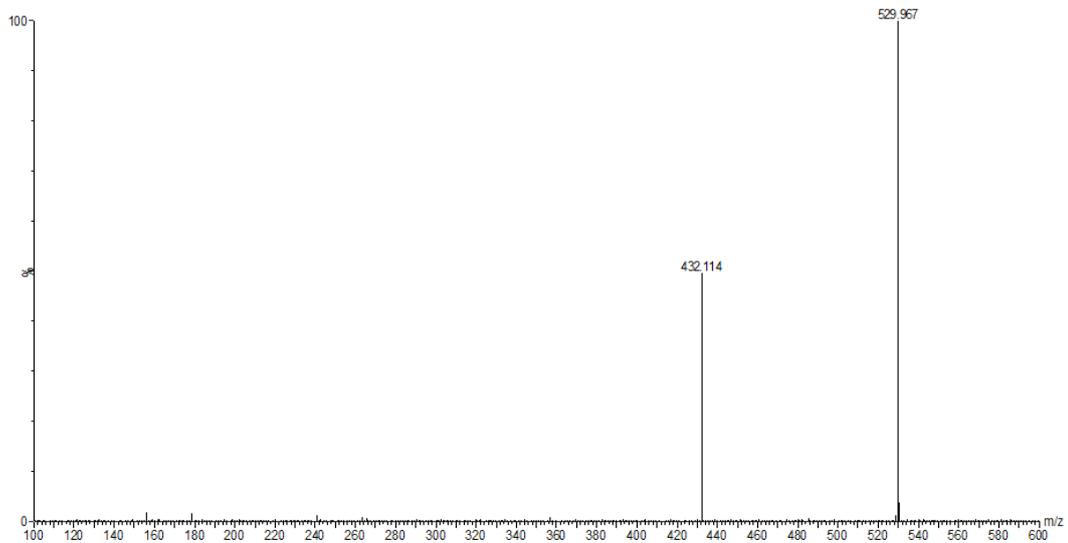


Figura 33 - Espectro de íons produto obtido para o íon  $m/z$  530. Ionização por electrospray, modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização ( $100 \text{ L.h}^{-1}$ ) e gás de secagem ( $200 \text{ L.h}^{-1}$ ), temperatura da linha de dessolvatação  $250^\circ\text{C}$ , temperatura da fonte  $120^\circ\text{C}$ , tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV.

Fonte: Do autor.

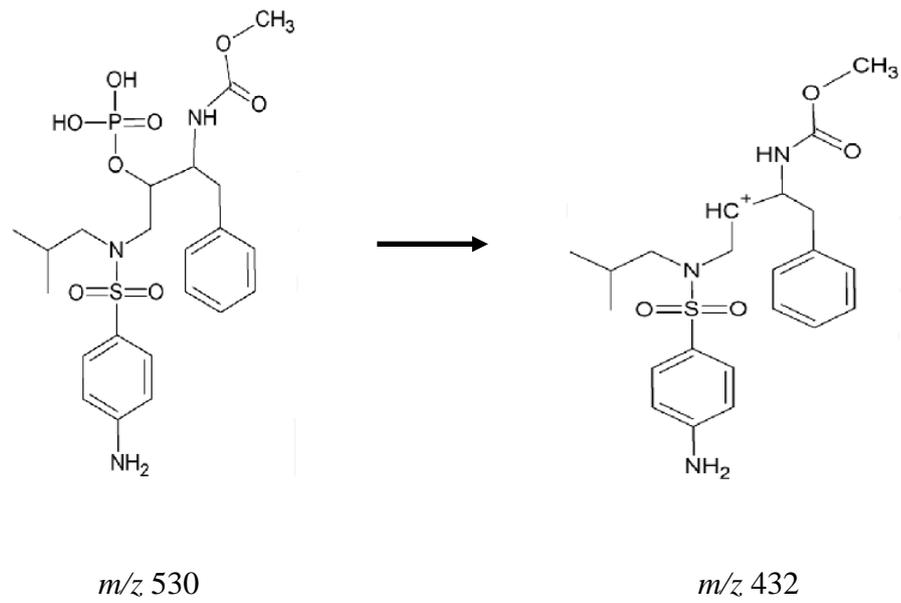


Figura 34 - Perfil de fragmentação do íon  $m/z$  530 baseado nos estudos MS/MS.  
Fonte: Do autor.

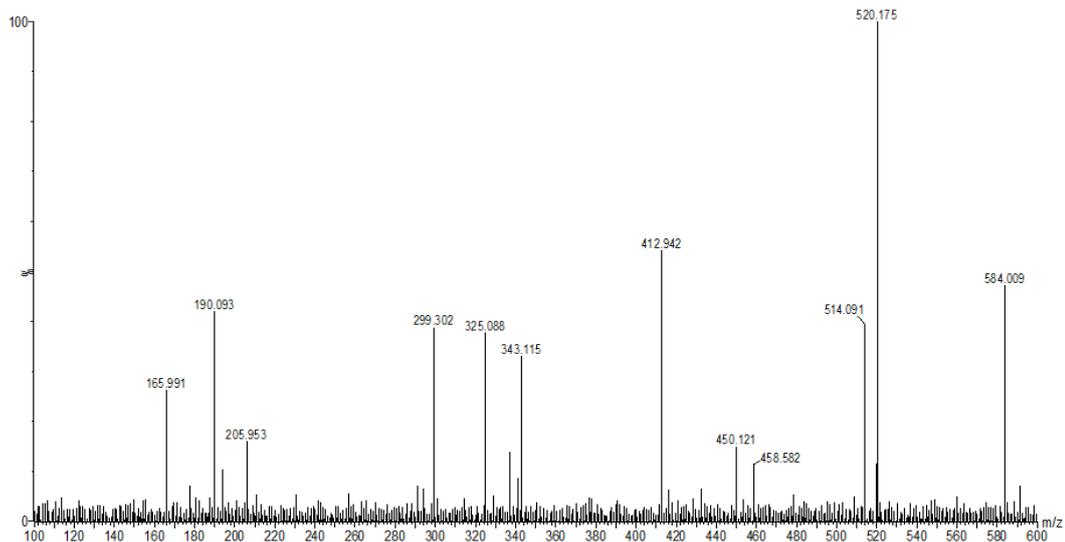


Figura 35 - Espectro de íons produto obtido para o íon  $m/z$  584. Ionização por electrospray, modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização ( $100 \text{ L.h}^{-1}$ ) e gás de secagem ( $200 \text{ L.h}^{-1}$ ), temperatura da linha de dessolvatação  $250^\circ\text{C}$ , temperatura da fonte  $120^\circ\text{C}$ , tensão no capilar 4 kV, tensão no cone 30 V e energia de colisão 15 eV.

Fonte: Do autor.

### 5.4.2 Predição dos mecanismos reacionais

Estudos de degradação forçada são sugeridos por agências reguladoras internacionais e também pela ANVISA como forma de avaliação da estabilidade intrínseca de fármacos (BRASIL, 2012; ICH, 2003). Esta avaliação não deve ser limitada somente à identificação dos produtos de degradação. Deve fornecer bases para o conhecimento da estabilidade da molécula como um todo. Neste sentido, torna-se relevante a predição dos mecanismos reacionais que possam conduzir à formação dos produtos de degradação. Dessa forma pode-se compreender como eles são formados e desenvolver estratégias farmacotécnicas e logísticas que evitem ou minimizem a sua formação.

Nas análises realizadas neste trabalho para a elucidação estrutural dos subprodutos do fosamprenavir cálcico, foi utilizado um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, o qual possui baixa resolução. Entretanto, as estruturas propostas para os produtos de degradação são corroboradas pelos mecanismos reacionais descritos abaixo.

A Figura 36 ilustra a hidrólise do grupo carbamato presente na molécula do fosamprenavir quando este é exposto em meio básico, conduzindo à formação do produto de degradação de relação massa/carga 472. Por se tratar de um carbamato primário, a hidrólise ocorre preferencialmente pelo mecanismo de eliminação unimolecular com base conjugada (E1cb). A reação inicia-se pelo ataque da hidroxila ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio, conduzindo à eliminação de um álcool e à formação do grupo isocianato ( $\text{-N=C=O}$ ). Este grupo é instável, reagindo com a água presente no meio reacional, liberando  $\text{CO}_2$  e, finalmente, gerando o grupo amino.

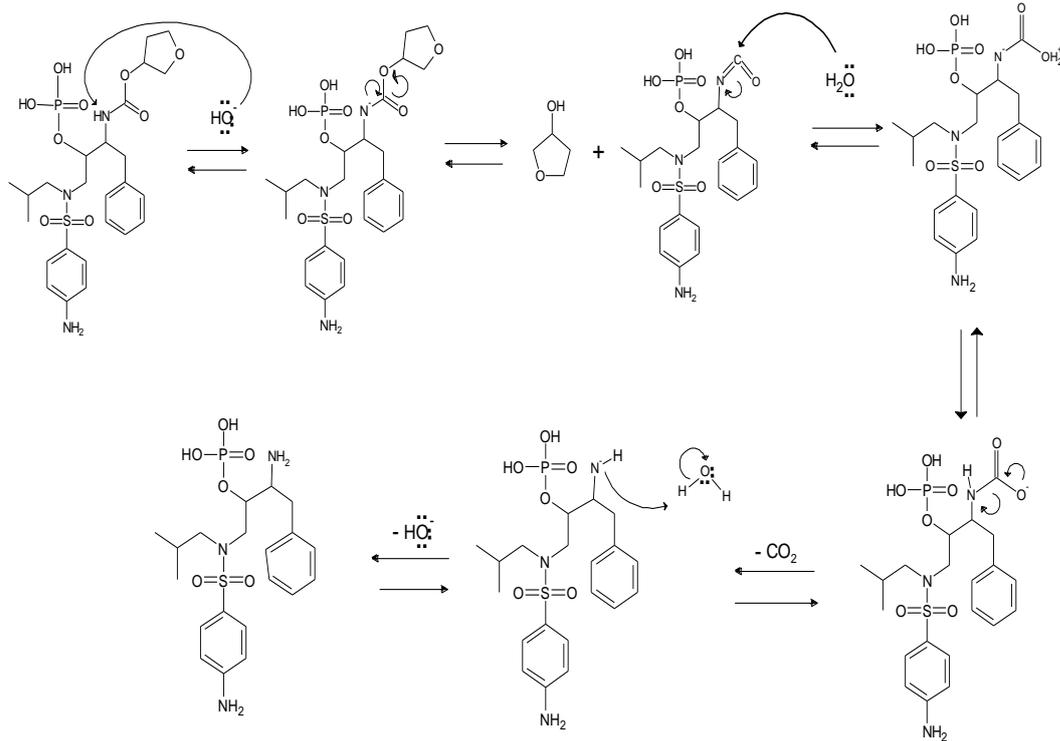


Figura 36 - Mecanismo proposto para formação do íon de  $m/z$  472: Hidrólise do grupo carbamato em meio básico - mecanismo E1cb.

Fonte: Do autor.

A Figura 37 mostra o mecanismo proposto para a formação do produto de degradação de relação massa/carga 472 quando o fosamprenavir é submetido à hidrólise ácida. A reação inicia-se pelo ataque do par de elétrons do átomo de nitrogênio ao próton oriundo do meio ácido. Tal fato aumenta a reatividade do carbono do grupo carbonila, favorecendo o ataque nucleofílico da água e posterior formação do intermediário tetraédrico. Neste último, o retorno do par de elétrons do átomo de oxigênio para formação da dupla conduz à saída do grupo abandonador, dando origem ao produto de degradação de  $m/z$  472 e à eliminação de álcool e  $\text{CO}_2$  para o meio reacional.

A hidrólise do grupo éster presente na molécula do fosamprenavir quando este é exposto à meio ácido é outro possível mecanismo que ocorre concomitantemente ao descrito na Figura 37, levando à formação do produto de degradação de  $m/z$  472.

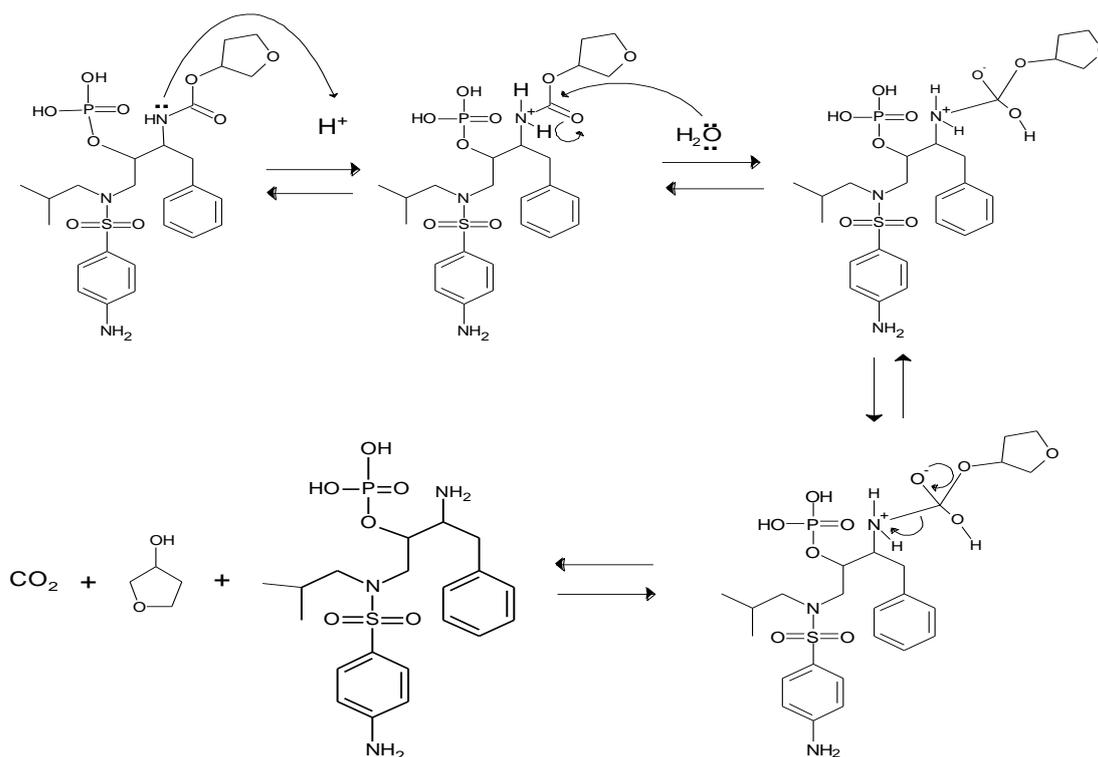


Figura 37 - Mecanismo proposto para formação do íon de  $m/z$  472: Hidrólise do grupo carbamato em meio ácido.

Fonte: Do autor.

A hidrólise do fármaco fosamprenavir em meios ácido e básico originou o mesmo produto de degradação, o que já era esperado uma vez que nessas condições foi verificado um pico com mesmo tempo de retenção relativo e mesma relação massa/carga. Esse PD trata-se de uma impureza conhecida do fosamprenavir e denominada de Impureza A (CHILUKURI; NARAYANAREDDY; HUSSIANREDDY, 2013).

A Figura 38 ilustra o mecanismo proposto para a formação do produto de degradação de  $m/z$  530 quando o fosamprenavir é submetido à hidrólise básica. A reação inicia-se com o ataque nucleofílico do oxigênio do metanol ao carbono da carbonila e posterior formação do intermediário tetraédrico. O retorno da carga parcial negativa do átomo de oxigênio para formação da dupla ligação conduz à saída do grupo abandonador, dando origem a uma molécula de álcool e à formação do subproduto de relação massa/carga 530, o qual é um pseudo-produto de degradação originado devido à utilização do metanol no preparo das soluções. Mecanismo semelhante foi proposto por RAO et al. (2014) para a degradação do antirretroviral Duranavir.

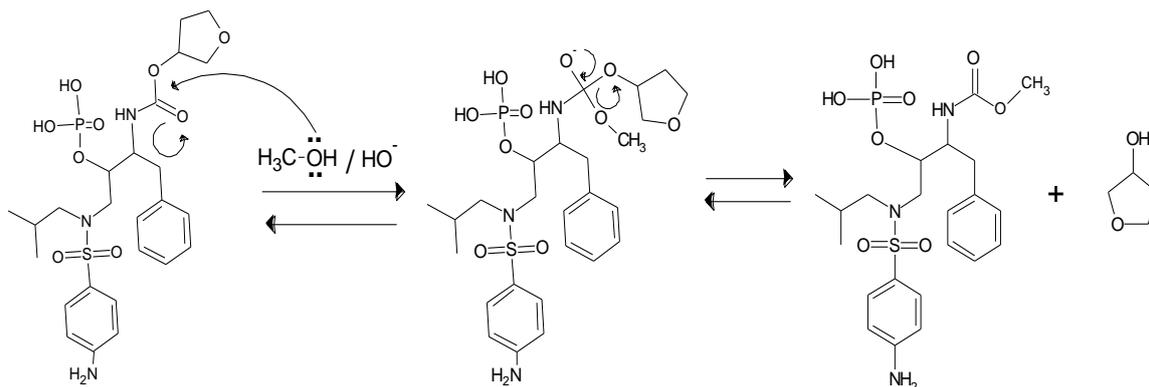


Figura 38 - Mecanismo proposto para formação do íon de  $m/z$  530: Reação de transesterificação do tipo alcoólise catalisada por base.

Fonte: Do autor.

## 5.5 ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE

### 5.5.1 Amostras de tempo inicial

#### 5.5.1.1 Análise por espectroscopia no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram determinados em triplicata para o fármaco, excipientes e misturas binárias. As triplicatas foram semelhantes entre si (resultados não apresentados).

A Figura 39 mostra os espectros obtidos para as misturas no tempo inicial do fosamprenavir cálcico com os excipientes povidona K-30, sílica anidra coloidal e estearato de magnésio. Observa-se que o espectro da mistura do fármaco com a povidona K-30 corresponde ao somatório do espectro dos componentes individuais. Resultados semelhantes foram observados para os outros excipientes avaliados, com exceção da sílica anidra coloidal e estearato de magnésio. Os espectros das misturas do fosamprenavir cálcico com esses excipientes apresentaram uma redução significativa nas bandas de absorção do fármaco. Tal fato indica uma possível interação no estado sólido entre os componentes da mistura, a qual pode ser de natureza física (tais como a solubilização do fármaco pelos excipientes e interações intermoleculares entre grupos funcionais) ou química.

Em nenhuma das misturas analisadas foi observado o desaparecimento de bandas características do fosamprenavir e nem o aparecimento de bandas não relacionadas ao fármaco ou ao excipiente da mistura.

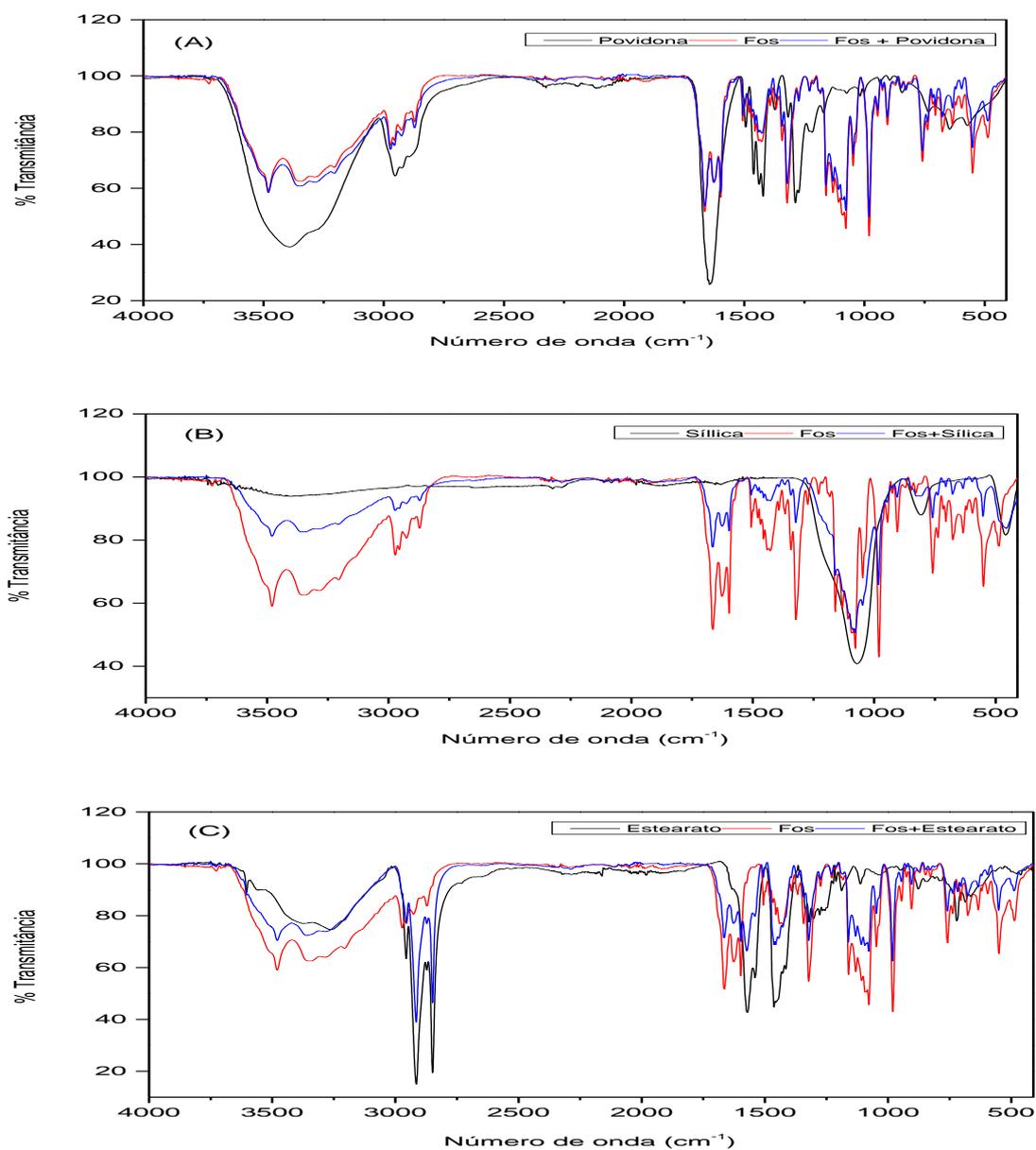


Figura 39 - Comparação entre os espectros de absorção no infravermelho para amostras de tempo inicial em temperatura ambiente.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Povidona K-30, fosamprenavir cálcico e mistura povidona K-30 + fosamprenavir cálcico;  
(B) Sílica, fosamprenavir cálcico e mistura sílica + fosamprenavir cálcico;  
(C) Estearato de magnésio, fosamprenavir cálcico e mistura estearato de magnésio + fosamprenavir cálcico.

### 5.5.1.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

A Figura 40 apresenta os resultados das análises para as amostras de fosamprenavir isolado e misturas binárias do fármaco com os excipientes empregados no estudo. Cada preparação de amostra foi injetada em duplicata no cromatógrafo.

Não foram detectadas reduções significativas do teor do fármaco em nenhuma das misturas analisadas e nem a presença de produtos de degradação. Estes resultados indicam ausência de incompatibilidade química entre o fosamprenavir cálcico e os excipientes nas amostras de tempo inicial.

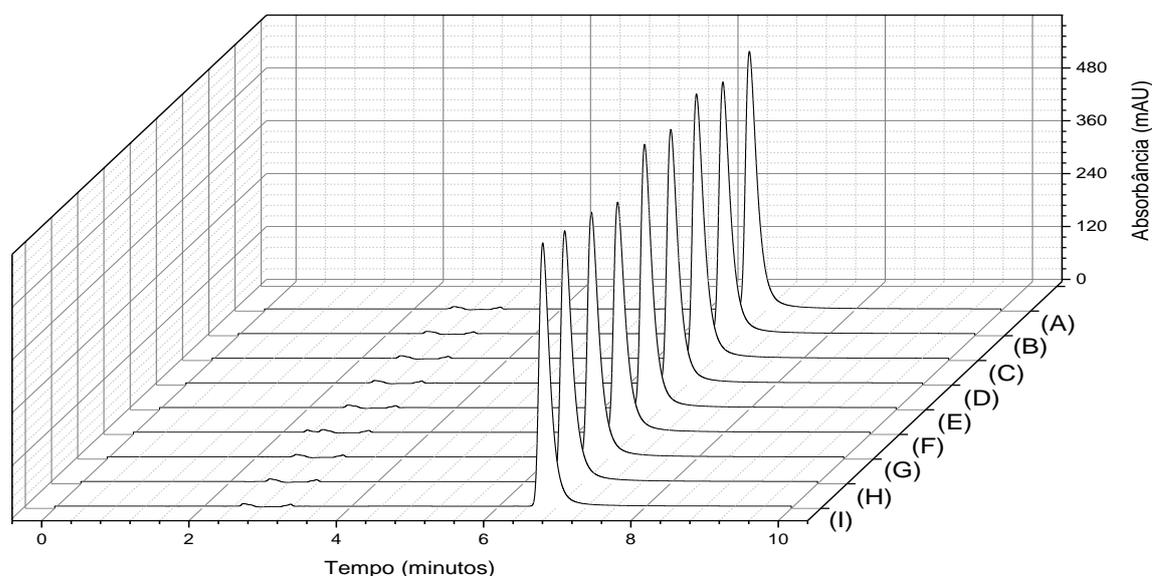


Figura 40 - Cromatogramas das amostras de tempo inicial (não submetidas às condições de estresse). Fase móvel tampão acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20  $\mu$ L, fluxo de 1,1 mL.min<sup>-1</sup> e detecção em 266 nm. Resultados: Média (%)  $\pm$  coeficiente de variação entre as injeções.

Fonte: Do autor.

- Legenda: (A) Fosamprenavir + Amido glicolato de sódio - Teor do fármaco:  $99,4 \pm 1,41\%$ ;  
 (B) Fosamprenavir + Celulose microcristalina - Teor do fármaco:  $100,0 \pm 0,30\%$ ;  
 (C) Fosamprenavir + Croscarmelose sódica - Teor do fármaco:  $104,2 \pm 0,02\%$ ;  
 (D) Fosamprenavir + Crospovidona - Teor do fármaco:  $99,2 \pm 0,06\%$ ;  
 (E) Fosamprenavir + Estearato de magnésio - Teor do fármaco:  $102,9 \pm 0,25\%$ ;  
 (F) Fosamprenavir + Opadry rosa - Teor do fármaco:  $98,5 \pm 0,46\%$ ;  
 (G) Fosamprenavir + Povidona K30 - Teor do fármaco:  $98,9 \pm 0,43\%$ ;  
 (H) Fosamprenavir + Sílica anidra coloidal - Teor do fármaco:  $101,1 \pm 0,73\%$ ;  
 (I) Fosamprenavir isolado - Teor do fármaco:  $100,8 \pm 0,50\%$ .

## 5.5.2 Análise das amostras de 3 e 6 meses de incubação

Foram verificados os seguintes resultados:

### 5.5.2.1 Análise por espectroscopia no infravermelho

A Figura 41 apresenta a comparação entre os espectros no infravermelho para as amostras de fosamprenavir cálcico no tempo inicial e após 3 e 6 meses de incubação. Nota-se o mesmo perfil de bandas para todas as amostras. Sendo assim, o período de incubação a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa não provocou alterações estruturais na molécula do fármaco, demonstrando que o sal cálcico do fosamprenavir, na ausência dos excipientes, é estável nestas condições de estocagem. Dessa forma, nas amostras analisadas no estudo de compatibilidade, quaisquer alterações nas bandas características do fármaco devem ser atribuídas à interação com os excipientes avaliados.

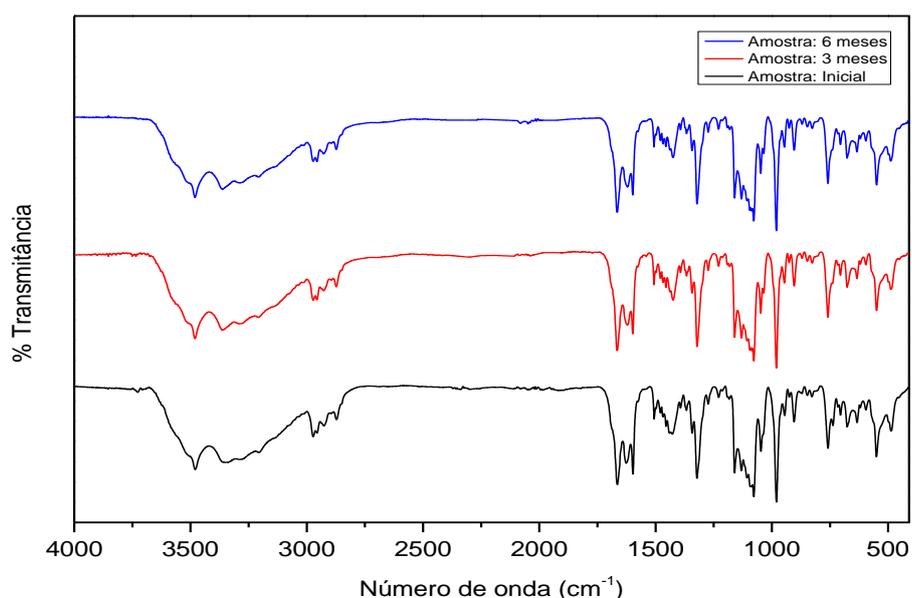


Figura 41 - Espectros de absorção no infravermelho para fármaco fosamprenavir cálcico. Amostras de tempo inicial, 3 e 6 meses de incubação a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Espectros em temperatura ambiente.

Fonte: Do autor.

Amostras do fármaco, excipientes e misturas após 3 e 6 meses de incubação foram analisadas em triplicata. Os resultados entre as réplicas foram semelhantes (dados não apresentados).

As Figuras 42 e 43 apresentam os espectros obtidos para as amostras de 3 e 6 meses de incubação, respectivamente. Nota-se que, de forma semelhante ao ocorrido com as amostras de tempo inicial, nos espectros correspondentes à mistura do fosamprenavir cálcico com os excipientes sílica anidra coloidal e estearato de magnésio há uma redução significativa nas bandas de absorção do fármaco, indicando uma aparente interação no estado sólido entre os componentes. Já na mistura do fosamprenavir cálcico com a povidona K-30, o espectro corresponde ao somatório dos espectros de seus componentes individuais. Resultados semelhantes foram observados para os outros excipientes avaliados (dados não apresentados).

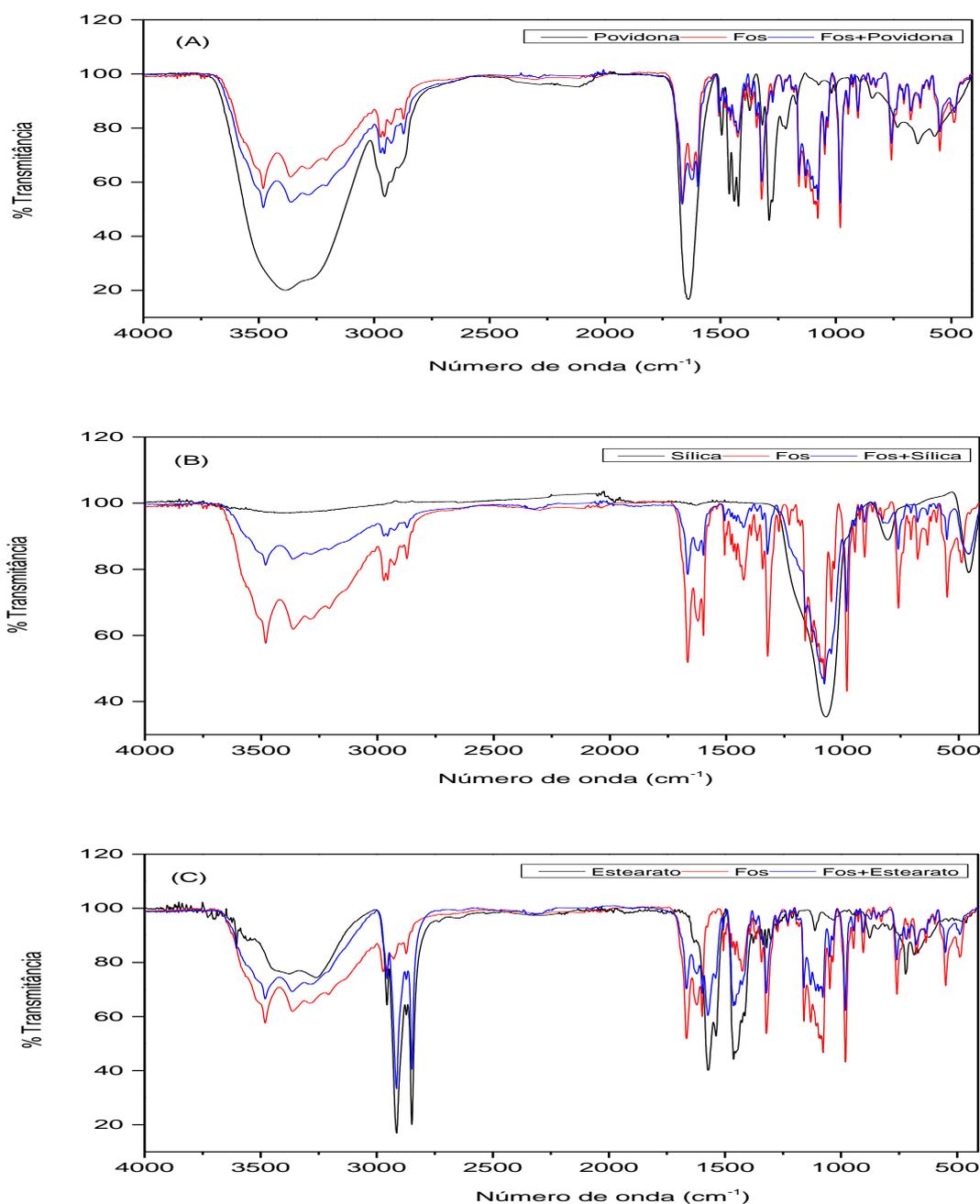


Figura 42 - Comparação entre os espectros de absorção no infravermelho para amostras de 3 meses de incubação a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Espectros em temperatura ambiente.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Povidona K-30, fosamprenavir cálcico e mistura povidona K-30 + fosamprenavir cálcico;  
 (B) Sílica, fosamprenavir cálcico e mistura sílica + fosamprenavir cálcico;  
 (C) Estearato de magnésio, fosamprenavir cálcico e mistura estearato de magnésio + fosamprenavir cálcico.

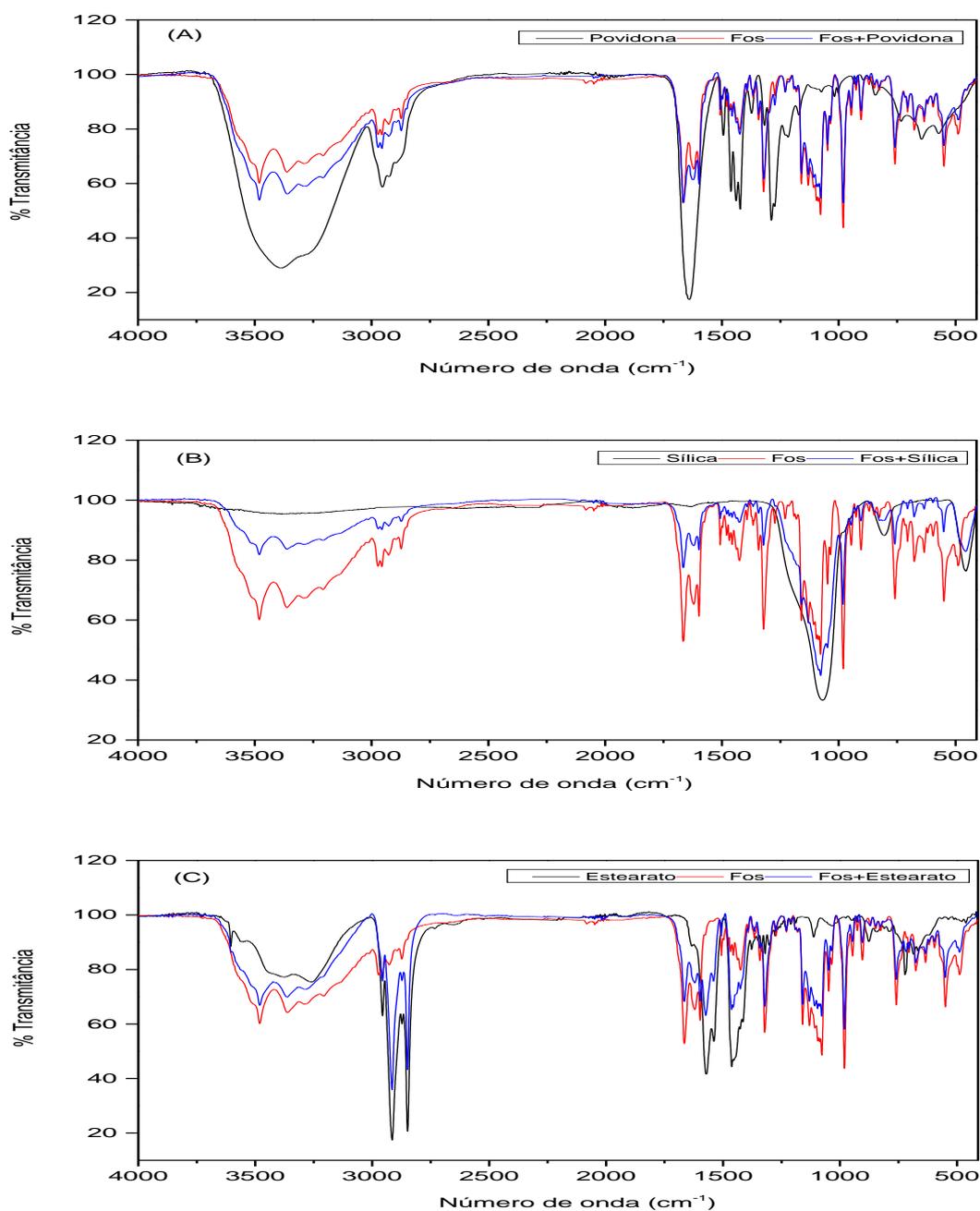


Figura 43 - Comparação entre os espectros de absorção no infravermelho para amostras de 6 meses de incubação a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Espectros em temperatura ambiente.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Povidona K-30, fosamprenavir cálcico e mistura povidona K-30 + fosamprenavir cálcico;  
 (B) Sílica, fosamprenavir cálcico e mistura sílica + fosamprenavir cálcico;  
 (C) Estearato de magnésio, fosamprenavir cálcico e mistura estearato de magnésio + fosamprenavir cálcico.

### 5.5.2.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As Figuras 44 e 45 apresentam os resultados das análises para as amostras de fosamprenavir cálcico isolado e de suas misturas binárias com os excipientes empregados neste estudo após o período de 3 e 6 meses de incubação, respectivamente. Cada preparação de amostra foi injetada em duplicata no cromatógrafo.

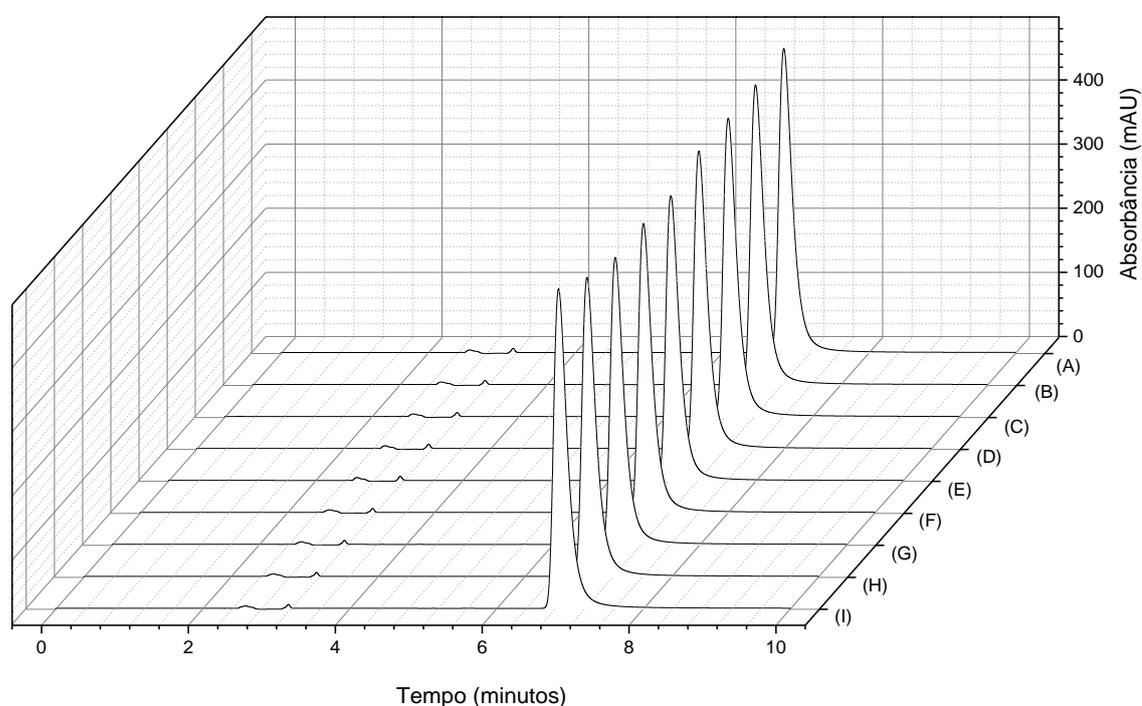


Figura 44 - Cromatogramas das amostras de 3 meses de incubação a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Fase móvel tampão acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ , fluxo de  $1,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção em 266 nm. Resultados: Média (%)  $\pm$  coeficiente de variação entre as injeções.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Fosamprenavir + Amido glicolato de sódio - Teor do fármaco:  $102,7 \pm 0,13\%$ ;  
 (B) Fosamprenavir + Celulose microcristalina - Teor do fármaco:  $101,1 \pm 0,22\%$ ;  
 (C) Fosamprenavir + Croscarmelose sódica - Teor do fármaco:  $102,7 \pm 0,08\%$ ;  
 (D) Fosamprenavir + Crospovidona - Teor do fármaco:  $101,9 \pm 0,19\%$ ;  
 (E) Fosamprenavir + Estearato de magnésio - Teor do fármaco:  $102,5 \pm 0,11\%$ ;  
 (F) Fosamprenavir + Opadry rosa - Teor do fármaco:  $101,9 \pm 0,28\%$ ;  
 (G) Fosamprenavir + Povidona K30 - Teor do fármaco:  $99,7 \pm 0,29\%$ ;  
 (H) Fosamprenavir + Sílica anidra coloidal - Teor do fármaco:  $102,3 \pm 0,19\%$ ;  
 (I) Fosamprenavir isolado - Teor do fármaco:  $101,2 \pm 0,37\%$ .

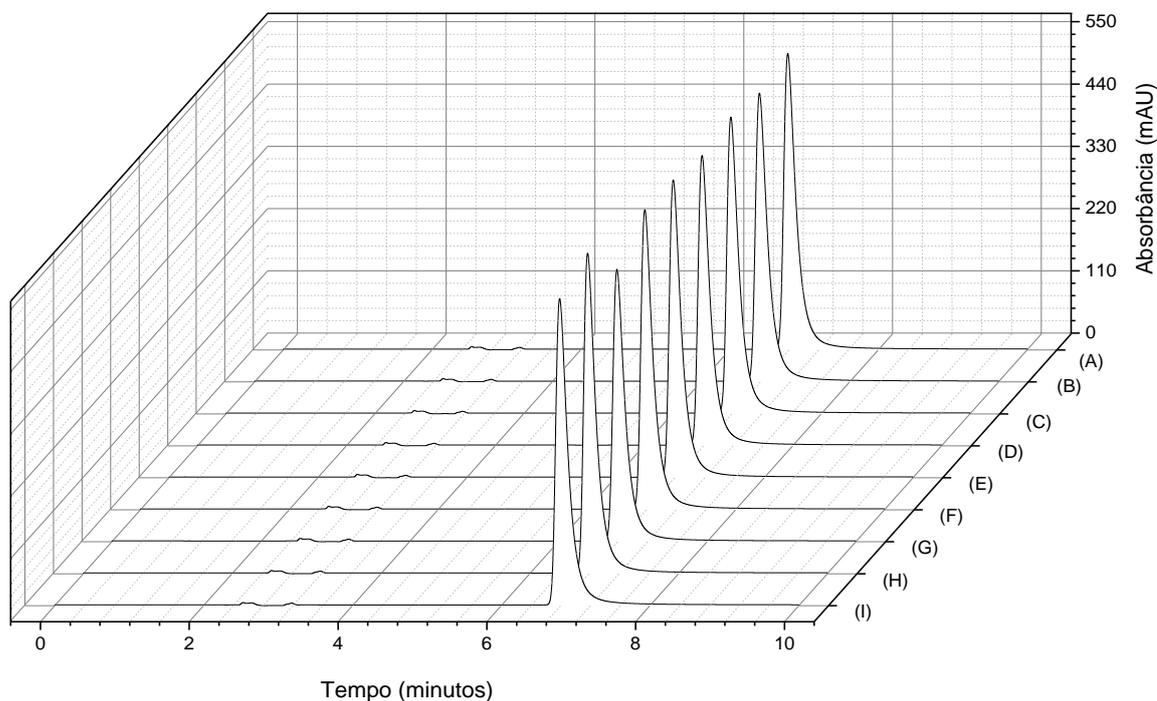


Figura 45 - Cromatogramas das amostras de 6 meses de incubação à  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Fase móvel tampão acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina, pH 6,0/Acetonitrila 68:32 (v/v), coluna C8, volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ , fluxo de  $1,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção em 266 nm. Resultados: Média (%)  $\pm$  coeficiente de variação entre as injeções.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Fosamprenavir + Amido glicolato de sódio - Teor do fármaco:  $99,1 \pm 0,08\%$ ;  
 (B) Fosamprenavir + Celulose microcristalina - Teor do fármaco:  $99,6 \pm 0,33\%$ ;  
 (C) Fosamprenavir + Croscarmelose sódica - Teor do fármaco:  $101,9 \pm 0,32\%$ ;  
 (D) Fosamprenavir + Crospovidona - Teor do fármaco:  $98,7 \pm 0,17\%$ ;  
 (E) Fosamprenavir + Estearato de magnésio - Teor do fármaco:  $99,8 \pm 0,20\%$ ;  
 (F) Fosamprenavir + Opadry rosa - Teor do fármaco:  $99,5 \pm 0,32\%$ ;  
 (G) Fosamprenavir + Povidona K30 - Teor do fármaco:  $97,9 \pm 0,51\%$ ;  
 (H) Fosamprenavir + Sílica anidra coloidal - Teor do fármaco:  $101,1 \pm 0,48\%$ ;  
 (I) Fosamprenavir isolado - Teor do fármaco:  $101,2 \pm 0,40\%$ .

Os resultados das análises realizadas por CLAE durante o estudo de estabilidade acelerada são apresentados resumidamente na Tabela 10. O intervalo de confiança calculado para cada amostra individualmente demonstra que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos no tempo inicial e após o período de incubação ( $p < 0,05$ ). Já a análise de variância (ANOVA) empregando os dados obtidos para todas as amostras demonstrou a ausência de diferenças estatísticas no doseamento do fármaco quando isolado ou associado

aos excipientes empregados neste estudo ( $p < 0,05$ ). Tal resultado é ilustrado graficamente na Figura 46.

Paralelamente à manutenção do teor do fármaco, não foi verificada a formação de produtos de degradação em nenhuma das amostras analisadas. Tais resultados comprovam que o fosamprenavir cálcico é estável nas condições de estocagem avaliadas e que não houve incompatibilidade química entre o fármaco e os excipientes utilizados.

A ausência de produtos de degradação nas misturas do sal cálcico do fosamprenavir com os excipientes sílica anidra coloidal e estearato de magnésio indica que as reduções de intensidade de bandas, observadas na análise por infravermelho para essas misturas, podem ter ocorrido devido a interações de natureza física entre os componentes. Ressalta-se que interações de natureza física não significam necessariamente uma incompatibilidade, desde que não haja um comprometimento de características físico-químicas relevantes do fármaco que possam comprometer a qualidade da formulação final.

Tabela 12 - Resultados finais estudo de estabilidade acelerada

Tempo de Incubação	Amostras								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Inicial	99,4	100	104,2	99,2	102,9	98,5	98,9	101,1	100,8
3 meses	102,7	101,1	102,7	101,9	102,5	101,9	99,7	102,3	101,2
6 meses	99,1	99,6	101,9	98,7	99,8	99,5	97,9	101,1	101,2
Média	100,4	100,2	102,9	99,9	101,7	100,0	98,8	101,5	101,0
IC	4,961	1,930	2,901	4,275	4,188	4,340	2,241	1,722	0,574

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Fosamprenavir + Amido glicolato de sódio;

(B) Fosamprenavir + Celulose microcristalina;

(C) Fosamprenavir + Croscarmelose sódica;

(D) Fosamprenavir + Crospovidona;

(E) Fosamprenavir + Estearato de magnésio;

(F) Fosamprenavir + Opadry rosa;

(G) Fosamprenavir + Povidona K30;

(H) Fosamprenavir + Sílica anidra coloidal;

(I) Fosamprenavir isolado.

Notas: Incubação: Temperatura  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa  $75\% \pm 5\%$ ;

Resultados: %;

IC = Intervalo de confiança:  $n = 3$ ,  $\alpha = 0,05$ .

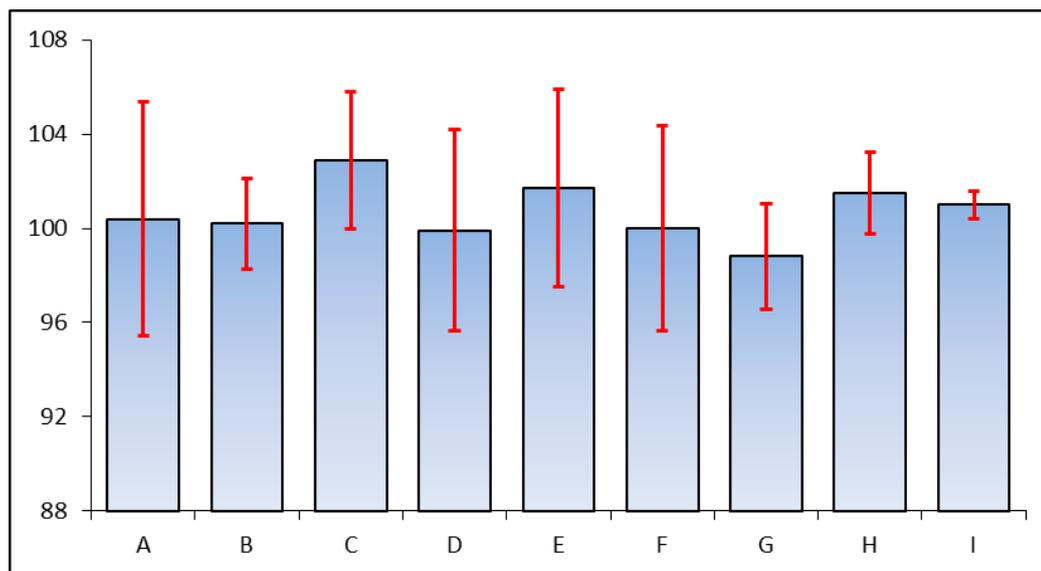


Figura 46 - Representação gráfica dos resultados finais do estudo de estabilidade acelerada, evidenciando uma possível interseção entre os intervalos de confiança de todas as amostras, indicando ausência de diferenças significativas.

Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Fosamprenavir + Amido glicolato de sódio;  
 (B) Fosamprenavir + Celulose microcristalina;  
 (C) Fosamprenavir + Croscarmelose sódica;  
 (D) Fosamprenavir + Crospovidona;  
 (E) Fosamprenavir + Estearato de magnésio;  
 (F) Fosamprenavir + Opadry rosa;  
 (G) Fosamprenavir + Povidona K30;  
 (H) Fosamprenavir + Sílica anidra coloidal;  
 (I) Fosamprenavir isolado.

Notas: Resultados: %;

IC = Intervalo de confiança:  $n=3$ ,  $\alpha=0,05$ .

## 5.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE POLIMÓRFICA

A estabilidade polimórfica do fosamprenavir cálcico foi avaliada pelas técnicas de FTIR e PXRD. Os resultados são descritos abaixo:

### 5.6.1 Análise por espectroscopia no infravermelho

Conforme demonstrado na Figura 41, os espectros de infravermelho para o fosamprenavir cálcico no tempo inicial e após 3 e 6 meses de incubação não apresentaram alterações nos modos de frequência vibracional dos grupos funcionais presentes na molécula do fármaco. Sendo assim, não há evidências de alterações polimórficas do fármaco quando submetido às condições de estocagem avaliadas.

### 5.6.2 Análise por difratometria de raios X em pó

Os difratogramas do fosamprenavir cálcico no tempo inicial e após 3 e 6 meses de incubação são apresentados na Figura 47. A sobreposição dos gráficos permite verificar que em todas as amostras os picos de Bragg ocorrem sempre nos mesmos ângulos de difração, ou seja, não há diferenças de estrutura cristalina entre as amostras analisadas, corroborando com os resultados obtidos por FTIR. Dessa forma pode-se concluir que a forma I do fármaco fosamprenavir cálcico é estável nas condições de temperatura e umidade avaliadas.

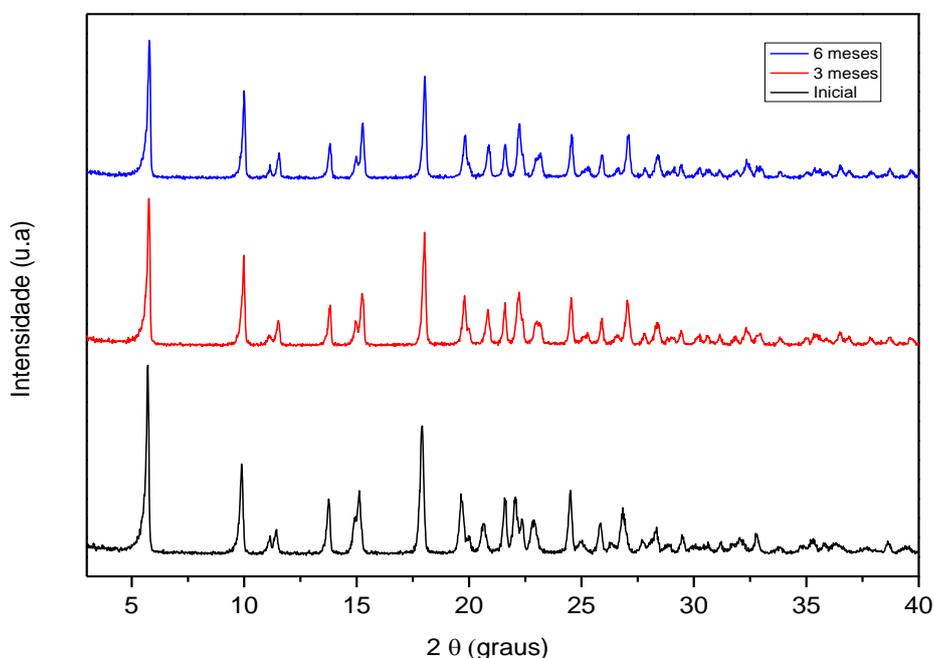


Figura 47 - Difratogramas fosamprenavir cálcico. Amostra de tempo inicial, 3 e 6 meses de incubação a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Medidas de  $2\theta$  entre  $3^{\circ}$  e  $40^{\circ}$ , 40 KV, 30 mA e Cu- $K\alpha$  (1,54178).

Fonte: Do autor.

## 6 CONCLUSÃO

O fármaco fosamprenavir cálcico foi isolado eficientemente a partir do medicamento Telzir® e caracterizado pelas técnicas de RMN, FTIR, EM, PXRD, SXR, TG, DSC e MEV. Os espectros obtidos por ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas foram condizentes com a estrutura química do fármaco, comprovando que o produto obtido pelo método de extração foi realmente o fosamprenavir cálcico. A análise por difratometria de raios X em pó revelou que o fármaco obtido se encontrava no estado cristalino, correspondente à forma polimórfica I já descrita. As medidas por difratometria de raios X em monocristal permitiram determinar a estrutura cristalina dessa forma sólida do fármaco. Além disso, comprovaram que esta é um hidrato pentahidratado conforme já descrito na literatura, contendo 3 moléculas de água de coordenação ao íon cálcio e 2 moléculas de água desordenadas em canal. As análises térmicas demonstraram que o fármaco sofre intensa degradação próximo ao seu ponto de fusão e que o mesmo não apresenta temperatura e entalpia de fusão definidas, impossibilitando o emprego das técnicas de TG e DSC em estudos de compatibilidade fármaco-excipiente. Além disso, as análises térmicas e titulométrica em aparelho de Karl Fischer demonstraram a presença de 5 moléculas de água presentes na forma I do fosamprenavir cálcico, corroborando com os resultados encontrados por SXR. A avaliação morfológica da forma I do sal cálcico do fosamprenavir por MEV demonstrou que este se cristaliza na forma de agulhas finas, o que geralmente está associado à dificuldades em processos farmacêuticos para obtenção do insumo ativo e para o desenvolvimento de formulações. A análise cromatográfica revelou que o fármaco extraído a partir do medicamento Telzir® apresentou elevada pureza, possibilitando a sua utilização como padrão de trabalho nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente. A avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco revelou que o mesmo sofre degradação quando submetido à hidrólise ácida, hidrólise básica e meios oxidativos. Nestas condições foi verificada a formação de 3 produtos de degradação do fosamprenavir, dos quais dois tiveram a estrutura elucidada através de experimentos MS/MS. O produto de degradação com relação  $m/z$  472, formado pela hidrólise ácida e básica do grupo carbamato presente na molécula do fármaco, corresponde à impureza A do fosamprenavir cálcio, já descrita na literatura. O produto de degradação com relação  $m/z$  530 foi formado devido a utilização do metanol no preparo das amostras, sendo um pseudo-produto de degradação. A validação do método cromatográfico comprovou a sua adequabilidade em estimar o teor do fármaco e quantificar seus produtos de

degradação. Nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, as amostras analisadas por FTIR demonstraram uma aparente interação no estado sólido entre o fosamprenavir cálcico e os excipientes sílica anidra coloidal e estearato de magnésio. Essas interações não foram induzidas pelas condições de temperatura e umidade utilizadas no estudo, uma vez que foram detectadas já nas amostras de tempo inicial. Além disso, a análise por CLAE demonstrou que essas interações não foram de natureza química, uma vez que não ocorreu a redução no teor de fármaco e nem a formação de produtos de degradação nessas amostras. As análises por cromatografia líquida também revelaram ausência de incompatibilidade química entre o fosamprenavir cálcico e os excipientes povidona K-30, crospovidona, croscarmelose sódica, opadry rosa e amido glicolato de sódio. A avaliação da estabilidade polimórfica da forma cristalina I do fosamprenavir cálcico revelou que esta é estável nas condições de estocagem avaliadas. Não foram observadas transições de fase nas amostras analisadas.

## REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. A.; AL-GHOBASHY, M. A.; LOFTY, H. M. Investigation of the profile and kinetics of degradation of rivaroxaban using HPLC, TLC-densitometry and LC/MS/MS: Application to pre-formulation studies. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo, v. 53, p. 53-61, 2015.

AHUJA, S. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. 2005. Disponível em: <<http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10138148>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Crystal Growth Design**, Washington, v. 12, p. 2147-2152, 2012.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 9. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

ALVES-SILVA, I. et al. Preformulation studies of itraconazole associated with benznidazole and pharmaceutical excipients. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 575, p. 29-33, 2014.

ARAÚJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, Araraquara, v. 33, p. 27-36, 2012.

ARMITAGE, I. G.; SEARLE, A. D.; SINGH, H. Calcium (3S) tetrahydro-3-furanyl(1S,2R)-3-[[[4-aminophenyl)sulfonyl](isobutyl)amino]-1-benzyl-2-(phosphonooxy)propylcarbamate, **US6514953 B1**, 2003.

ASHRAFI, A. M. et al. Determination and detailed mechanism study of antiviral drug fosamprenavir using carbon paste electrode in the presence of Triton X-100. **Electrochimica Acta**, Leicester, v. 109, p. 381-388, 2013.

ATICI, E. B.; KARLIGA, B. Quantitative determination of two polymorphic forms of imatinib mesylate in a drug substance and tablet formulation by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 114, p. 330-340, 2015.

AYALA, A. P. et al. Thermal stability of aripiprazole monohydrate investigated by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Dunedin, v. 54, p. 169-173, 2010.

BAUER, J. et al. Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmaceutical Research**, Baltimore, v. 18, n. 6, 2001.

BERALDI, C. et al. Characterization of polymorphic ampicillin forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Munster, v. 100, p. 329-340, 2014.

BETTO, P.; TURCHETTO, L.; LONGINOTTI, L. Allergenic impurities in medicinal preparations containing aminopenicillin. I. Ampicillin sodium, **Ann. Ist. Super. Sanita**, Rome, v. 25, p. 315-316, 1989.

BHOGE, S. M. et al. Crystalline form of Fosamprenavir calcium, **US 2012/0208787 A1**, 2012.

BISSA, I. P. V. **Estudos de pré-formulação em formas farmacêuticas sólidas de uso oral para os fármacos Desloratadina e Etinilestradiol**. 2013. 157f. Dissertação (Mestrado) – UNIFAL, Alfenas, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. 2012a. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%202\\_Revisao\\_2\\_COFAR\\_setembro\\_2012\\_atual.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%202_Revisao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução RE nº1/2005** - Estudos de Estabilidade. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 03 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/informes/2008/01\\_160708.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/informes/2008/01_160708.htm)>. Acesso em: 03 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução RE nº 45, de 09 de agosto de 2012**. Dispõem sobre a realização de estudos de estabilidade em insumos farmacêuticos ativos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução RDC nº 53, de 04 de dezembro de 2015**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 05 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 13 jan. 2017.

BROG, J. et al. Polymorphism, what it is and how to identify it: a systematic review. **RSC Advances**, Cambridge, v. 3, p. 16905-16931, 2013.

BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. Dordrecht: Kluwer Acad, 2001.

CARTENSEN, J.T. Preformulation. In: BANKER, G.S.; RHODES, C.T. **Modern Pharmaceutics**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. cap. 7, p. 167-185.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening – Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHATTERJEE, A. K. X-Ray Diffraction. In: RAMACHANDRAN, V. S.; JAMES, J. B. (Ed.). **Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology**. Norwich: William Andrew, 2001, p. 275-332.

CHILUKURI, M.; NARAYANAREDDY, P.; HUSSIANREDDY, K. Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Fosamprenavir Calcium. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 52, n. 8, p. 781-787, 2013.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, Oxford, v. 2, p. 311-320, 1999.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**, 5. ed. Campinas – SP: Editora Unicamp, 2014.

COLMAN, M. D. et al. Evolved gas analysis (TG-DSC-FTIR) and (Pyr-GC–MS) in the disposal of medicines (aceclofenac). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Nancy, v. 119, p. 157-161, 2016.

CORBETT, A.H.; KASHUBA, A.D.M. Fosamprenavir Vertex Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline. **Current Opinion in Investigational Drugs**, London, v. 3, p. 384-390, 2002.

CORRADINI, D. **Hand book of HPLC**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.

CORRÊA, J. C. R. et al. Polymorphic stability of duranavir and its formulation. **Journal of Thermal analysis and Calorimetry**, Budapeste, v. 121, n. 3. 2015.

COSTA, S. P. M. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 562, p. 29-34, 2013.

CRAIG, D. Q. M. R. M. **Thermal analysis of pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2007.

CRYALIS PRO 1.7.; Oxford Diffraction Ltd.: Abingdon, UK, 2006.

DANIEL, J. S. P. et al. Risperidone - Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 568, p. 148-155, 2013.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparações de amostras**. Porto Alegre, 2007. Disponível em <<http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>>. Acesso em 09 de janeiro de 2017.

DONG, M. W. **Modern HPLC for practicing scientists**. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471973106.fmatter/pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Epar summary for the public. **Science medicines Health**, 2005, Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000264/WC500022929.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/000264/WC500022929.pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Epar summary for the public. **Science medicines Health**, 2010, Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

FARRUGIA, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystallography**, Liverpool, v. 32, p. 837-838, 1999.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry—**ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism Chemistry, Manufacturing and Controls Information**, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM072866.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

FURFINE, E. S. et al. Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, p. 791-798, 2004.

GEHRING et al. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.

GIBSON, M. (Ed). **Pharmaceutical preformulation and formulation** - A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. 2. ed. New York: Informa Healthcare, 2009.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, Oxford, v.1, n. 5, p. 191-199, 1998.

GORECKI, T. et al. Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, n. 9, p. 3186-3192, 2006.

GRANICH, R. et al. Trends in AIDS Deaths, New Infections and ART Coverage in the Top 30 Countries with the Highest AIDS Mortality Burden; 1990–2013. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, 2015.

GROSS, J. M., Fanconi syndrome (adult type) developing secondary to the ingestion of outdated tetracycline, **Ann. Intern. Med.** Philadelphia, v. 58, p. 523–528, 1963.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S.A. Electrochemical evaluation and determination of antiretroviral drug fosamprenavir using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 397, p. 189-203, 2010.

HAINES, P. J. **Principles of thermal analysis and calorimetry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.

HENRIET, T. et al. Solid state stability and solubility of triethylenetetramine dihydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, Lille, v. 511, p. 312-321, 2016.

HERVÉ, R. et al. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Lincoln, v. 850, p. 376-383, 2007.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman e Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION RESEARCH - ICH. Official web site. Disponível em: <[www.ich.org](http://www.ich.org)>. Acesso em: 08 jan. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry Q1A(R2): **Stability testing of new drug substances and products**, 2003. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry Q2(R1): **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry Q1B: **Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products**, 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry Q6A: **Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances**, 1999. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry Q3A(R2): **Impurities in new drug substances**, 2006. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry Q3B(R2): **Impurities in new drug products**, 2006. Disponível em:

<<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Guidance for industry M7: **Assessment and control of DNA reactive (Mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk**, 2014. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/multidisciplinary/multidisciplinary-single/article/assessment-and-control-of-dna-reactive-mutagenic-impurities-in-pharmaceuticals-to-limit-potential.html>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

JACKSON, K.; YOUNG, D.; PANT, S. Drug-excipient interactions and their effect on absorption. **PSTT**, Oxford, v. 3, n. 10, p. 336-345, 2000.

JACOBS, B. S. et al. Effect of fosamprenavir/ritonavir on the pharmacokinetics of single-dose olanzapine in healthy volunteers. **International Journal of antimicrobial Agents**, Marseille, v. 44, p. 173-177, 2014.

JETTI, R. R.; BHAGAVATULA, N.; GORANTLA, A. R. Crystalline fosamprenavir calcium and process for the preparation thereof, **US 0317236 A1**, 2013.

JÚLIO, T. A. et al. Solid-state stability and solubility determination of crystalline forms of Moxifloxacin hydrochloride. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Bhatia, v. 7, n. 12, p. 173-177, 2015.

KAMBERI, M.; RAPOZA, R. Stability testing of drug eluting stents. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Lille, v. 35, p. 58-68, 2016.

KARABAS, I.; ORKOULA, M. G.; KONTOYANNIS, C. G. Analysis and stability of polymorphs in tablets: The case of Risperidone. **Talanta**, London, v. 71, n. 3, p. 1382-1386, 2007.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003.

KAUR, A.; GOINDI, S.; KATARE, O. P. Thermal analysis and quantitative characterization of compatibility between diflunisal and lipid excipients as raw materials for development of solid lipid nanoparticles. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 643, p. 23-32, 2016.

KROMIDAS, S. **More practical problem solve in HPLC**. 2005. Disponível em: <<http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/Kromidas2005.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

LEITE, E.G. **Estabilidade:** importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. 2006, 178p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

LEKSIC, E.; SEPAC, D.; PAVLICIC, D. Solid state forms of fosamprenavir calcium salt and processes for preparation thereof, **US 0165202 A1**, 2011.

LI, L. et al. Thermal analysis of melting and freezing processes of phase change materials (PCMs) based on dynamic DSC test. **Energy and Buildings**, Sydney, v. 130, p. 388-396, 2016.

MACRAE, C. F. et al. Mercury CSD 2.0—New features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, Liverpool, v. 41, p. 466-470, 2008.

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <[http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf)>. Acesso em 05 jan. 2017.

MAROTHU, V. K. et al. Application of HPLC to assess the compatibility of bisoprolol fumarate with selected excipients in mixtures by isothermal stress testing. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Créteil, v. 73, p. 442-451, 2015.

MATOS, A. P. S. **Estudo de Pré-Formulação e Desenvolvimento de Comprimidos de Liberação Imediata contendo Diazepam**. 2014. 212f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.

MOTA, D. R. et al. Efeitos do Uso Crônico do Amprenavir sobre a Prenhez da Rata Albina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstetrícia**, São Paulo, v.26, n.3, p.207-211, 2004.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. São Paulo: I-editora, 2002.

MURAKAMI, F. S. et al. Physico-chemical solid-state characterization of omeprazole sodium: Thermal, spectroscopic and crystallinity studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 49, p. 72-80, 2009.

NALWADE, S. U. et al. A validated stability indicating ultra performance liquid chromatographic method for determination of impurities in Esomeprazole magnesium gastro

resistant tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 57, p. 109-114, 2012.

NARAYANAM, M. et al. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 87, p. 191-217, 2014.

PAISANA, M. C.; WAHL, M. A.; PINTO, J. F. Role of moisture on the physical stability of polymorphic olanzapine. **International Journal of Pharmaceutics**, Lille, v. 509, p. 135-148, 2016.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learnig, 2013.

PINDELSKA, E. et al. Solid-state NMR as an effective method of polymorphic analysis: solid dosage forms of clopidogrel hydrogensulfate. **Journal of Pharmaceutical Science**, Lawrence, v. 104, p. 106-113, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

RAO, R. N. et al. LC-MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Duranavir: An anti-HIV drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 89, p. 28-33, 2014.

REBIERE, H. et al. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Lincoln, v. 850, p. 376-383, 2007.

REDDY, B. P. et al. Novel polymorphs of fosamprenavir calcium, **US 0025040 A1**, 2015.

RENUKA, S. K. S.; MONICA GULATI, I. K. Characterization of solid state forms of glicazide. **Powder technology**, Columbus, v. 264, p. 365-376, 2014.

RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de química, UNICAMP, Campinas, 2004.

ROJEK, B.; WESOŁOWSKI, M.; SUCHACZ, B. Detection of compatibility between baclofen and excipients with aid of infrared spectroscopy and chemometry. **Spectrochimica Acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Amsterdam, v. 116, p. 532-538, 2013.

ROJEK, B.; WESOŁOWSKI, M. Fourier transform infrared spectroscopy supported by multivariate statistics in compatibility study of atenolol with excipients. **Vibrational Spectroscopy**, Dunedin, v. 86, p. 190-197, 2016.

ROMANO et al. Allergic reactions to ampicillin. Studies on the specificity and selectivity in subjects with immediate reactions. **Clin. Exp. Allergy**, Southampton, v. 27, p. 1425-1431, 1997.

ROSSI, R. C. et al. Development and validation of discriminating method of dissolution for Fosamprenavir tablets based on in vivo data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 54, p. 439-444, 2011.

ROSSI, R. C. **Validação de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade do anti-retroviral Fosamprenavir**. 2011. 197f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SANTOS, O. M. M. et al. Structure, Solubility and Stability of Orbifloxacin Crystal Forms: Hemihydrate versus Anhydrate. **Molecules**, Beijing, v. 21, p. 328, 2016.

SCHMITT, E. A. et al. Rapid, practical and predictive excipient compatibility screening using isothermal microcalorimetry. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 380, p. 175-183, 2001.

SHELDRIK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica A**, Chester, v. 64, p. 112-122, 2008.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev. Cienc. Farm. Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, p. 129-135, 2009.

SILVA, V. H.; SILVA, J. J.; PEREIRA, C. F. Portable near-infrared instruments: Application for quality control of polymorphs in pharmaceutical raw materials and calibration transfer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 134, p. 287-294, 2017.

SILVEIRA, A. A. **Mapeamento Genético do HIV-1 e Análise de Resistências Associadas aos Antirretrovirais em Pacientes do Centro - Oeste Brasileiro**. 2011. 99f. Tese

(Doutorado) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2006.

SINGH, S. et al. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 69, p. 148-173, 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

RSC - THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **The Merck Index**, 15. ed. RSC Publishing, 2013.

TIAN, F. et al. Factors affecting crystallization of hydrates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Belfast, v. 62, p. 1534-1546, 2010.

TILLEY, R. J. D. **Cristalografia: cristais e estruturas cristalinas**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2014.

TORRES, H. A.; ARDUINO, R. C. Fosamprenavir cálcio e ritonavir na infecção pelo HIV. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Scotland, v. 5, n. 3, p. 349-363, 2007.

UNAIDS/WHO. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS/World Health Organization, Global report: **UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2016**. Disponível em: <<http://www.unaids.org>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

VERONEZ, I. P. et al. Characterization and compatibility study of desloratadine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapeste, v. 115, p. 2407-2414, 2013.

WIRE, M. B.; SHELTON, M. J.; STUDENBERG, S. Fosamprenavir – Clinical pharmacokinetics and drug interactions of the amprenavir prodrug. **Clinical Pharmacokinetics**, Kingston, v. 45, p. 137-168, 2006.

WHO. **The International Pharmacopoeia**. 2016. Disponível em: <<http://apps.who.int/phint/en/p/about/>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. S. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Q Plenum Publishers, 2002.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. **Statistical Manual of the AOAC**, 48. ed. AOAC International: Arlington, 1975.

ZHAO, Y.; ZHENG, Z.; LI, S. Quantification of flupirtine maleate polymorphs using X-ray powder diffraction. **Chinese Chemical Letters**, Shanghai, v. 27, p. 1666-1672, 2016.