UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

ESTABILIDADE, POLIMORFISMO, DISSOLUÇÃO E CORRELAÇÃO IN VIVO-IN VITRO DE DARUNAVIR COMPRIMIDOS

JOSILENE CHAVES RUELA CORRÊA

ORIENTADOR: Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado

COORIENTADOR: Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

ARARAQUARA - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ESTABILIDADE, POLIMORFISMO, DISSOLUÇÃO E CORRELAÇÃO IN VIVO-IN VITRO DE DARUNAVIR COMPRIMIDOS

JOSILENE CHAVES RUELA CORRÊA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado

COORIENTADOR: Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

ARARAQUARA - SP
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C824e

Corrêa, Josilene Chaves Ruela
Estabilidade polimorfismo, dissolução e correlação *in vivo- in vitro* Darunavir comprimidos / Josilene Chaves Ruela Corrêa – Araraquara, 2014
173 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Hérida Regina Nunes Salgado
Coorientador: Cristina Helena dos Reis Serra

1. HIV. 2. Aids. 3. Duranavir. 4. Polimorfismo. 5. Ferramentas in vitro. I. Salgado, Hérida Regina Nunes, orient. II. Serra, Cristina Helena dos Reis, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Dedico este trabalho ao DEUS e pai de nosso Senhor Jesus Cristo, que era, que é e que há de vir.

“Temos, porém, esse tesouro em vasos de barro para que a excelência do poder seja de Deus e não de nós.” 2Co 4:7.

Agradecimentos

Ao meu marido, amor da minha vida. Sem você nada disso seria possível!

Aos meus pais, que nada tendo, me deram tudo.

Aos meus irmãos. Em nossa união há bênçãos e vida para sempre.

Às minhas orientadora, Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado,
e coorientadora, Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra.
Não tenho palavras para agradecer toda orientação, confiança e
ajuda que dispensaram a mim!!! Serei eternamente grata!!!

Aos supervisores no exterior, Profa. Dra. Deirdre M. D'Arcy do Trinity College Dublin e
Prof. Dr. Hartmut Derendorf da University of Florida.

"Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade." S. Tomás de Aquino

Aos amigos de laboratório que ao compartilhar tudo tornaram essa caminhada mais fácil.

Ao professor Dr. Álvaro José dos Santos Neto, docente do curso de Química da USP-São Carlos-SP, por abrir as portas de seu laboratório e me ajudar com todas as análises e interpretação de resultados da espectrometria de massas de forma tão generosa.

Ao professor Dr. Marcello Garcia Trevisan, docente do curso de Química da UNIFAL-Alfenas-MG, por abrir as portas de seu laboratório e me ajudar com todas as análises térmicas e interpretação de resultados de forma tão solícita.

Ao CNPq e à FAPESP (Processo 2011/05836-4), pelo apoio financeiro concedido.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima." Louis Pasteur

Resumo

O darunavir, antirretroviral inibidor de protease, compõe a terapia considerada altamente eficaz no tratamento da síndrome da imunodeficiência humana adquirida, e é um dos fármacos disponibilizados gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os produtos genéricos têm contribuído para a manutenção e abrangência desta política de distribuição gratuita de medicamentos, ao reduzir os custos desses produtos. Neste propósito, este estudo busca fornecer informações sobre o comportamento físico-químico e estabilidade do fármaco e da formulação, diante de diferentes condições climáticas, bem como, sobre sua solubilidade e liberação a partir da formulação. Além disso, pretende apresentar ferramentas *in vitro* e *in silico* que contribuam, no futuro próximo, para a produção de novos produtos contendo darunavir que apresentem alta qualidade, especialmente, genéricos do medicamento referência. Para tanto, a solubilidade do fármaco foi investigada em diferentes meios. A baixa solubilidade aquosa do fármaco foi verificada, e os meios adequados aos testes de dissolução foram escolhidos. O perfil de dissolução *in vitro* do darunavir e de absorção *in vivo* a partir papel dos comprimidos de Prezista® contendo 300 mg de fármaco foram investigados. Obteve-se um perfil de dissolução discriminativo para o produto e um método de quantificação por espectrofotometria derivada foi desenvolvido e validade. Uma correlação entre os dados de fração dissolvida *in vitro* e fração absorvida *in vivo* do darunavir foi alcançada (r^2= 0,95). Este é um método preditivo para avaliar o desempenho *in vivo* do darunavir a partir de comprimidos de liberação imediata, com base em dados *in vitro,* e é importante para minimizar o uso de animais e seres humanos em experimentos durante o desenvolvimento novos produtos farmacêuticos contendo darunavir. Além disso, uma ferramenta *in silico* foi desenvolvida e validada para a previsão da biodisponibilidade oral de produtos contendo o darunavir, a partir do seu perfil de dissolução. Para isso a modelagem farmacocinética fisiologicamente embasada foi empregada através do software Simcyp®. Estas ferramentas in vitro e in silico auxiliarão no desenvolvimento de formulações novas ou genéricas para administração oral de darunavir. A instabilidade físico-química do fármaco, com a geração de produtos de degradação foi verificada. As possíveis rotas de degradação e a estrutura química dos principais produtos de degradação foram estudadas e propostas. Como suporte ao estudo de estabilidade, um método cromatográfico indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado. A instabilidade do cristal do darunavir, com a perda de sua cristalinidade, foi observada quando submetido a diferentes condições climáticas. Amplo estudo sobre o papel desempenhado pela formulação e pela embalagem primária na manutenção das características do fármaco nos mostram que a embalagem tem papel importante, mas não é suficiente para garantir sua estabilidade em todas as condições testadas. De forma abrangente, este trabalho fornece ferramentas de suporte ao desenvolvimento de novos produtos contendo darunavir, contribui para a qualidade destes produtos e para a política governamental de distribuição de medicamentos.

Palavras chaves: HIV/AIDS; Darunavir; Dissolução; CIVIV; Estabilidade; Polimorfismo; Ferramentas *in vitro* e *in silico.*

Abstract

Darunavir, a protease inhibitor, constitute the highly active antiretroviral therapy against the acquired immunodeficiency syndrome. It is one of agents given free by the Brazilian Health System (SUS). Generic products have contributed to the maintenance and the policy of free distribution of medicines by the decreasing of costs of these products. In this way, this study seeks to provide information on the physical and chemical behavior and stability of the drug and formulation, facing different weather conditions, as well as provide information on their solubility and release from the formulation. It also aims to provide in vitro and in silico tools to contribute in the near future, for the production of new products containing darunavir, especially generic medicines. Therefore, the solubility of the drug was investigated in different media. The low aqueous solubility of the drug was observed, and suitable media for dissolution testing were chosen. The in vitro dissolution profile of darunavir and the in vivo absorption from Prezista® (tablets containing 300 mg of drug) were investigated. It was obtained a discriminating dissolution profile of the product and a method of quantification by spectrophotometry derivative was developed and validated. A correlation between the data of in vitro dissolved fraction and in vivo absorbed fraction of darunavir was achieved ($r2 = 0.95$). This is a predictive method to evaluate the in vivo performance of darunavir from immediate-release tablets, based on in vitro data, and it is important to minimize the use of animals and humans in experiments during the development of new medicines containing darunavir. In addition, an in silico tool was developed and validated for predicting the oral bioavailability of darunavir formulations, from their dissolution profile. For this, physiologically based pharmacokinetic modeling was applied through Simcyp® software. These, in vitro and in silico tools, assist in developing new or generic formulations for oral administration of darunavir. The physico- chemical instability of the drug with the generation of degradation products was verified. The possible routes of degradation and the chemical structure of the main degradation products have been studied and proposed. A stability indicating chromatographic method was developed and validated. In addition, the instability of the crystal darunavir, with loss of crystallinity was observed when it was subjected to several climatic conditions. Extensive study about the role played by the formulation and the primary packaging in maintaining the characteristics of the drug showed that packaging plays an important role, but it is not enough to ensure its stability in all tested conditions. Comprehensively, this work provides tools to support the development of new products containing darunavir, which contributes to the quality of these products and to the government policy of free distribution of drugs.

Keywords: HIV/AIDS; Darunavir; Dissolution; IVIVC; Stability; Polymorphism; *in vitro* e *in silico* tools.

Sumário

PARTE I 22
1 Introdução 23
1.1 Objetivos 29
1.2 Organização no texto dos assuntos estudados 30
2 Revisão bibliográfica 31
2.1 Propriedades farmacodinâmicas do darunavir 31
2.2 Propriedades farmacocinéticas do darunavir 33
2.3 Interação medicamentosa envolvendo o darunavir 35
2.4 Tratamento pediátrico 41
2.5 Propriedades físico-químicas e polimorfismo 42
2.6 Classificação biofarmacêutica 43
2.7 Controle de Qualidade 45
2.8 Publicações 51
3 Material, equipamentos e obtenção da matéria-prima 52
3.1 Material 52
3.2 Equipamentos 53
3.3 Obtenção da matéria-prima 53
3.3.1 Análise da matéria-prima obtida 54
PARTE II 57
4 Desenvolvimento e validação de método analítico espectrofotométrico 58
4.1 Material e método 60
4.1.1 Material 60
4.1.2 Preparação da solução padrão 60
4.1.3 Preparação da solução amostra 60
4.2 Resultados e discussão 61
4.2.1 Desenvolvimento analítico 61
4.2.2 Validação analítica 63
4.3 Conclusão 66
4.4 Publicações 66
5 Solubilidade, dissolução e construção de correlação *in vivo-in vitro* 67

5.1.1 Solubilidade 67
5.1.2 Dissolução 68
5.1.3 Correlação *in vivo-in vitro* 69
5.2 Materiais e métodos 70
5.2.1 Materiais 70
5.2.2 Estudos *in vivo* 71
5.2.3 Estudos *in vitro* 72
5.2.4 Correlação *in vitro–in vivo* (IVIVC) 74
5.2.5 Validação do método analítico para a dissolução 74
5.3 Resultados e discussão 75
5.3.1 Estudos *in vivo* 75
5.3.2 Estudos de solubilidade 76
5.3.3 Desenvolvimento do perfil de dissolução 78
5.3.4 Adequação e validação do método espectrofotométrico para o ensaio de perfil de dissolução 82
5.4 Conclusão 84
5.5 Participação internacional 84
6 Estudos *in silico* para o darunavir 85
6.1 Material e métodos 87
6.2 Resultados 88
6.3 Participação internacional 90
PARTE III 91
7 Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência 92
7.1 Materiais e métodos 93
7.2 Condições cromatográficas 94
7.3 Preparação das soluções padrão 94
7.4 Preparação da solução amostra 94
7.5 Estudos de degradação ácida, básica, neutra e oxidativa 95
7.6 Validação analítica 97
7.6.1 Emprego de combinação fatorial na avaliação da robustez do método proposto 99
7.7 Publicações 103
8 Espectrometria de massas 104

8.1 Introdução 104
8.2 Resultados e discussão 105
8.3 Publicações 112
9 Estudo de estabilidade 113
9.1 Introdução 113
9.2 Materiais e métodos 115
9.2.1 Estabilidade sob calor seco 115
9.2.2 Estabilidade sob calor úmido 115
9.2.3 Fotoestabilidade 116
9.3 Resultados e Discussão 116
9.3.1 Estabilidade sob calor seco 116
9.3.2 Estabilidade sob calor úmido 120
9.3.3 Fotoestabilidade 123
9.4 Publicações 126
PARTE IV 127
10 ESTUDOS DE POLIMORFISMO 128
10.1 Objetivo 130
10.2 Material e métodos 130
10.3 Resultados e discussão 131
10.4 Conclusão 141
10.5 Publicações 141
PARTE V 142
11 Introdução 143
11.1 Métodos 144
11.1.1 Estudo de dissolução intrínseca 144
11.1.2 Estudo de solubilidade 145
11.2 Resultados e discussão 145
11.2.1 Estudo de dissolução intrínseca 145
11.2.2 Estudo de solubilidade 150
CONCLUSÃO GERAL 155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 159

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do darunavir (CAS 206361-99-1) 26

Figura 2. Esquema ilustrando o ciclo de replicação do HIV. Figura adaptada de Hoggard & Owe (2003). 27

Figura 3. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para darunavir padrão (azul), matéria-prima extraída (verde), produto (preto) e placebo (vermelho) na concentração de 15 μg/mL. 55

Figura 4. Sobreposição dos espectros infravermelho de darunavir padrão e matéria-prima extraída 56

Figura 5. Espectro de absorção na região do U V de ordem zero para as amostras de darunavir comprimidos (a) e placebo (b) na concentração de 15 μg/mL, preparadas utilizando água e MEOH (20%) como solventes. 62

Figura 6. Espectro de absorção na região do UV de primeira ordem para a amostra de darunavir comprimidos (a) e placebo (b) na concentração de 15 μg/mL preparadas utilizando água e MEOH (20%) como solventes. 62

Figura 7. Curva fração da dose absorvida (%) *vs.* tempo (horas) para darunavir comprimidos, calculada empregando o método Loo-Riegelman. 76

Figura 8. Perfil de dissolução construído para os comprimidos de Prezista® (n = 3) usando 0,5, 1, 1,5 e 2% de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meios de dissolução e o aparato II a 75 rpm. 79

Figura 9. Perfil de dissolução construído para os comprimidos de Prezista® (n = 12) usando 0,5 % de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meio de dissolução e o aparato II a 50 e 75 rpm. 80

Figura 10. Curva de porcentagem de dose absorvida vs. porcentagem de dose dissolvida de comprimidos de Prezista® quando empregado 0,5, 1, 1,5 e 2% de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meios de dissolução e o aparato II a 75 rpm. 80

Figura 11. Curva de porcentagem de dose absorvida vs. porcentagem de dose dissolvida de comprimidos de Prezista® quando empregado 0,5% de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meio de dissolução e o aparato II a 50 e 75 rpm. 81

Figura 12. Curvas construídas usando os dados de Cmax (A) e AUCinf (B) obtidos nos estudos clínicos publicados e aqueles simulados pelo *software* Simcyp® 90

Figura 13. Cromatogramas obtidos a partir de sobreposição das soluções de estresse alcalino (A), ácido (B) e oxidativo (C) de darunavir sob aquecimento a 90° C durante 3 horas. Os possíveis produtos de degradação (PD) são mostrados. 96

Figura 14. Cromatograma (a) e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para darunavir matéria-prima..... 106

Figura 15. Cromatograma (a) e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para as amostras de darunavir sob estresse básico..... 107

Figura 16. Cromatograma (a) da solução de darunavir sob estresse ácido e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para o produto de degradação enumerado como pico 1. O pico enumerado como número 6 é o pico do fármaco. 108

Figura 17. Cromatograma (a) e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para o darunavir em meio oxidativo. O detalhe (b) apresenta a fragmentação direta do íon 594 em 560, 448, 404 e 113..... 109

Figura 18. Principais produtos de degradação obtidos em meio básico e o padrão de fragmentação proposto para o fármaco, referente espectro de massas do produto de degradação 1 (Figura 15)..... 110

Figura 19. Principais produtos de degradação em meio oxidativo e o padrão de fragmentação proposto para o fármaco, referente espectro de massas do produto de degradação 1 (Figura 17)..... 111

Figura 20. Curva teor (%) *vs.* tempo de estocagem (dias) sob calor seco para as amostras de matéria-prima, comprimidos em embalagem primária e comprimidos inteiros (com o revestimento), sem o revestimento e pulverizados armazenados em placas de Petri..... 119

Figura 21. Curva teor (%) *vs*. tempo de estocagem (dias) sob calor úmido para as amostras de matéria-prima, comprimidos em embalagem primária e comprimidos inteiros (com o revestimento) e pulverizados armazenados em placas de Petri. 122

Figura 22. Curva teor (%) *vs.* tempo de estocagem (dias) sob luz UVC para as amostras de matéria-prima, comprimidos inteiros revestidos, sem revestimento e pulverizados armazenados em placas de Petri. 125

Figura 23. Difratograma das amostras de darunavir matéria-prima (A), comprimidos estocados na embalagem primária (B) e comprimidos mantidos em placas de Petri (C) submetidas a calor seco (55° C) por 20, 40, 60 e 90 dias, sobrepostos às amostras não submetidas à temperatura (Inicial). 132

Figura 24. Curvas de DSC para amostras de matéria-prima de darunavir etanolato submetidas a calor seco por 20, 47 e 94 dias, sobrepostos à amostra não estressada (Inicial)..... 134

Figura 25. Curvas de DSC para amostras de comprimidos de darunavir submetidas a calor seco por 20, 40, 64 e 93 dias e estocados em placa de petri, sobrepostos à amostra não estressada (Inicial). 134

Figura 26. Curvas termogravimétricas integrada para as amostras de matéria-prima de darunavir estocados em placas de Petri não estressada e submetidas à 55° C durante diferentes 20, 47, 94 dias. 135

Figura 27. Curvas de DSC para amostras de matéria-prima de darunavir etanolato submetidas a calor seco por 20, 47 e 94 dias, e a amostra não estressada (Inicial), com a sobreposição da curva de DSC para o padrão de darunavir..... 136

Figura 28. Curvas de DSC para amostras de comprimidos de darunavir submetidas a calor seco por 20, 40, 61 e 93 dias e estocados na embalagem primária, sobrepostos à amostra não estressada (Inicial). 137

Figura 29. Curvas termogravimétricas integrada para as amostras de comprimidos de darunavir estocados na embalagem primária não estressada (J06) e submetidas à 55° C durante diferentes 20, 40, 61 e 93 dias (J07, J08, J09 e J10, repectivamente). 138

Figura 30. Curvas termogravimétricas das amostras de matéria-prima estocadas em placa de Petri a 55° C durante diferentes períodos de tempo. 140

Figura 31. Sobreposição dos difratogramas da matéria-prima de darunavir antes e após compressão. 146

Figura 32. Curva de massa dissolvida por área do disco *vs*. tempo obtida para matéria-prima no início do estudo. 147

Figura 33. Curva de massa dissolvida por área do disco *vs*. tempo obtida para matéria-prima no início do estudo (T_0) e após estresse. 148

Figura 34. Perfis de dissolução de comprimidos de darunavir submetidos a estresse armazenados dentro (EMB) e fora (PP) da embalagem primária. 149

Figura 35. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida a calor seco (55° C) por 90 dias. 151

Figura 36. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida a calor úmido (30° C/ 75 %UR) por um ano. 152

Figura 37. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida a calor úmido (40° C/ 75 %UR) por cinco meses. 152

Figura 38. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida à luz UVC por 27 dias. 153

Figura 39. Solubilidade da matéria-prima submetida a diferentes condições de estresse medida em meio de dissolução (tampão fosfato pH 3,0 + 0,5% Tween 20®). 153

Lista de Tabelas

Tabela 1. Interações entre a associação darunavir e baixa dose de ritonavir e outros fármacos 37

Tabela 2. Métodos cromatográficos publicados entre 2007 e 2011 para a determinação de darunavir 47

Tabela 3. Interferência do placebo na determinação de darunavir por espectrofotometria na região do ultravioleta 63

Tabela 4. Parâmetros da validação analítica do método espectrofotométrico para determinação de darunavir 64

Tabela 5. Valores determinados no estudo de exatidão do método espectrofotométrico proposto para quantificação do darunavir durante o estudo de dissolução 65

Tabela 6. Valores determinados no teste de robustez do método espectrofotométrico proposto para quantificação do darunavir 65

Tabela 7. Solubilidade do darunavir determinada através do método de equilíbrio 77

Tabela 8. Análise de regressão para cada uma das correlações construídas 81

Tabela 9. Interferência do placebo na determinação de darunavir em amostra de dissolução usando espectrofotometria UV 82

Tabela 10. Valores dos parâmetros determinados na validação analítica para determinação do darunavir durante os estudos de dissolução e solubilidade 83

Tabela 11. Valores obtidos para o parâmetro exatidão estudado na validação do método proposto para determinação do darunavir durante os estudos de dissolução e solubilidade 83

Tabela 12. Dados da literatura empregados na construção do perfil do darunavir no banco de dados do *software* Simcyp® 88

Tabela 13. Dados dos estudos clínicos publicados usados para validar o perfil do darunavir no *software* Simcyp® 89

Tabela 14. Dados obtidos de estudos clínicos publicados e através da simulação *in silico* dos estudos *in vivo* empregando o *software* Simcyp® 89

Tabela 15. Parâmetros cromatográficos e critérios de aceitação para a determinação do darunavir pelo método desenvolvido por CLAE 98

Tabela 16. Parâmetros de validação para o método cromatográfico desenvolvido para a quantificação do darunavir 99

Tabela 17. Dados de recuperação de soluções padrão adicionadas ao placebo analisadas pelo método cromatográfico proposto 99

Tabela 18. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez através do teste de Youden & Steiner. 101

Tabela 19. Parâmetros analíticos e suas variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para a quantificação do darunavir em presença de produtos de degradação 102

Tabela 20. Valores obtidos na quantificação de darunavir matéria-prima expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE 116

Tabela 21. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados na embalagem primária, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE 117

Tabela 22. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados em placa de Petri, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE 117

Tabela 23. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos com revestimento raspado acondicionados em placa de Petri, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE 118

Tabela 24. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos pulverizados acondicionados em placa de Petri, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE 118

Tabela 25. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de matéria-prima expostas a calor seco úmido (40° C e 75% UR) e analisadas por CLAE..... 120

Tabela 26. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados na embalagem primária, expostos a calor úmido (40° C e 75% UR) e analisados por CLAE..... 121

Tabela 27. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados em placa de Petri, expostos a calor úmido (40° C e 75% UR) e analisados por CLAE..... 121

Tabela 28. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos pulverizados acondicionados em placa de Petri, expostos a calor úmido (40° C e 75% UR) e analisados por CLAE 122

Tabela 29. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de matéria-prima expostas a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisadas por CLAE..... 123

Tabela 30. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos revestidos acondicionados em placa de Petri, expostos a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisados por CLAE 124

Tabela 31. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos sem revestimento acondicionados em placa de Petri, expostos a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisados por CLAE..... 124

Tabela 32. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos pulverizados acondicionados em placa de Petri, exposto a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisados por CLAE 125

Tabela 33. Valores de entalpia calculdos pela integração das curvas de DSC das amostras de matéria-prima de darunavir estocados em placas de Petri e submetidas à 55° C 136

Tabela 34. Valores de entalpia calculdos pela integração das curvas de DSC das amostras de comprimidos de darunavir estocados na embalagem primária e submetidas a 55° C 139

Tabela 35. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse seco (55° C) avaliada pelo método de equilíbrio 150

Tabela 36. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse calor úmido (40° C /75%UR) avaliada pelo método de equilíbrio 150

Tabela 37. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse calor úmido (30° C /75%UR) avaliada pelo método de equilíbrio 151

Tabela 38. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse fotolítico (UVC) durante 27 dias avaliada pelo método de equilíbrio 151

Lista de abreviaturas

ACN: acetonitrila

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida; do inglês, *Acquired immunodeficiency syndrome*

ANOVA: análise de variância; do inglês, *analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AUC: área sob a curva; do inglês, *area under curve*

BCS: sistema de classificação biofarmacêutica; do inglês, *biopharmaceutical classification system*

CLAE ou HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; do inglês, *high performance liquid chromatography*

Cmax: concentração plasmática máxima

DDP: diferença de potencial

DPR: desvio padrão relativo

DSC: calorimetria exploratória diferencial; do inglês, *differential scanning calorimetry*

EE: etinil estradiol

EMA: Agência Européia de Medicamentos; do inglês, *European Medicines Agency*

ESI: ionização por *eletrospray*; do inglês, *electrospray ionization*

FA: fração absorvida

FD: fração dissolvida

FDA: Agência Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos; do inglês, *Food and Drug Administration*

Gp-P: glicoproteína P

HAART: terapia antiretroviral altamente ativa; do inglês, *highly active antiretroviral therapy*

HIV: vírus da imunodeficiência humana; do inglês, *human immunodeficiency virus*

ICH: Conferência Internacional para Harmonização; do inglês, *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IVIVC: correlação *in vivo-in vitro;* do inglês*, in vivo-in vitro correlation*

LC/MS: cromatografia a líquido acoplada a detector de massas; do inglês, *high performance liquid chromatography with mass detector*

LD: limite de detecção

LLE: extração líquido-líquido; do inglês, *liquid-liquid extraction*

LQ: limite de quantificação

MeOH: metanol

MRM: monitoramento de múltiplas reações; do inglês, *multiple reaction monitoring*

MS/MS: Detectores de massas em série; do inglês, *tandem mass detector*

NE: noretindrona

INNTR: inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBMC: células sanguíneas periféricas mononucleares; do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*

PBPK: modelagem farmacocinética fisiologia embasada; do inglês, *physiologically based pharmacokinetic modeling*

PD: produto de degradação

PDA: detector de arranjo de diodos; do inglês, *photodiode array detector*

PI: nibidores de protease

PPAgente: agente de precipitação

PP: precipitação de proteína

PR: protease

PVDF: fluoreto de polivinilideno

RE: resolução

SPE: extração em fase sólida; do inglês, *solid phase extraction*

SQ: quadrupolo simples; do inglês, *simple quadrupole*

SRM: modo de monitoramento seletivo de reação; do inglês, *selective reaction monitoring mode*

TG: termogravimetria

INTR: inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa

TQ: quadrupolo triplo; do inglês, *triple quadrupole*

UR: umidade relativa

USP: Farmacopeia Americana; do inglês, *United States Pharmacopeia*
UV: ultravioleta

PARTE I

INTRODUÇÃO
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MATERAIS E EQUIPAMENTOS
OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

1 Introdução

O registro de medicamentos genéricos no Brasil baseia-se na comprovação da equivalência farmacêutica, bioequivalência, boas práticas de fabricação e controle de qualidade, seguindo normas internacionalmente aceitas (Storpirts et al., 2009). Tais normas têm sido discutidas no mundo há quase quatro décadas e como resultado, há alguns anos, o conceito de bioisenção com base no sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) foi inserido (Storpirts et al., 2009). No BCS, os fármacos são divididos em quatro diferentes classes de acordo com sua solubilidade e permeabilidade (Amidon et al., 1995).

Para os fármacos bioisentos, a bioequivalência entre medicamento inovador e genérico pode ser mostrada através de ensaios *in vitro*. Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) possui uma lista de fármacos que podem ser considerados bioisentos e uma regulamentação que afirma a possibilidade de substituição dos ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* em casos específicos. Entre esses estão os produtos que apresentam rápida dissolução *in vitro* e formulados com fármaco considerado altamente solúvel pelo BCS e com excipientes que não impactem a biodisponibilidade do fármaco (BRASIL, 2011).

Para os fármacos considerados como classe 1 no BCS, ou seja, altamente solúveis e permeáveis, a possibilidade de bioisenção já é discutida há bastante tempo e aceita em muitos casos. Há, no entanto, uma discussão por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre a possibilidade de bioisenções para alguns fármacos considerados como classe II e III do BCS com base em trabalhos publicados e com enfoque nos medicamentos essenciais, levando assim, em consideração fatores éticos que envolvem a utilização de humanos em experimentos e a melhoria do acesso das populações aos medicamentos (Storpirtis et al., 2009).

O governo brasileiro mantém uma política de distribuição gratuita de medicamentos essenciais ao tratamento de algumas doenças, entre elas a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Alguns desses medicamentos são de alto custo e, por isso, a política governamental de distribuição desses produtos é essencial para a garantia de amplo acesso a tratamento por parte da população. A possibilidade de

aquisição de medicamentos genéricos reduz os custos desta política e contribui para sua existência e maior abrangência.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) relacionado à AIDS tem ceifado mais de 36 milhões de vidas desde sua descoberta em 1981 (WHO, 2013; Sharma & Garg, 2010). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), apesar de não haver cura para a infecção pelo HIV, o tratamento efetivo que emprega os fármacos antirretrovirais controla a replicação viral e, assim, os pacientes com HIV podem ter uma vida produtiva (WHO, 2013) Em 2012 mais de 9,7 milhões de portadores do HIV em países de renda baixa ou média tiveram acesso à terapia antirretroviral (WHO, 2013). O Brasil encontra-se entre os países com renda baixa ou média (WHO, 2013a). Em todo o continente americano, a OMS estima que, em dezembro de 2012, 75% da população soropositiva dos países de renda baixa ou média desta região (exclui-se os Estados Unidos e o Canadá) teve acesso à terapia antirretroviral (WHO, 2013a). Entretanto, outros 19 milhões de pessoas que são elegíveis para o tratamento antirretroviral, de acordo com o guia para tratamento da OMS revisado em 2013, não tiveram acesso aos fármacos antirretroviarais (WHO, 2013b). A OMS estima que, desde a disponibilidade de tratamento altamente eficaz, em 1996, até 2009, cerca de 2,9 milhões de vidas foram salvas (WHO, 2009).

A região da Africa subsaariana é a região do globo mais afetada pelo HIV, aproximadamente, 1 em cada 20 adultos convive com o HIV. Cerca de 69% de todas as pessoas soropositivas para o HIV vivem nesta região do mundo (WHO, 2013). Desde 2001, quando a Declaração de Compromisso das Nações Unidas sobre HIV/AIDS foi assinada, o número de novas infecções na África subsaariana tem sido, aproximadamente, 15% menor, o que significa cerca de 400.000 infecções a menos em 2008. De modo geral, em 2009, novas infecções por HIV foram reduzidas em 17% em relação aos oito anos anteriores (WHO, 2009).

No leste da Ásia, a incidência do HIV diminuiu em quase 25% e no sul e sudeste da Ásia em 10% no mesmo período de tempo. Na Europa Oriental, após um aumento dramático de novas infecções entre usuários de drogas injetáveis, a epidemia se estabilizou. No entanto, em alguns países há sinais de que a incidência do HIV está crescendo novamente (WHO, 2009).

Dados da OMS mostram, também, que há mais pessoas vivendo com HIV do que nunca. Além do crescimento populacional, os portadores do vírus estão vivendo mais devido aos efeitos benéficos da terapia antirretroviral. Em 2012 havia, aproximadamente, 35,3 milhões de pessoas vivendo com AIDS (WHO, 2013). Para o Brazil, a OMS estima que, em 2012, existiam entre 530 e 660 mil pessoas convivendo com o HIV (WHO, 2013)

A terapia antirretroviral tem, ainda, um impacto significativo na prevenção de novas infecções em bebês nascidos de mães HIV-positivas. Devido ao acesso ao tratamento, que diminui as chances de transmitir o vírus da mãe aos filhos, estima-se que cerca de 200.000 novas infecções em crianças tenham sido evitadas entre 2001 e 2009 (WHO, 2009). Em 2012, 62% das mulheres grávidas portadoras do HIV receberam o tratamento mais efetivo recomendado pra OMS para a prevenção da transmissão viral das mães aos filhos (WHO, 2013b).

Com base no conhecimento adquirido sobre o ciclo de replicação do HIV, vários alvos de atuação puderam ser identificados ao longo dos anos e as opções de tratamento eficazes se fizeram disponíveis. De acordo com Sharma e Garg (2010), a atual terapia clínica, terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), é considerada como um dos avanços mais significativos no campo da terapêutica antirretroviral que, desde meados dos anos 1990, tem dado uma contribuição notável para a redução da mortalidade em pacientes (Sharma & Garg, 2010). A HAART é a coadministração de alguns fármacos antirretrovirais que atuam em diferentes estapas de replicação do HIV, podendo ser composta por fármacos das diversas classes de antirretrovirais.

Dentre as classes de antirretrovirais, os inibidores de protease surgiram em 1994, após a elucidação do mecanismo de replicação do HIV. O HIV requer protease (PR) ativa para a clivagem das Gag e Gag-Pol poliproteínas que são precursoras das proteínas estruturais. A HIV PR tem, portanto, se tornado um dos principais alvos para o tratamento anti-HIV e os inibidores de PR (PIs) provaram ser substâncias antirretrovirais altamente eficazes (Šašková et al., 2009).

O darunavir (Figura 1) é um inibidor de protease (PI) sintético e não peptídico, desenvolvido em 1998 pelo laboratório farmacêutico Tibotec (Ghosh et al., 1998), hoje uma empresa do grupo Johnson & Johnson. O composto foi licenciado em junho de 2006 nos Estados Unidos e em fevereiro de 2007 na União Europeia (Gyseghem et al., 2009).

Desde o seu surgimento, muitos estudos têm demonstrado a eficácia do darunavir contra o HIV (Ghosh et al., 1998, Back et al., 2008), assim, esse fármaco se tornou um importante componente na terapia HAART.

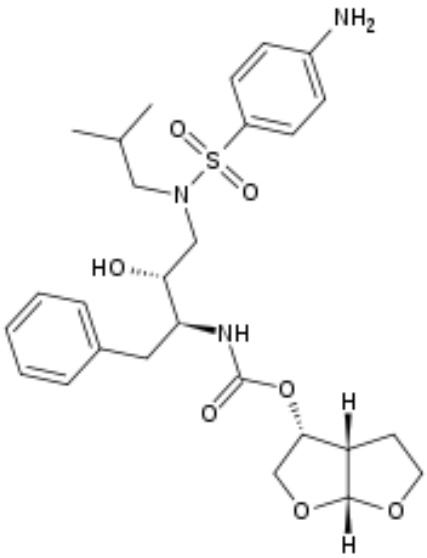


Figura 1. Estrutura química do darunavir (CAS 206361-99-1)

Como fármaco PI, o darunavir inibe a dimerização e a atividade catalítica da protease do HIV-1, inibindo seletivamente a clivagem das poliproteínas Gag-Pol codificadas do HIV em células infectadas pelo vírus, prevenindo a formação de partículas virais infecciosas maduras (JANSSEN-CILAG). Para o vírus se tornar infeccioso é essencial que as novas proteínas virais sejam cortadas e estruturadas corretamente, como é apresentado na Figura 2.

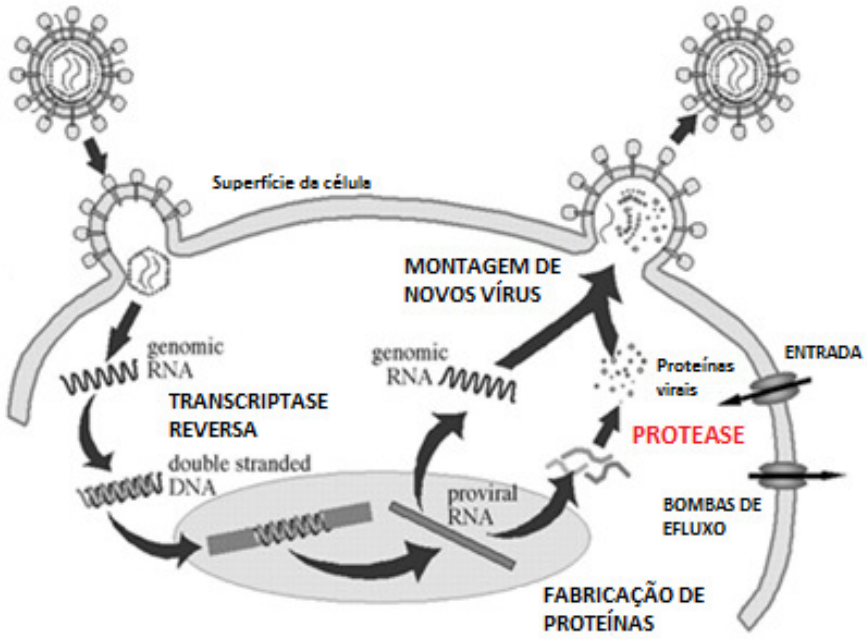


Figura 2. Esquema ilustrando o ciclo de replicação do HIV. Figura adaptada de Hoggard & Owe (2003).

A protease é essencial para a produção de partículas virais infecciosas e maduras. Ela corta as novas multi-proteínas virais em proteínas internas estruturais (centrais) individuais. O darunavir liga-se firmemente à protease do HIV-1 e, a partir do momento em que assumem a sua posição, não abandona o local, tornando a protease inativa (JANSSEN-CILAG). No mau funcionamento da protease, o ácido ribonucleico não se encontra devidamente estabilizado, o centro do vírus não estará preparado para os procedimentos de entrada nas células e os vírus não se tornarão infecciosos.

Em 2010, a FDA aprovou novas doses para o darunavir. A dose oral diária de darunavir para pacientes adultos submetidos a tratamento com nenhuma resistência é de 800 mg (dois comprimidos de 400 mg) acrescido de 100 mg de ritonavir uma vez por dia, administrados com alimentos; para pacientes adultos que apresentem resistência a, pelo menos, um aintirretroviral, a dose deverá ser 600 mg de darunavir tomado duas vezes ao dia, acrescido de 100 mg e também de alimentos. Para pacientes em tratamento, o teste de genotipagem é recomendado. No entanto, quando o teste de genotipagem não é viável, a administração de 600/100 mg de darunavir/ritonavir é

recomendada duas vezes ao dia (Sekar et al., 2007; New Drugs.Drug News, 2008; FDA, 2010).

O darunavir é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, apesar de não ser produzido no Brasil, é comercializado. As apresentações disponíveis no Brasil são comprimidos revestidos de liberação imediata contendo 75, 150 e 300 mg de fármaco. A apresentação contendo 300 mg de darunavir foi a primeira apresentação do produto (Prezista®) comercializada no mundo e com a qual todos os ensaios farmacocinéticos e farmacodinâmicos para aprovação do produto foram realizados.

O Prezista® encontra-se ainda sob o período patentário, de modo que é o único produto contendo darunavir comercializado no mundo. Hoje, existem algumas apresentações do produto apresentado como comprimido revestido de liberação imediata, nas doses 75, 150, 300, 400 e 600 mg e na forma de suspensão para uso oral de 100 mg/mL.

O Prezista® compõe o quadro de antirretrovirais disponibilizados gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) aos pacientes. Como parte da política de distribuição gratuita dos medicamentos especiais, ao terminar o tempo de proteção patentária sobre estes produtos, o governo brasileiro tem incentivado seus laboratórios farmacêuticos oficiais a produzirem produtos genéricos dos medicamentos em questão.

Neste propósito, este estudo busca fornecer informações sobre o comportamento físico-químico e a estabilidade do fármaco e da formulação atualmente comercializada, diante de diferentes condições climáticas, bem como informações sobre a solubilidade do fármaco e sua liberação a partir da formulação. Além disso, pretende-se apresentar ferramentas *in vitro* e *in silico* que contribuam, no futuro próximo, para a produção de novos produtos contendo darunavir que apresentem alta qualidade, especialmente, genéricos do medicamento referência.

1.1 Objetivos

O objetivo com este trabalho foi estudar o darunavir na forma de matéria-prima e produto acabado para compreender seu comportamento relativo à solubilidade, dissolução, estabilidade e polimorfismo, a fim de fornecer ferramentas de suporte ao desenvolvimento de novos produtos contendo darunavir.

Para a realização desses objetivos as seguintes etapas foram cumpridas:

1) Extensa pesquisa bibliográfica sobre as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmica do darunavir, bem como os métodos de análise descritos na literatura aplicáveis à detecção do darunavir;

2) Desenvolvimento e validação de método analítico espectrofotométrico na região do ultravioleta para quantificação do darunavir durante os estudos de dissolução;

3) Estudos matemáticos para obtenção do perfil de absorção do darunavir etanolato (Prezista®) utilizando dados *in vivo* de estudos farmacocinéticos publicados na literatura;

4) Desenvolvimento do perfil de dissolução com base nos dados obtidos para o perfil de absorção do darunavir etanolato (Prezista®), a fim de desenvolver ensaio de dissolução discriminativo, preditivo do comportamento *in vivo* do produto e construir prévia correlação *in vivo-in vitro*;

5) Estudos de estabilidade do darunavir matéria-prima e produto acabado. Desenvolvimento e validação de método analítico por LC/MS para análise de darunavir produto acabado e matéria-prima durante os estudos de estabilidade, a fim de obter um método analítico indicativo de estabilidade com possível separação e identificação de produtos de degradação;

6) Avaliação da possível conversão do darunavir etanolato em diferentes polimorfos durante o estudo de estabilidade, bem como a influência na liberação do fármaco a partir do produto acabado, utilizando o método de dissolução desenvolvido e validado e as técnicas de calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e difração de raios-X.

7) Avaliação do impacto do comportamento polimórfico e da instabilidade do darunavir sobre sua solubilidade e perfil de dissolução.

1.2 Organização no texto dos assuntos estudados

Para melhor compreensão do trabalho e maior coesão entre os resultados aqui descritos, a parte experimental foi dividida em quatro grandes partes. As três primeiras partes compreendem os três principais focos da pesquisa quais sejam: estudos de dissolução e solubilidade; estudos de estabilidade; e estudos de polimorfismo. Na quarta parte, com base nos resultados descritos nas três iniciais partes do estudo experimental, o impacto da instabilidade e polimorfismo do fármaco sobre a solubilidade e o perfil de dissolução são descritos.

2 Revisão bibliográfica

Como guia e base para a realização deste projeto, uma extensa pesquisa bibliográfica foi conduzida. Buscou-se na literarura informações sobre o darunavir, tais como, propriedades físico-químicas e comportamento polimórfico, a classificação do fármaco segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, e as interações medicamentosas às quais o darunavir possa estar relacionado.

Pesquisou-se ainda sobre os métodos analíticos paraa determinação do darunavir e que tenham sido publicados em periódicos internacionais ou estejam disponíveis em monografias nos compêndios oficiais aceitos pela ANVISA. Não foram encontradas monografias farmacopeicas para o darunavir, A maior parte dos métodos analíticos encontrados envolvia a determinação do darunavir através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de massas ou por ultravioleta (UV), além de um único método analítico para doseamento do darunavir como produto aplicando espectrofotometria no UV.

2.1 Propriedades farmacodinâmicas do darunavir

- **Eficácia e segurança terapêutica**

A eficácia e segurança de darunavir isolado e administrado com ritonavir foram demonstradas em vários estudos (Meyer et al., 2005; Haubrich et al., 2007; Ripamonti et al., 2009; Curran et al., 2010). Os resultados destes estudos mostraram que o darunavir melhorou significativamente os resultados virológicos e imunológicos em comparação com outros inibidores de protease avaliados e foi geralmente bem tolerado. De acordo com Back e colaboradores (2008), o darunavir foi concebido para ter uma alta barreira genética para o desenvolvimento da resistência e ter atividade contra vírus do tipo selvagem HIV-1 e uma vasta gama de vírus resistentes a inibidores de protease.

Como foi explicado por Back e colaboradores (2008), o darunavir é estruturalmente semelhante ao amprenavir, outro fármaco antirretroviral, no entanto darunavir tem dois anéis tetrahidrofurano (THF) que são fundidos entre si. Esta diferença é muito importante para a atividade do darunavir, pois o agrupamento bis-THF inverte a estereoquímica na ponte que o liga ao resto da molécula e permite interações adicionais do darunavir com o ASP29, um aminoácido chave para a protease do HIV (Back et al., 2008).

- **Efeitos adversos e contraindicações**

Os efeitos colaterais mais comumente observados durante a terapia com darunavir são distúrbios gastrintestinais (dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos), nasofaringite e hipertrigliceridemia. Por apresentar extensa metabolização hepática, o darunavir não deve ser administrado a pacientes com disfunção hepática grave e deve ser usado com precaução em casos de disfunção moderada (Martindale, 2009).

A terapia antirretroviral combinada tem sido associada a alterações metabólicas, tais como aumento de triglicérides e colesterol, resistência à insulina, aumento de açúcar no sangue e hiperlactatemia (Martindale, 2009).

- **Resistência**

A maior complicação no tratamento antirretroviral, segundo Šašková e colaboradores (2009), é o surgimento de variantes virais resistentes aos tratamentos, o que ocorre devido à rápida replicação viral. Esses pesquisadores têm enfatizado que o entendimento detalhado do desenvolvimento do mecanismo de resistência é essencial para a detecção não tardia de possíveis falhas de tratamento. Além disso, esse entendimento tem levado ao desenho de novos inibidores de protease capazes de inibir mesmo as espécies mais resistentes (Šašková et al., 2009).

O darunavir mostra ser muito potente contra o tipo selvagem de HIV (forma natural do vírus, que não sofreu mutações), bem como a um grande número de tipos resistentes a inibidores de protease que foram isolados de pacientes. Além disso,

apresenta alta barreira ao desenvolvimento genético de resistência aos antirretrovirais. Os resultados de diferentes estudos apontam que o darunavir é um fármaco para o tratamento de pacientes HIV-positivos que estejam em tratamento, bem como pacientes nunca antes tratados (Meyer et al., 2005; Šašková et al., 2009).

Šašková e colaboradores (2009) sequenciaram mais de 60.000 amostras do vírus HIV entre os anos de 2006 e 2008, nos quais mostraram que a prevalência de resistência ao darunavir permanece baixa. Apenas 5,8% das amostras com mutação que conferiam resistência a algum fármaco antirretroviral também apresentaram resistência ao darunavir (Šašková et al., 2009).

Fun e colaboradores (2011), ao investigarem se a diversidade genética do subtipo HIV-1 afetaria o darunavir, depararam-se com o fato de o polimorfismo na Gag poder facilitar o surgimento de resistência e mutações nesta proteína, podendo induzir o surgimento de resistência ao darunavir (Fun et al., 2011).

2.2 Propriedades farmacocinéticas do darunavir

A farmacocinética do darunavir tem sido extensivamente estudada (Back et al., 2006; Sekar et al., 2006, 2006a, 2007, 2007a, 2008, 2008a, 2008b; Tomi et al., 2011). Estudos farmacocinéticos em que o darunavir foi administrado isoladamente demonstraram que a sua biodisponibilidade é de cerca de 37%. Quando o darunavir foi administrado em combinação com ritonavir, um potente inibidor da CYP3A, a concentração plasmática de darunavir foi aumentada e sua biodisponibilidade passou a ser 82% (Sekar et al., 2006). De acordo com Back e colaboradores, a enorme diferença na biodisponibilidade do darunavir pela ação do ritonavir sugere que a eliminação de primeira passagem do fármaco tenha sido inibida quase em sua totalidade (Back et al., 2008).

Sekar e colaboradores (2007) avaliaram o efeito dos alimentos sobre a farmacocinética de darunavir. A administração de darunavir com dose baixa de ritonavir em jejum resultou em diminuição na concentração plasmática máxima (Cmax) do darunavir e na área sob a curva concentração plasmática x tempo construída até o

último ponto de coleta plasmática (AUClast), redução de aproximadamente 30% em comparação com a administração após uma refeição padrão. Diferentes estados alimentares não causaram diferenças significativas nas concentrações plasmáticas do darunavir, indicando que a solubilidade e absorção do darunavir não são afetadas pelo tipo de refeição. Portanto, o darunavir deve ser administrado com dose baixa de ritonavir e durante alimentação (Back et al., 2008; Sekar et al., 2007).

O darunavir é rapidamente absorvido no trato gastrintestinal, alcançando pico de concentração plasmática após 2,5 a 4 horas (Back et al., 2008). O darunavir, de forma similar a outros inibidores de protease, demonstrou ser altamente ligado às proteínas, tanto à glicoproteína ácida, quanto à albumina (Sekar et al., 2006a; Back et al., 2008; Sekar et al., 2008), sendo que maior extensão da ligação se dá com a alfa1-glicoproteína ácida, e em menor grau, à albumina. Sekar e colaboradores (2006a) demonstraram que o darunavir permanece, em média, 95,3% ligado às proteínas plasmáticas, quando sua concentração no plasma é aproximadamente igual a 500 ng/mL (concentração clinicamente relevante). O percentual de ligação às proteínas se mostrou dependente da concentração plasmática de darunavir (Sekar et al., 2006a).

A rota de metabolismo mais importante para o darunavir é a oxidativa. Ele é extensamente metabolizado pelas enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450), principalmente pela enzima CYP3A. Alguns metabólitos do darunavir mostraram atividade contra o tipo selvagem do vírus, mas apresentaram atividade dez vezes menor que o próprio darunavir (Back et al., 2008).

Vermeir e colaboradores (2009) têm demonstrado que o ritonavir, administrado como reforço da terapia, altera o metabolismo do darunavir. Em seu estudo, o darunavir foi extensivamente metabolizado em indivíduos que não receberam o reforço do ritonavir na terapia, principalmente por hidrólise do carbamato, hidroxilação alifática do isobutil e hidroxilação aromática da anilina e, em menor medida, por hidroxilação aromática benzílica e glucuronidação. O reforço com o ritonavir resultou em significativa inibição da hidrólise do carbamato, da hidroxilação alifática isobutil e da hidroxilação aromática e anilínica. Esse reforço não teve efeito sobre a hidroxilação aromática da fração benzílica, enquanto que a excreção de metabólitos glicuronídeo foi marcadamente maior, mas ainda assim representou uma via de menor importância.

Expressiva diferença para o percentual total da dose administrada de darunavir excretada inalterada, entre pacientes que receberam ou não o reforço do ritonavir, pode ser detectada: 48,8% e 8,0%, respectivamente, o que demonstra forte inibição do seu metabolismo pelo ritonavir (Vermeir et al., 2009).

Por tudo isso, o darunavir deve ser coadministrado com doses baixas de ritonavir duas vezes ao dia por via oral e com alimentos. A dose para adultos ainda não tratados deve ser de 800 mg (dois comprimidos de 400 mg) com 100 mg de ritonavir uma vez por dia. Para os adultos submetidos a tratamento, a dose é de 600 mg coadministrada com 100 mg de ritonavir duas vezes ao dia (Sekar et al., 2007; New Drugs.Drug News, 2008; FDA, 2010).

2.3 Interação medicamentosa envolvendo o darunavir

Interações medicamentosas são uma preocupação prática para médicos que tratam pacientes infectados pelo HIV (Back et al., 2006). Além da HAART, que exige a combinação de vários medicamentos antirretrovirais, a ingestão de outros medicamentos não é incomum para os pacientes soropositivos, uma vez que, frequentemente precisam prevenir ou tratar infecções oportunistas, tratar de doenças concomitantes, controlar os efeitos colaterais dos antirretrovirais, entre outros (Back et al., 2008).

Como foi bem apontado por Back e colaboradores (2008), nem todas as interações medicamentosas são indesejáveis e a ilustração disso é a bem estabelecida potencialização farmacocinética de inibidores de protease pelo ritonavir (Back et al., 2008). No entanto, muitas interações medicamentosas podem resultar em problemas terapêuticos que requerem ajustes de dose ou até mesmo não recomendação de utilização de algum fármaco. Muitas interações entre darunavir - ritonavir em baixa dose e outros medicamentos frequentemente administrados a pacientes HIV positivos têm sido estudadas.

Compostos que alteram a atividade da CYP3A4 e sua expressão podem influenciar as concentrações de darunavir. A combinação entre darunavir e ritonavir

pode influenciar, de forma imprevisível, as concentrações de outros fármacos coadministrados que sejam metabolizados principalmente através da isoenzima CYP3A4. Poucas substâncias têm a sua coadministração ao darunavir não recomendada, sendo que, a maioria dos casos de interações medicamentosas com o darunavir pode ser gerenciada. A Tabela 1 mostra os detalhes da maioria dos estudos de interação medicamentosa envolvendo o darunavir. Para a construção dessa tabela, as informações publicadas em artigos de revisão escritas pelos pesquisadores Back e colaboradores (2006 e 2008) e Rittweger & Arasteh (2007) foram avaliadas e compiladas.

Como foi bem apontado por Rittweger & Arasteh, embora os estudos de interação medicamentosa tenham sido realizados principalmente em voluntários saudáveis HIV-negativos, os resultados devem ser igualmente aplicáveis à população alvo, os pacientes infectados pelo HIV (Rittweger & Arasteh, 2007).

Tabela 1. Interações entre a associação darunavir e baixa dose de ritonavir e outros fármacos

Fármacos	Classe farmacêutica	Interação farmacológica	Resultados	Recomendação
Atazanavir	Inibidor de protease	Os PIs atuam como substrato ou inibidores e/ou indutores das isoenzimas CYP3A. Também são substrato e moduladores para a GP-P e outras proteínas transportadoras.	Não houve mudança na exposição ao fármaco	Não há interação com relevância clínica
Saquinavir			Exposição ao darunavir decaiu 26%	Combinação não recomendada
Lopinavir			Exposição ao darunavir decaiu 41% e ao lopinavir aumentou 9%	Combinação não recomendada
Indinavir			Exposição ao darunavir aumentou 24% e ao indinavir aumentou 23%	Em caso de intolerância reduzir a dose de indinavir de 800 para 600 mg duas vezes ao dia
Efavirenz	Inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa (INNTRs)	INNTRs são substratos e indutores da isoenzima CYP3A4.	Exposição ao darunavir decaiu 13% e ao efavirenz aumentou 21%	Nenhuma interação com relevância clínica
Etravirina			Exposição à etravirina decaiu 37%	Nenhuma interação com relevância clínica
Nevirapina			Exposição ao darunavir aumentou 24% e à nevirapina aumentou 27%	Nenhuma interação com relevância clínica

(Continua na próxima página)

Tabela 1. Interações entre a associação darunavir e baixa dose de ritonavir e outros fármacos (*Continuação*)

Fármacos	Classe farmacêutica	Interação farmacológica	Resultados	Recomendação
Tenofovir	Inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa (INTR)	Tenofovir tem excreção renal e não é substrato, indutor ou inibidor de qualquer isoenzima do grupo CYP, o mecanismo envolve proteínas transportadoras	Exposição ao darunavir aumentou 21% e ao tenofovir decaiu 22%	Não há interação com relevância clínica, mas deve-se monitorar a função renal
Didanosina			Não houve mudança na exposição ao fármaco	Não há interação com relevância clínica
Enfuvirtida	Inibidor de fusão	Enfuvirtida não é metabolizada pelas enzimas CYP450	Não houve mudança na exposição ao fármaco	Não há interação com relevância clínica
Elvitegravir	Inibidor da integrase	Não encontrada	Não houve mudança na exposição ao fármaco	Não há interação com relevância clínica
Atorvastadina	Inibidor da HMG-CoA redutase	O metabolismo da atorvastatina é mediado pela CYP3A4	Exposição à atorvastadina aumentou fortemente	Iniciar com dose diária de10 mg e titular de acordo com a resposta clínica
Pravastatina		Pravastatina não é significativamente metabolizada pelas enzimas CYP. Provavelmente seu mecanismo envolve a interação com um transportador	Exposição à pravastatina aumentou 81%	Iniciar com a mais baixa dose e titular de acordo com a resposta clínica

(Continua na próxima página)

Tabela 1. Interações entre a associação darunavir e baixa dose de ritonavir e outros fármacos (*Continuação*)

Fármacos	Classe farmacêutica	Interação farmacológica	Resultados	Recomendação
Omeprazol Ranitidina	Modificadores de pH gástrico	A co-administração dos modificadores de pH gástrico e alguns PIs não é recomendada, mas não é válido para o darunavir	Não houve mudança na exposição ao fármaco	Não há interação com relevância clínica
Sildenafil	Inibidor da fosfodiesterase tipo-5	Sildenafil é convertido ao metabólito primário pela isoenzima CYP3A4	A exposição ao sildenafil aumentou quatro vezes	Não mais que 25 mg de sildenafil é recomendado por 48 horas
Contraceptivos orais: etinil estradiol (EE) 0,035 mg e noretindrona (NE) 1,0 mg	Hormônios	EE é metabolizado pela CYP3A e a glucoronil transferase	A exposição ao EE (44%) e à NE (24%) decaiu	Uso de contraceptivo alternativo/adicional recomendado
Claritromicina	Antiinfecciosos e antifúngicos	Ambos inibem a CYP3A4	Exposição ao darunavir decaiu 13% e à claritromicina aumentou 57%	Sem mudança de dose, exceto por complicação renal
Cetoconazol			Exposição ao darunavir aumentou 42% e ao cetoconazol decaiu 212%	Dose máxima diária 200 mg

(Continua na próxima página)

Tabela 1. Interações entre a associação darunavir e baixa dose de ritonavir e outros fármacos

Fármacos	Classe farmacêutica	Interação farmacológica	Resultados	Recomendação
Sertralina	Inibidor seletivo da reabsorção de serotonina	Ambos são altamente ligados à proteína e metabolizados pela CYP3A4 (sertralina) ou CYP2D6 (paroxetina)	Exposição à sertralina decaiu 49%	Monitorar e titular se necessário
Paroxina			Exposição à paroxina decaiu 39%	
Metadona	Analgésico narcótico	Ritonavir é um indutor do metabolismo da metadona	Exposição à metadona decaiu 16%	Não há, *a priori*, necessidade de ajuste de dose de metadona

Outro ponto importante nos estudos de interações medicamentosas é que, considerando os bons resultados do tratamento contra o HIV/AIDS e a expectativa de vida aumentada dos pacientes, mais estudos sobre interações medicamentosas são necessários a fim de abordar novas possíveis interações, uma vez que o envelhecimento traz novas comorbidades e o uso frequente e concomitante de diferentes medicamentos.

2.4 Tratamento pediátrico

Desde a introdução do tratamento antirretroviral, a mortalidade por HIV/AIDS tem caído e esta doença tem se tornado uma doença crônica. Este é um fato particularmente importante para os pacientes pediátricos, que têm suas expectativas de vida aumentadas, como foi ressaltado por Nso-Roca e colaboradores (Nso-Roca et al., 2010). Entretanto, o tratamento de crianças soropositivas permanece como um desafio, especialmente para crianças com menos de um ano de idade. Pesquisas têm mostrado que a concentração plasmática de alguns antirretrovirais tem estado abaixo da efetiva para essas crianças, o que estaria relacionado aos casos de falha terapêutica. Isso tem uma forte implicação e é um desafio considerável para essa população que necessita de tratamento muito longo (Nso-Roca et al., 2010). Sosnik e colaboradores (2009) afirmam que a utilização pediátrica da HAART é bastante difícil. Além do difícil ajuste de dose segura e eficaz, há as restrições relacionadas à formulação. Formulações líquidas são essenciais para o uso pediátrico. Crianças com menos de sete anos de idade são normalmente incapazes de deglutir medicamentos sólidos e para tornar os medicamentos produzidos para adultos administráveis às crianças frequentemente eles são processados, pulverizados (Sosnik et al., 2009). A segurança e a eficácia dessas formulações extemporâneas são certamente uma preocupação.

A administração de darunavir com baixa dose de ritonavir e outros antirretrovirais a crianças com mais de seis anos foi aprovada pela FDA. A dose deve ser calculada tendo como base o peso do paciente e não deve ultrapassar a dose para adultos (600 mg de darunavir com 100 mg de ritonavir duas vezes ao dia). Darunavir deve sempre ser administrado com baixa dose de ritonavir e alimentos. Dose única diária não deve ser dada a crianças. A segurança e a eficácia da administração de darunavir/ritonavir a

crianças que tenham entre três e seis anos não foi ainda bem estabelecida e sua administração aos pacientes com menos de três anos de idade não é recomendada (FDA, 2010a).

A formulação com menor dose de darunavir (75 mg) é empregada no tratamento de pacientes soro positivos que tenham entre seis e 18 anos de idade e pesem, pelo menos, 20 kg. Pacientes pediátricos que pesam entre 20 e 30 kg devem receber 375 mg de darunavir e 50 mg de ritonavir duas vezes ao dia; crianças que pesam entre 30 e 40 kg devem receber 450 mg de darunavir e 60 mg de ritonavir duas vezes ao dia; para aquelas que pesam mais que 40 kg a dose recomendada é composta por 600 mg de darunavir e 100 mg de ritonavir duas vezes ao dia (New Drugs. Drug News, 2008).

2.5 Propriedades físico-químicas e polimorfismo

O peso molecular do darunavir é 593,73 g/mol. Este fármaco apresenta alta lipofilia, log P 3,94 + 0,57 (ACD/labs pka DB, 1994-2002). O darunavir é um pó branco a esbranquiçado e sua solubilidade em água é de aproximadamente 0,15 mg/mL a 20° C. A solubilidade é dependente do pH (solubilidade aumenta em pH extremos), o log D é um pouco menor quando calculado em meios em que os valores de pH sejam acima de 11 e abaixo de 2 (ACD/labs pka DB, 1994-2002; Rittweger & Arasteh, 2007).

O darunavir apresenta pseudo-polimorfismo. Pseudo-polimorfos são fases cristalinas formadas quando moléculas de solvente estão presentes na rede cristalina. A propensão de uma molécula para formar solvatos está relacionada à sua estrutura molecular, aos padrões de ligação de hidrogênio e ao empacotamento do cristal (Gyseghem et al., 2009).

De acordo com Gyseghem e colaboradores (2009), a estrutura cristalina do darunavir etanolato é preservada em ambiente com até 5% de umidade relativa (UR), e converte-se em hidrato quando sob moderada ou alta umidade relativa; o darunavir hidrato se converte em etanolato em uma atmosfera de etanol e em produto amorfo após a remoção de água do ambiente ou por aumento da temperatura. A estrutura cristalina se reestabelece sob condições de UR partir de 40%. Sua forma amorfa se converte em

hidrato quando sob moderada ou alta UR, e em etanolato sob uma atmosfera de etanol (Gyseghem et al., 2009).

O darunavir etanolato é a forma usada nos comprimidos atualmente comercializados. Importantes questões relacionadas ao comportamento polimórfico do fármaco emergem, tais como, a possível influência das diferentes condições climáticas sobre a forma polimórfica e sua solubilidade; especialmente porque, sendo a AIDS uma doença global e o Prezista® comercializado em todo o mundo, o fármaco é exposto, então, a diferentes condições ambientais ao redor do planeta.

2.6 Classificação biofarmacêutica

A maioria dos fármacos antirretrovirais é administrada por via oral. Para que os fármacos sejam absorvidos, eles devem estar dissolvidos nos fluidos biológicos no trato gastrointestinal. Esta é uma condição crítica para fármacos de baixa solubilidade aquosa (Sharma & Garg, 2010; Sinha et al., 2010).

Amidon e colaboradores (1995) propuseram o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) que define que a solubilidade/dissolução aquosa da dose administrada do fármaco nos fluidos gastrointestinais e a permeabilidade intestinal da substância são fundamentais e controlam a absorção dos fármacos (Amidon et al., 1995; Dahan et al., 2009; Sharma & Garg, 2010).

Segundo o BCS, um fármaco é considerado muito solúvel quando a maior dose administrada se dissolve em, no máximo, 250 mL de meio aquoso numa faixa de pH que varie de 1,0 a 7,5 a 37° C. De modo semelhante, a permeabilidade dos fármacos é considerada alta quando, determinada em humanos, ao menos 85% ou 90% da dose administrada são absorvidos em comparação à administração intravenosa ou com base em balanço de massas, seguindo recomendações da FDA ou da EMA, respectivamente (EMA, 2008; FDA, 2000; Sharma & Garg, 2010). Entretanto, como ressaltado por Sharma & Garg, existem outros fatores que devem ser levados em consideração para uma correta estimativa da biodisponibilidade de fármacos, tais como os efeitos de efluxo, a atuação de transportadores que facilitam a absorção, a ação de enzimas

metabolizadoras intestinais (CYP34A e UDP-glucuronosil transferases) e o impacto de alimentos na absorção dos fármacos (Sharma & Garg, 2010).

A atuação da glicoproteína P expressa no epitélio das células intestinais em diminuir a absorção intestinal de inibidores de protease já é descrita. Sabe-se também que a baixa absorção intestinal e atuação do complexo enzimático de metabolização hepática, CYP P450, são os principais fatores que contribuem para baixa biodisponibilidade dos inibidores de protease (Fujimoto et al., 2009; Sharma & Garg, 2010).

Fujimoto e colaboradores (2009) mostraram que a glicoproteína P controla o efluxo do darunavir na parte apical das membranas celulares em células Caco-2. O darunavir mostrou ser substrato para este transportador também em células renais LLC-PK1 contendo o gene MDR1. Além disso, o mecanismo de ação do ritonavir em melhorar a biodisponibilidade do darunavir envolve a inibição do sistema de efluxo intestinal e o metabolismo intestinal e hepático do darunavir (Fujimoto et al., 2009).

A relevância do efluxo de fármacos para a biodisponibilidade e classificação biofarmacêutica de inibidores de protease foi demonstrada por Sosnik e colaboradores (2009) ao usar estudos publicados com o fármaco indinavir como exemplo. O indinavir foi inicialmente classificado como classe IV do BCS devido à sua aparente baixa permeabilidade após administração oral e baixa solubilidade aquosa. Entretanto, mais tarde, o fármaco foi reclassificado como classe II, indicando a capacidade da molécula em intrinsicamente atravessar a barreira intestinal na ausência de mecanismos de efluxo (Sosnik et al., 2009).

A absorção intestinal do darunavir tem sido definida como intermediária a alta em estudo aplicando monocamadas de células Caco-2 (Back et al., 2008). Não são encontrados estudos que tenham avaliado a solubilidade do fármaco segundo o BCS e a classificação do fármaco segundo esse sistema não foi definida. Entretanto, algumas inferências podem ser feitas sobre a possível classificação do darunavir.

Como foi detalhado anteriormente, o darunavir é sempre administrado com baixa dose de ritonavir e alimentos. O ritonavir, como um potente inibidor da enzima CYP3A e um possível substrato para a glicoproteína P, tem mostrado melhorar muito a biodiponibilidade do darunavir de 37% para 82% em relação à administração intravenosa

do fármaco (Sekar et al., 2006). A coadministração de alimentos aumenta em 30% a biodisponibilidade do darunavir quando comparado com a administração oral em jejum (Sekar et al., 2006). Tomando essas informações em consideração, podemos inferir que o darunavir, quando coadministrado com ritonavir e alimentos se comporta como um fármaco da classe II do BCS, considerando que sua solubilidade aquosa seja baixa (ACD/labs pka DB, 1994-2002). Essa inferência traz consigo a importância da dissolução para a absorção do darunavir e, consequentemente, a ideia de que o teste de dissolução é crucial para a forma farmacêutica contendo darunavir. Além disso, é bem possível que uma correlação *in vivo-in vitro* (IVIVC) possa ser construída para o darunavir aumentando a significância, o poder e a utilidade do ensaio de dissolução do produto.

2.7 Controle de Qualidade

Todo o conhecimento detalhado sobre a eficácia, segurança, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e as propriedades físicas e químicas de um medicamento deverá contribuir conjuntamente para o desenvolvimento de um produto de alta qualidade terapêutica. Para todos os testes analíticos exigidos em qualquer estágio de desenvolvimento de novos produtos ou de monitorização terapêutica deve ser usado método analítico sensível, seletivo, exato, preciso e robusto.

Um rigoroso controle de qualidade é necessário para garantia de resultados analíticos confiáveis durante o desenvolvimento de medicamentos. Yekalla e colaboradores (2008) têm notado que, embora os inibidores de protease sejam relativamente novos, vários medicamentos genéricos já estão sendo produzidos por empresas que operam em países com capacidades de produção de mais baixo custo e menos rigorosas práticas de fabricação. De acordo com Yekalla e colaboradores (2008) a produção desses medicamentos pode ser diferente da forma originalmente utilizada para o produto referência e, portanto, o perfil de impurezas e qualidade geral poderia mudar (Yekalla et al., 2008).

A maior parte dos métodos cromatográficos avaliados empregam solução tampão na fase móvel. Esta é uma ferramenta que deve ser evitada sempre que possível, pois

seu uso leva a considerável desgate do equipamento e está relacionado a diminuição da vida útil de colunas cromatográficas.

O método publicado por Goldwirt e colaboradores (2007) emprega detecção no UV e não utiliza solução tampão como parte da fase móvel. Este método foi otimizado no desenvolvimento de ensaio analítico indicativo de estabilidade para o darunavir, desenvolvimento que será descrito no capítulo 7 (Parte III).

Como foi descrito por Yekalla e colaboradores (2008), todos os inibidores de protease são produzidos por síntese química. Durante o processo de síntese e armazenamento, alguns subprodutos podem ser formados. Portanto, estes fármacos podem conter várias impurezas. Embora a identificação de impurezas acima do nível de 0,1% em uma substância ativa e 0,2% em um novo medicamento (para uma dose máxima de 50 mg ao dia) tornou-se uma obrigação em alguns países, poucos artigos foram publicados na literatura para análise e controle de pureza dos inibidores de protease (Yekalla et al., 2008).

Neste trabalho, uma extensa revisão de métodos analíticos para darunavir foi feita e é mostrada na Tabela 2. A base de dados utilizada para essa pesquisa foi a Scopus e especial atenção foi dada aos métodos cromatográficos que são os encontrados em maior abundância na literatura internacional para o darunavir. Não há monografia farmacopeica para darunavir, no entanto, a FDA recomenda o teste de dissolução para comprimidos de darunavir usando 900 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 *M*, pH 3,0 acrescido de 2% Tween-20® em como meio, aparato USP II (pá) e 75 rpm de agitação; os tempos de amostragem recomendados são 10, 20, 30 e 45 minutos (FDA, 2007). A dissolução é a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e sua solubilização no meio, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. As características de dissolução da forma farmacêutica devem permanecer constantes durante todo período de validade do produto (Corrêa & Salgado, 2011). Este teste se torna ainda mais importante para os medicamentos de relativa baixa solubilidade em água como o darunavir.

Tabela 2. Métodos cromatográficos publicados entre 2007 e 2011 para a determinação de darunavir

Referência	Matriz	Pré-tratamento da amostra	Separação	Detecção	FT; precisão intra e interdia; exatidão
D'Avolio et al., 2011	PBMC	centrifugação; MeOH:água (70:30, v/v)	CLAE; coluna: Atlantis® T3 (2,1 × 150 mm, 3 µm); eluição: gradiente: A: água (0,05% ácido fórmico), B:ACN (0,05% ácido fórmico); vazão: 0,3 mL/min	MS: TQ - SIR, ESI, ionização positiva $[M-H]^+$	0,125 - 32 ng/mL; <11,14%; <14,7%; <2,18% (DPR)
Garcia et al., 2011	plasma humano	PP: volume: 50 µL; agente precipitante: ACN:MeOH (50:50)	CLAE; coluna: X-Bridge® C18 (2,1 × 100 mm, 3,5 µm); eluição: gradiente: A: ACN, B: (3 m*M* acetato de amônio+ 0,1 *M* ácido fórmico); vazão: 0,4 mL/min; corrida: 5,5 min	MS/MS: TQ - ESI, ionização positiva $[M-H]^+$	0,1 - 10 µg/mL; <4,62%; <4,7 %; >92,5%
Curran et al., 2010	plasma humano	LLE: volume: 1 mL; solvente: éter	CLAE; coluna: Symmetry 300TM C18 (4,6 × 150 mm, 3,5 µm); eluição: gradiente: A: 10 m*M* tampão fosfato de potássio (pH 5,5), B: ACN; vazão: 0,8 mL/min	UV 220 nm	0,1 – 10 µg/mL; < 2,9%; <3,4%; 82,6%

(Continua na próxima página)

Tabela 2. Métodos cromatográficos publicados entre 2007 e 2011 para a determinação de darunavir *(Continuação)*

Referência	Matriz	Pré-tratamento da amostra	Separação	Detecção	FT; precisão intra e interdia; exatidão
D'Avolio et al., 2010	mancha de sangue seco	solvente de extração: ACN/MeOH/0,2 *M* ZnSO4 (1:1:2)	CLAE; coluna: Atlantis® C-18 (150 × 2,1 mm, 3 µm); eluição: gradiente: A (água + 0,05% ácido fórmico), B (ACN + 0,05% ácido fórmico); vazão: 0,25 mL/min	MS: ESI-TQ, ionização positiva $[M-H]^+$	200 – 8.000 ng/mL; <8,1%; <6,9%; <4,5%(DPR)
Else et al., 2010	plasma humano	PP: volume: 100 µL; PPAgente: ACN	CLAE; colum: Ascentis™ C18 (3 µm, 100×2,1mm); eluição: gradiente: ACN:água (0,05% ácido fórmico), 5:95 e 80:20, v/v; vazão: 400 µL/min	MS/MS: TQ – SRM, ionização positiva $[M-H]^+$	250 - 12000 ng/mL; <8,3%; <8,0% 98%
Fayet et al., 2009	plasma humano	PP: volume:100 µL; PPAgente: ACN	CLAE; coluna: Atlantis™ dC18 (2,1 × 50 mm, 3 µm); eluição: gradiente: A (2 m*M* acetato de amônio+ 0,1% ácido fórmico (pH 2,8), B (ACN + 0,1% ácido fórmico); vazão: 0,3 – 0,5 mL/min	MS/MS: ESI-TQ - SRM, ionização positiva $[M-H]^+$	25 – 10,000 ng/mL; <7,2%; <7,3%; <5,1% (DPR)
Heine et al., 2009	PBMC	PBMC: centrifugação; solvente: MeOH:água (50:50, v/v)	CLAE; coluna: C18 (150 × 2,0 mm, 5 µm); eluição: gradiente: tampão acetato (pH 5): MeOH; vazão: 0,25 mL/min.	MS/MS: TQ – MRM; ionização positiva $[M-H]^+$	1 – 400 ng/mL; < 9,4%; <10,1%; <8,3% (DPR)

(Continua na próxima página)

Tabela 2. Métodos cromatográficos publicados entre 2007 e 2011 para a determinação de darunavir *(Continuação)*

Referência	Matriz	Pré-tratamento da amostra	Separação	Detecção	FT; precisão intra e inter-dia; exatidão
Rezk et al., 2009	plasma humano	LLE: volume: 100 µL; solvente: éter	CLAE; coluna: Agilent Zorbax® XDB C-8 (50 × 3,0 mm, 1,8 µm); eluição: gradiente: A: 0,01% ácido fórmico em água, B: 0,01% ácido fórmico em ACN; vazão: 0,65 a 0,75 mL/min	MS: ESI, ionização positiva $[M-H]^+$	0,002 - 2 µg/mL; <6,3%; <4,3 %; >88,6%
Heine et al., 2008	mancha de sangue seco	solvente de extração: ACN/MeOH/0,2 *M* ZnSO4 (1:1:2);	CLAE; coluna: C18 (150 × 2,0 mm, 5 µm); eluição: gradiente: tampão acetato (pH 5): MeOH; vazão: 0,25mL/min	MS/MS: TQ-MRM, ESI, ionização positiva $[M-H]^+$	0,1-20 mg/L; 4,6%; 4,4%;102,2%
D'Avolio et al., 2007	plasma humano	PP: volume: 50 µL; PPAgente: MeOH:ACN (50:50 v/v)	CLAE; coluna: Atlantis® C-18 (150 × 2,1 mm, 3 µm); eluição: gradiente: A (água + 0,05% ácido fórmico), B (ACN + 0,05% ácido fórmico); vazão: 0,25 mL/min	MS: ESI ionização positiva $[M-H]^+$	200-8.000 ng/mL; 3,9%; 5,5%; 1,1% (DPR)
Goldwirt et al., 2007	plasma humano	SPE (C18): volume: 100 µL; recuperação: 71%	CLAE; coluna: C8 plus Satisfaction (250 × 3 mm, 5 µm); eluição: isocrático: água:ACN (60:40, v/v); vazão: 0,6 mL/min	UV; 266 nm	0,25 – 20 µg/L; <7,9%; <13,7; 89,6%

(Continua na próxima página)

Tabela 2. Métodos cromatográficos publicados entre 2007 e 2011 para a determinação de darunavir

Referência	Matriz	Pré-tratamento da amostra	Separação	Detecção	FT; precisão intradia e interdia; exatidão
Heine et al., 2007	plasma humano	PP: volume: 100 µL; PPAgente: MeOH:ACN (50:50, v/v)	CLAE; coluna: C18 (150 x 2,0 mm, 5 µm); eluição: gradiente: A (MeOH + 10 m*M* tampão acetato de amônio pH 5,0 (35:65, v/v), B (MEOH); vazão: 250 µL/min	MS/MS: MRM; ESI-TQ, ionização positiva $[M-H]^+$	0,05 – 10 µg/mL; < 5,6%; <6,8%; >93,6%
Takahashi et al., 2007	plasma humano	LLE: volume: 500 µL; solvente: acetato de etila/hexano (50:50, v:v)	CLAE; coluna: Waters NovaPak C18 (4 µm, 8 x 100 mm); eluição: isocrático: 50 m*M* tampão fosfato (pH 5,9):MeOH:ACN (39:22:39, v/v); vazão: 1,8 mL/min	UV; 205 nm	0,13 – 10,36 µg/mL; 6,7%; 6,7%; 100,7 – 105,6%

ACN, acetonitrila; DPR, desvio padrão relativo; ESI, ionização por *eletrospray*; LLE, extração líquido-líquido; MeOH, metanol; MRM, monitoramento múltiplo de reação; PBMC, células sanguíneas periféricas mononucleares; PPAgente, agente de precipitação; PP, precipitação de proteínas; SPE, extração em fase sólida, SQ, quadrupolo simples; SRM, monitoramento seletivo de reação, TQ, triplo quadrupolo; UV, ultravioleta.

2.8 Publicações

Dois artigos de revisão foram publicados a partir desta extensa revisão bibliográfica.

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Deirdre M. D'Arcy, Cristina Helena dos Reis Serra, Hérida Regina Nunes Salgado. A Critical Review of Properties of Darunavir and Analytical Methods for Its Determination. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44:16-22, 2014.

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Deirdre M. D'Arcy, Cristina Helena dos Reis Serra, Hérida Regina Nunes Salgado. Darunavir: A Critical Review of Its Properties, Use and Drug Interactions. *Pharmacology*, 90:102-109, 2012.

3 Material, equipamentos e obtenção da matéria-prima

3.1 Material

- **Substância química de referência**

Foi utilizado darunavir, substância química de referência, com teor declarado igual a 98%, adquirido da empresa Sequoia Research Products (Pangbourne, Reino Unido).

- **Matéria-prima**

A matéria-prima darunavir etanolato foi obtida dos comprimidos contendo 300 mg de darunavir comercializados pelo laboratório farmacêutico Janssen-Cilag sob o nome de Prezista®. O lote AEZ0C00 foi empregado.

- **Produto farmacêutico**

Foi utilizado o produto farmacêutico Prezista®, lotes AEZ0C00, AJZTE00 e CCZ0500, comprimido revestido de liberação imediata, contendo 300 mg de darunavir. A forma farmacêutica usada é composta por 325,24 mg de darunavir etanolato (equivalente a 300 mg de darunavir) e adjuvantes (crospovidona, estearato de magnésio, Opadry II® branco (álcool polivinílico parcialmente hidrolisado, dióxido de titânio, macrogol e talco) e Prosolv® (celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal). O peso médio calculado para este lote, usando 20 comprimidos, foi 645,46 mg/comprimido.

- **Placebo**

O placebo utilizado foi obtido através de extração dos comprimidos de Prezista® contendo 300 mg de darunavir cada. O lote utilizado foi AEZ0C00.

3.2 Equipamentos

- Aparato para dissolução intrínseca (Flowscience®)
- Balança analítica analógica (METTLER®, modelo H10)
- Balança analítica digital
- Balança termogravimétrica (SII NanoTechnology®, modelo TG/DTA7300, Japão)
- Banho de aquecimento
- Banho de ultra-som (UNIQUE®, Ultra sonic clear)
- Calorímetro (SII NanoTechnology®, modelo DSC7020, Japão)
- Câmara Climática (Marconi®, MA 835/UR)
- Cromatógrafo a líquido (Waters® Corporation, Milford, MA, EUA), equipado com bomba binária Waters® 1525, injector manual Breeze Rheodyne 7725i, detector Waters® 2487 UV-VIS.
- Cromatógrafo a líquido com detectores UV e massas (Shimadzu® acoplada a SPD-20A UV e Microtof – QII detector de massas)
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu® R CLASS-VP, com detector PDA (Shimadzu® Corporate, Japão)
- Difratômetro (Rigaku®, modelo Ultima IV, Japão)
- Dissolutor Agilent® VK 7010 com amostrador automático VK 8000
- Espectrofotômetro UV-Visível (UV 1800, Shimadzu, Japão), *software* UV Probe
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR-Irprestige 21, Shimadzu® Corporate, Japão)
- Estufa (FABBE® Ltda)
- Prensa hidráulica

3.3 Obtenção da matéria-prima

Darunavir matéria-prima foi extraído do produto Prezista® que continha em cada comprimido 300 mg do antirretroviral. A extração foi feita em meio etanólico, já que o etanol é um solvente no qual o darunavir apresenta alta solubilidade e a maioria dos

adjuvantes apresenta baixa ou nenhuma solubilidade. O método de extração descrito por Berginc e colaboradores (2010) foi adaptado para esta extração.

Para a extração, os comprimidos foram pulverizados utilizando gral e pistilo de vidro. Cinco alíquotas de 50 mL de etanol foram adicionadas para cada *pool* de três comprimidos; essa mistura foi manualmente homogeneizada usando-se o pistilo. Após, aproximadamente; 30 minutos de agitação, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo. O precipitado retido no filtro foi, então, devolvido ao gral para receber mais uma alíquota de etanol e, desta forma, prosseguir o processo de extração. O filtrado, composto por uma solução etanólica, foi então levado à evaporação que resultou na precipitação do darunavir. O precipitado foi lavado com água Milli-Q®, utilizando filtro de porcelana e papel de filtro quantitativo. O precipitado lavado foi mantido em placa de Petri aberta, em câmara de vidro contendo etanol, a fim de garantir que a forma etanolata do fármaco precipitado. A massa de comprimidos insolúvel em etanol, que sobrou após a extração do fármaco, foi reservada. Após a garantia de que não há fármaco detectável por cromatografia líquida, esta massa foi utilizada como placebo na validação de métodos analíticos.

A pureza do fármaco extraído foi confirmada por análise cromatográfica e por espectrometria de infravermelho em comparação ao padrão de darunavir.

3.3.1 Análise da matéria-prima obtida

A área do pico referente à matéria-prima obtida através de CLAE usando o método desenvolvido (Parte III, capítulo 7) representou 96,6% do total da área do cromatograma (Figura 3). Quando analisada e padronizada em comparação ao padrão de darunavir, a matéria-prima extraída mostrou que seu teor é igual a 94% (n=3). Além disso, foi obtido o espectro infravermelho (cm^{-1}) da matéria-prima extraída e do padrão de darunavir que mostraram possuir os mesmos picos característicos (Figura 4).

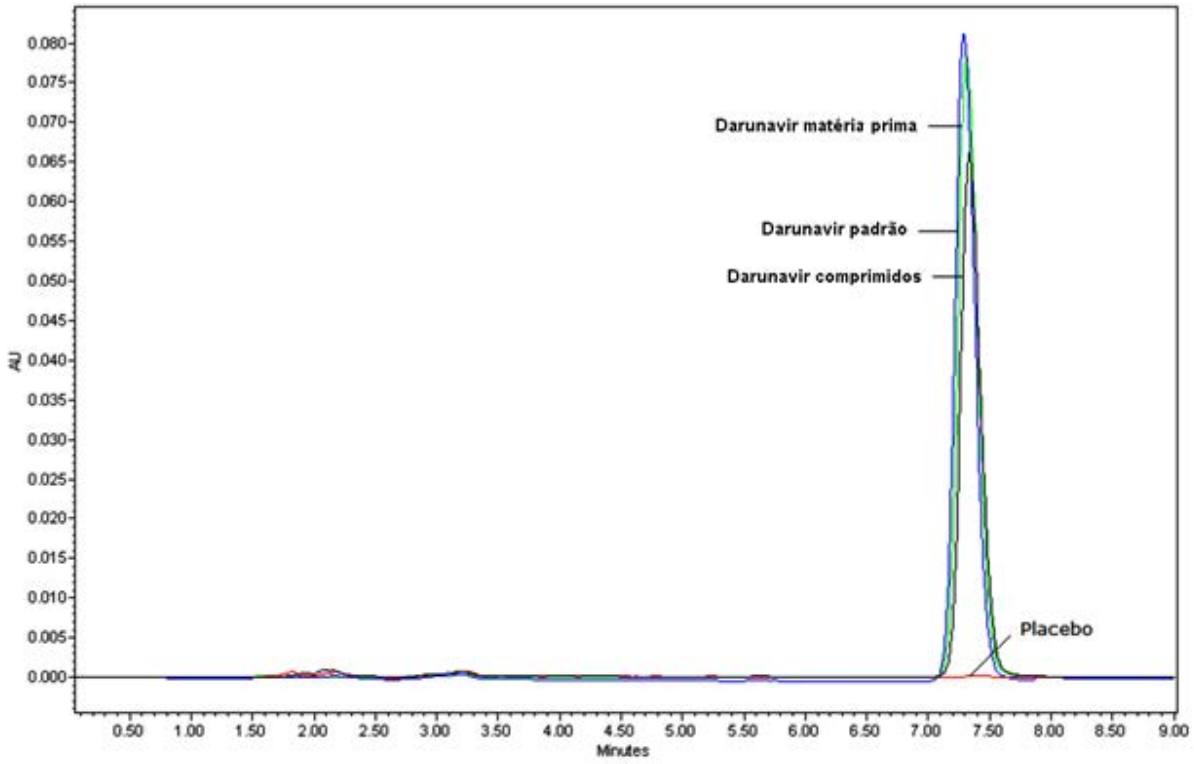


Figura 3. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para darunavir padrão (azul), matéria-prima extraída (verde), produto (preto) e placebo (vermelho) na concentração de 15 µg/mL.

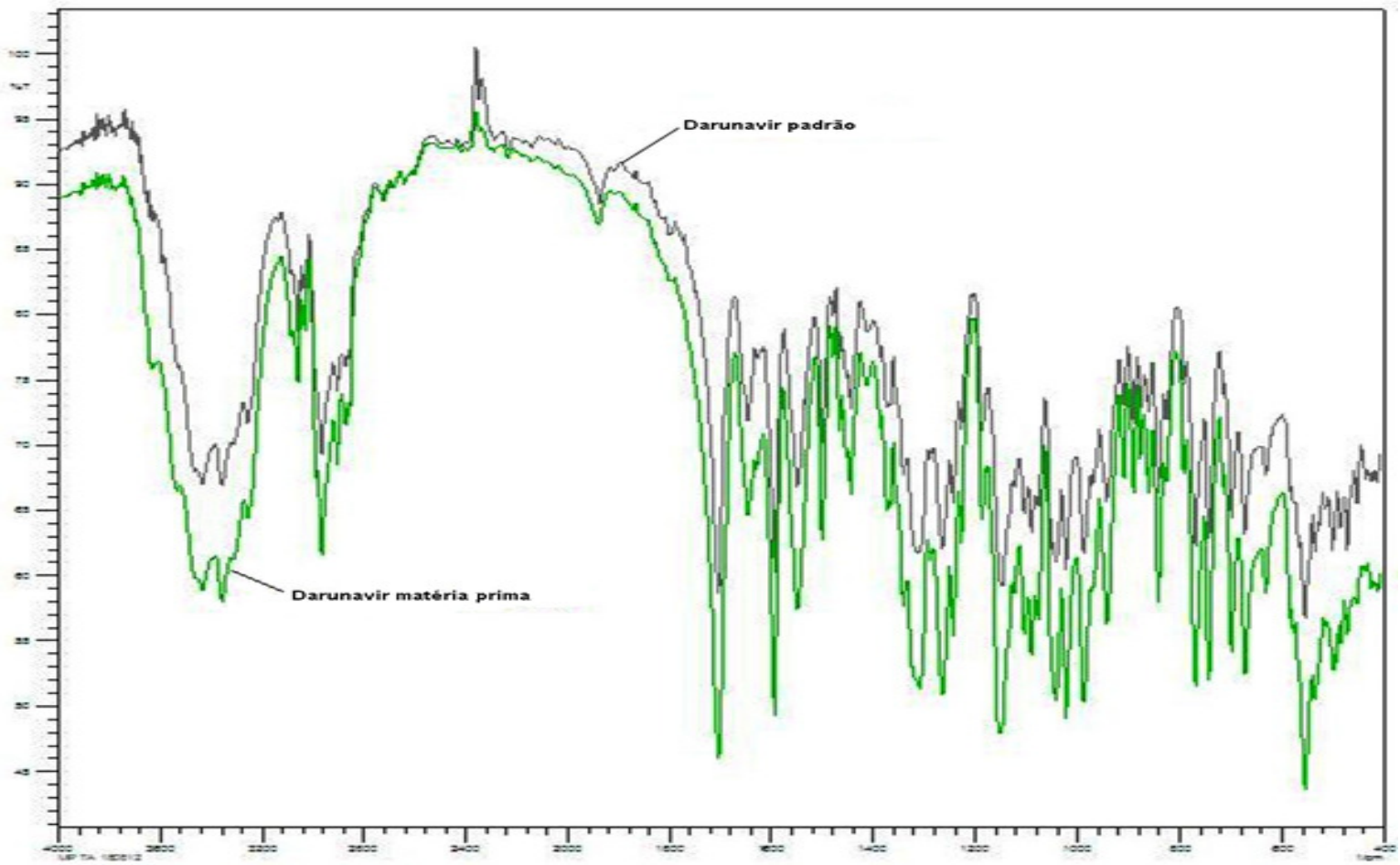


Figura 4. Sobreposição dos espectros infravermelho de darunavir padrão e matéria-prima extraída

PARTE II

ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO E SOLUBILIDADE

Nesta etapa do projeto, a solubilidade do darunavir foi estudada segundo o BCS. O perfil de dissolução do darunavir, a partir dos comprimidos de Prezista® contendo 300 mg de fármaco, foi construído baseado em dados do perfil de absorção *in vivo* para o mesmo produto. Além disso, uma ferramenta *in silico* foi utilizada e validada para a previsão da biodisponibilidade oral de produtos contendo o darunavir, a partir do seu perfil de dissolução.

Para o desenvolvimento desta parte do estudo se fez necessário o desenvolimento e validação de método analítico espectrofotométrico para a quantificação do darunavir. A simplicidade e a rapidez, comparado a métodos cromatográficos, faz da espectrofotometria o método mais empregado em estudos de dissolução.

4 Desenvolvimento e validação de método analítico espectrofotométrico

A análise de fármacos em produtos farmacêuticos pode ser um desafio dependendo dos insumos inativos, empregados na formulação e das técnicas disponíveis para a análise. A interferência dos adjuvantes nas medidas analíticas é comumente detectada. Técnicas de separação, como a cromatografia, são largamente empregadas para esse fim obtendo com alta frequência bons resultados. No entanto, técnicas mais simples e rápidas como a espectrofotometria derivada podem ser uma ferramenta alternativa.

Rocha & Teixeira (2004) afirmam que a aplicação analítica da espectrofotometria derivada se baseia no fato de que as medidas das derivações serem sempre proporcionais à concentração do analito, o que é provado através da derivação da lei de Lambert & Beer. Utilizando a derivação espectral é possível observar o aumento da seletividade, sensibilidade e menor limite de detecção (Rocha & Teixeira, 2004). O aumento da seletividade observado na derivação se baseia na relação entre a amplitude da absorção derivada e o comprimento de onda que é inversamente proporcional à largura da banda no espectro de ordem zero (Rocha & Teixeira, 2004).

O método espectrofotométrico por derivação tem sido amplamente empregado nas análises de controle de qualidade de preparações farmacêuticas devido à sua

rapidez, simplicidade e custo relativamente baixo (Fell, 1978; Talsky et al., 1978; Levillain & Fombeydie, 1986; Hackmann et al., 1990; Cazedey et al., 2012). Esta técnica é uma alternativa para a determinação de fármacos que sofrem interferência do placebo ou que apresentam valores baixos de absortividade (Martins et al., 2007).

A espectrofotometria derivada também tem sido utilizada para separar fármacos que apresentam espectros de absorção em comprimentos de onda próximos (sobrepostos/overlapping) quando estas substâncias apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta ou visível (Paschoal et al., 2003).

A espectrofotometria derivativa consiste na representação das derivadas da absorvância em relação ao comprimento de onda ($dA/d\lambda$), em função do comprimento de onda. É positivo onde a absorção aumenta e negativo onde ela diminui. Assim, uma curva diferencial de ordem *n* se anula *n* vezes, apresentando n + 1 bandas (Paschoal et al., 2003; Rocha & Teixeira, 2004).

A sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos parâmetros instrumentais e da forma de medida do sinal (método da tangente, *zero-crossing* e *peak-peak*/*zero-peak*), como também das características do espectro de absorção ordinário. A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que usualmente verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem de derivação (Sanchez-Rojas et al., 1988; Rocha & Teixeira, 2004).

O único método analítico encontrado na literatura para determinação do darunavir usando espectrofotometria foi publicado por Reddy & Ramireddy (2013), e conta com o inconveniente de que uma reação prévia se faz necessária para o emprego do método. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método simples e seletivo aplicando espectrofotometria para a determinação de darunavir em matéria-prima e produto acabado.

4.1 Material e método

4.1.1 Material

Ácido clorídrico, acetato de sódio, fosfato de potássio, hidróxido de sódio e ácido acético em grau analítico foram utilizados. As soluções de amostra e padrão foram filtradas através de filtro quantitativo (2 µm, JProlab, Brasil).

O espectrofotômetro UV-Visível UV 1800 (Shimadzu®, Japão) acoplado ao *software* UV Probe empregado nas análises, foi programado para gerar espectros na região do ultravioleta (200 - 400 nm) usando as ordens zero e primeira derivada. Foi utilizada velocidade média de exploração para aquisição dos sinais com intervalo de amostragem de 0,2 nm. A largura da fenda foi de 1,0; o *delta lambda* empregado foi 2,0 e o fator de escala 1,0. A quantificação do fármaco foi executada com leituras em 267 nm no espectro de ordem zero e em 276 nm no espectro de primeira ordem de derivação. Cubetas de quartzo com largura de 1 cm foram utilizadas.

4.1.2 Preparação da solução padrão

A solução estoque de darunavir foi preparada dissolvendo 6,5 mg de darunavir substância química de referência exatamente pesado em balão volumétrico de 200 mL. O darunavir foi solubilizado com 40 mL de metanol e 100 mL de água e a solução foi mantida em banho de ultra-som por dez minutos antes de completar o volume com água. Subsequentes diluições levaram ao preparo de seis soluções nas concentrações iguais a 11, 13, 15, 17, 19 e 21 µg/mL.

4.1.3 Preparação da solução amostra

Para o preparo das soluções amostra, 20 comprimidos Prezista® foram pesados, triturados e misturados perfazendo o *pool*. Deste *pool* de comprimidos triturados, quantidade exata de massa equivalente a 6,5 mg de darunavir foi pesada e transferida

para balão volumétrico de 200 mL. A diluição foi feita de modo semelhante à solução padrão gerando uma solução estoque que foi posteriormente diluída em água para obter solução na concentração de trabalho (15 µg/mL). A solução placebo foi preparada de modo semelhante excluindo a adição de darunavir.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Desenvolvimento analítico

A seletividade do método derivativo é uma das características mais importantes em comparação com o método de ordem zero. A derização provou ser eficaz na eliminação da interferência sofrida pelo darunavir por ação de seu placebo, quando sob análise espectrofotométrica (Figuras 5 e 6). A interferência não é mais detectada ao empregar a derivação em primeira ordem.

Para avaliação da seletividade do método, soluções padrão, amostra e placebo foram preparadas empregando ácido clorídrico 0,1 *M*, tampão de acetato 0,05 *M* (pH 4,5), tampão fosfato 0,2 *M* (pH 6,8) e água como solventes, a fim de verificar se havia um solvente no qual a interferência do placebo fosse inexistente. Para auxiliar na solubilização do darunavir, ao utilizar os três últimos solventes 20% de MEOH foram empregados. A percentagem de interferência do placebo foi calculada utilizando a ordem zero e a primeira derivada da curva de absorção.

Como a ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, afim de evitar aumento do nível de ruído com o aumento da ordem de derivação, a primeira ordem foi testada em primeiro lugar. As derivações seguintes não foram necessárias, uma vez que bons resultados foram alcançados com a derivação de primeira ordem (Figura 6 e Tabela 3).

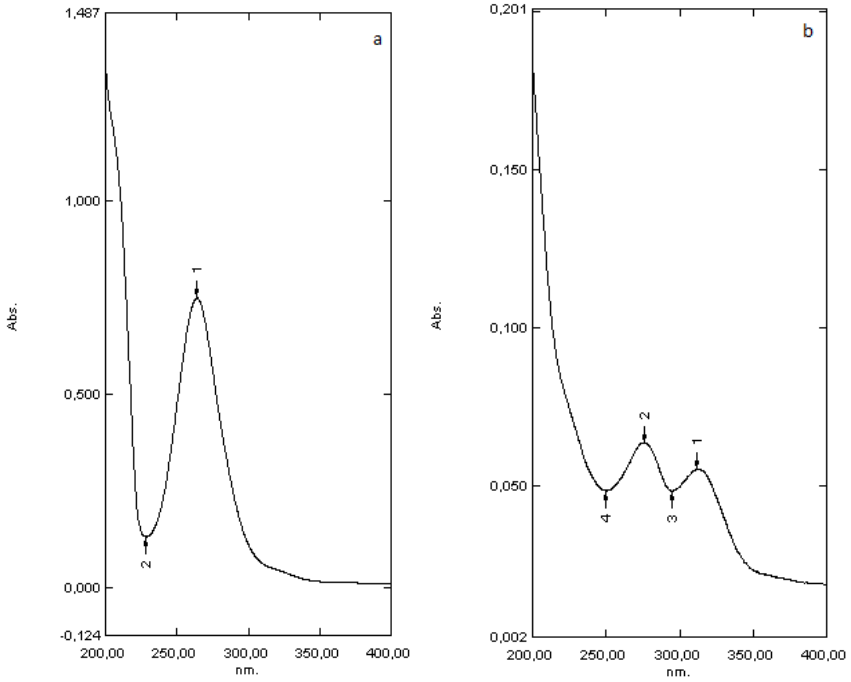


Figura 5. Espectro de absorção na região do U V de ordem zero para as amostras de darunavir comprimidos (a) e placebo (b) na concentração de 15 µg/mL, preparadas utilizando água e MEOH (20%) como solventes.

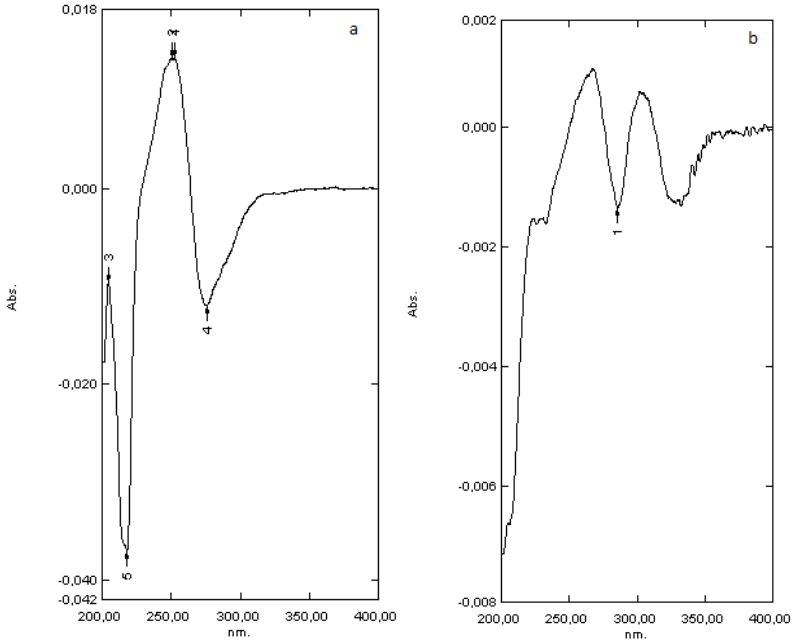


Figura 6. Espectro de absorção na região do UV de primeira ordem para a amostra de darunavir comprimidos (a) e placebo (b) na concentração de 15 µg/mL preparadas utilizando água e MEOH (20%) como solventes.

Tabela 3. Interferência do placebo na determinação de darunavir por espectrofotometria na região do ultravioleta

Meio	Interferência (%)	
	Ordem zero (267 nm)	Primeira ordem (276 nm)
Água (20 % de MeOH)	7,92	0
Ácido clorídrico 0,1 *M*	5,70	0
Tampão acetato, pH 4,5 (20 % de MeOH)	3,25	0
Tampão fosfato, pH 6,8 (20 % de MeOH)	1,35	0

A Tabela 3 apresenta os valores de interferência do placebo empregando diferentes solventes. Independente do solvente utilizado, a interferência desaparece ao usar a primeira derivada. Deste modo, o solvente de mais fácil manipulação e que apresentou resultados mais precisos para o ensaio de teor do fármaco após preparo em triplicata foi água com 20 % de metanol. Este foi, portanto, escolhido para os ensaios.

Como é mostrado na Figura 6 em 276 nm, no espectro de primeira ordem, há vale intenso e bem caracterizado, apontado na figura como número 4. Este foi escolhido para as leituras.

4.2.2 Validação analítica

Após definição dos parâmetros de análise, o método foi validado seguindo o guia do ICH (ICH, 2005). A linearidade do método foi avaliada empregando concentrações que variaram de 11 a 21 µg/mL que apresentaram valores de absorvância entre 0,2 e 0,8, faixa onde a linearidade é normalmente esperada. A concentração de trabalho escolhida foi 15 µg/mL. A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados e ótimos resultados foram alcançados na faixa de trabalho avaliada. O coeficiente de determinação foi 0,997 e a equação da regressão foi $y = 0{,}017x - 0{,}0039$ (em que y é a amplitude medida em 276 nm no espectro de primeira ordem e x é a concentração em µg/mL). De acordo com a análise de variância (ANOVA) há regressão estatisticamente significativa (F calculado < F crítico; $P = 0{,}05$).

As soluções padrão foram preparadas em triplicata em todas as seis concentrações e analisadas no mesmo dia (precisão intradia), além disso as concentrações baixa, alta e de trabalho foram preparadas em triplicata em dias diferentes e analisadas (precisão interdia). O método apresentou boa precisão com desvio padrão relativo (DPR) de 0,06 e 3,75 para os ensaios intradia e interdia, respectivamente (Tabela 4).

A exatidão do método foi avaliada pelo método de recuperação empregando o enriquecimento de placebos. Assim, amostras de placebo foram enriquecidas com darunavir matéria-prima e seis soluções, nas concentrações definidas no ensaio de linearidade, foram preparadas em triplicata. O resultado médio de recuperação foi 99,84% (Tabelas 4 e 5) indicando ótima relação entre os valores reais e os encontrados.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados com base no desvio padrão do intercepto das três curvas construídas nos ensaios de linearidade e a inclinação da curva, seguindo a recomendação do guia do ICH (ICH, 2005). Os valores calculados foram 0,09 e 0,30 µg/mL para os limites de detecção e de quantificação, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros da validação analítica do método espectrofotométrico para determinação de darunavir

Parâmetros	**Resultados**
Concentração de trabalho, µg/mL	15,0
Curva analítica	0,0038X – 0,0017
Coeficiente de determinação (r^2)	0,997
DPR intradia (%)	0,06
DPR interdia (%)	3,75
Recuperação (%)	99,84
DPR de recuperação (%)	1,52
Limite de detecção, µg/mL	0,09
Limite de quantificação, µg/mL	0,30

Tabela 5. Valores determinados no estudo de exatidão do método espectrofotométrico proposto para quantificação do darunavir durante o estudo de dissolução

Concentração final dos placebos enriquecidos (μg/mL)	Recuperação (%)
11,0	98,79
13,0	98,54
15,0	100,25
17,0	99,28
19,0	100,09
21,0	102,08

Na avaliação da robustez do método, pequenas e deliberadas mudanças foram realizadas no tempo em que as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom. As soluções padrão e amostra foram submetidas ao banho de ultrassom a sonificação por nove, dez (condição padrão) e onze minutos. A possível interferência dessas pequenas mudanças na determinação do darunavir foi monitorada e os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores determinados no teste de robustez do método espectrofotométrico proposto para quantificação do darunavir

Tempo de sonicação (min)	Doseamento (%)
9,0	97,68
10,0	96,64
11,0	96,13

O método é considerado robusto quando pequenas alterações sofridas ao executar o método não causam mudanças significativas nos resultados. Assim, os valores apresentados confirmam que o método é robusto em relação ao parâmetro testado.

4.3 Conclusão

Este estudo descreve um método útil, confiável e rápido para a determinação do darunavir. Os ensaios mostraram que o método é seletivo e livre de interferência dos adjuvantes da formulação, bem como linear, preciso e exato na faixa de concentração testada. Assim, este método pode ser facilmente aplicado na rotina laboratorial.

4.4 Publicações

Este estudo gerou um artigo que foi publicado.

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Cristina Helena dos Reis Serra, Hérida Regina Nunes Salgado. Development and Validation of First Derivative Spectrophotometric Method for Quantification of Darunavir in Tablets. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(6): 722-730, 2014.

5 Solubilidade, dissolução e construção de correlação *in vivo-in vitro*

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida dissolve-se no solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação do fármaco de uma forma farmacêutica para uma determinada área, numa determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição é mais adequada com a aplicação dos ensaios de dissolução aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico a libera (Costa & Lobo, 1999 e 2001). No entanto, podem ser incorporadas à formulação substâncias que permitam a alteração da dissolução do fármaco no meio (Preechagoon et al., 2000).

O ensaio de dissolução é uma ferramenta importante no controle de qualidade de medicamentos durante toda sua vida útil, sendo que as características de dissolução devem ser mantidas constantes durante todo o período de validade. Este ensaio torna-se ainda mais importante para fármacos de solubilidade aquosa baixa ou relativamente reduzida, como é o caso do darunavir.

5.1.1 Solubilidade

Como o darunavir é um fármaco que apresenta limitada solubilidade aquosa, mas biodisponibilidade elevada quando coadministrado com ritonavir, sua absorção deve ser governada pelas características físico-químicas do fármaco, tais como solubilidade nos fluidos gastrointestinais, taxa de dissolução, tamanho das partículas, forma do cristal e pKa (Cardot et al., 2007). Para formulações de liberação imediata, que se desintegram e se dispersam rapidamente após a ingestão, como é o caso do Prezista®, as características físico-químicas e a estabilidade do fármaco são importantes pontos a serem considerados. Darunavir é uma molécula altamente lipofílica, log P 3,94 +/- 0,57 (ACD/labs pka DB, 1994-2002), sua baixa solubilidade aquosa é pH dependente com o

log D ligeiramente menor em meios com pH acima de onze e abaixo de dois (Rittweger e Arastéh, 2007; ACD/labs pka DB, 1994-2002).

5.1.2 Dissolução

O teste de dissolução deve ser discriminativo e deve possibilitar avaliar o comportamento do produto ao ser produzido, bem como possíveis modificações que a liberação do fármaco possa ter sofrido durante o estudo de estabilidade.

Segundo Marcolongo (2003), inúmeras variáveis podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas e algumas monitoradas a fim de obter resultados confiáveis. Dentre essas variáveis se encontram: a solubilidade, o tamanho de partícula e a natureza química do fármaco; a forma farmacêutica, os excipientes e a tecnologia de fabricação empregada; o aparato utilizado, a vibração do sistema, a velocidade de agitação, a posição e o método de amostragem, o emprego de dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam; o volume de meio empregado, a presença de gases no meio, o pH, a evaporação, a presença de tensoativos, a temperatura e a viscosidade do meio; os métodos de análise e de filtração e as condições de estocagem do produto.

Há um grande número de aparatos de dissolução descritos na literatura. Para formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas e comprimidos, os mais utilizados são os aparatos 1 (cesto) e 2 (pás) descritos na farmacopeia americana (USP 35, 2012).

Para o desenvolvimento de um ensaio de dissolução, deve-se, inicialmente, conhecer bem as características do fármaco e seu comportamento nos meios que serão testados. Deve-se escolher um método analítico para a quantificação que seja sensível, seletivo, exato e preciso. O aparato a ser utilizado deve ser capaz de manter as condições *sink* (concentração que equivale até 10% da concentração de saturação). Deve-se ainda considerar as condições fisiológicas para que se possa empregar um meio que mimetize a dissolução *in vivo* (Marcolongo, 2003).

Para fármacos de baixa solubilidade aquosa, a adição de enzimas ou tensoativos nos meios de dissolução é recomendada (Cardot et al., 2007). A FDA tem sugerido algumas condições analíticas para o ensaio de dissolução do darunavir. O método

proposto pela agência emprega aparato USP II (pá) à velocidade de 75 rpm e tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0, com 2% de Tween 20® como meio de dissolução (FDA, 2007).

5.1.3 Correlação *in vivo-in vitro*

Um dos principais objetivos no desenvolvimento de um produto farmacêutico é o perfeito entendimento do comportamento *in vivo* e *in vitro* do produto em questão (Modi, 2007). Princípios e métodos científicos preditivos para avaliar o desempenho *in vivo* de formas farmacêuticas com base em estudos *in vitro* são importantes para minimizar o uso de animais e seres humanos em experimentos durante o desenvolvimento de fármacos e produtos farmacêuticos. Devido a questões relacionadas com a baixa solubilidade e baixa permeabilidade dos novos fármacos, a pesquisa em correlação *in vivo-in vitro* para medicamentos tem tido, nos últimos anos, um foco especial, particularmente àqueles usados por via oral.

De acordo com Modi (2007), a construção de uma boa correlação *in vivo-in vitro* (IVIVC) pode proporcionar o uso de estudos de dissolução *in vitro* para o controle na produção de produtos farmacêuticos de modo a predizer o comportamento *in vivo* com base em dados laboratoriais. O valor do ensaio de dissolução, como uma ferramenta para o controle de qualidade para predizer o comportamento *in vivo* de medicamentos, é significativamente aumentado se uma correlação *in vivo-in vitro* é estabelecida (FDA, 1997; Dressman & Reppas, 2000; US Pharmacopeial Forum, 2004; Modi, 2007).

A IVIVC tem sido definida pela farmacopeia americana como “o estabelecimento de uma relação quantitativa entre propriedades biológicas ou parâmetros derivados das propriedades biológicas produzidas por uma forma farmacêutica e uma propriedade físico-química ou características dessa mesma forma farmacêutica” (USP 35, 2012). As propriedades biológicas mais comumente utilizadas são máxima concentração plasmática do fármaco (Cmax) ou área sob a curva (AUC) obtida de estudos clínicos, enquanto que o perfil de dissolução *in vitro* é a propriedade físico-química comumente empregada (FDA, 1997; Li et al., 2005; Modi, 2007). Em consonância com Cardot e colaboradores (2007), a IVIVC pode ser usada para otimização de formas farmacêuticas

com o mínimo possível de ensaios com humanos, ao estabelecer os critérios de aceitação para o ensaio de dissolução e substituir futuros estudos de bioequivalência.

Como foi destacado por Rossi e colaboradores (Rossi et al., 2011), a inexistência de uma correlação entre os resultados de ensaios de dissolução e o comportamento *in vivo* de formas farmacêuticas pode levar ao controle inapropriado de parâmetros críticos de produção. Deste modo, os limites especificados *in vitro* devem ser dados em acordo com a relação estabelecida entre os resultados *in vivo* e *in vitro* (Rossi et al., 2011).

A correlação entre dados *in vivo* e o perfil de dissolução é provável de ser alcançada quando a dissolução do fármaco é a etapa limitante para sua biodisponibilidade e o fármaco apresenta alta permeabilidade. Assim, para fármacos classificados como classe II no BCS, a IVIVC é provável (Li et al., 2005; Modi, 2007).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a solubilidade do darunavir segundo o guia do BCS, desenvolver e validar teste de dissolução para os comprimidos de Prezista® com base na possível IVIVC. À semelhança do trabalho de Rossi e colaboradores publicado em periódico internacional de impacto, os dados *in vivo* utilizados foram obtidos da literatura (Rossi et al., 2011).

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Materiais

A substância química de referência do darunavir (teor declarado de 98%) adquirido da Sequoia Research (Pangbourne, United Kingdom), a matéria-prima foi obtida dos comprimidos Prezista® por extração etanólica segundo o método descrito por Berginc e colaboradores (Berginc et al., 2010) e descrito detalhadamente no capítulo 3. Comprimidos de Prezista® 300 mg (Lotes: AJZTE00 e CCZ0500) foram adquiridos no mercado local. O Placebo resultante da extração do fármaco a partir dos comprimidos de Prezista® foI empregado neste estudo. Ácido clorídrico, acetato de sódio, fosfato de sódio, ácido acético glacial e Tween 20® em grau analítico foram utilizados no estudo. Água ultrapura (Millipore Corporation, Billerica, EUA) foi usada para preparar os meios

de dissolução que foram filtrados em membrana de filtração de celulose regenerada com porosidade igual a 0,45 µm.

5.2.2 Estudos *in vivo*

Perfis de liberação *in vivo* do darunavir foram obtidos da literatura (FDA, 2005). Foram usados os seguintes estudos apresentados à FDA:

- TMC114-C114 (Biodisponibilidade absoluta do TMC114 (darunavir), formulado como comprimidos, administrado na ausência e presença de baixa dose de ritonavir a pacientes saudáveis, comparado com administração intravenosa feita também em ausência e presença de baixa dose de ritonavir);
- TMC114-C116 (Estudo de fase I, randomizado, *open-label* e *crossover* para a comparação da taxa e extensão da absorção do TMC114 após administração única da formulação comercial de comprimidos em presença de baixa dose de ritonavir).

Os perfis de concentração plasmática após administração intravenosa e oral de darunavir (TMC114) foram, então, obtidos. O darunavir é um fármaco que é distribuído de forma bicompartimental (Back et al., 2008), assim, para a obtenção da fração absorvida de fármaco ao longo do tempo os cálculos sugeridos por Loo & Riegelman foram aplicados (Wagner, 1975). A partir dos dados obtidos da administração intravenosa de darunavir (TMC114-C114), as constantes de eliminação e distribuição do fármaco entre os dois compartimentos (k10, k12 e k21) foram calculadas usando os *softwares* Excel® e WinNolin® Phoenix. Tais constantes, juntamente com os dados de concentração plasmática do darunavir obtidos após administração oral de dose única da formulação comercial de comprimidos de darunavir em presença de 150 mg de ritonavir a voluntários em jejum, foram aplicadas à equação de Loo-Riegelman (Wagner, 1975) para a obtenção da fração absorvida do fármaco ao longo do tempo.

As equações 1 e 2 apresentam os cálculos desenvolvidos por Loo & Riegelman para obtenção do valor da fração de fármaco absorvida (Wagner, 1975).

$$(A/Vp)_{tn} = Cp_{tn} + Kel\ Cp\Delta t + Ct_{tn} \qquad \text{(Equação 1)}$$

Em que *A* é a quantidade de fármaco absorvida no tempo *t*; *Vp* é o volume do compartimento central; *Cp* é a concentração do fármaco no sangue; *kel* é a constante de eliminação, a soma das constantes de primeira ordem para os processos simultâneos de metabolismo e excreção e *Ct* é a quantidade de fármaco distribuída nos tecidos.

Assim, é possível avaliar a quantidade de fármaco distribuída no sangue (Cp_{tn}), nos tecidos (Ct_{tn}) e a quantidade eliminada (Kel CpΔt).

Transformações matemáticas que facilitam a obtenção dos dados levaram os pesquisadores Loo e Riegelman à seguinte equação:

$$(A/Vp)_{tn} = Cp_{tn} + Kel\ Cp\Delta t + k_{12}/k_{21} \times Cp_{tn}\text{-}1\ [1- e\text{-}k_{21}\Delta t] + (k_{12}\Delta Cp\Delta t)/2 + Ct_{tn-1}\ e\text{-}k_{21}\Delta t \qquad \text{(Equação 2)}$$

Em que *A* é a quantidade de fármaco absorvida no tempo *tn*; *Vp* é o volume do compartimento central; *Cp* é a concentração do fármaco no sangue; *kel* é a constante de eliminação, a soma das constantes de primeira ordem para os processos simultâneos de metabolismo e excreção e k_{12} e k_{21} são as constantes de distribuição de primeira ordem para fora do compartimento central em direção ao compartimento periférico e de volta a ele, respectivamente.

5.2.3 Estudos *in vitro*

- **Condições para o ensaio de dissolução**

Os ensaios de dissolução foram conduzidos aplicando 900 mL dos meios de dissolução avaliados pré-aquecidos a 37 ± 0,5° C. Alíquotas foram retiradas após 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos de teste. Filtros de PVDF com porosidade igual a 0,35 µm foram utilizados para filtrar as amostras no exato momento de sua retirada, parando, assim, a dissolução. Todas as amostras foram analisadas por espectrofotometria derivada.

- **Método espectrofotométrico**

O método analítico por espectrofotometria derivada descrito anteriormente foi otimizado para sua aplicação durante o estudo de dissolução. As mesmas condições analíticas anteriormente validadas foram aplicadas e a seletividade do método foi desafiada em relação aos meios de dissolução utilizados e sua linearidade, precisão e exatidão averiguados. As leituras foram então realizadas através da medida da amplitude do vale expresso em 276 nm na primeira derivada do espectro de absorção das amostras.

Para adequação de concentração, todas as amostras retiradas durante o estudo de dissolução foram, após sua filtração, diluídas para que a faixa de linearidade analítica estabelecida no capítulo 4 fosse respeitada.

- **Estudos de solubilidade**

A solubilidade do darunavir foi determinada seguindo o guia do BCS e aplicando diferentes meios. Foi empregado o método do equilíbrio e a técnica de *shake-flask,* onde o equilíbrio de saturação é obtido após muitas horas de agitação constante. Foram empregados HCl 0,1 *M*, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 e pH 6,8 e tampão fosfato 0,05 *M* pH 3,0 acrescido de 2; 1,5; 1; 0,5; 0,25 and 0,1% de Tween 20®. Aos tubos contendo 5 mL de cada um dos meios pré-aquecidos a 37° C foi adicionada grande quantidade de darunavir matéria-prima, o suficiente para, após o estabelecimento do equilíbrio, restar fármaco no fundo do tubo de ensaio.O ensaio foi realizado em triplicata. Os tubos foram mantidos em incubadora aquecida a 37° C e sob agitação de 60 rpm por 72 horas. Após esse período, foi observada precipitação no fundo de cada tubo, evidenciando a saturação do meio, e então, as amostras foram filtradas usando membrana de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm. Aliquotas de 0,2 mL de cada filtrado foram pipetadas e diluídas para subsequente análise por espectrofotometria derivada.

5.2.4 Correlação *in vitro–in vivo* (IVIVC)

De acordo com a FDA, a IVIVC é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre as propriedades *in vitro* de uma forma farmacêutica e uma resposta *in vivo* relevante (FDA, 1997; Modi, 2007). Uma possível IVIVC para o darunavir foi avaliada ao plotar a porcentagem média da fração absorvida do fármaco (FA) *versus* a porcentagem média de fármaco dissolvido (FD) tentando atingir uma correlação que empregue todos os pontos dessas duas curvas, uma correlação de nível A. Este nível de correlação é considerada, dentre os tipos de correlação, a mais informativa e útil para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos ou serve de suporte à regulação sanitária a respeito de mudanças no produto farmacêutico em questão (Modi, 2007).

O perfil de concentração plasmática do darunavir foi usado para estimar a *liberação in vivo* do fármaco; seguidamente, a liberação *in vivo* foi comparada com a liberação *in vitro*. Regressão linear foi empregada para avaliação do resultado.

5.2.5 Validação do método analítico para a dissolução

O método espectrofotométrico por derivada previamente desenvolvido e validado foi otimizado e adaptado ao ensaio de dissolução (ICH, 2005; USP 35, 2012). A especificidade do método foi avaliada através da comparação do espectro de absorção do darunavir matéria-prima, comprimidos e placebo preparados usando o meio de dissolução. A ausência de interferências por parte do meio de dissolução foi comprovada.

As concentrações empregadas neste ensaio estão em acordo com aquelas obtidas após diluição das amostras de dissolução retiradas ao longo do teste de perfil de dissolução (9, 12, 15, 18 e 21 µg/mL). Estas cinco concentrações foram empregadas ao testar a linearidade, a precisão e a exatidão do método.

Para os ensaios de linearidade e precisão, solução estoque foi preparada dissolvendo 6,50 mg de darunavir matéria-prima em balão volumétrico de 200 mL de capacidade usando metanol como solvente. Em triplicata, cinco soluções nas concentrações avaliadas foram preparadas através da diluição de alíquotas da solução estoque em meio de dissolução. ANOVA foi empregada para avaliação dos resultados

do ensaio de linearidade. As precisões intradia e interdia foram estabelecidas com base no DPR de seus resultados.

A exatidão foi obtida através do ensaio de recuperação aplicando placebo enriquecido. Quantidade conhecida de darunavir matéria-prima foi adicionada ao placebo e uma solução estoque foi preparada usando metanol como solvente. Alíquotas dessa solução estoque foram adicionadas às cubas de dissolução contendo 900 mL de meio de dissolução. As cinco concentrações avaliadas foram alcançadas nas cubas e o ensaio foi realizado em triplicata. O meio de dissolução foi pré-aquecido a 37 $\pm$ 0,5° C e a rotação foi mantida a 150 rpm por uma hora. Alíquotas foram então retiradas e analisadas. A recuperação do método foi calculada usando a equação da reta obtida no ensaio de linearidade.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Estudos *in vivo*

O resultado da aplicação da equação de Loo-Riegelman pode ser visto na Figura 7, cujo perfil de absorção *in vivo* do darunavir é apresentado. Este é um método modelo dependente para fármacos bicompartimentais aprovado pela FDA para calcular perfis de absorção (FDA, 1997).

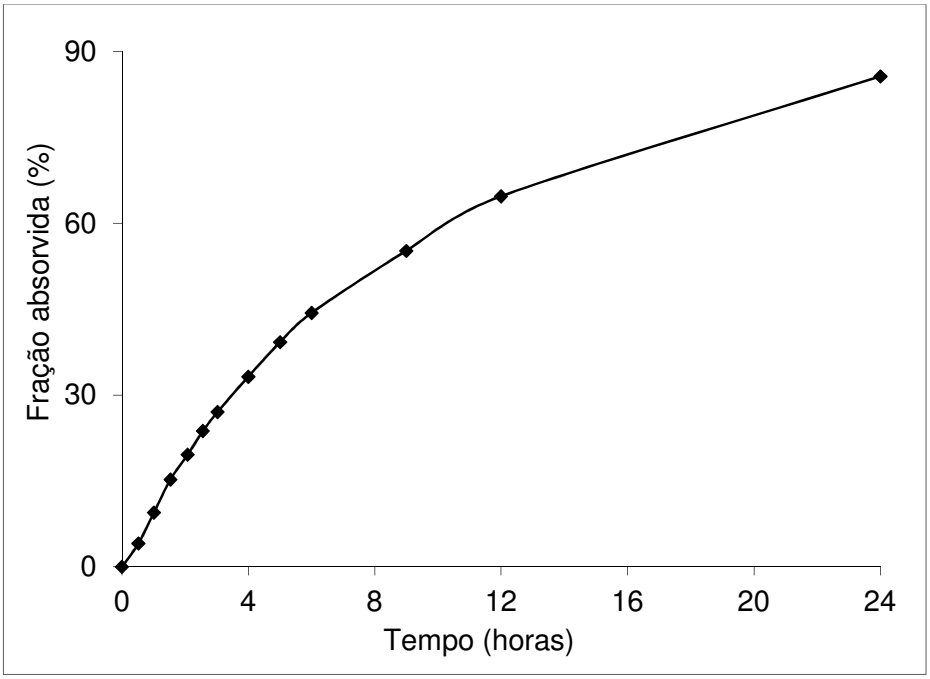


Figura 7 Curva fração da dose absorvida (%) *vs.* tempo (horas) para darunavir comprimidos, calculada empregando o método Loo-Riegelman.

5.3.2 Estudos de solubilidade

Segundo o guia do BCS para solubilidade, um fármaco será considerado de alta solubilidade se a maior dose disponível no mercado for solúvel em, pelo menos, 250 mL de meio e esta solubilidade deve ser testada na faixa de pH existente no trato gastrointestinal.

O estudo de solubilidade do darunavir provou que sua solubilidade se eleva em meios com baixo pH, como em ácido clorídrico, ou em altas concentrações de tensoativo, como o Tween 20®. Os resultados médios obtidos para cada meio testado são apresentados na Tabela 7, onde os dados de solubilidade são também apresentados como porcentagem da dose de darunavir utilizada neste estudo (300 mg).

Darunavir apresenta pouca solubilidade aquosa e, de acordo com Shah e colaboradores (Shah et al., 1999), o uso de tensoativos no meio de dissolução é fisiologicamente relevante para esses fármacos, uma vez que consegue melhor simular o comportamento no trato gastrointestinal.

Tabela 7. Solubilidade do darunavir determinada através do método de equilíbrio.

Meio	Solubilidade (µg/mL)	% Dose[a]
Ácido clorídrico 0,1 *M*	509,14	169,71
Tampão acetato 0,05 *M*, pH 4,5	181,20	60,40
Tampão fosfato 0,2 *M*, pH 6,8	160,71	53,57
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0	208,54	69,51
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (0,1 % Tween-20®)	268,58	89,53
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (0,25 % Tween-20®)	373,70	124,57
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (0,5 % Tween-20®)	588,57	196,19
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (1 % Tween-20®)	824,64	274,88
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (1,5 % Tween-20®)	1319,43	439,81
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (2 % Tween-20®)	1709,66	569,88

[a] 300 mg

A concentração máxima atingida pelo fármaco (300 mg) na cuba de dissolução contendo 900 mL de meio é igual a 333,33 µg/mL. O fármaco apresentou solubilidade maior que a concentração em questão quando avaliado em ácido clorídrico 0,1 *M* e em tampão fosfato 0,05 *M* pH 3,0 com Tween 20® nas concentrações 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2%. Como já foi discutido anteriormente, o darunavir não é estável em ácido clorídrico, não sendo portanto indicado como meio de dissolução. Os meios compostos por tampão fosfato pH 3,0 e Tween 20® nas concentrações 0,5; 1; 1,5 e 2% foram escolhidos para serem testados como meios de dissolução. Os outros meios não foram escolhidos devido à instabilidade do fármaco, como no caso do HCl, ou pelo fato de o fármaco apresentar solubilidade, nestes meios, menor ou muito próxima a que seria observada após completa liberação do fármaco na cuba contendo 900 mL de meio.

Os ensaios de dissolução, realizados com os meios escolhidos, revelarão qual será o meio que proporcionará perfil de liberação do fármaco que melhor se ajuste ao seu perfil de fração absorvida.

5.3.3 Desenvolvimento do perfil de dissolução

Aplicando os meios de dissolução considerados adequados em relação à solubilidade e estabilidade do fármaco, os comprimidos de darunavir Prezista® (*n* = 3 para os testes iniciais e *n* = 12 para o ensaio empregando as condições analíticas estabelecidas) foram avaliados em relação ao seu perfil de dissolução usando o aparato II da USP (pá) em diferentes rotações (50 e 75 rpm) e 900 mL de meios pré-aquecidos a 37 ± 0,5° C. Alíquotas foram retiradas após 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos de teste e a porcentagem liberada do fármaco até o momento da retirada da amostra foi calculada levando em consideração a massa anteriormente retirada e o perfil de dissolução pode ser construído (Figuras 8 e 9). As condições analíticas sugeridas pela FDA também foram avaliadas, mas não apresentaram bons resultados ou alguma possível relação com a dissolução *in vivo*, pois a liberação foi muito rápida.

Testar diferentes concentrações de tensoativo auxiliou na busca pelo melhor resultado com a menor quantidade de tensoativo possível e contribuiu para aumentar a sensibilidade e o poder discriminativo do ensaio. O ensaio de dissolução deve apresentar capacidade de distinguir diferenças significantivas na composição ou processo de manufatura de um produto farmacêutico que possa afetar a performance *in vivo* (USP 32, 2009).

Ao utilizar os meios de dissolução contendo 1% de tensoativo ou mais, a dissolução do darunavir foi muito rápida comparada ao perfil de absorção. Assim, para estes meios de dissolução uma correlação entre os dados de FA e FD não pode ser estabelecida (Figuras 10 e 11 e Tabela 8). A liberação de 85% do fármaco foi alcançada antes de 60, 30 e 25 minutos de teste usando meios de dissolução com quantidades de tensoativo igual a 1, 1,5 e 2%, respectivamente (Figura 8).

O impacto da velocidade de agitação do meio foi avaliado usando meio de dissolução contendo 0,5% de tensoativo, a 50 e 75 rpm. A melhor correlação entre a fração dissolvida e a fração absorvida foi obtida ao empregar tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 contendo 0,5 % de Tween 20® e agitação de 75 rpm (Figuras 9 e 11). O perfil de dissolução obtido nestas condições analíticas mostrou ser mais discriminativo que as demais e mostrou maior similaridade com o perfil de absorção *in vivo* (r^2 = 0,95), mesmo

quando comparado ao perfil obtido com menor velocidade de agitação (50 rpm). A Figura 11 mostra o gráfico de IVIVC (FA x FD). Correlação *in vivo-in vitro* de nível A (construída ponto-a-ponto) foi alcançada com a velocidade rotação de 75 rpm (Figura 11 e Tabela 8). Como foi explicado por Modi (2007), este nível de correlação, que relaciona todo o perfil de dissolução com o perfil de absorção, pode ser usado como substituto para as performances *in vivo* (Modi, 2007).

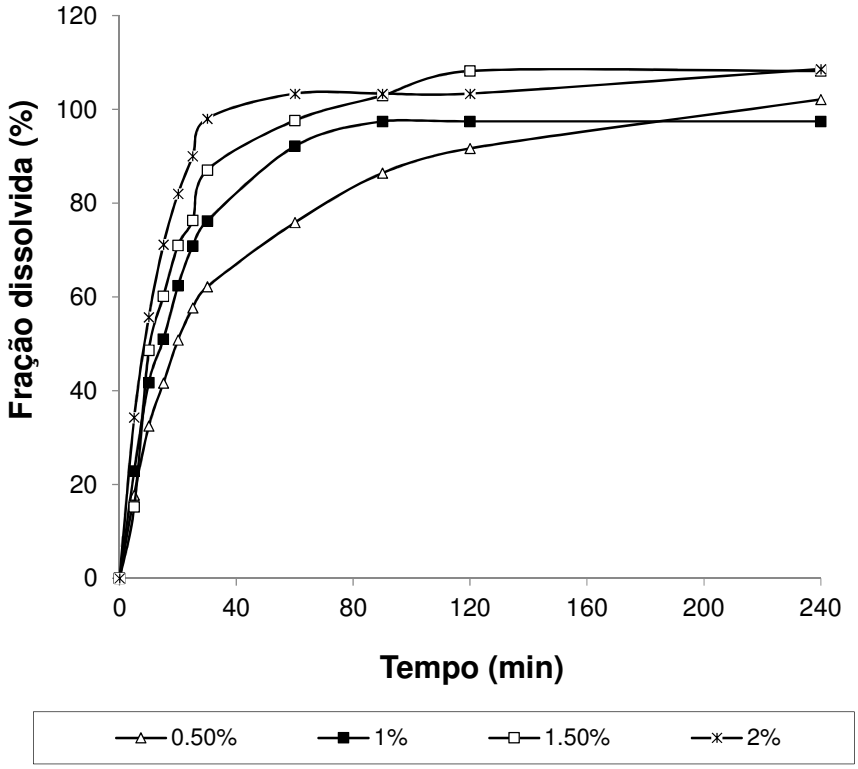


Figura 8. Perfil de dissolução construído para os comprimidos de Prezista® (n = 3) usando 0,5, 1, 1,5 e 2% de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meios de dissolução e o aparato II a 75 rpm.

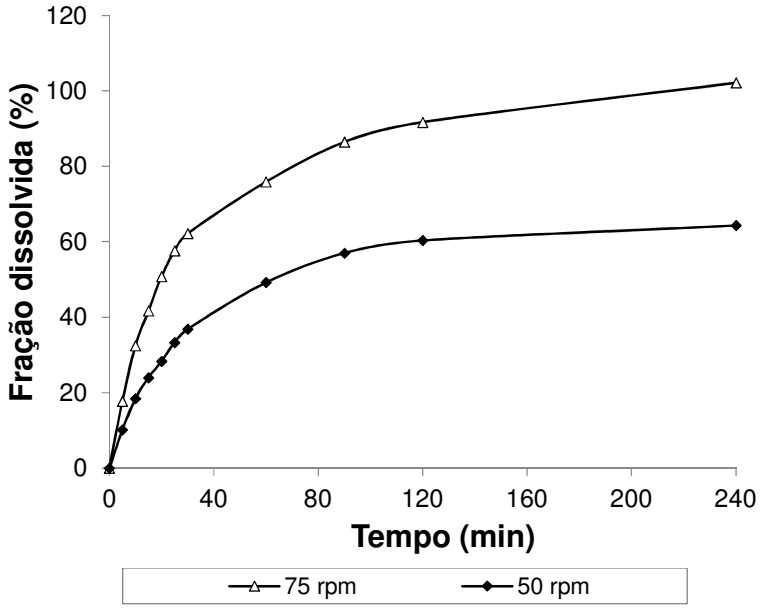


Figura 9. Perfil de dissolução construído para os comprimidos de Prezista® (n = 12) usando 0,5 % de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meio de dissolução e o aparato II a 50 e 75 rpm.

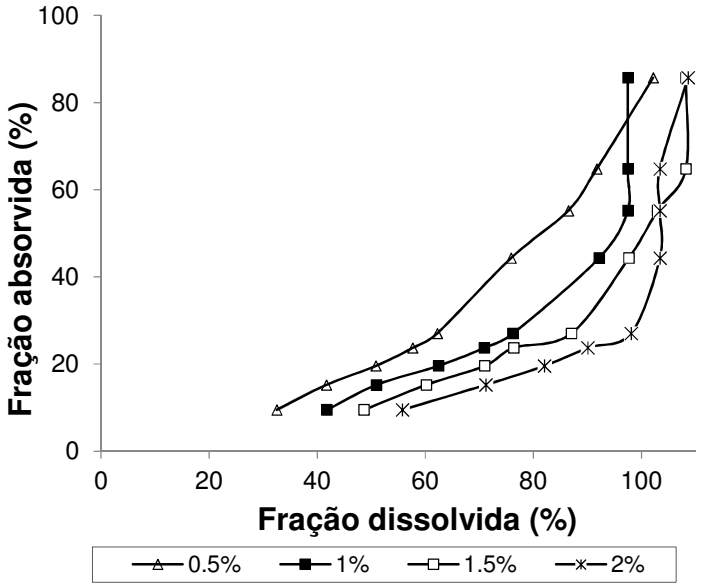


Figura 10. Curva de porcentagem de dose absorvida vs. porcentagem de dose dissolvida de comprimidos de Prezista® quando empregado 0,5, 1, 1,5 e 2% de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meios de dissolução e o aparato II a 75 rpm.

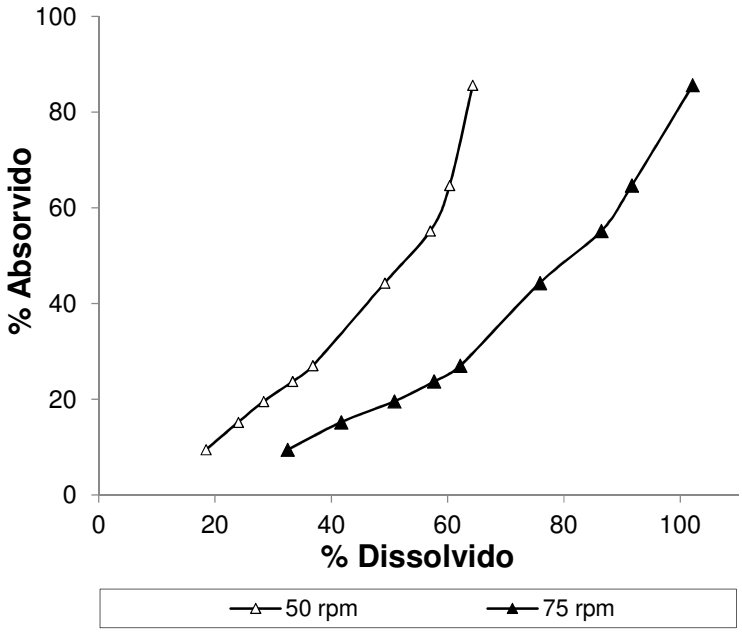


Figura 11. Curva de porcentagem de dose absorvida vs. porcentagem de dose dissolvida de comprimidos de Prezista® quando empregado 0,5% de Tween 20® em tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 como meio de dissolução e o aparato II a 50 e 75 rpm.

Tabela 8. Análise de regressão para cada uma das correlações construídas

Meio	Inclinação	Intercepto	Coeficiente de determinação (r^2)
TF[a] (0,5% Tween 20®), 50 rpm	1,484	22,957	0,941
TF[a] (0,5% Tween 20®), 75 rpm	**1,059**	**32,388**	**0,950**
TF[a] (1% Tween 20®), 75 rpm	1,078	43,889	0,797
TF[a] (1,5% Tween 20®), 75 rpm	1,082	53,040	0,829
TF[a] (2% Tween 20®), 75 rpm	1,190	69,554	0,676

[a] TF: tampão fosfato, pH 3,0.

Toda a informação vinda do perfil de dissolução *in vitro* e perfil de absorção *in vivo* foi usada para a construção da correlação linear que foi feita sobreponível pelo uso de um fator de escala igual a 6.

5.3.4 Adequação e validação do método espectrofotométrico para o ensaio de perfil de dissolução

O método espectrofotométrico desenvolvido e validado para a determinação do darunavir teve sua validação checada empregando como solvente das amostras e branco o meio de dissolução escolhido. A Tabela 9 apresenta os resultados de interferência de placebo para o método espectrofotométrico ao utilizar o meio de dissolução como solvente.

Tabela 9. Interferência do placebo na determinação de darunavir em amostra de dissolução usando espectrofotometria UV

Meio	**Interferência (%)**	
	Ordem zero (267 nm)	**Primeira ordem (276 nm)**
Tampão fosfato 0,05 *M*, pH 3,0 (0,5% de Tween 20®)	2,33	0

A linearidade do método foi provada entre as concentrações de 9 a 21 µg/mL. A concentração do meio da curva foi selecionada como concentração de trabalho (15 µg/mL). A linearidade foi avaliada por regressão pelo método dos mínimos quadrados e apresentou boa linearidade na faixa de concentração testada. O coeficiente de determinação é igual a 0,994 e a equação da reta é $y = 0{,}001509x - 0{,}00055$ (*y,* amplitude do espectro derivado em primeira ordem medido em 276 nm; *x,* concentração µg/mL) (Tabela 10). A ANOVA mostrou que a linearidade é estatisticamente significativa (F calculado < F crítico; $P = 0{,}05$).

Tabela 10. Valores dos parâmetros determinados na validação analítica para determinação do darunavir durante os estudos de dissolução e solubilidade

Parâmetros	**Resultados**
Concentração de trabalho, µg/mL	15,0
Curva analítica	0,001509X – 0,00055
Coeficiente de determinação (r^2)	0,994
DPR intradia (%)	2,14
DPR interdia (%)	3,24
Recuperação (%)	96,59
DPR da recuperação (%)	0,85
Limite de detecção[a], µg/mL	0,80
Limite de quantificação[b], µg/mL	2,67

[a] 3 σ/S; [b] 10 σ/S.

A precisão do método foi medida em todos os níveis de concentração apresentando DPR igual a 2,14 e 3,24 %, respectivamente para os testes realizados intradia e interdia (Tabela 10). A exatidão do método, determinada pelo teste de recuperação, apresentou resultado médio igual a 96,59% (Tabelas 10 e 11). Segundo a farmacopeia americana o valor mínimo de recuperação para o ensaio de dissolução é 95% (USP 30, 2004; USP 32, 2009).

Tabela 11. Valores obtidos para o parâmetro exatidão estudado na validação do método proposto para determinação do darunavir durante os estudos de dissolução e solubilidade

Concentração final das amostras enriquecidas com matéria-prima (µg/mL)	**Recuperação (%)**
97,08	98,79
96,65	98,54
97,66	100,25
98,07	99,28
95,66	102,08

Os limites de detecção e de quantificação, calculados segundo o guia de validação do ICH, são, respectivamente, 0,80 e 2,67 µg/mL (Tabela 10).

O método espectrofotométrico para a determinação do darunavir durante os ensaios de dissolução provou ser linear, exato e preciso na faixa de concentração avaliada e pode ser usado no controle de qualidade e desenvolvimento de formulações contendo o fármaco.

5.4 Conclusão

O ensaio de dissolução é uma importante ferramenta no controle de qualidade de medicamentos. Uma IVIVC inclui relevância *in vivo* para as especificações *in vitro* do ensaio de dissolução, atribuindo maior valor ao teste (Emami, 2006). Um teste de alta significância foi desenvolvido, através da construção da IVIVC, para os comprimidos de Prezista® contendo 300 mg de darunavir.

As melhores condições para a avaliação *in vitro* do perfil de dissolução dos comprimidos de Prezista® foram alcançadas empregando 900 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 *M*, pH 3,0, contendo 0,5% de Tween 20® pré-aquecido a 37 ± 0,5° C como meio de dissolução e hastes do tipo pá a 75 rpm; e a quantificação feita empregando espectrofotometria derivada com leitura em 276 nm da primeira derivada do espectro UV.

A ótima correlação obtida (r^2=0,95) demonstra que o perfil de dissolução *in vitro* reflete a condição encontrada *in vivo*, e pode, portanto, ser usado como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de formulações genéricas ou outros produtos de administração oral contendo darunavir.

5.5 Participação internacional

Parte deste estudo foi realizada durante estágio de pesquisa na School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences do Trinity College Dublin, na Irlanda, sob a supervisão da Professora Dra. Deirdre M. Darcy.

6 **Estudos *in silico* para o darunavir**

O governo brasileiro tem a política de acesso livre e universal a medicamentos antirretrovirais a todos os portadores de HIV/AIDS. Os medicamentos genéricos muito têm contribuído para a manutenção e maior abrangência desta política por serem medicamentos de menor custo. O darunavir é um dos fármacos que compõe essa política e ao terminar seu período patentário se tornará alvo de formulações genéricas.

O objetivo da implementação da política de medicamentos genéricos no Brasil foi aumentar o acesso da população a medicamentos, melhorar a qualidade desses produtos e diminuir o custo dos tratamentos médicos, além de estimular a concorrência, levando a uma previsível redução de seus preços e traz benefícios a todos os segmentos envolvidos na cadeia de produção, controle, comercialização e consumo (Carvalho et al., 2006). Não só os genéricos, mas os medicamentos similares também exercem essa função no mercado.

A bioequivalência é essencial para que se faça a intercambialidade, isto é, o medicamento considerado de referência possa ser substituído pelo seu genérico, sem comprometer a eficácia ou a segurança. Casos de bioinequivalência afirmam que o desempenho do produto *in vivo* pode levar a uma resposta terapêutica diferente da esperada (Ruiz et al., 2012). Além disso, há uma questão de credibilidade do laboratório farmacêutico perante os órgãos sanitários, uma vez que todos os todos os estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa devem ser reportados à ANVISA, independentemente do resultado do estudo.

A bioequivalência de um fármaco indica a velocidade e extensão de sua absorção a partir de uma forma farmacêutica com base na curva concentração do fármaco no sangue ou urina *vs*. tempo (Storpirtis et al., 2009). As medidas de biodisponibilidade se baseiam na suposição de que haja relação direta entre a concentração do fármaco no sangue e no sítio de ação, sendo que normalmente avalia-se o pico de concentração plasmática (Cmax), o tempo gasto para alcançar o pico (Tmax) e a área sob a curva concentração sanguínea *vs*. tempo do instante 0 ao instante T (AUC_{0-T}) (Storpirtis et al., 2009).

É necessário que todo medicamento genérico seja bioequivalente ao medicamento referência, compartilhando mesmos perfis terapêuticos e mesmas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, podendo, então, ser intercambiados (Ruiz et al., 2012).

A intercambialidade entre esses produtos deve ser assegurada pelos estudos de equivalência farmacêutica, bioequivalência e biodisponibilidade relativa e, também, pela avaliação da qualidade das matérias primas empregadas e da observância nas boas práticas de fabricação de medicamentos (Bermudez, 1994; Moretto, 1999).

Os estudos de dissolução representam uma ferramenta indispensável para as várias etapas do processo de desenvolvimento farmacotécnico, e permite verificar o perfil de liberação do fármaco em meios líquidos. Na área de produção farmacêutica e controle de qualidade, os resultados do teste de dissolução podem ser empregados para detectar desvios de fabricação, para assegurar uniformidade durante a produção de um lote e reprodutibilidade lote a lote. Testes de dissolução também podem ser utilizados para avaliar mudanças após o registro do produto e podem auxiliar na decisão para a realização de estudos de bioequivalência e no desenvolvimento de correlação *in vivo-in vitro* (Marques, 2002).

O teste de dissolução está emergindo como um teste substituto de bioequivalência para certas categorias de fármacos com administração oral que tenham sido isentos de estudos *in vivo*. Para estes medicamentos, o perfil de dissolução do produto teste deve ser similar ao perfil de dissolução do produto referência, o teste pode ser usado para documentar a equivalência entre os produtos (Lobenberg, 2012).

Esse estudo teve o propósito de contribuir para o desenvolvimento racional de formulações farmacêuticas, através do emprego de ferramentas *in silico* com base em dados de dissolução *in vitro.* Estudos *in silico* vêm sendo cada vez mais utilizados devido a sua facilitade de execução e custo baixo. Além disso, novas ferramentas, *softwares* mais complexos e bases de dados mais completas têm surgido, e, à proporção que correspondências concretas entre dados *in silico* e dados *in vitro* e *in vivo* são demosntradas, aumenta a confiabilidade da comunidade científica nas ferramentas *in silico*.

Portanto, o objetivo deste estudo é elaborar e validar a utilização do *software* de modelagem farmacocinética Simcyp® para a predição do comportamento *in vivo* do darunavir, a partir de dados fisiológicos e dados de dissolução *in vitro*.

6.1 Material e métodos

O modelo avançado dissolução, absorção e metabolismo (ADAM) como uma ferramenta da modelagem farmacocinética fisiologicamente fundamentada (PBPK) pode ser um recurso importante para os formuladores. Este pode ser empregado para avaliar a bioequivalência da formulação utilizando os dados do perfil de dissolução e dados fisiológicos e farmacocinéticos. O modelo ADAM, como implementado no *software* Simcyp® *simulator* divide o trato gastrointestinal em nove segmentos anatomicamente definidos a partir do estômago até o cólon. A absorção do fármaco em cada segmento é descrita como uma função de liberação a partir da formulação levando em consideração a dissolução, precipitação, degradação luminal, permeabilidade, metabolismo, transporte e o trânsito de um segmento para outro. Supõe-se que a absorção a partir do estômago é insignificante em comparação com a do intestino delgado, e que o movimento do fármaco, na forma líquida e/ou sólida através de cada segmento do trato gastrointestinal pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. Supõe-se também que o metabolismo do fármaco no cólon é negligenciável (Jamei et al., 2009).

O perfil do darunavir no simulador Simcyp® foi construído após uma extensa pesquisa. Dados farmacocinéticos e físico-químicos do darunavir foram utilizados para o preenchimento de cada parâmetro requisitado pelo simulador (Tabela 12). Os dados de dissolução do darunavir 300 mg, comprimidos revestidos, publicados pela FDA (FDA, 2005) foram empregados para a utilização do modelo ADAM. Foi utilizada a média de dissolução a partir de onze diferentes lotes comerciais do produto. Alguns estudos clínicos publicados pela FDA (FDA, 2005) foram utilizados para avaliação do perfil construído. Estudos clínicos idênticos aos experimentais escolhidos foram simulados no *software* e os dados de área sob a curva de concentração plasmática *vs.* tempo (AUC) e máxima concentração plasmática (Cmax) obtidos após a simulação foram comparados com aqueles do estudo real, a fim de validar o perfil do darunavir.

6.2 Resultados

A Tabela 12 apresenta os dados coletados na literatura e empregados na construção do perfil do darunavir.

Tabela 12. Dados da literatura empregados na construção do perfil do darunavir no banco de dados do *software* Simcyp®

Parâmetros	Valores usados	Referência
Massa molecular	547,66	FDA, 2005; molinpiration (*web site*)
log P	3,94	ACD/labs (1994-2002); Molinpiration e drugbank (*web sites*)
Tipo de composto	Anfotérico	
pka1 (ácido)	13,59	ACD/labs (1994-2002); Molinpiration e drugbank (*web sites*)
pka2 (básico)	2,39	ACD/labs (1994-2002)
B/P	0,59	drugbank (*web site)*
Fração livre no plasma	predito pelo *software*	
Componentes ligados no plasma	Glicoproteína ácida a1	FDA, 2005; Sekar et al., 2006a
ADAM modelo (TGI)	predito pelo *software*	
fuGut*	1	**
Caco-2 (A-B, 6.5:7.4, passivo)	25	Holmstock et al., 2010
Formulação sólida	liberação imediata	
Dissolução	perfil publicado	FDA, 2005
Distribuição		
Modelo completo *PBPK* Vss (L/kg)	predito pelo *software*	
Método	2	
Eliminação		
Clearance in vivo	32,8(L/h) DPR(%) 28,34	FDA, 2005; Sekar et al., 2006a
Qual a % de contribuição da CYP3A?	100%	FDA, 2005
Interação CYP (inibição competitivo)		
CYP2C9	ki = 52	FDA, 2005
CYP2C19	ki = 25	FDA, 2005
CYP2D6	ki = 41	FDA, 2005
CYP3A4	ki = 0,4	FDA, 2005

* Fração livre no trato gastrintestinal;

**Segundo o guia do *software*, não havendo informação disponível usa-se o valor 1.

Estudos clínicos foram simulados no *software* Simcyp® para o darunavir. Os dados dos ensaios clínicos são os mesmos daqueles ensaios publicados pela FDA (FDA, 2005) e são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Dados dos estudos clínicos publicados usados para validar o perfil do darunavir no *software* Simcyp®

Ensaio	Dose	Formulação	Estado de alimentação	Número de voluntários	Referência
1	800	comprimido	jejum	9	FDA, 2005
2	800	comprimido	alimentado	9	
3	150	Solução para administração intravenosa (infusão de 1 h)	--	7	

Os resultados para os parâmetros de concentração máxima e área sob a curva obtidos na simulação foram confrontados com aqueles dos ensaios publicados (Tabela 14). Estes resultados foram plotados a fim de verificar o nível de correlação entre eles, o que é apresentado na Figura 12 (A e B).

Tabela 14. Dados obtidos de estudos clínicos publicados e através da simulação *in silico* dos estudos *in vivo* empregando o *software* Simcyp®

Ensaio	Dados experimentais			Dados simulados		
	AUC	Cmax	Tmax	AUC	Cmax	Tmax
1	4,23	0,81	0,99	5,24	1	1,89
2	7,21	1,42	1,50	6,44	1,08	2,52
3	4,73	3,43	0,97	4,86	2,72	0,99

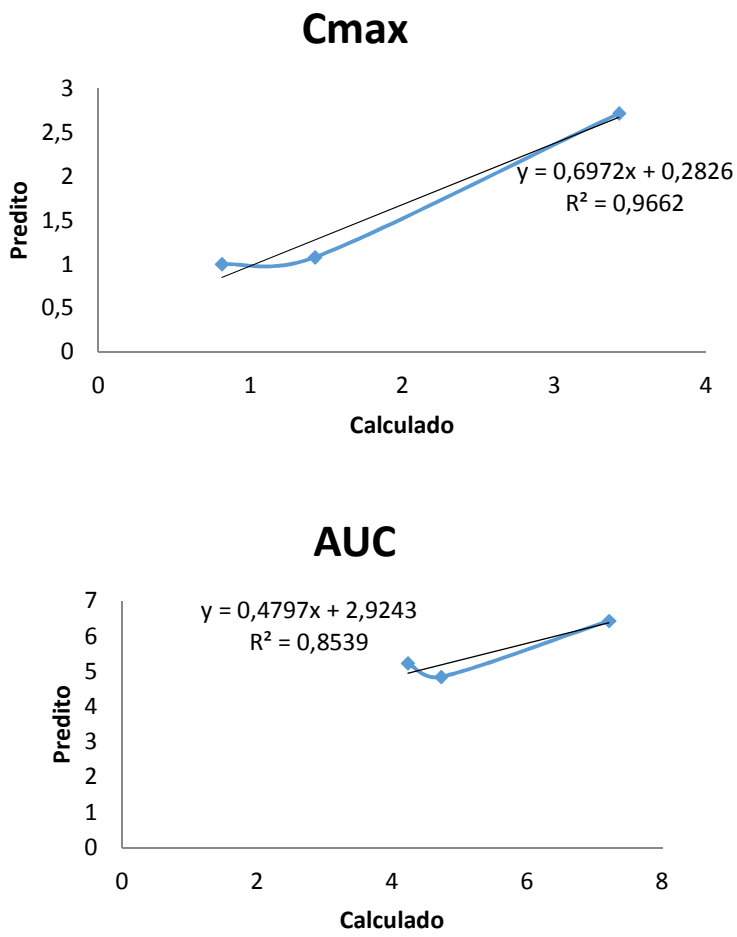


Figura 12. Curvas construídas usando os dados de Cmax (A) e AUCinf (B) obtidos nos estudos clínicos publicados e aqueles simulados pelo *software* Simcyp®

É possível observar que foi alcançada correlação entre os dados acima de 80% (r^2=0,8539 e 0,9662), o que é considerado muito bom para esse tipo de correlação. Os dados de dissolução empregados no estudo foram os publicados pela FDA (FDA, 2005) por ser o único disponível naquele momento em que esse estudo foi realizado.

6.3 Participação internacional

Este estudo foi realizado durante o doutorado sanduíche na University of Florida sob a supervisão do Professor Dr. Hartmut Derendorf.

PARTE III

ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Os fármacos e medicamentos devem ser estáveis o suficiente para garantir sua atividade terapêutica e a segurança do paciente. No entanto, a maioria dos fámacos apresenta-se instável sob alguma condição relevante para sua utilização e/ou administração, tais como condições climáticas, solvente ou fluidos biológicos.

Estudos a respeito da estabilidade dos fármacos e formulações são, então, uma importante área de pesquisa. Como forma de suporte a estes estudos é imprescindível a utilização de métodos analíticos que sejam indicativos de estabilidade, ou seja, que sejam capazes de apontar a degradação do fármaco e monitorar os principais produtos de degradação.

7 Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação amplamente empregada em estudos de estabilidade, principalmente por possibilitar a separação entre o fármaco em análise e seus produtos de degradação, podendo assim servir como indicativo da estabilidade do produto.

No desenvolvimento analítico buscou-se um método simples, otimizado e que fosse indicativo de estabilidade. Para isso, alguns parâmetros cromatográficos foram considerados como o número de pratos teóricos (N) e o fator de retenção (k'), equações 3 e 4, respectivamente.

$$N = \frac{16 \times (tR)^2}{W^2} \qquad \text{(equação 3)}$$

Em que, *tR* é o tempo de retenção, *W* é a largura na base, em unidades de tempo.

$$k' = \frac{tR - tM}{tM} \qquad \text{(equação 4)}$$

Em que, *tR* é o tempo de retenção do fármaco e *tM* é o tempo morto.

A estabilidade pode ser definida como a capacidade de uma substância, fármaco ou produto, permanecer dentro das especificações estabelecidas e manter a sua identidade, potência, qualidade e pureza ao longo do tempo até a expiração de seu prazo de validade. O teste de estabilidade de um fármaco ou medicamento pode fornecer evidência sobre a qualidade do medicamento e das influências de fatores ambientais, tais como, temperatura e umidade. As degradações químicas e físicas dos fármacos podem resultar em efeito terapêutico alterado e mesmo em efeitos tóxicos. Portanto, entender os fatores que alteram a estabilidade de fármacos e identificar formas de garantir a sua estabilidade são de extrema importância.

7.1 Materiais e métodos

Foram utilizados o padrão de darunavir, a matéria-prima extraída, os comprimidos de Prezista® e o placebo.

A acetonitrila grau HPLC foi adquirida da J.T. Baker (Center Valley, EUA) e Tedia (Fairfield, EUA). Água ultrapurificada (resistividade maior que 18,2 MΩ.cm) foi obtida usando Direct-QR® sistema de água (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Antes da utilização, os solventes da fase móvel foram desgaseificados em banho de ultrassom durante 30 min. Hidróxido de sódio, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água purificada foi utilizada para preparar a fase móvel; as soluções padrão e amostra foram filtradas através de membrana de celulose regenerada com tamanho de poros igual a 0,45 µm.

A análise por CLAE foi realizada utilizando cromatógrafos acoplados a detector UV-Vis e PDA e coluna cromatográfica C18 (Waters® Symmetry, Milford, MA, EUA), com dimensões de 5 µm, 4,6 mm x 250 mm.

7.2 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada de modo isocrático, com fase móvel constituída por acetonitrila:água (50:50, v/v) em vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e o comprimento de onda de detecção de 267 nm. O tempo de execução total foi de 9 min. Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25° C) e a área total do pico foi utilizada para quantificar o darunavir.

7.3 Preparação das soluções padrão

A solução padrão de darunavir foi preparada dissolvendo 3,0 mg da substância química de referência, que, seguidamente, foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Darunavir foi solubilizado em 20 mL de metanol e 50 mL de água, mantido em banho de ultrassom durante 10 min, e o volume foi completado com água. Em seguida, através de diluição, soluções de diferentes concentrações foram preparadas. Os balões volumétricos foram completados com água e as seis concentrações finais obtidas foram: 6, 9, 12, 15, 18 e 21 µg/mL de darunavir.

7.4 Preparação da solução amostra

Para preparar a solução da amostra, 20 comprimidos de darunavir foram pesados e pulverizados. Uma quantidade equivalente a 3,0 mg de darunavir foi transferida para balão volumétrico de 100 mL com 20 mL de metanol e 50 mL de água, mantida em banho de ultrassom durante 10 min, e o volume foi completado com água. As seis concentrações finais foram preparadas empregando as mesmas diluições utilizadas na preparação das soluções padrão.

Do mesmo modo, uma solução placebo foi preparada na concentração de trabalho (15 µg/mL), evidentemente, sem a presença do darunavir. Para o ensaio de reprodutibilidade, durante a validação do método, fármaco foi acrescentado à solução placebo, a fim de obter as mesmas concentrações usadas no ensaio de linearidade.

7.5 Estudos de degradação ácida, básica, neutra e oxidativa

Os estudos de estresse foram realizados com o intuito de verificar a estabilidade do darunavir e contribuir para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. Durante os estudos pode-se observar que o darunavir é bastante instável e apresenta muitos produtos de degradação em condições oxidativa e ácida. Em meio básico o fármaco é, praticamente, degradado completamente.

Foram preparadas soluções de hidróxido de sódio 0,1 *M*, ácido clorídrico 0,1 *M*, água deionizada e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% v/v contendo darunavir na concentração de 15 µg/mL. Metanol na concentração de 20 % foi utilizado para facilitar a solubilização do fármaco. As soluções foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, foram submetidas a banho de aquecimento a 90° C por 3, 6 e 12 horas. As alíquotas retiradas foram neutralizadas e filtradas em filtros de seringa de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm. Soluções branco foram igualmente preparadas, mas sem a adição de darunavir, e foram analisadas por CLAE. Os cromatogramas referentes a estas soluções podem ser vistos na Figura 13. Para melhor visualização dos diferentes picos referentes a possíveis produtos de degradação, especial atenção foi dada à região próxima à linha de base dos cromatogramas. Observando o eixo da ordenada, é possível verificar que os possíveis produtos de degradação se apresentaram em maior abundância sob estresse alcalino, seguido pelo estresse ácido. O procedimento de estudos de degradação foi realizado de acordo com o guia do ICH para estudos de estabilidade (ICH, 2003).

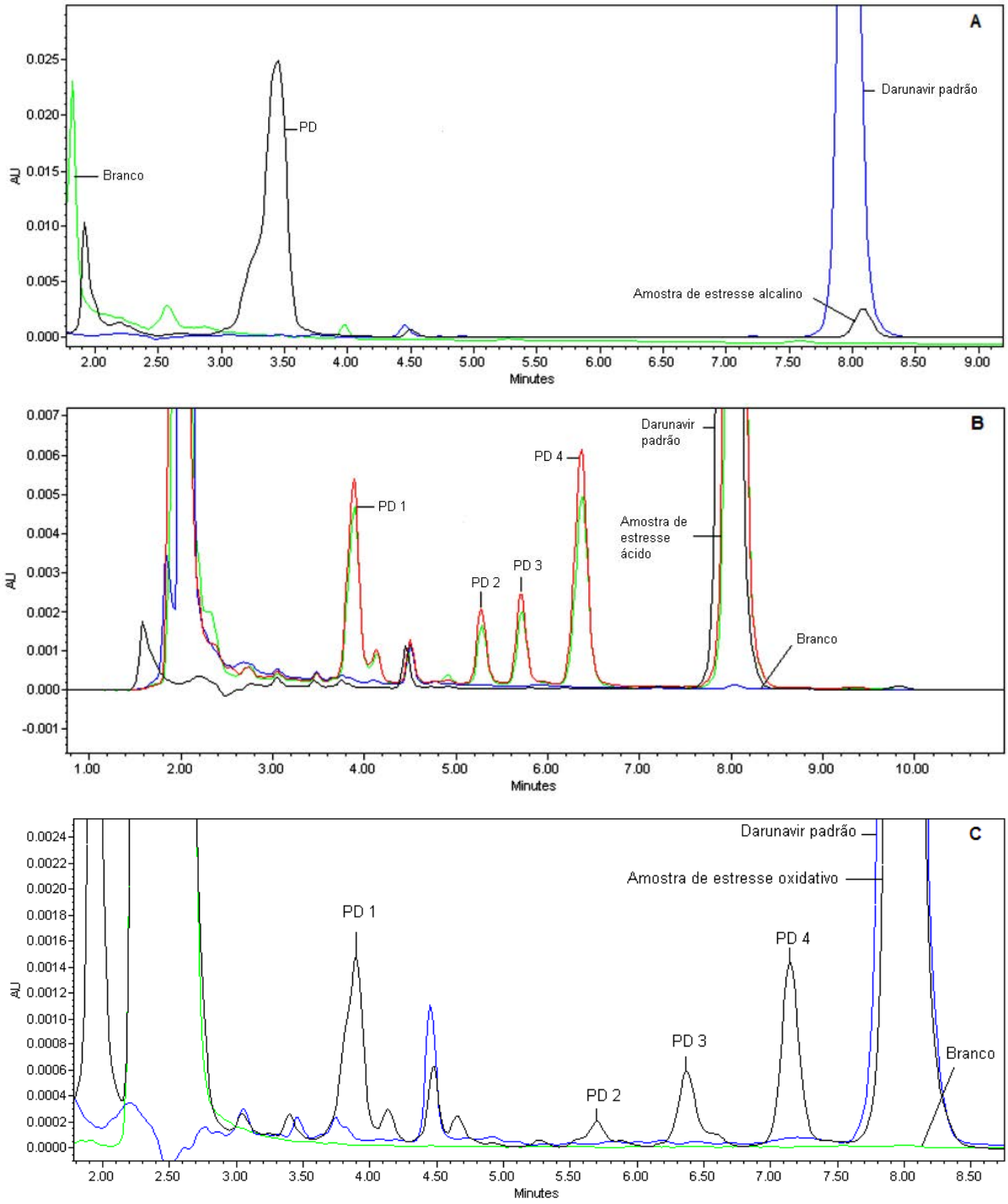


Figura 13. Cromatogramas obtidos a partir de sobreposição das soluções de estresse alcalino (A), ácido (B) e oxidativo (C) de darunavir sob aquecimento a 90° C durante 3 horas. Os possíveis produtos de degradação (PD) são mostrados.

O estudo de degradação forçada foi conduzido de modo a promover degradação em extensão que permitisse a avaliação da formação de produtos de degradação, sem, no entanto, consumir completamente o fármaco. Segundo normativa da ANVISA (RDC 58/2013), estes testes devem promover uma degradação superior a 10% e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste. Os resultados desses ensaios devem ser usados como suporte para o desenvolvimento e a validação da metodologia de análise dos produtos de degradação formados e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento (BRASIL, 2013).

Uma das limitações deste teste para o darunavir está ligada à sua baixa solubilidade aquosa. De modo que, nos ensaios conduzidos em água e em meio oxidativo, metanol (20%) teve que ser empregado para assegurar a solubilização do fármaco nos solventes. Durante as reações de degradação a molécula do solvente orgânico pode interferir, fazendo parte das reações e levando a falsos produtos de degradação.

7.6 Validação analítica

A especificidade do método foi determinada por análises do darunavir padrão, matéria-prima, produto acabado e placebo, e submetendo as soluções de estudo de degradação forçada em meios ácido, básico, neutro e oxidativo, às condições cromatográficas a fim de avaliar a interferência na quantificação de darunavir. O método foi validado de acordo com o guia do ICH para validação (ICH, 2005). A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros cromatográficos monitorados durante o desenvolvimento analítico.

Tabela 15. Parâmetros cromatográficos e critérios de aceitação para a determinação do darunavir pelo método desenvolvido por CLAE

Parâmetros cromatográficos	**Resultados**	**Critérios de aceitação**
t_R (tempo de retenção, min)	7,4	-
T_0 (tempo morto, min)	1,2	-
k' (fator de retenção)	5,16	2 < k' < 10
N (eficiência da coluna)	2433	N > 2000

O método foi aplicado para o controle da qualidade da matéria-prima e do produto e para quantificar o fármaco durante os estudos de estabilidade. As amostras foram submetidas a detector PDA e os picos se revelaram puros. Não houve coeluição de impureza degradada com o pico do darunavir (Figuras 3 e 13).

A validação do método foi verificada por meio da análise de variância (ANOVA). De acordo com a ANOVA há regressão linear na faixa de concentrações testadas, 6-21 µg/mL (Fcalculado < Fcrítico, P = 0,05). A equação da curva é y = 43272,84X + 6875,41 e o coeficiente de determinação é 0,997.

A precisão do método foi determinada por repetibilidade (durante o mesmo dia) e precisão intermediária (interdia) e foi expressa como DPR (%) de uma série de medições. O resultado obtido mostra DPR igual a 1,75% para a precisão intradia indicando boa precisão nas medições. A variabilidade interdia foi calculada a partir de ensaios em 3 dias diferentes e com analista diferente e apresentou DPR de 3,28% (Tabela 16).

A exatidão do método foi determinada pela média de recuperação, empregando a técnica de placebo enriquecido. O resultado médio foi de 99,64% (Tabelas 16 e 17) que indica ótima concordância entre o valor verdadeiro e o valor encontrado.

Tabela 16. Parâmetros de validação para o método cromatográfico desenvolvido para a quantificação do darunavir

Parâmetros	**Método cromatográfico**
Concentração de trabalho, µg/mL	15,0
Equação da reta	43272,84X + 6875,41
Coeficiente de determinação (r^2)	0,997
DPR da repetibilidade (%)	1,75
DPR da precisão intermediária (%)	3,28
Exatidão (%)	99,64
DPR da exatidão (%)	1,36
Limite de detecção[a], µg/mL	0,87
Limite de quantificação[b], µg/mL	2,89

[a] 3 σ/S; [b] 10 σ/S.

Tabela 17. Dados de recuperação de soluções padrão adicionadas ao placebo analisadas pelo método cromatográfico proposto

Concentração (µg/mL)	**Recuperação[a] (%) ± DPR[b]**
6,0	101,5 ± 0,5
9,0	99,9 ± 1,0
12,0	98,5 ± 0,6
15,0	98,8 ± 1,2
18,0	98,9 ± 0,7
21,0	98,9 ± 1,0

[a] Média de três réplicas; [b] Desvio padrão relativo.

7.6.1 Emprego de combinação fatorial na avaliação da robustez do método proposto

Robustez é a capacidade que o método possui em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para o desenvolvimento de métodos devem-se realizar variações nos parâmetros considerados críticos e passíveis de erros. Assim, mudanças pequenas e

deliberadas dos parâmetros analíticos críticos são feitas e as possíveis alterações nos resultados são monitoradas. Um método é considerado robusto quando as alterações testadas não produzem mudanças significativas nos resultados.

Youden & Steiner (1975) propuseram um método que aplica combinação fatorial para o ensaio de robustez. Esse método permite não apenas avaliar a robustez como também a influência de cada parâmetro no resultado final. No teste de Youden, sete parâmetros são escolhidos e avaliados por oito pequenas variações analíticas de acordo com a combinação fatorial (Cesar & Pianetti, 2009). Para determinar a influência de cada parâmetro, a média dos resultados das quatro medidas em que o parâmetro sofreu alteração é comparada com a média dos resultados das quatro outras medidas em que o parâmetro não foi alterado. Sabendo se algum parâmetro apresenta alta influência sobre o resultado analítico, é possível estabelecer critérios mais rigorosos para evitar eventuais variações durante a rotina analítica (Cesar & Pianetti, 2009).

O teste de robustez de Youden & Steiner (1975) pode avaliar a interferência de mudanças pequenas e deliberadas em sete parâmetros sobre o ensaio de teor do fármaco. Os parâmetros avaliados foram: coluna cromatográfica (A/a), comprimento de onda (B/b), vazão (C/c), fase móvel (D/d), tempo de sonicação (E/e), temperatura da coluna (F/f) e marca da acetonitrila (G/g). A Tabela 18 mostra as combinações fatoriais de parâmetros analíticos avaliados. Quando possível, os parâmetros analíticos foram variados para mais (letra minúscula) e para menos (letra minúscula com linha) em relação às condições estabelecidas durante o desenvolvimento analítico. A Tabela 19 mostra os parâmetros analíticos e suas variações.

Tabela 18. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez através do teste de Youden & Steiner.

Variáveis	**Combinação fatorial**							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A,a	A	A	A	A	a/a'	a/a'	a/a'	a/a'
B,b	B	B	b/b'	b/b'	B	B	b/b'	b/b'
C,c	C	c/c'	C	c/c'	C	c/c'	C	c/c'
D,d	D	D	d/d'	d/d'	d/d'	d/d'	D	D
E,e	E	e/e'	E	e/e'	e/e'	E	e/e'	E
F,f	F	f/f'	f/f'	F	F	f/f'	f/f'	F
G,g	G	g/g'	g/g'	G	g/g'	G	G	g/g'
Resultados	*s*	*t*	*u*	*V*	*x*	*y*	*w*	*z*

Para avaliar o efeito de cada variação no doseamento do darunavir foi usada a seguinte equação.

$$\boldsymbol{A} = \frac{\boldsymbol{x} + \boldsymbol{y} + \boldsymbol{w} + \boldsymbol{z}}{4} - \frac{\boldsymbol{s} + \boldsymbol{t} + \boldsymbol{u} + \boldsymbol{v}}{4} \qquad \text{(equação 5)}$$

A alteração mais pronunciada sobre o ensaio de teor do darunavir foi mostrada quando o parâmetro de tempo de sonicação foi modificado. Os valores obtidos pela equação acima são: E, e (1,26%) e E, e' (1,50%). Os resultados referentes aos outros parâmetros foram consideravelmente baixos e sem significância, mostrando que pequenas mudanças não implicam em grandes variações quando ocorrem de forma não intencional.

Tabela 19. Parâmetros analíticos e suas variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para a quantificação do darunavir em presença de produtos de degradação

	Parâmetros	**Variação**
A	Coluna cromatográfica	A: Waters Symmetry®, [a] a: Agilent®, [a]
B	Comprimento de onda	B: 267 nm b: 268 nm b': 266 nm
C	Vazão	C: 1,0 mL/min c: 1,1 mL/min c': 0,9 mL/min
D	Fase móvel	D: 50:50[b] d: 55:45[b] d': 45:55[b]
E	Tempo de sonicação	E: 10 min e: 11 min e': 9 min
F	Temperatura da coluna	F: 25° C f: 20° C
G	Marca da acetonitrila	G: JTBaker® g: Tedia®

[a] C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm; [b] acetonitrila:água.

Para a rotina do controle de qualidade de medicamentos, é essencial empregar método analítico bem caracterizado e totalmente validado para a obtenção de resultados fiáveis que podem ser interpretados de forma satisfatória.

A escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada, em determinada forma farmacêutica. Precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade são características fundamentais de um método analítico (USP 35, 2012; Ermer, 2001), porém outros fatores como: a disponibilidade de

instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional podem também ser consideradas.

O método desenvolvido é simples e eficiente e foi validado mostrando ser exato, preciso, específico e robusto para quantificar o darunavir na presença de produtos de degradação.

O método proposto foi usado com sucesso para determinar o darunavir matéria-prima e comprimidos, mesmo em presença de produtos de degradação. Os resultados dos estudos de validação mostram que o método cumpre todos os requisitos e não sofre qualquer interferência dos excipientes e é capaz de separar o pico do darunavir de seus possíveis produtos de degradação. Os resultados dos testes de estresse mostraram que o fármaco é significativamente instável em meios oxidativos, ácido e alcalino. Nestas condições e sob aquecimento, novas substâncias são produzidas, possíveis produtos de degradação. Com alta probabilidade, em meio básico a molécula de darunavir tem seu carbamato completamente hidrolisado. Os produtos de degradação formados estiveram sob investigação a fim de conhecer sua molécula e a via de degradação do darunavir. O método validado pode ser recomendado para avaliar a qualidade do darunavir matéria-prima e comprimidos e para monitorar o fármaco durante os estudos de estabilidade.

7.7 Publicações

Este método desenvolvido e validado foi publicado na revista Chromatography Research International.

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Cristina Helena dos Reis Serra, Hérida Regina Nunes Salgado. Stability Study of Darunavir Ethanolate Tablets Applying a New Stability-Indicating HPLC Method. *Chromatography Research International*, Article ID 834173, 7 pages, 2013.

8 Espectrometria de massas

8.1 Introdução

A degradação físico-química de fármacos pode resultar em perda de eficácia terapêutica e, eventualmente, intoxicar pacientes. O completo entendimento dos fatores que alteram a estabilidade dos produtos farmacêuticos e a identificação dos meios disponíveis para manutenção de sua estabilidade são essenciais na garantia da eficácia e segurança da terapêutica. O objetivo desta investigação foi avaliar a estabilidade do darunavir, separar e identificar os principais produtos de degradação gerados sob diferentes condições de estresse. Uma abrangente avaliação da degradação do darunavir foi realizada ao submetê-lo à análise por cromatografia acoplada a espectrômetro de massas. O fármaco foi submetido à hidrólise (ácida e básica), oxidação e estresse térmico, em acordo com o guia do ICH para estudos de estabilidade (Q1A(R2)), (ICH, 2003). A rota de fragmentação do darunavir foi estudada com o auxílio de um analisador espectrométrico de massas híbrido do tipo QToFMS, o qual possui alta resolução e proporciona a obtenção de massas exatas.

- ***Estudo de estresse***

Os comprimidos pulverizados de darunavir e seu placebo foram dissolvidos em meios aquosos básico (0,1 *M* NaOH), ácido (0,1 *M* HCl) e oxidativo (3% v/v H_2O_2) e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos e em banho de aquecimento a 90° C por 3, 6 e 12 horas. Após este tempo de exposição, as amostras foram analisadas.

- ***Condições analíticas***

O método cromatográfico indicativo de estabilidade desenvolvido e validado para o darunavir foi adaptado às condições analíticas necessárias ao acoplamento com o espectrômetro de massas. Para a separação foi utilizada coluna C18 (Phenomenex® Kinetex 2,6 µm, 100 x 2,1 mm) e fase móvel em modo isocrático composta por

(ACN:ácido fórmico 0,1% 40:60 v/v, 0,25 mL/min). As análises espectrométricas foram feitas usando-se ionização por *electrospray* no modo positivo. As condições da fonte de íons foram: pressão de nebulização de 4 bar, gás de secagem a 8 L/min com temperatura de 200º C e DDP em relação ao capilar do *electrospray* a 4.500 V. O tempo de aquisição de espectros em modo MS e MS/MS foi de 1 segundo, na faixa de 50 a 3.000 m/z. Nos experimentos de MS/MS, a energia de colisão (para fragmentação) foi de 20 eV usando-se gás nitrogênio e janela de isolamento de 10,0 m/z em relação à m/z nominal selecionada.

8.2 Resultados e discussão

O cromatograma (a) e o espectro de massas (b) obtidos para o darunavir matéria-prima são apresentados na Figura 14. No espectro de massas é possível observar o pico principal de relação massa/carga igual a 548,2 e dois principais fragmentos, 436,1 e 392,2 m/z.

O darunavir é instável quando submetido a meios básico, ácido e oxidativo e nessas condições alguns possíveis produtos de degradação surgiram. Em meio alcalino o fármaco foi rapidamente degradado, possivelmente devido à hidrólise da função carbamato presente na molécula do fármaco (Figura 15).

As Figuras 15, 16 e 17 apresentam os cromatogramas e os espectros de massas e com especial enfoque para produtos de degradação gerados com maior intensidade em meios básico, ácido e oxidativo, que foram avaliados por MS/MS. As estruturas propostas para o principal produto de degradação e a sua rota de fragmentação são mostrados nas Figuras 18 e 19. Sob meio ácido, muitos produtos de degradação foram formados com intensidade semelhante. A figura 16 apresenta o espectro de massas para o produto de degradação enumerado como 1.

Para a solubilização do darunavir no meio aquoso oxidativo (H_2O_2 3% v/v) foi necessária a utilização de metanol, e este pode ter feito parte da reação de degradação e contribuído para a formação do produto de degradação de maior intensidade (pico 1), que apresentou ganho de massa (Figuras 17 e 19).

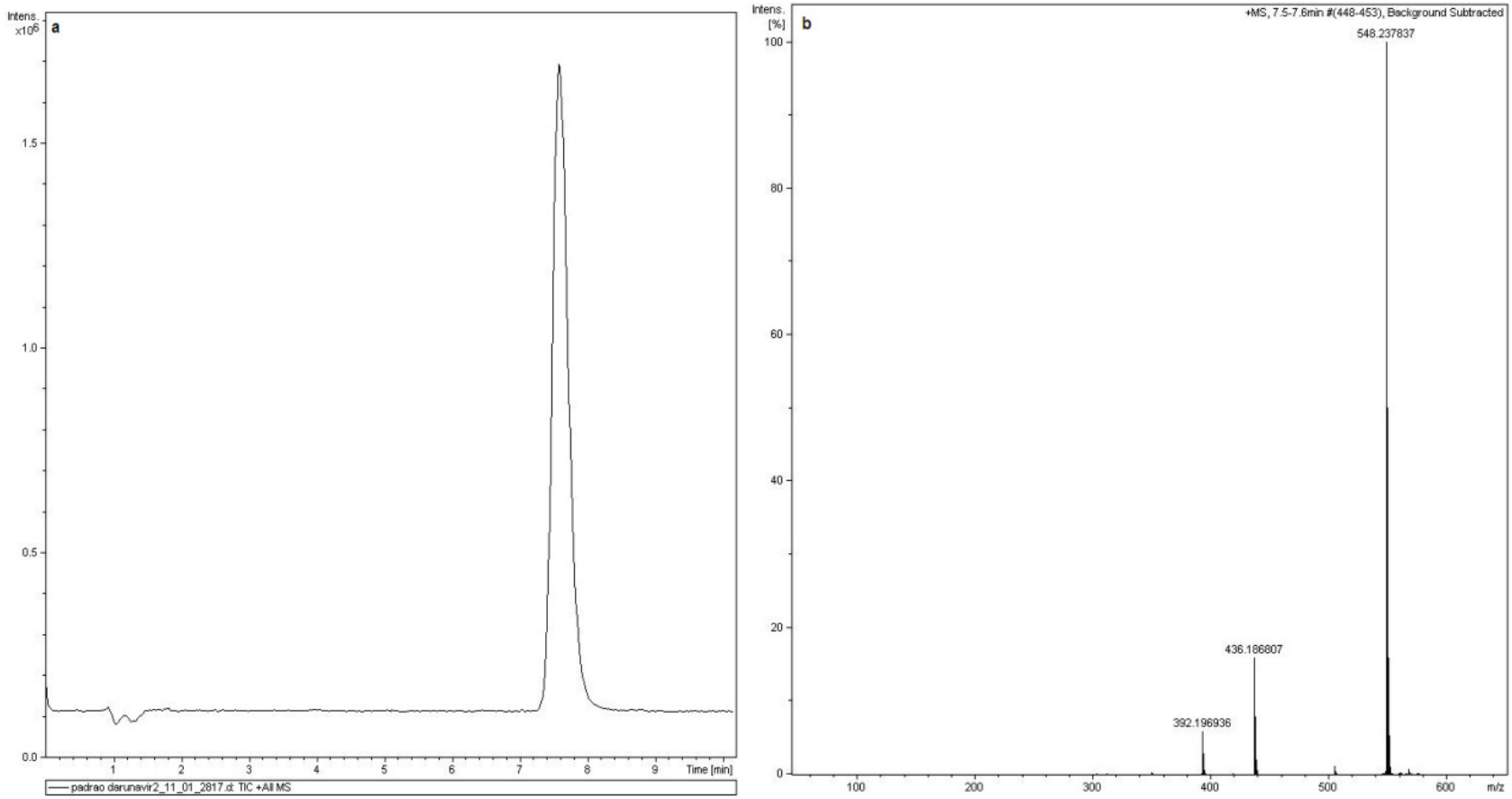


Figura 14. Cromatograma (a) e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para darunavir matéria-prima.

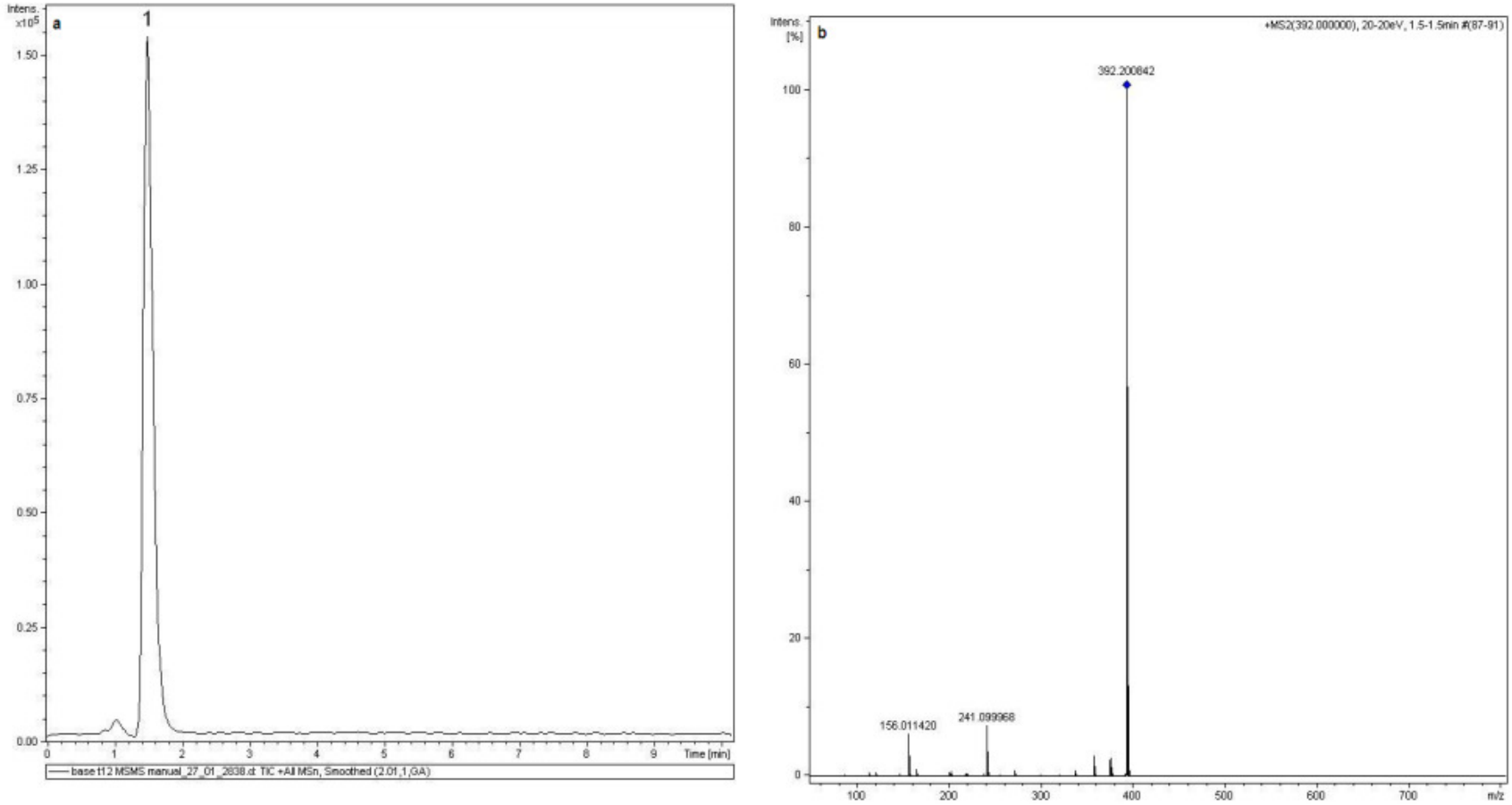


Figura 15. Cromatograma (a) e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para as amostras de darunavir sob estresse básico.

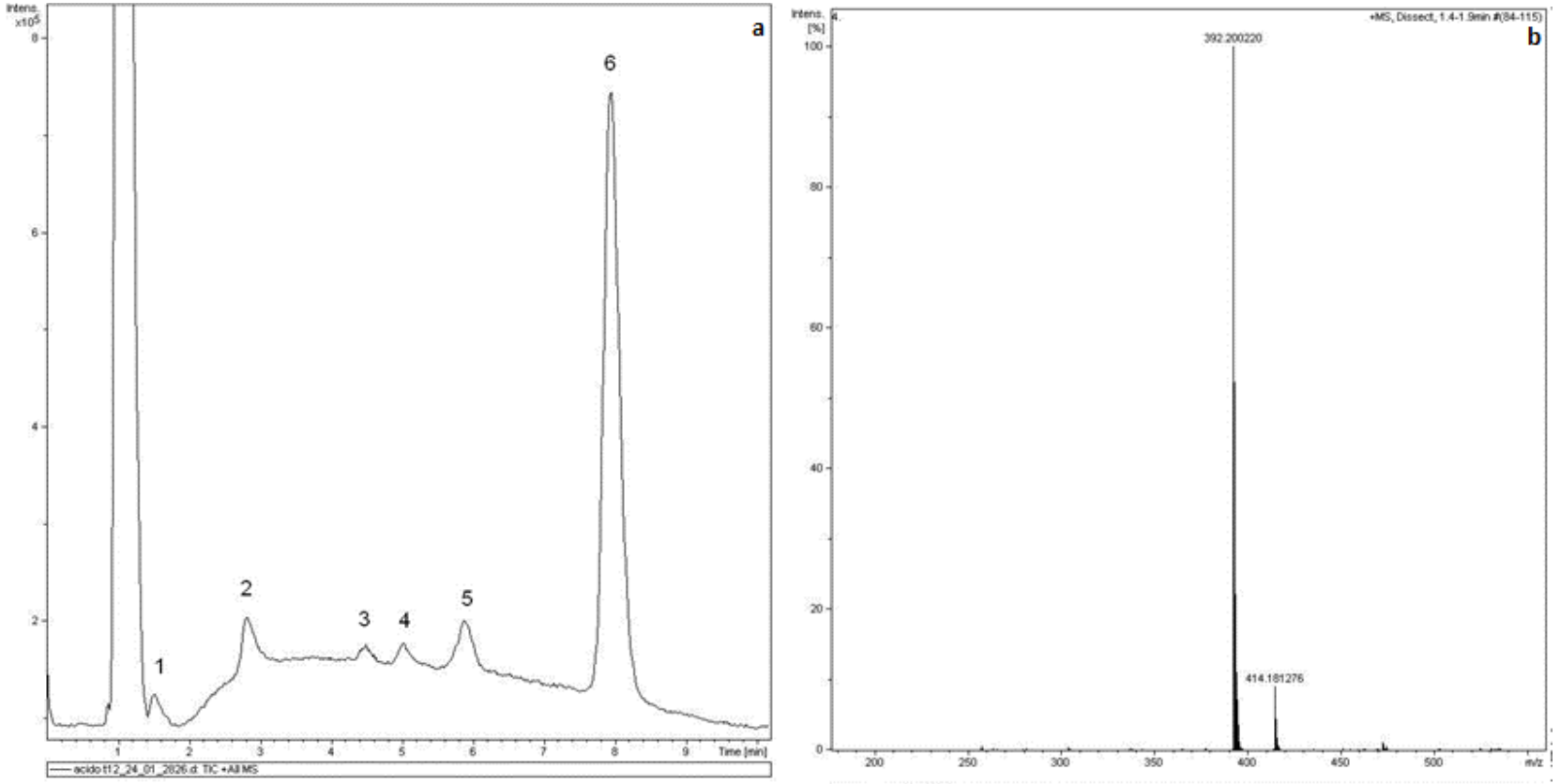


Figura 16. Cromatograma (a) da solução de darunavir sob estresse ácido e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para o produto de degradação enumerado como pico 1. O pico enumerado como número 6 é o pico do fármaco.

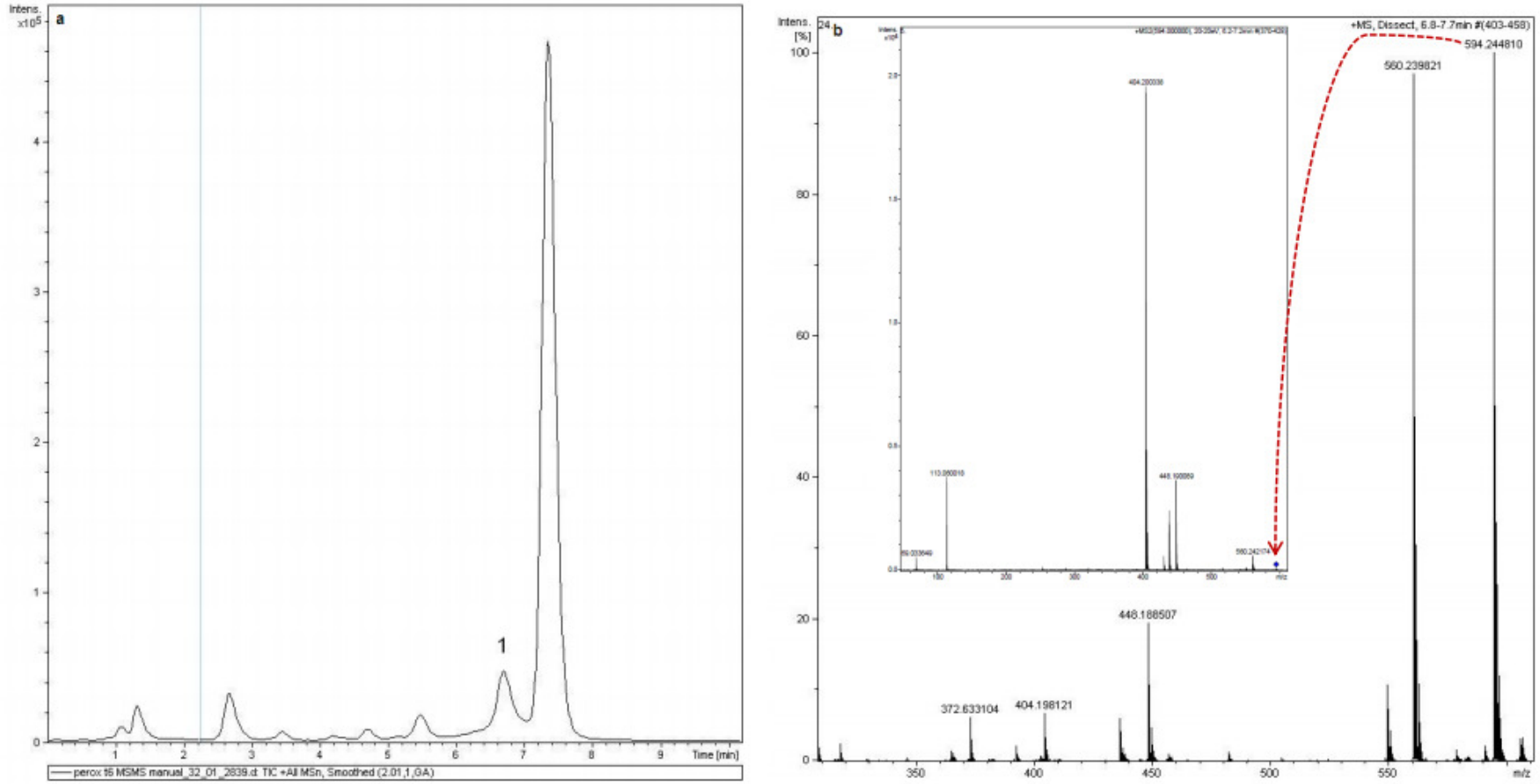


Figura 17. Cromatograma (a) e espectro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo (b) para o darunavir em meio oxidativo. O detalhe (b) apresenta a fragmentação direta do íon 594 em 560, 448, 404 e 113.

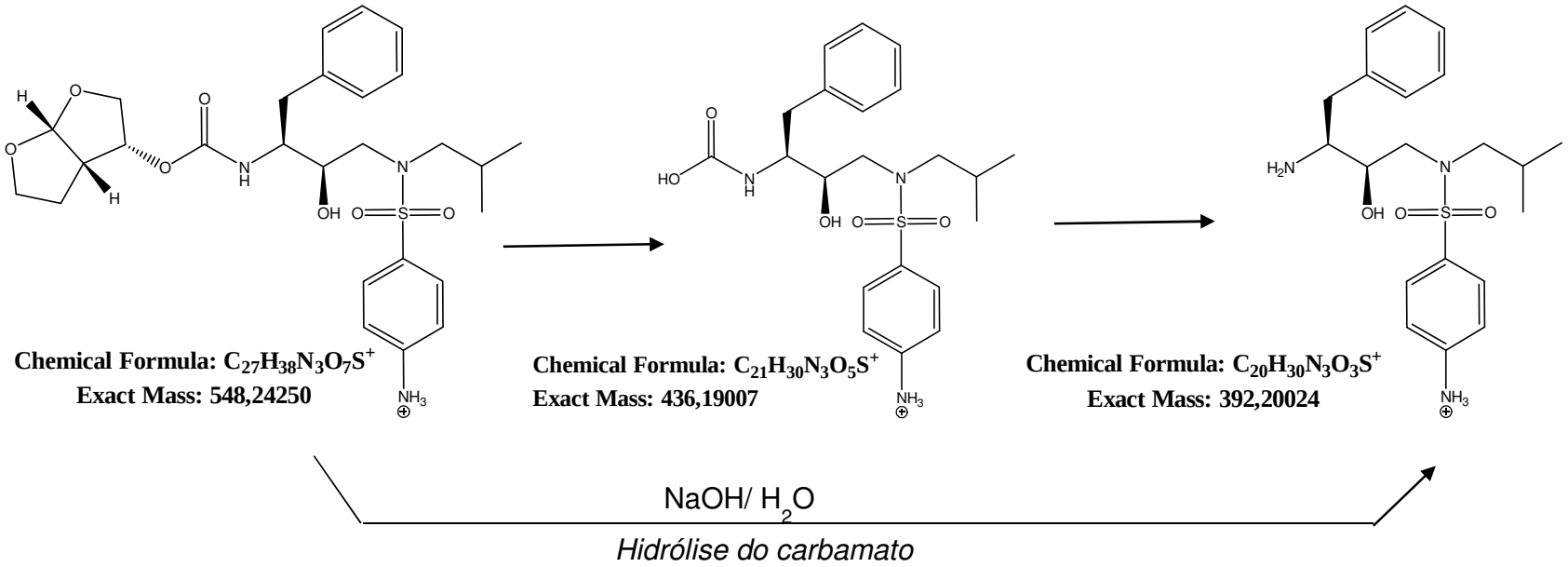


Figura 18. Principais produtos de degradação obtidos em meio básico e o padrão de fragmentação proposto para o fármaco, referente espectro de massas do produto de degradação 1 (Figura 15).

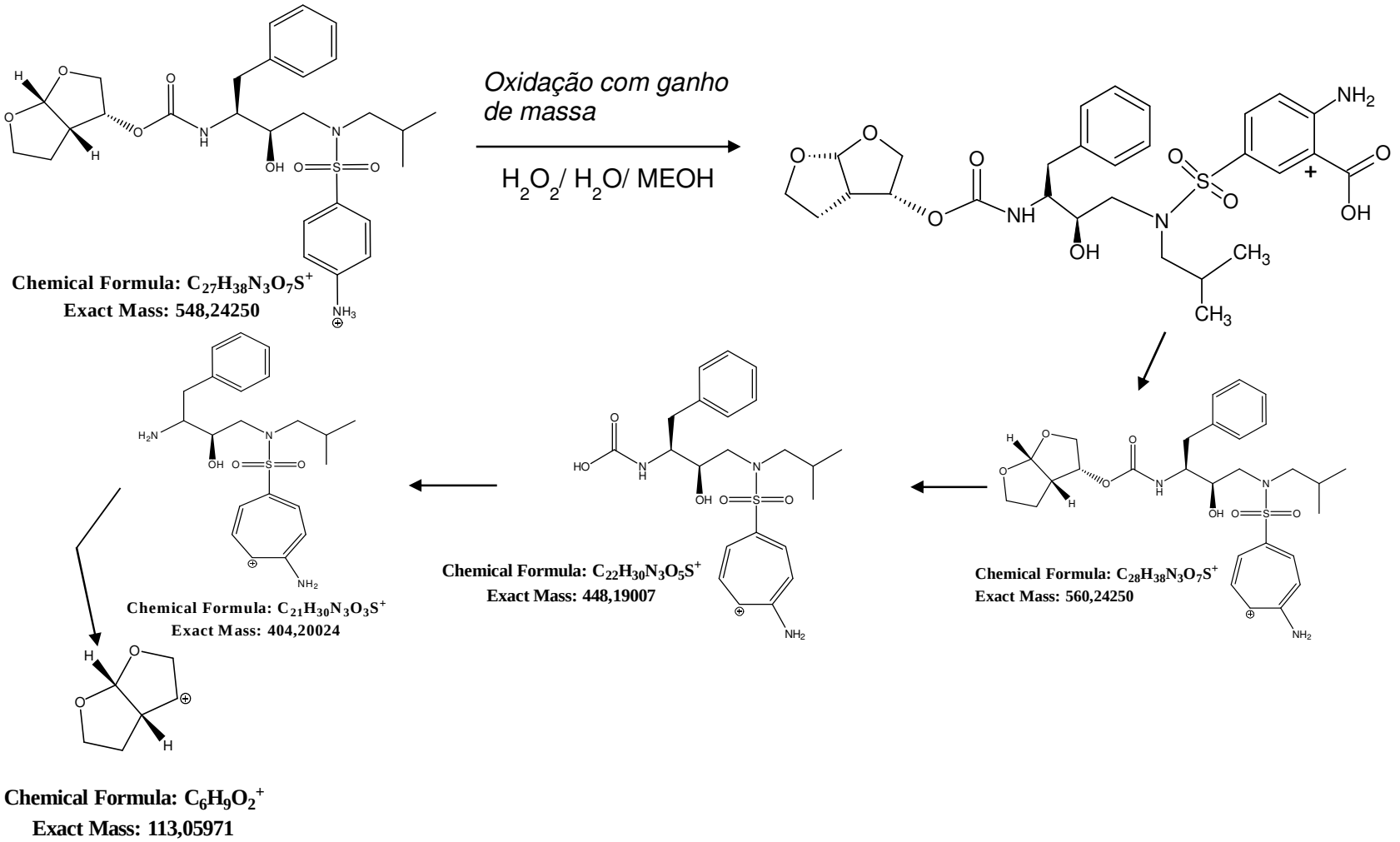


Figura 19. Principais produtos de degradação em meio oxidativo e o padrão de fragmentação proposto para o fármaco, referente espectro de massas do produto de degradação 1 (Figura 17).

Neste estudo, as razões m/z referentes aos principais produtos de degradação gerados durante os estudos de estresse foram obtidas com espectrômetro de massas capaz de atingir resolução FWHM (do inglês *full width at half maximum*) de 10.000 na faixa de massas explorada. A partir desses valores de m/z obtidos com acurácia e do estudo do padrão de fragmentação do darunavir e dos principais produtos de degradação, bem como do estudo da molécula do darunavir a fim de identificar os possíveis pontos de reação em cada pH específico, foi possível propor o padrão de fragmentação apresentado na Figura 18.

Além de identificar as moléculas, é necessário conhecer a toxicidade desses produtos de degradação. Assim, estudos de citotoxicidade podem futuramente ser realizados a fim de aprimorar os conhecimentos sobre a segurança e a estabilidade do fármaco.

8.3 Publicações

Este estudo, até o momento, resultou em dois trabalhos apresentados em dois congressos internacionais:

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Cristina Helena dos Reis Serra, Guilherme Titato, Fernando Lanças, Álvaro José dos Santos Neto, Hérida Regina Nunes Salgado. LC-QToFMS studies for the separation, identification, and characterization of degradation products of darunavir. LCMS-Montreaux 2012. Montreaux, Suíça, 2012.

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Cristina Helena dos Reis Serra, Guilherme Titato, Fernando Lanças, Álvaro José dos Santos Neto, Hérida Regina Nunes Salgado. Stability indicating LC method and LC-QToFMS studies for the separation and identification of degradation products of darunavir. HPLC 2013. Amsterdam, Holanda, 2013.

9 Estudo de estabilidade

9.1 Introdução

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de armazenamento e uso, as mesmas condições características que possuía quando da época de sua fabricação (Ansel et al., 2000; Vadas, 2000).

A estabilidade dos medicamentos também pode ser definida como o período a partir da data de fabricação e envase da formulação até o momento em que sua atividade química e biológica não seja menor que um nível pré-determinado de potência rotulada e suas propriedades físicas não tenham modificado apreciavelmente e de forma deletéria. Embora existam exceções, 90% das potências descritas em rótulos, geralmente são reconhecidas como o nível mínimo de potência aceitável. O prazo de validade é então definido como o período de tempo no qual a preparação permanecerá estável, dentro dos limites aceitáveis para efeito terapêutico, quando armazenada sob as condições recomendadas (Vadas, 2000).

Muitos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, entre eles, a estabilidade das substâncias ativas, a interação excipiente-fármaco, os processos de produção, a forma farmacêutica, a embalagem e o sistema de lacre, as condições durante o transporte, armazenamento e o período entre a fabricação e a validade calculada do produto. Fatores ambientais que podem alterar um produto com o tempo incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, pH, interações, contaminação microbiana, entre outros (Kommanaboyina & Rhodes, 1999).

A manipulação de fármacos sensíveis à umidade é um dos grandes problemas para as Ciências Farmacêuticas, principalmente quando não há a possibilidade de prever as mudanças rápidas da umidade no ambiente. Uma vez que a estabilidade em relação a esta condição depende da sensibilidade dos fármacos direta e indiretamente ao seu

teor no ambiente, as reações hidrolíticas podem envolver uma combinação de eventos complexos (Waterman, 2005).

Grande parte dos fármacos apresenta em sua estrutura molecular grupos funcionais que são facilmente atacados pela água, hidrolisando-se e formando novas moléculas (Ev, 2003). Muitos fármacos são, também, suscetíveis à oxidação. A maioria dos fármacos apresenta-se na forma reduzida e a presença de 20% de oxigênio livre na atmosfera pode acarretar problemas de estabilidade (Ev, 2003). No estado sólido, os processos fotoquímicos ocorrem na superfície do produto, ficando, na maioria dos casos, o interior do produto sólido inalterado (Tonnesen, 2001).

Dentro de uma formulação, muitos fatores são capazes de acelerar ou diminuir a velocidade das reações. O pH está entre esses fatores, já que as reações podem ser catalisadas por ácidos e/ou bases (Ev, 2003).

Os testes de degradação forçada, ou teste de estresse, são definidos como os testes de estabilidade da substância de referência e de medicamentos que excedem as condições utilizadas para os testes acelerados. Os testes de estresse são de extrema importância para a indústria farmacêutica e também para pesquisa. Estes testes são aplicados aos estudos de pré-formulação, no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e também para selecionar a melhor formulação (Klick et al., 2005).

De acordo com documentos regulatórios, toda vez que a empresa for registrar um novo produto, é obrigatório realizar os testes de estresse, que devem ser incluídos na documentação (FDA, 2004; Brasil, 2005). O teste de estresse é a principal ferramenta utilizada para predizer problemas relacionados à estabilidade, para identificar possíveis produtos de degradação e para desenvolver métodos analíticos indicativos de estabilidade.

9.2 Materiais e métodos

9.2.1 Estabilidade sob calor seco

No estudo de degradação térmica por calor seco, a estufa foi mantida a 55° C. Amostras da matéria-prima, do placebo e do produto de darunavir foram mantidas na estufa por diferentes períodos. O produto foi estocado em placa de Petri e em sua embalagem primária. Em placa de Petri, o produto foi mantido em três diferentes formas: intacto, com o revestimento raspado e pulverizado.

Amostras foram retiradas após 20, 40, 60 e 90 dias para análise cromatográfica e para avaliação de polimorfismo.

9.2.2 Estabilidade sob calor úmido

- ***Estudo prévio de estabilidade acelerada***

No estudo de degradação térmica por calor úmido, a câmara climática foi mantida a 40° C e 75% de umidade relativa. Amostras da matéria-prima, do placebo e do produto de darunavir foram mantidas na estufa por diferentes períodos. O produto foi estocado em placa de Petri, mantido de forma íntegra e pulverizada, e em sua embalagem primária.

Amostras foram retiradas após 30, 60, 90 e 120 dias para análise cromatográfica e para avaliação de polimorfismo.

9.2.3 Fotoestabilidade

Neste estudo de fotodegradação, a câmara espelhada foi mantida a temperatura ambiente, aproximadamente 25° C. Amostras da matéria-prima, do placebo e do produto de darunavir foram mantidas na estufa por diferentes períodos. O produto, estocado em placa de Petri, foi mantido em sua forma íntegra, com o revestimento raspado e pulverizado.

As placas foram expostas à distância de 10 cm da lâmpada (luz UVC, 254 nm, 20 W). Amostras foram retiradas após 7, 14 e 21 dias para análise cromatográfica.

9.3 Resultados e Discussão

9.3.1 Estabilidade sob calor seco

As amostras retiradas de todas as condições de estresse por calor seco foram preparadas e analisadas segundo o método cromatográfico desenvolvido e validado para análise do darunavir descrito no capítulo 7. Os resultados são apresentados nas Tabelas 20 a 24 e na Figura 20, que mostram os valores obtidos no ensaio de teor dessas amostras.

Tabela 20. Valores obtidos na quantificação de darunavir matéria-prima expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio* (%)	DPR** (%)	Decaimento*** (%)
20	97,37	0,39	2,63
40	96,22	0,89	3,78
60	93,61	2,68	6,39
90	89,64	0,65	10,36

*Para o cálculo de teor a pureza inicial da matéria-prima foi considerada.

**Desvio padrão relativo das amostras analisadas em triplicata.

***Decaimento calculado em relação ao teor da matéria-prima não submetida a estresse.

Tabela 21. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados na embalagem primária, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
20	98,15	0,61	-
60	94,58	1,22	2,42
90	93,26	0,16	3,74

*Desvio padrão relativo das amostras analisadas em triplicata.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 22. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados em placa de Petri, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
20	96,92	0,58	0,08
40	91,72	1,51	5,28
60	94,89	2,80	2,10
90	81,37	0,07	15,63

*Desvio padrão relativo das amostras analisadas em triplicata.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 23. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos com revestimento raspado acondicionados em placa de Petri, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
20	84,33	0,73	12,66
60	80,55	0,24	16,45
90	79,36	0,79	17,64

*Desvio padrão relativo das amostras analisadas em triplicata

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 24. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos pulverizados acondicionados em placa de Petri, expostos a calor seco (55° C) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
20	95,38	0,32	1,62
40	93,00	2,40	3,99
60	93,75	2,54	3,25
90	90,76	0,08	6,23

*Desvio padrão relativo das amostras analisadas em triplicata.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

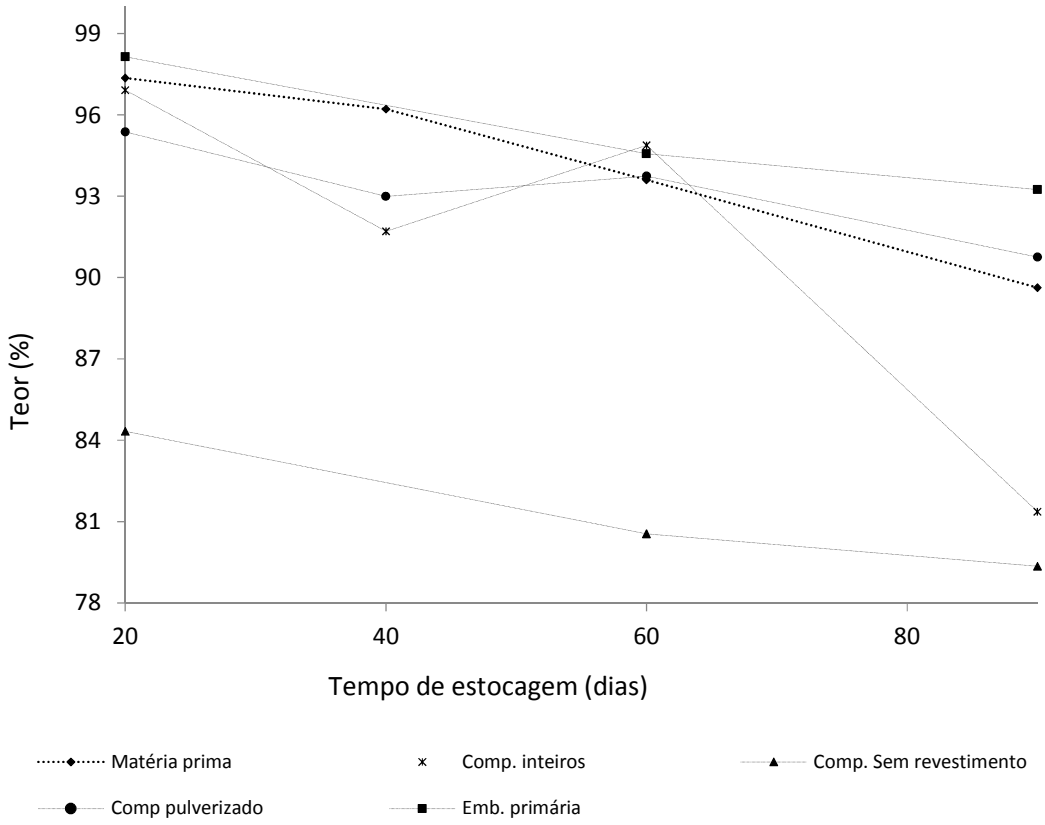


Figura 20. Curva teor (%) *vs.* tempo de estocagem (dias) sob calor seco para as amostras de matéria-prima, comprimidos em embalagem primária e comprimidos inteiros (com o revestimento), sem o revestimento e pulverizados armazenados em placas de Petri.

Estes resultados mostram que o darunavir é instável quando submetido a calor seco. O fármaco é quimicamente instável, apresentando forte tendência de queda no teor de todas as amostras testadas e, como poderá ser visto no capítulo seguinte (Capítulo 10) é, também, instável fisicamente, com perda do etanol preso à sua rede cristalina e consequente mudança física no estado cristalino do darunavir etanolato.

A perda de etanol sofrida pelo darunavir etanolato, quando submetido ao calor seco, será mais bem discutida no capítulo 10. No entanto, é possível inferir que perdas de massas (etanol) têm interferência direta nos cálculos de massa para otenção do teor das amostras. Podemos afirmar que a massa de etanol representa, aproximadamente, 7,5% da massa de darunavir e as quedas no teor do fámaco foram, de forma geral,

maiores do que 7,5% para a amostra que permaneceu por maior tempo sob calor. Assim, a tendência de queda no teor do fármaco parece ser mais forte do que a perda de etanol, pois mesmo para amostra submetida por mais tempo ao calor, não houve perda total do etanol preso à rede cristalina, mas parte dele.

9.3.2 Estabilidade sob calor úmido

As amostras retiradas de todas as condições de estresse climático calor úmido (40° C e 75% UR) em todos os tempos testados foram preparadas e analisadas segundo o método cromatográfico desenvolvido e validado para análise do darunavir descrito no capítulo 7 (Parte III). Os resultados são apresentados nas Tabelas 25 a 28 e na Figura 21, que mostram os valores obtidos no ensaio de teor destas amostras.

Tabela 25. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de matéria-prima expostas a calor seco úmido (40° C e 75% UR) e analisadas por CLAE

Tempo de exposição (dias)	**Teor médio* (%)**	**DPR** (%)**	**Decaimento*** (%)**
30	98,60	3,09	1,40
60	97,15	2,50	2,85
90	93,77	3,41	6,23
120	87,82	0,10	12,18

*Para o cálculado de teor a pureza inicial da matéria-prima foi considerada.

**Desvio padrão relativo.

***Decaimento calculado em relação ao teor da matéria-prima não submetida a estresse.

Tabela 26. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados na embalagem primária, expostos a calor úmido (40° C e 75% UR) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
30	98,33	3,46	-
60	97,45	3,06	-
90	95,98	2,83	1,02
120	94,74	0,02	2,26

*Desvio padrão relativo.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 27. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos acondicionados em placa de Petri, expostos a calor úmido (40° C e 75% UR) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
30	97,67	2,40	-
60	94,35	3,89	2,65
90	96,16	0,10	0,84
120	95,57	0,21	1,43

*Desvio padrão relativo.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 28. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos pulverizados acondicionados em placa de Petri, expostos a calor úmido (40° C e 75% UR) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
30	98,49	0,85	-
60	94,43	0,72	2,57
90	94,06	3,91	2,94
120	91,02	0,20	5,98

**Desvio padrão relativo.

*Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

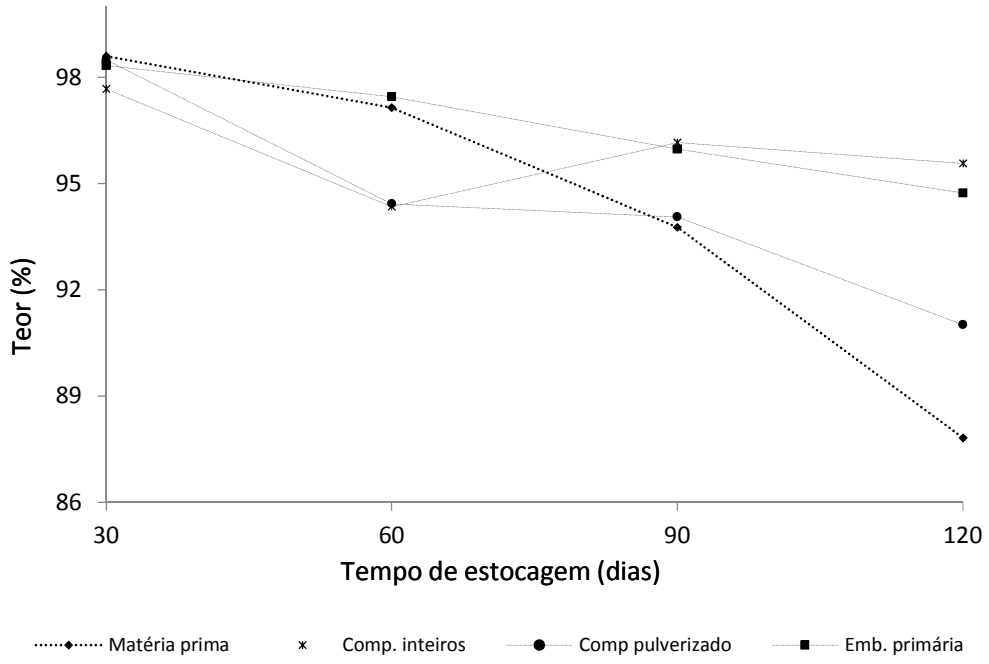


Figura 21. Curva teor (%) *vs.* tempo de estocagem (dias) sob calor úmido para as amostras de matéria-prima, comprimidos em embalagem primária e comprimidos inteiros (com o revestimento) e pulverizados armazenados em placas de Petri.

Assim como no estudo sob calor seco, sob calor úmido do darunavir se mostrou instável, com tendência de queda para os teores de todas as amostras analisadas. A temperatura empregada neste estudo (40° C) foi menor do que a utilizada no estudo sob calor seco (55° C). Este pode ser um dos motivos para a tendência de queda mais acentuada durante o estudo sob calor seco, mostrando que o darunavir é muito sensível ao calor, tornando-se intável sob altas temperaturas. Neste estudo pode ainda ter ocorrido troca da molécula de etanol preso à rede cristalina por moléculas de água, como descrito por Gyseghem e colaboradores (2009).

9.3.3 Fotoestabilidade

As amostras retiradas de todas as condições de estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) em todos os tempos testados foram preparadas e analisadas segundo o método cromatográfico desenvolvido e validado para análise do darunavir. Os resultados são apresentados nas Tabelas 29 a 32 e na Figura 22, que mostram os valores obtidos no ensaio de teor dessas amostras.

Tabela 29. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de matéria-prima expostas a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisadas por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio* (%)	DPR** (%)	Decaimento*** (%)
7	95,79	0,08	4,21
14	92,39	1,41	7,61
21	87,51	0,62	12,49

*Para o cálculo de teor, a pureza inicial da matéria-prima foi considerada.

**Desvio padrão relativo.

***Decaimento calculado em relação ao teor da matéria-prima não submetida a estresse.

Tabela 30. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos revestidos acondicionados em placa de Petri, expostos a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
7	95,08	0,08	4,92
14	88,17	0,05	11,83
21	87,27	0,23	12,73

*Desvio padrão relativo.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 31. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos sem revestimento acondicionados em placa de Petri, expostos a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
7	90,68	0,45	9,32
14	88,97	0,11	11,03
21	76,91	0,16	23,09

*Desvio padrão relativo.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

Tabela 32. Valores obtidos na quantificação de darunavir em amostras de comprimidos pulverizados acondicionados em placa de Petri, exposto a estresse fotolítico (luz UVC, 254 nm, 20 W) e analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Decaimento** (%)
7	92,27	0,03	7,73
14	86,14	0,04	13,86
21	82,07	0,40	17,93

*Desvio padrão relativo.

**Decaimento calculado em relação ao teor do produto quando não submetido a estresse (97,00%)

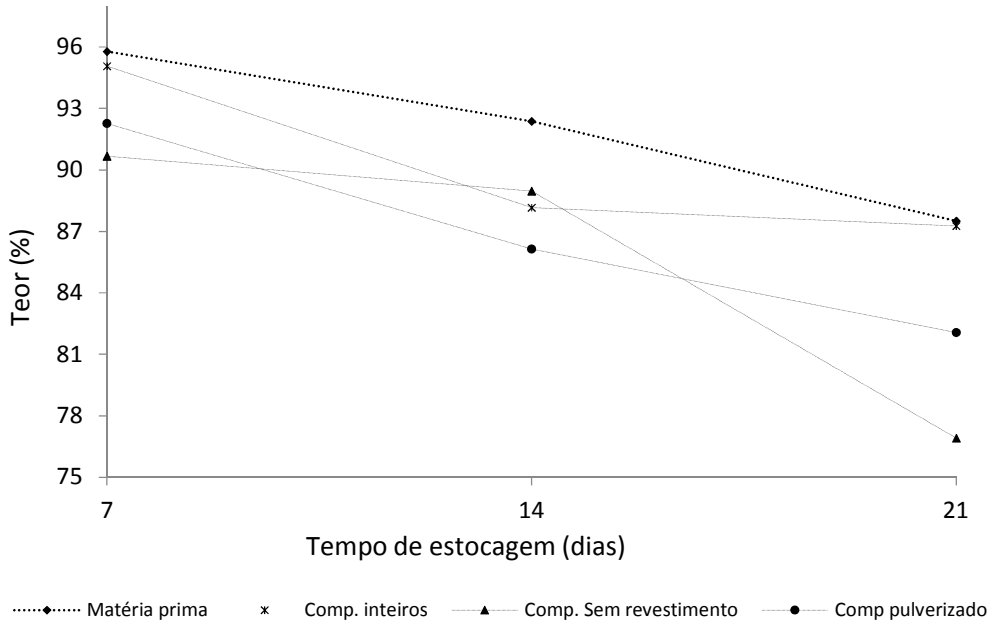


Figura 22. Curva teor (%) *vs.* tempo de estocagem (dias) sob luz UVC para as amostras de matéria-prima, comprimidos inteiros revestidos, sem revestimento e pulverizados armazenados em placas de Petri.

O estudo de fotoestabilidade apresenta forte queda no teor do darunavir, para todas as amostras ensaiadas, e em período de estudo inferior ao empregado para os

estudos sob calor seco ou úmido. Os resultados deste estudo mostram a necessidade de proteger o darunavir da exposição à luz.

Em todos os testes realizados, independentemente das condições climáticas empregadas, a tendência foi de queda no teor do fármaco. Estes resultados mostraram que o fármaco é instável sob as condições ensaiadas. Tanto para as amostras de matéria-prima, quanto para o produto acabado, a mesma tendência de queda no teor do fármaco foi observada. Algumas amostras apresentaram, inclusive, mudança em suas características organolépticas como cor e odor. As amostras de matéria-prima após 7 dias sob estudo fotolítico e 30 dias sob as demais condições testadas passaram a apresentar tonalidade amarelada.

Os comprimidos que tiveram seu revestimento raspado apresentaram teor inicial muito abaixo daquele obtido para os comprimidos com revestimento, o que pode indicar que o processo de raspagem do revestimento levou à perda de massa interna ao filme.

A embalagem primária, um frasco plástico composto de polietileno de alta densidade, foi capaz de proteger o fármaco em todas as condições em que foi testada (os decaimentos de teor do produto não chegaram a 5 %) provando que desempenha um importante papel na estabilidade do produto.

9.4 Publicações

Parte deste estudo de estabilidade contribuiu para os trabalhos apresentados em dois congressos internacionais já citados, que foram realizados nas cidades de Boston, EUA e Amsterdam, Holanda.

PARTE IV

ESTUDOS DE POLIMORFISMO

10 **ESTUDOS DE POLIMORFISMO**

Polimorfismo é a capacidade de uma substância existir em mais de uma estrutura cristalina. Assim, o polimorfismo tem conotação cristalográfica e só ocorre no estado sólido (Storpirtis et al., 2009; Honorato et al., 2012). Os sólidos em geral, inclusive os fármacos, podem se apresentar na forma amorfa, em que não há nenhum arranjo em nível molecular e não se observa a formação de cristais, ou cristalina, em que há um arranjo ordenado em nível molecular (Storpirtis et al., 2009). Segundo a FDA e o ICH o conceito de polimorfos engloba polimorfos propriamente ditos, solvatos e sólidos amorfos (ICH, 1999; FDA, 2007a; Storpirtis et al., 2009).

Diferentes polimorfos apresentam diferentes conformações e/ou interações intra e intermoleculares que modificam os empacotamentos das moléculas nos polimorfos e têm como consequência propriedades diferentes, tais como higroscopicidade, solubilidade, velocidade de dissolução, estabilidade, tensão superficial e fluidez (Storpirtis et al., 2009; Honorato et al., 2012).

Como é esperado, as formas polimórficas com maior energia interna, ou termodinamicamente menos estáveis (metaestáveis) de um sólido, tendem a migrar para a forma mais estável ou de menor energia interna. Além disso, dependendo das condições a que são submetidas, as formas estáveis e metaestáveis de um sólido podem se converter entre si ou em outras formas, como os solvatos, por exemplo. Este é o grande desafio, conhecer profundamente a estabilidade física do fármaco.

O estudo da estabilidade física dos fármacos deve ser bem conduzido a fim de se conhecer os aspectos da formulação proposta e poder prever possíveis alterações no estado sólido do fármaco em matrizes complexas (Storpirtis et al., 2009). Os processos farmacêuticos (granulação, secagem, compressão) podem levar às transformações polimórficas e deve-se identificar quais são as etapas críticas desse processo e quais os controles necessários para garantir sua estabilidade até o fim de seu prazo de validade (Huang & Tong, 2004; Storpirtis et al., 2009)

De modo geral, os diversos polimorfos de um fármaco apresentam diferentes velocidades de dissolução e podem tornar-se menos ativos, inativos, ou mesmo tóxicos

se existir relação direta entre a atividade farmacológica e a velocidade de dissolução (Storpirtis et al., 2009).

O comportamento polimórfico do darunavir foi primeiro explicado por Gyseghem e colaboradores (Gyseghem et al., 2009). Os pesquisadores mostraram que, em diferentes condições ambientais, formas pseudo-polimórficas diversas surgem e se convertem entre si. A estrutura cristalina do darunavir etanolato, que é a forma comercializada, permanece como tal quando a umidade relativa (UR) do ar permanece abaixo de 5%, se a UR se eleva, ela se transforma na forma hidrato. Além disso, as formas etanolato e hidrato podem se converter em amorfa sob altas temperaturas. Todavia, a forma amorfa pode se converter em hidrato quando sob UR moderada a alta e em forma etanolato quando sob atmosfera etanólica (Gyseghem et al., 2009).

Esse comportamento do darunavir é bastante preocupante ao levarmos em consideração os fatos de o HIV/AIDS apresentar prevalência global e o darunavir ser considerado pela OMS, medicamento essencial para o tratamento da doença. Dessa forma, o produto Prezista® pode ser utilizado em todo o mundo e está sujeito às diferentes condições climáticas características de cada parte do globo terrestre. Além disso, tem-se o agravante de ser desconhecido o impacto deste comportamento sobre a solubilidade do fármaco e a dissolução do produto.

O governo brasileiro tem uma política que permite acesso gratuito e universal aos medicamentos antirretrovirais aos pacientes soropositivos. Esta política muito contribui para o desenvolvimento de formulações genéricas e, consequentemente, mais acessíveis desses produtos, o que retro-alimenta o sistema ao favorecer o menor custo e permitir a manutenção e a ampliação desta política ao longo dos anos.

O entendimento do comportamento do fármaco, de sua estabilidade, bem como qual o papel desempenhado pela formulação e embalagem para a manutenção de suas características primárias seria uma contribuição relevante ao desenvolvimento de uma formulação genérica de qualidade e estável nas condições ambientais brasileiras.

10.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento do darunavir em relação a mudanças polimórficas quando submetido a diferentes condições climáticas e avaliar o papel desempenhado pela formulação do produto Prezista® e da embalagem na manutenção das características iniciais do fármaco.

10.2 Material e métodos

A matéria-prima darunavir etanolato mantida em placa de Petri tampada, e os comprimidos de Prezista® com revestimento armazenados dentro e fora da embalagem original, e sem revestimento (o revestimento foi raspado), foram submetidos à condição de calor seco, 55 °C, durante 20, 40, 60 e 90 dias. Ensaios de calorimetria diferencial exploratória e termogravimetria (SII Nanotechnology®, Japão) e difração de raios-X (Rigaku, Japão) foram aplicados para avaliar as mudanças polimórficas nas amostras.

As curvas de DSC foram obtidas usando o calorímetro sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10° C/min a partir de 30° C até atingir 300° C usando cadinho de alumínio aberto. O instrumento foi calibrado usando índio como padrão. Os parâmetros de calibração foram obtidos através da temperatura do pico extrapolado para determinar a temperatura (T*onset* = 156,6° C) e a entalpia de fusão (ΔH_f = 28,5 J/g) do padrão de índio.

As análises de termogravimetria foram realizadas usando balança térmica sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10° C/min de 30 a 500° C. As amostras foram pesadas em cadinhos de alumínio abertos. O equipamento foi calibrado usando índio como padrão para o parâmetro temperatura e um peso padrão de alumina para a calibração da linha de base.

O estudo de difração de raios-X foi feito usando as medidas de 2θ variando de 5° a 55° usando 40 kV e 30 mA. As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento 941 da Farmacopeia Americana (Haware et al., 2011; USP 35, 2012).

10.3 Resultados e discussão

As análises de difração de raios-X mostraram que os comprimidos revestidos mantidos na embalagem primária permaneceram durante todo o tempo em que foram submetidos ao calor seco com sua estrutura cristalina intacta.

Os difratogramas sobrepostos da matéria-prima no tempo inicial (sem ter sido submetida a estresse) e submetida a calor seco por 20, 40, 60 e 90 dias são apresentados na Figura 23 (A). Podemos observar que a estrutura cristalina não se mantém idêntica durante o estudo, não houve completa amorfização, mas algumas modificações, principalmente a formação de banda do material amorfo próximo à 20° 2θ, podem ser observadas ao comparar o difratograma das amostras com o difratograma da matéria-prima do tempo inicial (não submetida ao estresse). Essas pequenas diferenças apontam a possível perda do etanol, deixando de ser a forma etanolata, e uma possível inicial amorfização; apontam também para o fato que a temperatura de 55° C não foi suficiente para levar à completa amorfização da matéria-prima quando mantida em placa de Petri fechada.

A Figura 23 (B) apresenta os difratogramas dos comprimidos de Prezista® no tempo inicial, mantidos na embalagem original, e após ser submetido ao calor seco por 20, 40, 60 e 90 dias sobrepostos. É possível verificar que todos os picos do difratograma se sobrepõem. Percebe-se com este difratograma o importante papel desempenhado pela embalagem primária do produto em manter as características do cristal do fármaco.

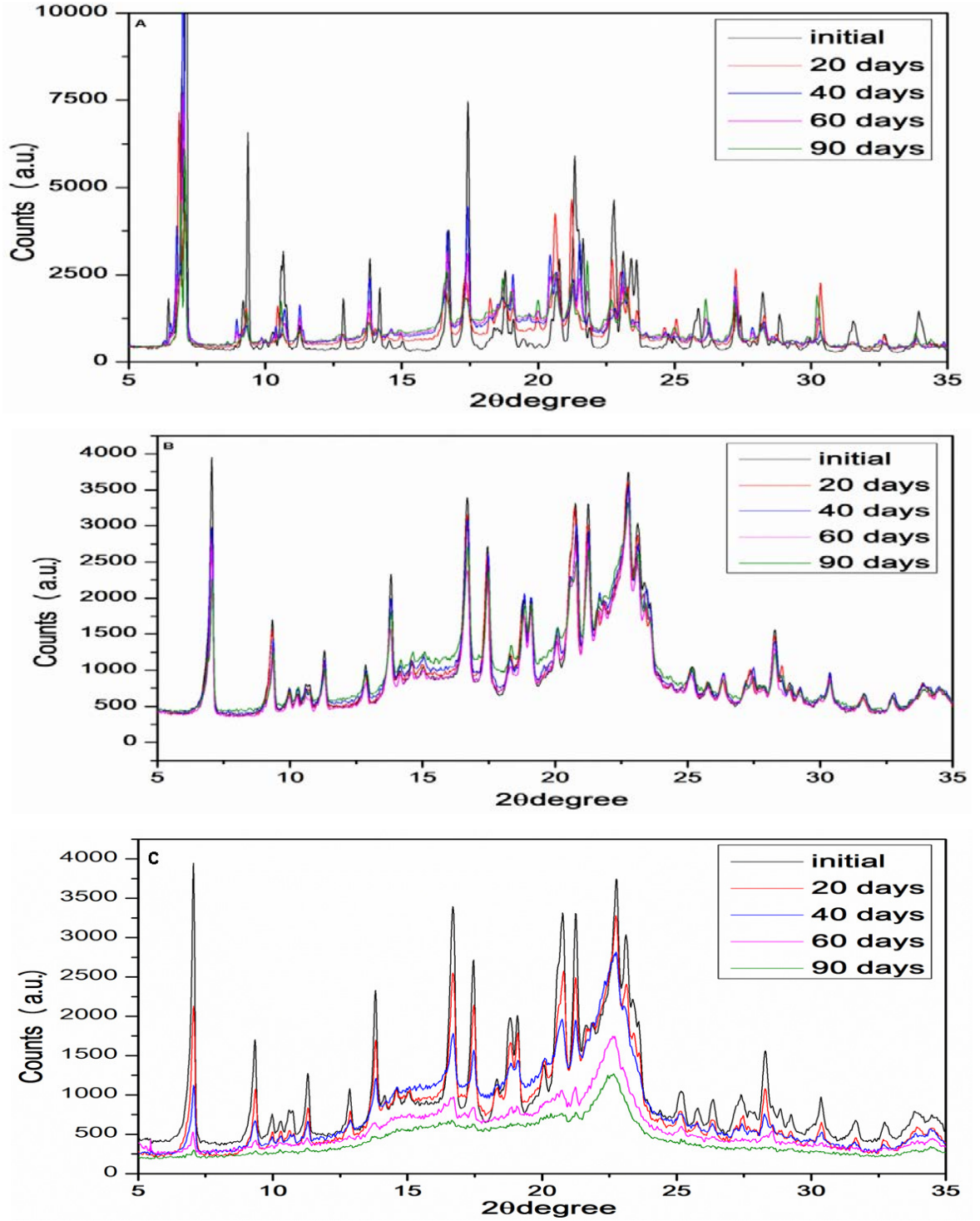


Figura 23. Difratograma das amostras de darunavir matéria-prima (A), comprimidos estocados na embalagem primária (B) e comprimidos mantidos em placas de Petri (C) submetidas a calor seco (55° C) por 20, 40, 60 e 90 dias, sobrepostos às amostras não submetidas à temperatura (Inicial).

Entretanto, os comprimidos revestidos de Prezista® armazenados fora da embalagem primária, mas em placas de Petri fechadas, sofreram grandes transformações em seus cristais com acentuada amorfização após 20 dias de armazenamento sob calor seco. Esse comportamento é apresentado na Figura 23 C, onde mostra que os picos da forma cristalina são reduzidos a partir da amostra de 20 dias até desaparecerem completamente na amostra de 90 dias. É possível verificar que, comparada à matéria-prima (Figura 24), a formulação, mesmo com seu revestimento, apresentou intensa modificação em sua estrutura cristalina (Figura 25), o que leva à suspeita de que o fármaco após ter sido manipulado e comprimido pode ter sofrido mudanças e interações com os adjuvantes da fórmula que não contribuem para sua estabilidade sólida e parecem acelerar o processo de amorfização quando mantido fora da embalagem primária e sob calor seco.

Ao aplicar a calorimetria exploratória diferencial, dois eventos térmicos são observados, o primeiro próximo a 60° C e o segundo próximo a 100° C (Figuras 24, 26 e Tabela 33). Possivelmente, a perda de etanol fora da rede cristalina ocorre próximo a 60° C e a perda do etanol preso à rede próximo a 100° C. A matéria-prima não estressada (inicial) apresentou apenas um evento térmico, mostrando que o etanol da molécula está preso em sua rede cristalina. Ao longo do tempo em que as amostras foram submetidas ao calor seco, o etanol deixa a rede cristalina e dois eventos térmicos podem ser observados, sendo o segundo de menor intensidade.

Ao sobrepor as cuvas de DSC para as amostras de matéria-prima de darunavir etanolato à amostra de darunavir padrão de referência (Figura 27), observa-se a inexistência da perda de etanol preso à rede cristalina para a substância padrão. Isso era esperado, pois o darunavir padrão não se encontra na forma etanolata.

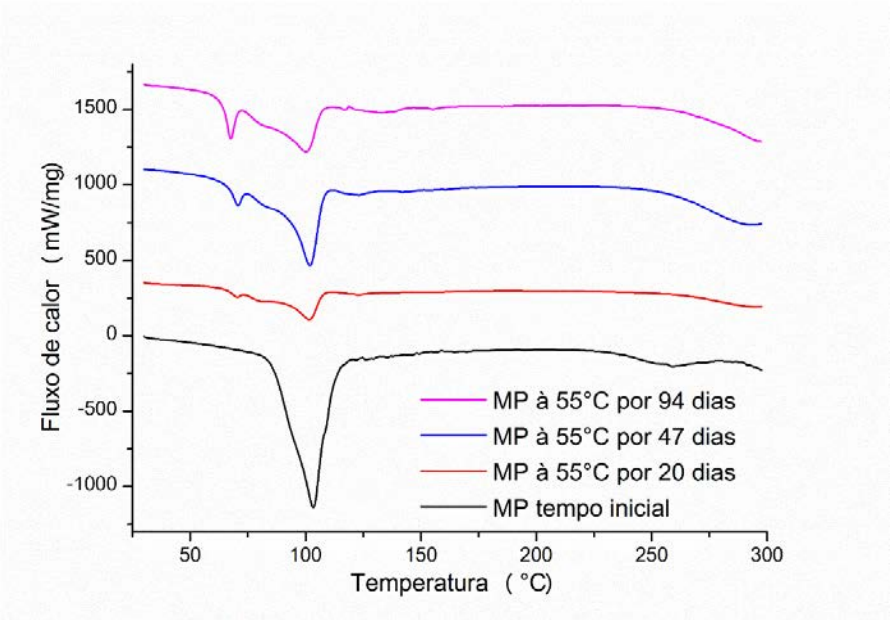


Figura 24. Curvas de DSC para amostras de matéria-prima de darunavir etanolato submetidas a calor seco por 20, 47 e 94 dias, sobrepostos à amostra não estressada (Inicial).

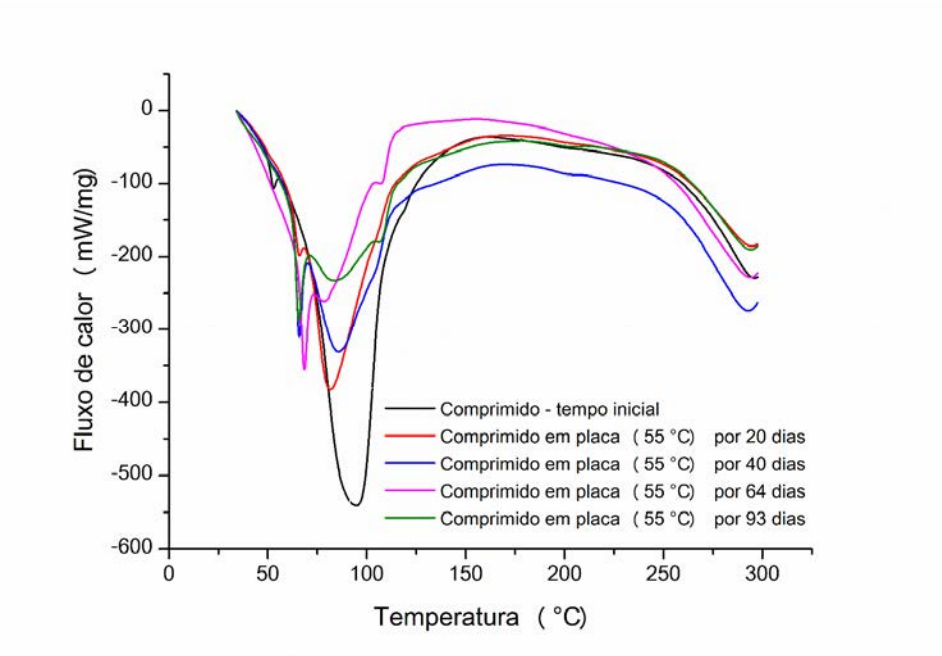


Figura 25. Curvas de DSC para amostras de comprimidos de darunavir submetidas a calor seco por 20, 40, 64 e 93 dias e estocados em placa de petri, sobrepostos à amostra não estressada (Inicial).

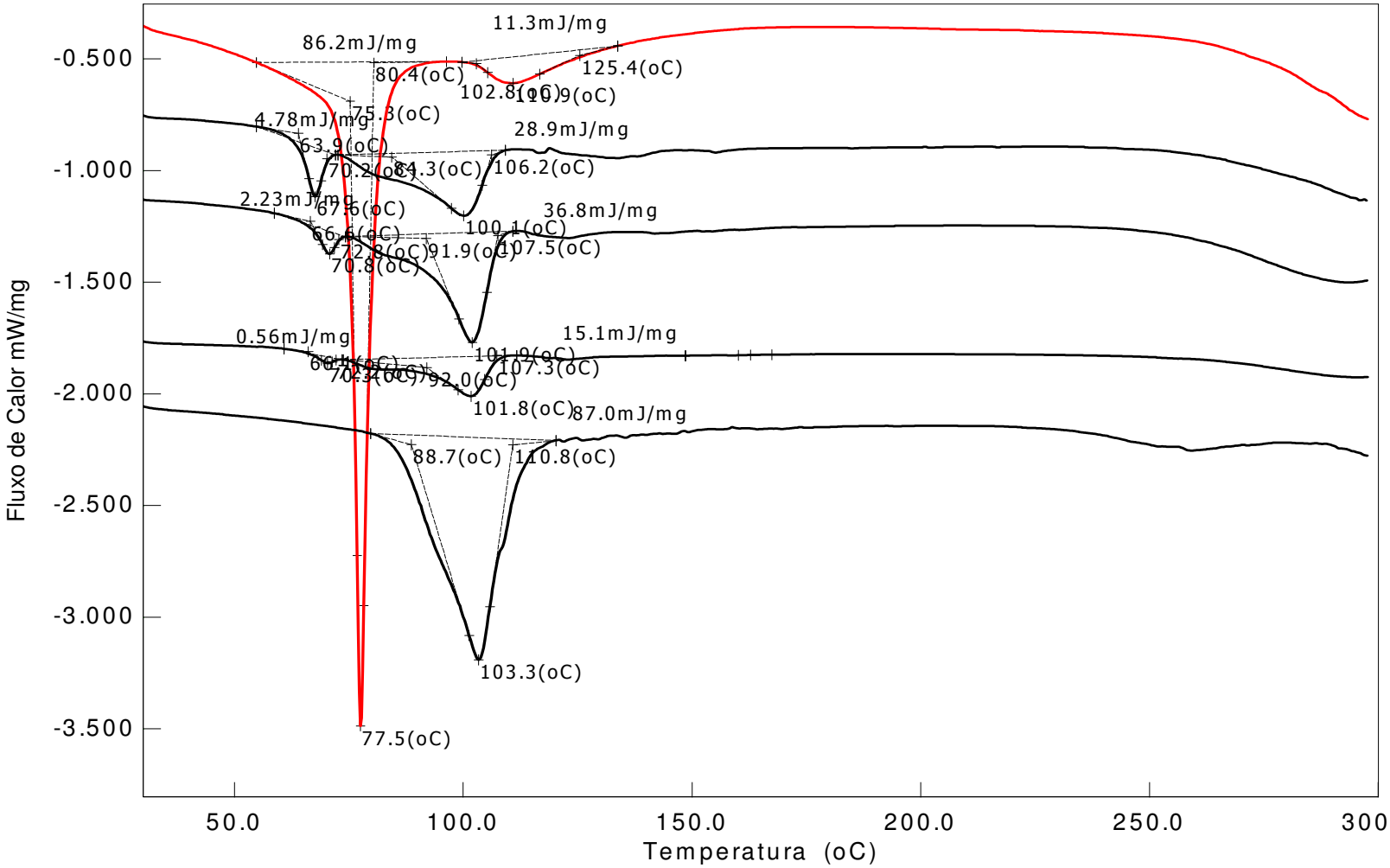


Figura 26. Curvas termogravimétricas integrada para as amostras de matéria-prima de darunavir estocados em placas de Petri não estressada e submetidas à 55° C durante diferentes 20, 47, 94 dias.

Tabela 33. Valores de entalpia calculdos pela integração das curvas de DSC das amostras de matéria-prima de darunavir estocados em placas de Petri e submetidas à 55° C

Tempo de exposição ao calor seco	Entapia (mJ/mg)
0	87,0
20	15,1
47	36,8
94	28,9

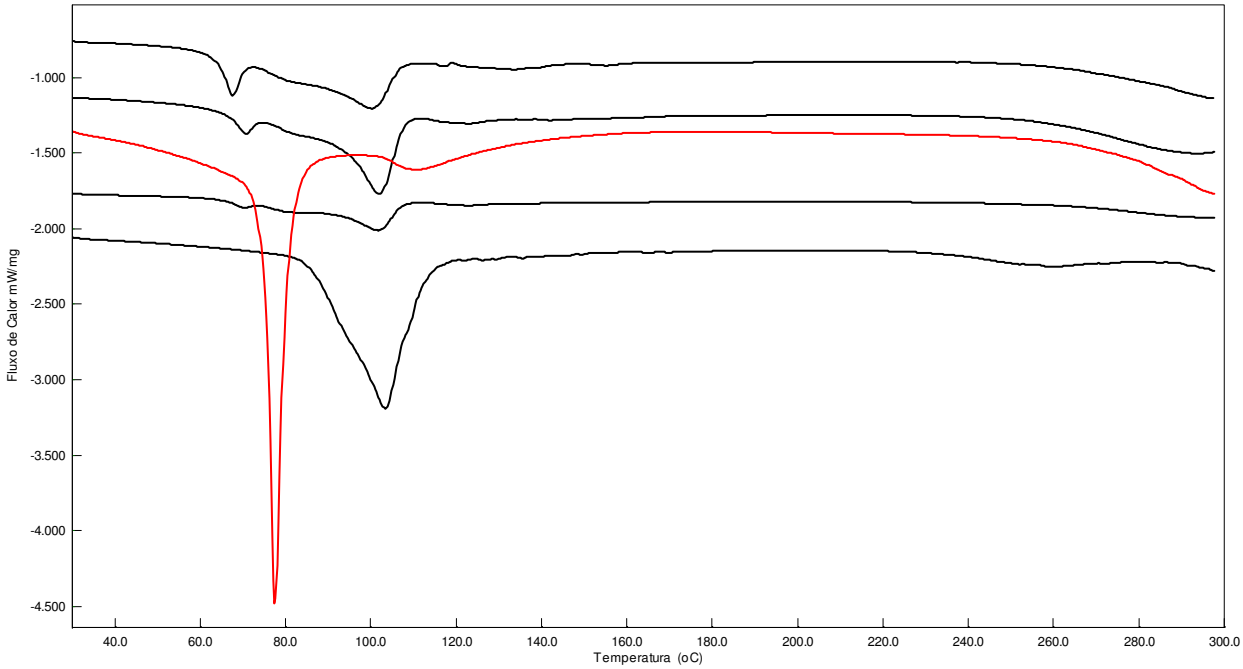


Figura 27. Curvas de DSC para amostras de matéria-prima de darunavir etanolato submetidas a calor seco por 20, 47 e 94 dias, e a amostra não estressada (Inicial), com a sobreposição da curva de DSC para o padrão de darunavir.

Pouca ou nenhuma mudança pode ser observada no perfil calorimétrico das amostras submetidas ao calor seco armazenadas na embalagem primária fechada (Figura 28 e 29, e Tabela 34). No entanto, os comprimidos revestidos, armazenados fora da embalagem primária (placa de Petri), apresentaram alterações em seu perfil calorimétrico, de forma parecida ao que pode ser visto para a matéria-prima (Figuras 24 e 25). Ao longo do tempo em que os comprimidos foram estocados fora da embalagem primária, observou-se que a entalpia do segundo evento foi diminuindo e a entalpia do primeiro evento foi aumentando, confirmando a perda do cristal darunavir etanolato e a formação de etanol livre (Figura 24, 25 e 26).

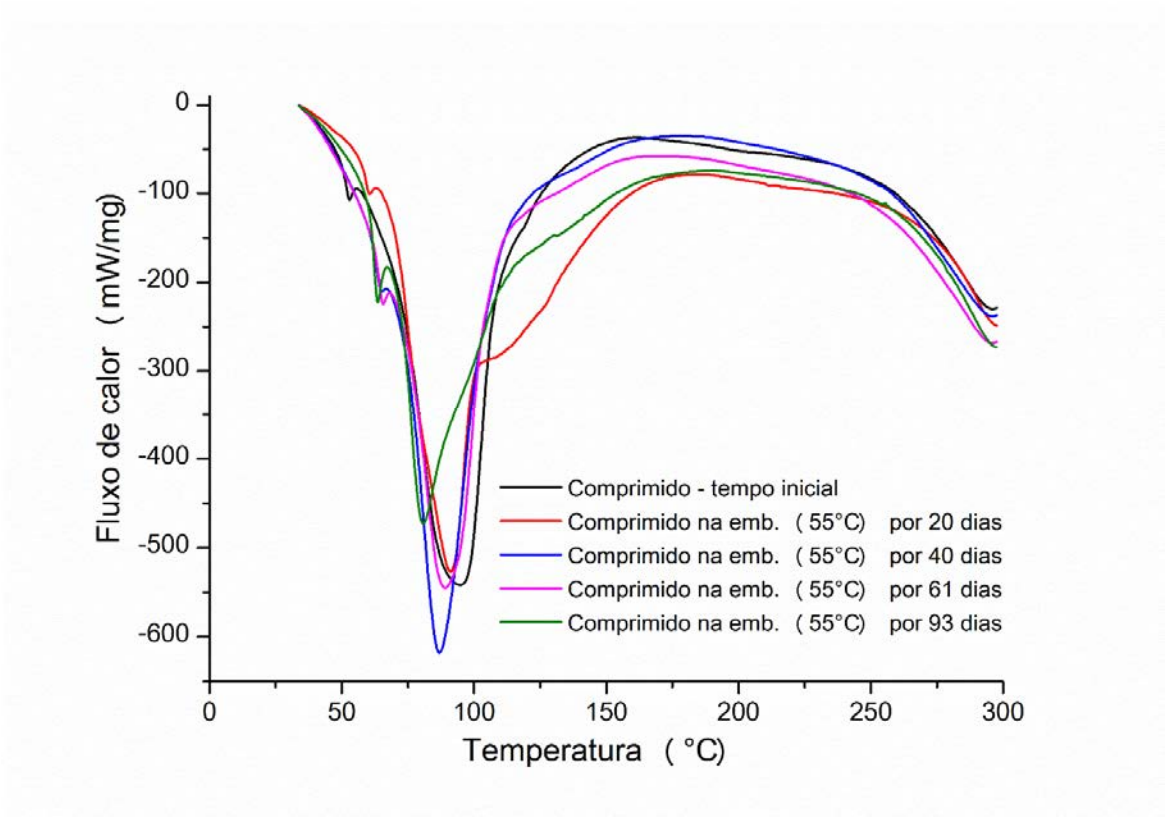


Figura 28. Curvas de DSC para amostras de comprimidos de darunavir submetidas a calor seco por 20, 40, 61 e 93 dias e estocados na embalagem primária, sobrepostos à amostra não estressada (Inicial).

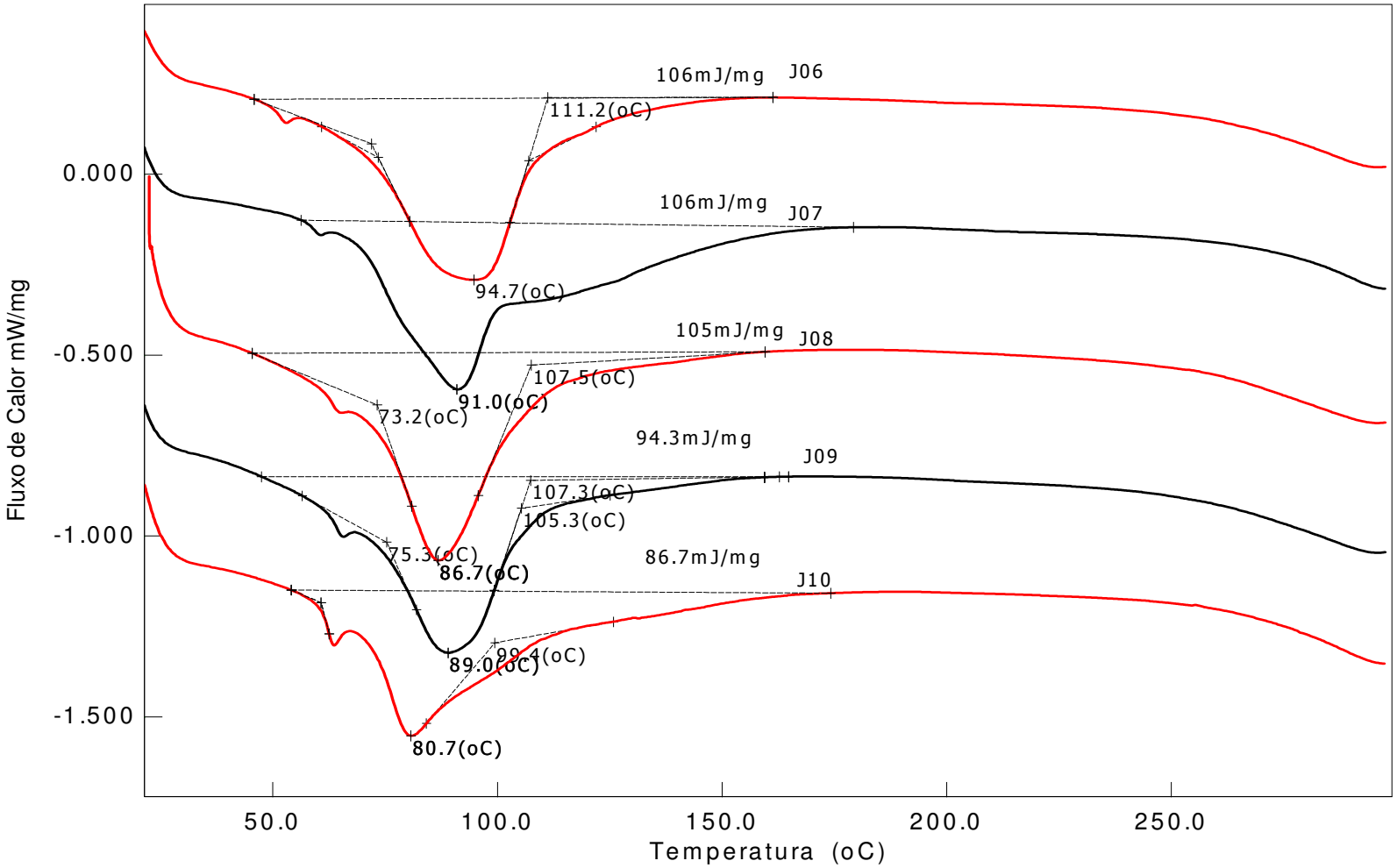


Figura 29. Curvas termogravimétricas integrada para as amostras de comprimidos de darunavir estocados na embalagem primária não estressada (J06) e submetidas à 55° C durante diferentes 20, 40, 61 e 93 dias (J07, J08, J09 e J10, repectivamente).

Tabela 34. Valores de entalpia calculdos pela integração das curvas de DSC das amostras de comprimidos de darunavir estocados na embalagem primária e submetidas a 55° C

Tempo de exposição ao calor seco	Entapia (mJ/mg)
0	106,0
20	106,0
40	105,0
61	94,3
93	86,7

.

A análise termogravimétrica de matéria-prima estocada a 55° C em placa de Petri (Figura 30) apresenta perda de massa que decaiu ao longo do tempo. A amostra representada na figura como J02 representa a matéria-prima não submetida ao calor e as amostras J03 e J04 representam, respectivamente, amostras de matéria-prima estocadas por 20 e 40 dias sob a condição de calor seco. Para amostra J02, a perda de massa calculada foi de 7,5 %, valor que está próximo à porcentagem de massa de etanol na molécula de etanolato de darunavir (325,24 mg de darunavir etanolato equivale a 300 mg de darunavir). Para as amostras J03 e J04, as perdas de massa foram 4,1 e 3,4 %. A queda na perda de massa detectada no ensaio demonstra que o etanolato de darunavir mantido a 55° C sem controle de umidade perde o etanol que é preso em sua rede cristalina.

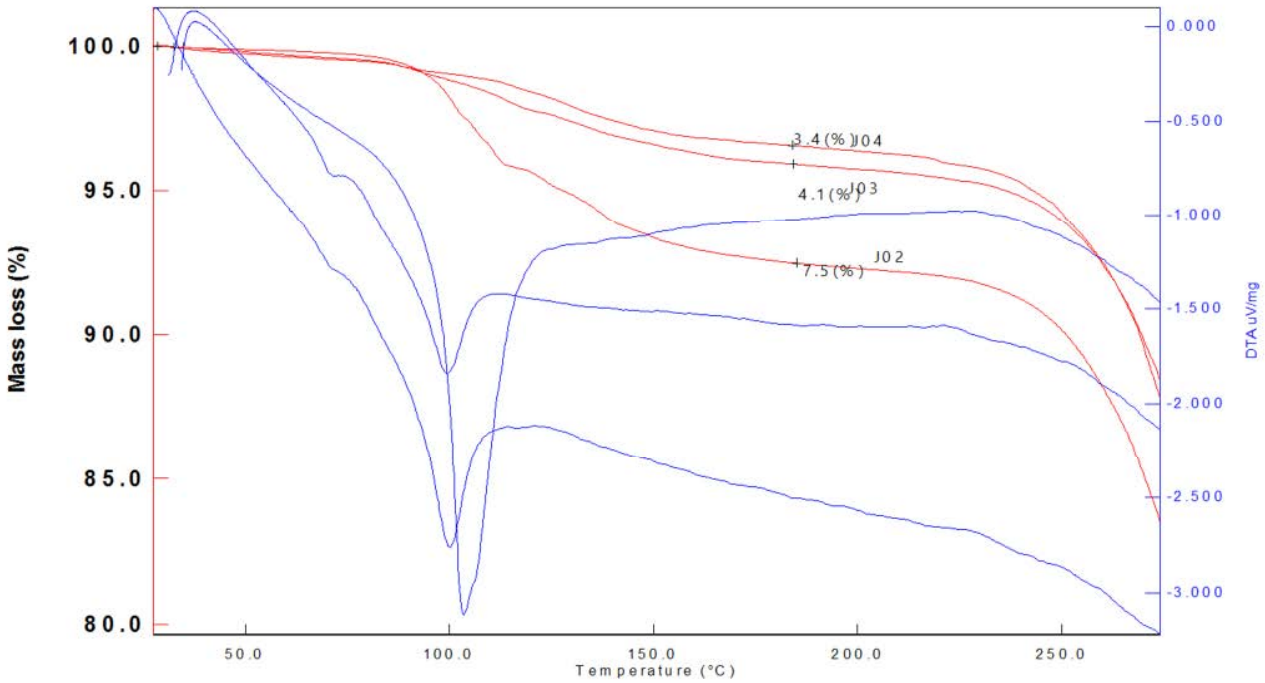


Figura 30. Curvas termogravimétricas das amostras de matéria-prima estocadas em placa de Petri a 55° C durante diferentes períodos de tempo.

10.4 Conclusão

Darunavir etanolato mostrou seu comportamento polimórfico durante este estudo, confirmando o que havia sido descrito por Gyseghem e colaboradores (2009). No entanto, a embalagem primária (frasco de plástico composto por polietileno de alta densidade) provou ser capaz de proteger o produto contra as mudanças polimórficas nas condições avaliadas até o momento. Os comprimidos revestidos mantidos no seu recipiente permaneceram com a estrutura do cristal inalterada.

A matéria-prima e os comprimidos com ou sem revestimento armazenados fora da embalagem primária, mas em placas de Petri fechadas, apresentaram uma diminuição da forma etanolato. Como a perda de etanol acompanha mudanças na forma cristalina do fármaco, a solubilidade e, consequentemente, a biodisponibilidade do darunavir, podem ser afetadas. Não há estudos publicados sobre o impacto dessa transformação sofrida pelo darunavir sobre a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade do fármaco. O que será alvo de estudo dentro desta pesquisa.

A avaliação do papel desempenhado pela formulação, revestimento e embalagem na manutenção das características do produto desenvolvido pode fornecer dados para os estudos de pré-formulação de produtos genéricos e/ou similares do produto referência em questão.

10.5 Publicações

Os estudos de polimorfismo levaram à apresentação de trabalhos em dois congressos:

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Cristina Helena dos Reis Serra, Ariadne M. Brondi, Marcello G. Trevisan, Hérida Regina Nunes Salgado. Solid-state Stability of Darunavir. Drug Discovery and Therapy World Congress 2013, Boston, EUA.

Josilene Chaves Ruela Corrêa, Cristina Helena dos Reis Serra, Ariadne M. Brondi, Marcello G. Trevisan, Hérida Regina Nunes Salgado. Solid-state Stability of Darunavir. VI Encontro de Usuários de Técnicas Termoanalíticas 2013, São Carlos, Brasil.

PARTE V

IMPACTO DO POLIMORFISMO E DA ESTABILIDADE NA SOLUBILIDADE E VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO

11 Introdução

A solubilidade pode ser definida como a concentração de um soluto dissolvido em um solvente à temperatura e pressão constantes após ocorrer o equilíbrio entre o soluto dissolvido e o não dissolvido (Storpirtis et al., 2009).

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS), a solubilidade de um fármaco é definida como baixa ou alta dependendo da dose dissolvida do fármaco em 250 mL de solução aquosa com pH que varie de 1 a 7,5. Assim, ela será considerada alta quando a maior dose disponível do fármaco se dissolver em até 250 mL dessa solução (Kasim et al., 2004; Storpirtis et al., 2009).

A solubilidade é um dos parâmetros utilizados para direcionar o desenvolvimento farmacotécnico, especialmente para fármacos pouco solúveis. Além disso, o estudo e controle do polimorfismo é mais crítico para fármacos de baixa solubilidade, apesar de ser importante para alguns fármacos de alta solubilidade também (Storpirtis et al., 2009).

O comportamento polimórfico dos fármacos tem impacto sobre sua velocidade de dissolução, sendo que diferentes polimorfos podem apresentar diferentes velocidades de dissolução (Storpirtis et al., 2009). Segundo a Farmacopeia Americana (2012), a velocidade de dissolução e a biodisponibilidade de um fármaco são influenciadas por suas propriedades de estado sólido como cristalinidade, amorfização, polimorfismo, hidratação, solvatação, tamanho de partículas e área de superfície das partículas (USP 35, 2012). Devido a este fato, os estudos mais empregados para a avaliação de diferentes polimorfos e de seu comportamento em diferentes formulações são os estudos de dissolução e dissolução intrínseca.

Enquanto a dissolução apresenta a massa de fármaco dissolvida ao longo do tempo do teste, a dissolução intrínseca determina a velocidade de massa dissolvida do fármaco (Storpirtis et al., 2009). Estes conceitos são cinéticos e, por isso, mais adequados do que o estudo de solubilidade para a avaliação de diferentes polimorfos.

Deve-se, no entanto, avaliar, tratando-se de dissolução intrínseca, se a força empregada para a formação da pastilha não interfere na estrutura cristalina do fármaco, já que mudanças polimórficas podem ocorrer durante a compressão dos fármacos.

Para avaliar se as mudanças encontradas no estado cristalino do darunavir nas amostras submetidas a estresse têm ou não impacto sobre sua dissolução, ensaios de dissolução intrínseca para a matéria-prima do fármaco e ensaios de dissolução para a forma farmacêutica foram propostos.

11.1 Métodos

11.1.1 Estudo de dissolução intrínseca

Para a determinação da velocidade de dissolução intrínseca em disco foi empregado o dispositivo de Wood (USP 35, 2012). O estudo da dissolução intrínseca do darunavir iniciou-se com a matéria-prima que não foi submetida a estresse. Foi adicionada à cavidade da matriz uma quantidade de matéria-prima suficiente para atingir o nível marcado, logo em seguida, o punção foi encaixado. O pó foi comprimido em prensa hidráulica utilizando-se uma força de compressão de 1 tonelada durante um minuto. Para todos os ensaios de dissolução intrínseca foram empregados 50 mg de matéria-prima. Obteve-se uma pastilha compacta não desintegrante de 0,5 cm^2 de área, com uma das superfícies faceando a parte inferior da matriz. Em seguida, o punção foi removido.

O aparato foi desmontado e a pastilha foi retirada com cuidado para que fosse investigado se alguma mudança na forma cristalina do fármaco aconteceu após sofrer a compressão. A pastilha foi submetida à análise por difração de raios-X empregando as mesmas condições já descritas no capítulo 10 (Parte IV). O resultado foi comparado com o difratograma da matéria-prima quando não submetida à compressão.

11.1.2 Estudo de solubilidade

O estudo de solubilidade foi realizado empregando o método de equilíbrio por *shake-flask* utilizando os meios solventes recomendados pelo BCS. Foram então usados tampão acetato de sódio pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 3,0 com 0,5% de Tween 20® como solventes. O ácido clorídrico não foi utilizado devido à instabilidade do darunavir neste meio. Grandes quantidades de amostra foram colocadas em cada tubo contendo 5 mL de cada um dos solventes que, em seguida, foram colocados sob agitação (60 rpm) e temperatura constante (37° C) por 72 horas. Este estudo foi realizado em triplicata. Após o tempo de agitação, as amostras foram filtradas em filtro de celulose regenerada com porosidade igual a 0,45 µm e analisadas por espectrofotometria derivada. O método analítico espectrofotométrico desenvolvido e validado neste estudo para o darunavir foi mais uma vez empregado. Os resultados médios obtidos para cada meio testado foram comparados com aqueles obtidos no estudo em que a matéria-prima empregada não foi submetida a estudos de estresse.

11.2 Resultados e discussão

11.2.1 Estudo de dissolução intrínseca

Apesar de o estudo de solubilidade não ser o mais indicado para a diferenciação de polimorfos, este estudo foi realizado a fim de complementar o estudo de dissolução intrínseca.

Os difratogramas sobrepostos da matéria-prima no tempo inicial (sem ter sido submetida à compressão) e após ter sido comprimida são apresentados na Figura 31. É possível observar que os difratogramas não são completamente sobreponíveis, o que indica que a estrutura cristalina sofreu algumas modificações durante este procedimento.

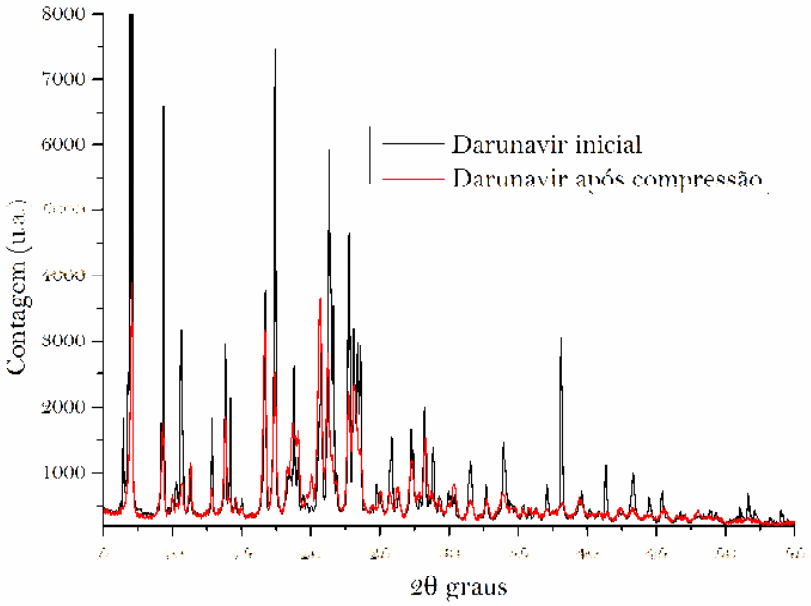


Figura 31. Sobreposição dos difratogramas da matéria-prima de darunavir antes e após compressão.

O difratograma apresenta algumas alterações sofridas na estrutura cristalina da matéria-prima comprimida, mas sem mudança polimórfica, pois as fases (picos) são mantidas, mudando apenas sua intensidade. O fármaco comprimido foi pulverizado para que pudesse ser realizado o ensaio de DRX, o que poderia ter causado alguma dessas pequenas e insignificantes mudanças observadas no difratograma.

A fim de complementar o estudo dissolução intrínseca para as matérias primas submetidas ao estudo de estabilidade, ensaios de solubilidade foram conduzidos.

Para os comprimidos submetidos a estresse dentro e fora da embalagem primária, ensaios de perfil de dissolução foram realizados a fim de observar possíveis mudanças na velocidade de liberação do fármaco.

Os ensaios de perfil de dissolução, para os comprimidos, e de dissolução intrínseca, para a matéria-prima, foram realizados seguindo os parâmetros estabelecidos durante o desenvolvimento do ensaio descrito no capítulo 5 (Parte II).

Os resultados obtidos para o ensaio de dissolução intrínseca da matéria-prima no início do estudo (T_0) e após ser submetida a estresse são apresentadas nas Figuras 32 e 33, respectivamente. Os perfis de dissolução obtidos para os comprimidos submetidos a estresse são mostrados na Figura 34.

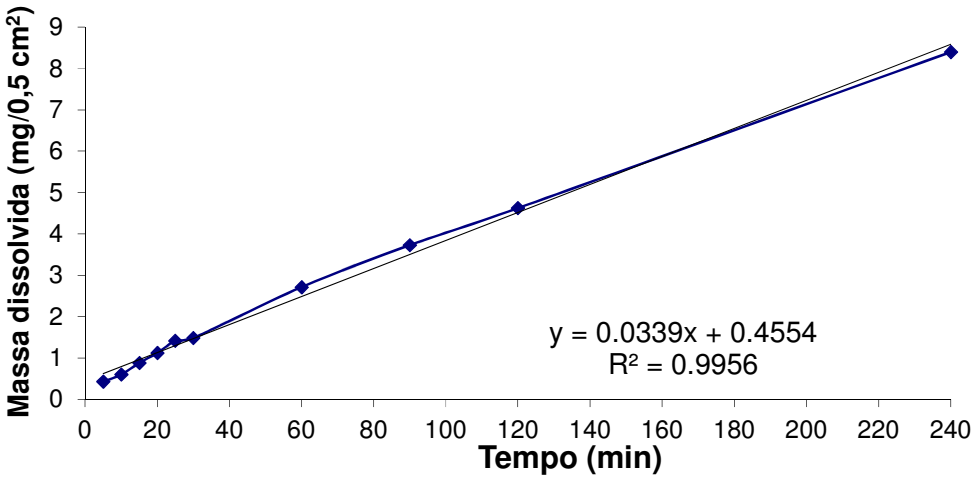


Figura 32. Curva de massa dissolvida por área do disco *vs*. tempo obtida para matéria-prima no início do estudo.

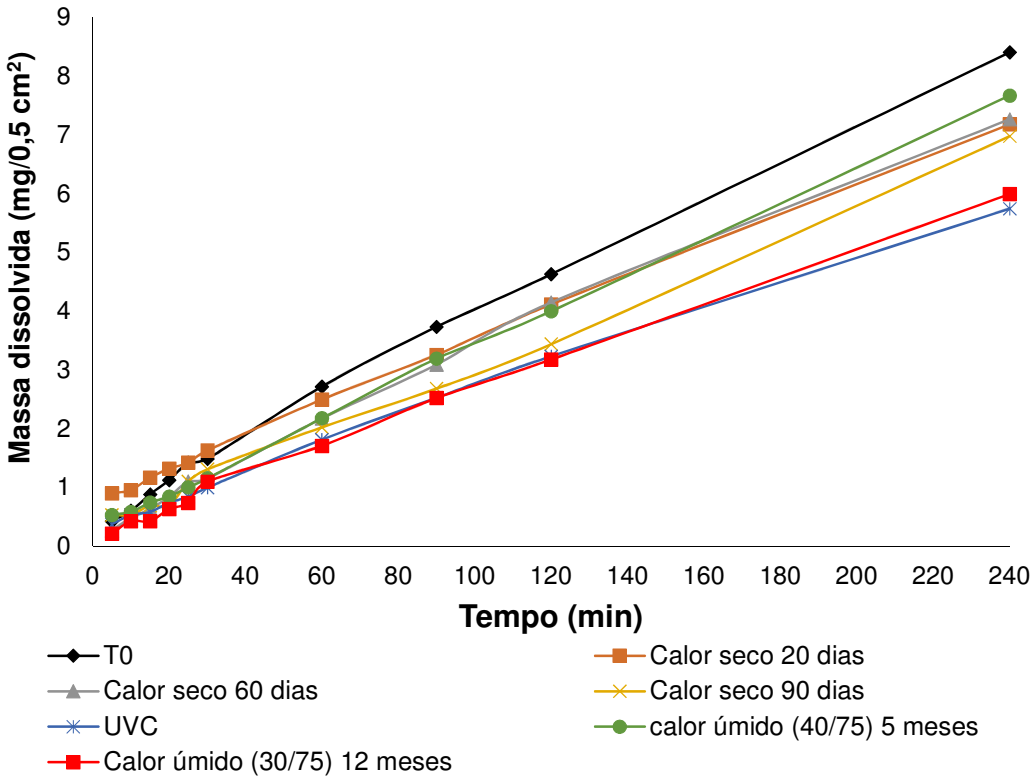


Figura 33. Curva de massa dissolvida por área do disco *vs*. tempo obtida para matéria-prima no início do estudo (T_0) e após estresse.

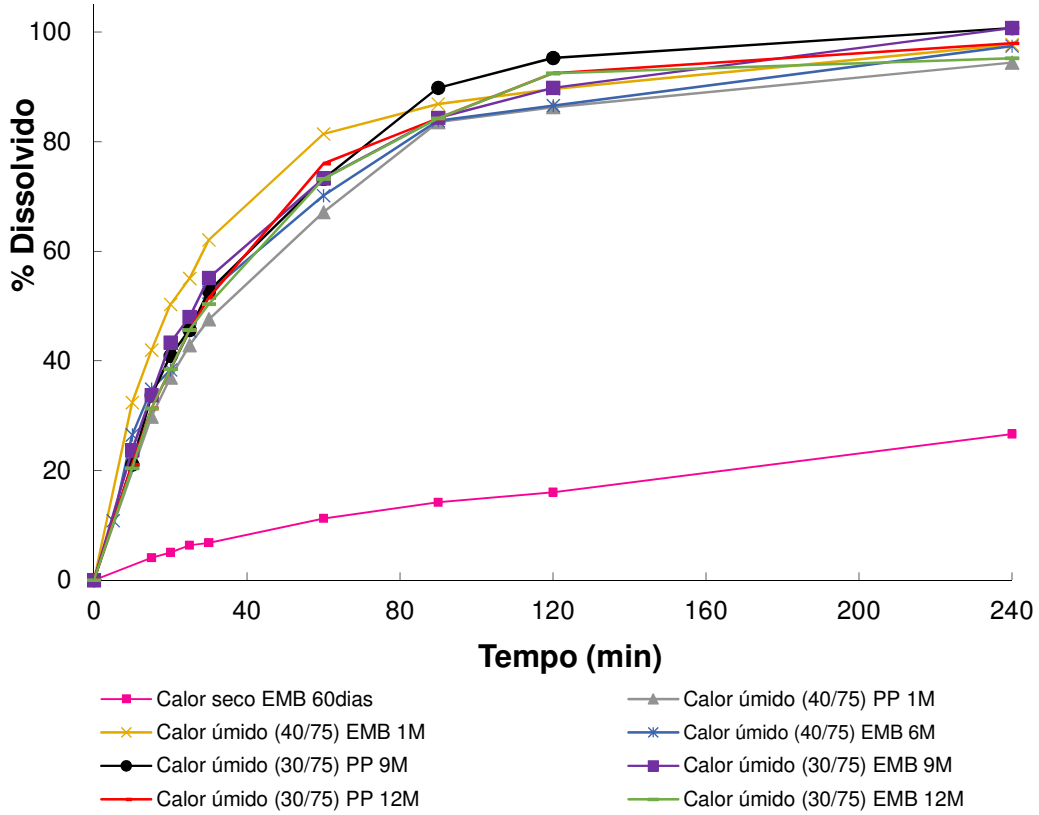


Figura 34. Perfis de dissolução de comprimidos de darunavir submetidos a estresse armazenados dentro (EMB) e fora (PP) da embalagem primária.

Os resultados obtidos para o estudo de dissolução intrínseca (Figura 33) mostram que a velocidade de dissolução da matéria-prima foi diminuída quando submetida às diferentes condições de estresse. Independentemente da condição de estresse aplicada, as mudanças sofridas pela matéria-prima levaram à solubilização mais lenta quando comparada à amostra inicial (T_0).

A formulação submetida às mesmas condições de estresse que a matéria-prima mostrou resultados diferentes. Os comprimidos mantidos sob calor úmido, dentro ou fora da embalagem primária, apresentaram velocidade de liberação do fármaco inalterada, mostrando que a formulação se manteve estável quanto a esta característica. No entanto, quando submetido a calor seco e mantido na embalagem primária, a formulação apresentou grande instabilidade resultando em forte desaceleração da velocidade de liberação do fármaco a partir do comprimido.

11.2.2 Estudo de solubilidade

As amostras de matéria-prima submetidas a estudos de estresse sob calor seco e úmido e luz UVC tiveram sua solubilidade avaliada seguindo o guia do sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) pelo método de equilíbrio.

As Tabelas 35 a 38 e as Figuras 35 a 39 apresentam os resultados obtidos para solubilidade em diferentes meios para as amostras submetidas a todas as condições de estresse empregadas.

Tabela 35. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse seco (55° C) avaliada pelo método de equilíbrio

Meio	**Solubilidade (µg/mL)**				
	T_0	**20d[a]**	**40d[a]**	**60d[a]**	**90d[a]**
Água	166,82	162,72	164,53	212,25	232,48
Tampão acetato, pH 4,5	180,77	234,02	247,59	242,80	257,58
Tampão fosfato, pH 6,8	147,15	182,22	186,38	193,79	200,12
Tampão fosfato, pH 3,0 (0,5 % Tween 20®)	585,71	645,41	594,02	592,51	586,46

[a] d= dias

Tabela 36. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse calor úmido (40° C /75%UR) avaliada pelo método de equilíbrio

Meio	**Solubilidade (µg/mL)**		
	T_0	**2 M[a]**	**5 M[a]**
Água	166,82	161,27	156,44
Tampão acetato, pH 4,5	180,77	195,68	192,88
Tampão fosfato, pH 6,8	147,15	135,94	128,17
Tampão fosfato, pH 3,0 (0,5 % Tween 20®)	585,71	548,68	562,28

[a] M= meses

Tabela 37. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse calor úmido (30° C /75%UR) avaliada pelo método de equilíbrio

Meio	Solubilidade (µg/mL)			
	T_0	6 M[a]	9 M[a]	12 M[a]
Água	166,82	160,54	162,36	139,16
Tampão acetato, pH 4,5	180,77	192,49	193,28	183,70
Tampão fosfato, pH 6,8	147,15	131,06	131,97	111,72
Tampão fosfato, pH 3,0 (0,5 % Tween 20®)	585,71	577,39	584,95	559,26

[a] M= meses

Tabela 38. Solubilidade da matéria-prima de darunavir antes (T_0) e após ser submetida a estresse fotolítico (UVC) durante 27 dias avaliada pelo método de equilíbrio

Meio	Solubilidade (µg/mL)	
	T_0	27 dias
Água	166,82	155,11
Tampão acetato, pH 4,5	180,77	185,30
Tampão fosfato, pH 6,8	147,15	125,82
Tampão fosfato, pH 3,0 (0,5 % Tween 20®)	585,71	545,65

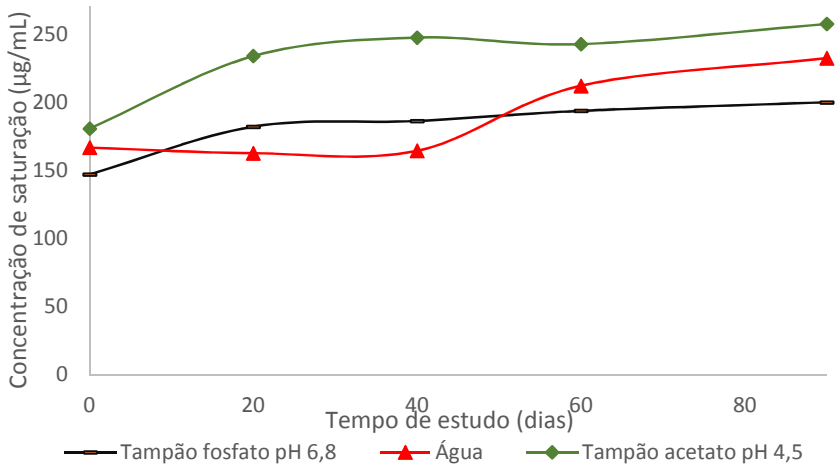


Figura 35. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida a calor seco (55° C) por 90 dias.

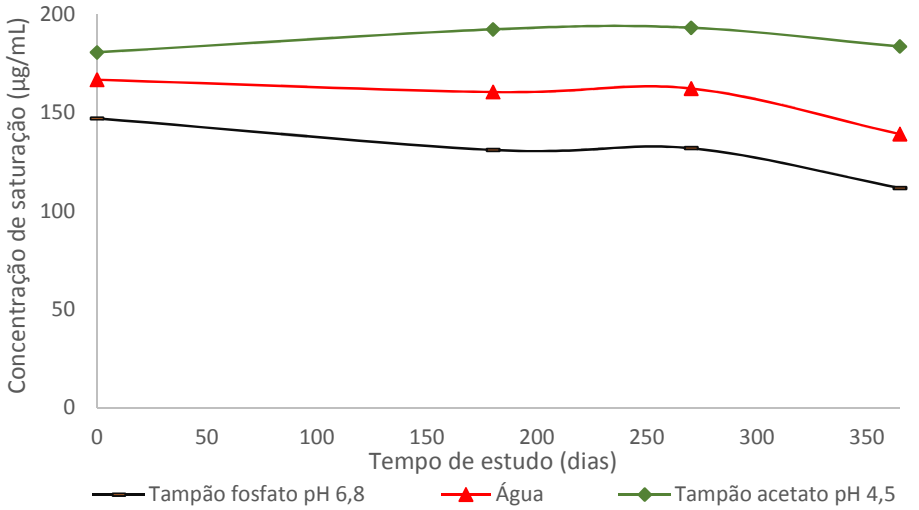


Figura 36. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida a calor úmido (30° C/ 75 %UR) por um ano.

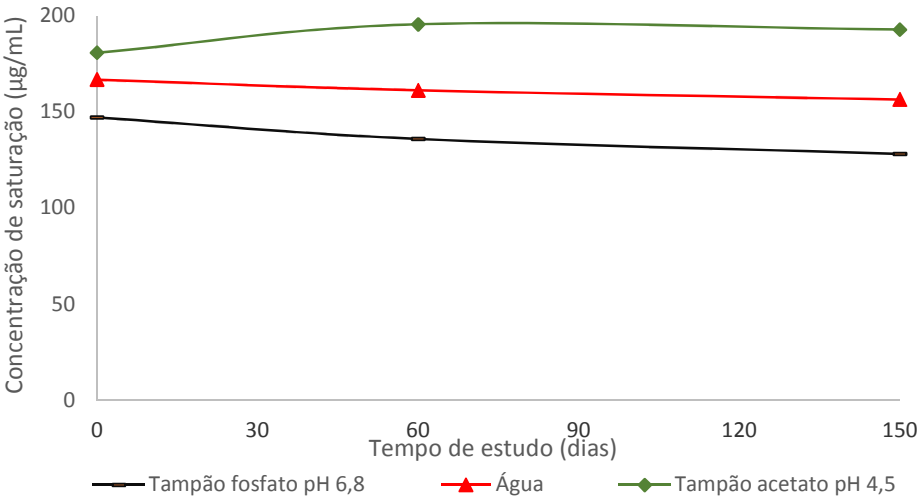


Figura 37. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida a calor úmido (40° C/ 75 %UR) por cinco meses.

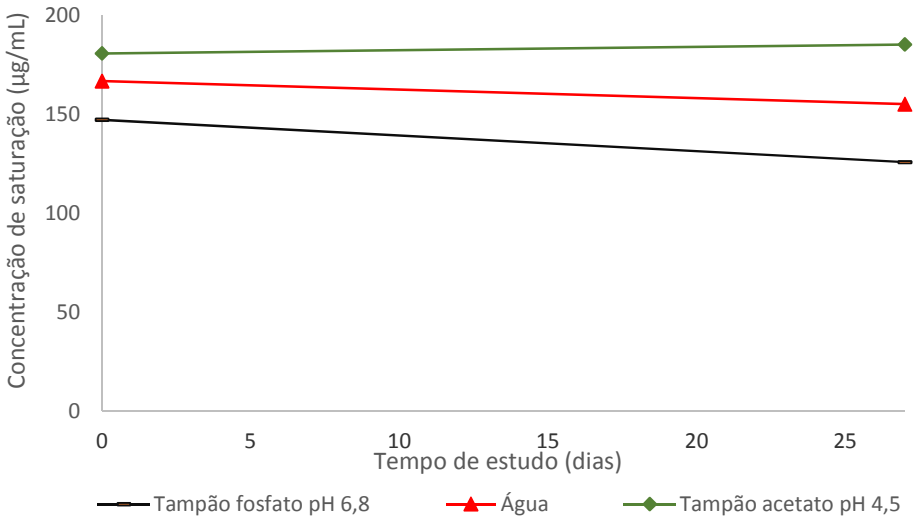


Figura 38. Solubilidade medida em diferentes meios para a matéria-prima submetida à luz UVC por 27 dias.

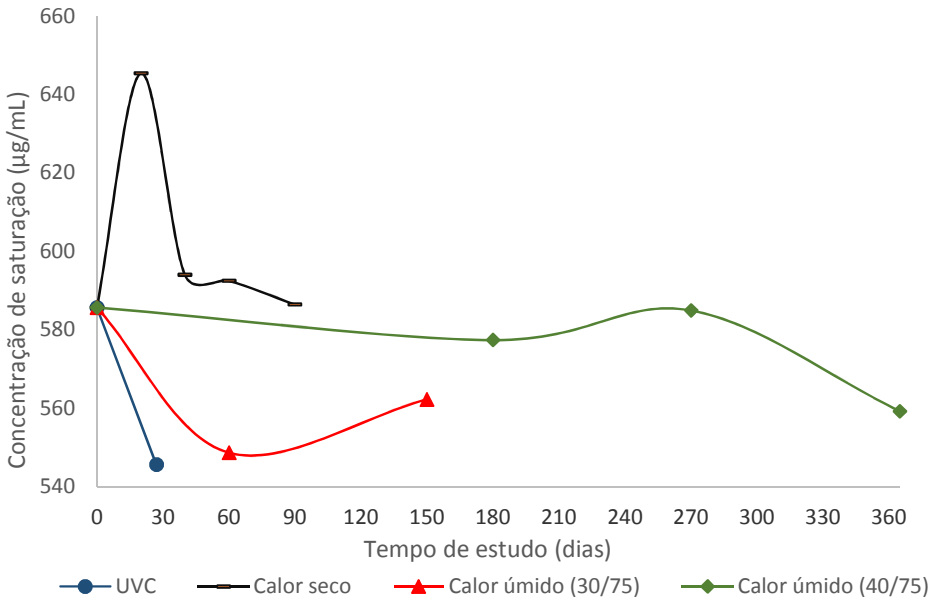


Figura 39. Solubilidade da matéria-prima submetida a diferentes condições de estresse medida em meio de dissolução (tampão fosfato pH 3,0 + 0,5% Tween 20®).

Comparando os resultados obtidos para as amostras submetidas a calor úmido e luz UVC em relação à matéria-prima não estressada (T_0) observa-se que há uma tendência de diminuição da solubilidade ao longo do tempo, independentemente do meio empregado. Mudanças no estado cristalino do fármaco, como as apresentadas no capítulo 10 (Parte IV) e as publicadas por Gysenghem e colaboradores (2009) têm impacto direto na solubilidade e velocidade de dissolução do darunavir.

As amostras submetidas ao calor seco apresentaram uma tendência de aumento da solubilidade ao longo do tempo quando nos meios água e tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. Em meio de dissolução um aumento pronunciado da solubilidade foi observado no início, seguida de queda. Comparando estes resultados com aqueles obtidos para a dissolução intrínseca dessas amostras, observa-se que, apesar da solubilidade no estado de equilíbrio ter aumentado, a velocidade com que o fármaco submetido ao calor seco se dissolve é menor que a matéria-prima não estressada.

A matéria-prima submetida ao calor seco sofreu mudanças em sua estrutura cristalina até a completa amorfização, como mostrado no capítulo 10 (Parte IV). Essas mudanças mostraram o seu impacto sobre a solubilidade e velocidade de dissolução do fármaco.

Além da instabilidade física do darunavir, a instabilidade da formulação afeta diretamente a velocidade de liberação do fármaco a partir do comprimido (Figura 34). Todos estes dados, conjuntamente, nos mostram que as mudanças polimórficas afetam a solubilidade e a velocidade de dissolução do fármaco em soluções fisiologicamente relevantes, o que nos permite inferir que sua biodisponibilidade pode ser afetada.

CONCLUSÃO GERAL

Os estudos de solubilidade e dissolução permitiram verificar a baixa solubilidade do darunavir em meios aquosos com valores de pH fisiologicamente relevantes. Ao comparar os resultados de solubilidade e de biodisponibilidade oral do darunavir quando coadministrado com ritonavir, podemos inferir que o fármaco deve ser classificado como classe II no sistema de classificação biofarmacêutica. Podemos inferir, ainda, que o perfil de liberação do darunavir a partir da formulação é de extrema importância, tendo em vista sua baixa solubilidade aquosa, que é um dos principais reguladores do perfil de absorção do fármaco quando coadministrado com o ritonavir.

Foi possível o desenvolvimento de perfil de dissolução *in vitro* para os comprimidos de darunavir hoje comercializados (Prezista® - darunavir 300 mg) com base em dados *in vivo*. Os dados de liberação do fármaco *in vitro*, a partir da formulação, mostraram alta correlação com os dados de fração absorvida *in vivo* (r^2= 0,95), que foram matematicamente transformados, a partir de dados de estudos *in vivo* submetidos à FDA para aprovação da comercialização do produto. O perfil de dissolução desenvolvido é discriminativo e tem alta relevância, ao predizer a liberação *in vivo* do fármaco a partir de dados de liberação *in vitro*. É, portanto, uma poderosa ferramenta de auxílio ao desenvolvimento de novos produtos para administração oral do darunavir e para produtos genéricos da atual formulação, que se encontra sob o período de proteção patentária.

A utilização de métodos alternativos aos ensaios *in vivo* é uma forte tendência nos dias atuais, buscando, sempre que possível e tomadas as devidas precauções, diminuir a utilização de seres vivos. As ferramentas *in vitro* e *in silico*, certamente, não substituem por completo os estudos com animais e seres humanos, mas são ferramentas valiosas que, se bem desenvolvidas e corretamente empregadas, permitem a diminuição do emprego de seres vivos em pesquisas.

Neste estudo foi possível desenvolver e validar uma ferramenta *in silico* para a predição do perfil de concentração plasmática do darunavir, através da aplicação da modelagem farmacocinética populacional fisiologicamente embasada (POP PBPK). Para tal, dados físico-químicos e farmacocinéticos do fármaco, dados do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir da formulação e dados de fisiológicos populacionais foram empregados. Os dados obtidos através dos estudos *in silico* a partir da utilização do

software Simcyp® mostraram alta correlação ($r^2 > 0,85$) com os dados *in vivo* obtidos de estudos apresentados à FDA para aprovação da comercialização do darunavir.

Os estudos de estabilidade e polimorfismo trouxeram importantes dados a respeito da instabilidade química do fármaco, tanto em solução quanto em estado sólido, formulado ou não. Sendo que, condições climáticas extremas, mas não muito distantes das possivelmente encontradas ao longo de todo o país proporcionam degradação química do fármaco e alteração em sua estrutura cristalina. Está é, portanto, uma questão importante, e estes estudos permitiram avaliar quais as principais ferramentas para a estabilização físico-química do fármaco e a elucidação de possíveis rotas de degradação da substância. Podemos concluir que mais importante que a formulação ou o revestimento, é a proteção conferida ao produto pela embalagem hoje utilizada, o que nos leva a concluir que o material de embalagem a ser empregado no produto contendo darunavir deve ser cuidadosamente escolhido. A proteção contra a exposição à luz e a utilização de adjuvantes com poder antioxidante, são imprescindíveis para as formulações contendo darunavir, e devem, por conseguinte, ser questões a que se deve dar atenção durante o desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade dessas formulações.

As mudanças na cristalidade do fármaco, quando submetido ao calor seco, mostraram afetar drasticamente o perfil de liberação do darunavir a partir da formulação estudada. De modo que a estabilidade da forma cristalina do fármaco deve ser monitorada para que o seu efeito terapêutico seja mantido. A garantia da manutenção da forma cristalina do fármaco deve ser uma preocupação que permeie a caracterização da matéria-prima a ser adquirida, a condição climática de estocagem da matéria-prima e do produto acabado, bem como o correto monitoramento do processo produtivo a ser empregado.

A utilização de métodos analíticos específicos e confiáveis, como os desenvolvidos neste estudo, é primordial para que se tenha segurança nos resultados obtidos e esta é, também, uma contribuição deste trabalho. Um método cromatográfico indicativo de estabilidade e um método espectrofotométrico com derivação foram desenvolvidos e validados neste estudo. Tais métodos são confiáveis e podem ser

usados como ferramentas analíticas para avaliação do darunavir e produtos contendo este fármaco.

Enfim, como suporte ao desenvolvimento de formulações contendo darunavir, este estudo proporciona diversas ferramentas e dados, com o intuito de contribuir para a produção de novos produtos e produtos genéricos do darunavir que apresenta alta qualidade como uma das garantias de sucesso terapêutico.

Enquanto a cura para a AIDS continua a ser um compromisso de longo prazo, os desafios terapêuticos, com respeito a qualidade e a eficácia dos produtos hoje utilizados, permanecem como alvos que precisam ser alcançados em curto prazo. Este trabalho buscou responder parte desses desafios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/labs pKa DB. Advanced Chemistry Development Inc., Copyright©1994-2002.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v.12, p.413-420, 1995.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. *Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, 2000. p.568.

BACK, D.; SEKAR, V.; LEFEBVRE, E.; De PAUW, M.; De PAEPE, E.; VANGENEUGDEN, T.; HOETELMANS, R.M.W. Use of darunavir (TMC114) in combination with other drugs: guidance from pharmacokinetic studies. *8th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection,* Glasgow, UK, Poster PL5.1, 12–16 November 2006.

BACK, D.; SEKAR, V.; HOETELMANS, R.M.W. Darunavir: pharmacokinetics and drug interactions. *Antiviral Therapy*, v.13, n.1, p.1-13, 2008.

BERGINC, K.; TRDAN, T.; TRONTELJ, J.; KRISTL, A. HIV Protease inhibitors: garlic supplements and first-pass intestinal metabolism impact on the therapeutic efficacy. *Biopharmaceutical Drug Disposition*, v.31, p.495-505, 2010.

BERMUDEZ, J. Medicamentos genéricos: uma alternativa para o mercado brasileiro. *Caderno de Saúde Pública,* v.10, p.368-378, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005, que aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 01 agosto de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011, que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 03 de agosto de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados

como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2013.

CARDOT, J-M.; BEYSSAC, E.; ALRIC, M. In vitro–in vivo correlation: importance of dissolution in IVIVC. *DissolutionTechnologies*. Fevereiro, 2007.

CARVALHO, M.C.R.D.; ACCIOLY JÚNIOR, H.; RAFFIN, F.N. Representações sociais do medicamento genérico por consumidores residentes em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v.22, n.3, p.653-661, 2006.

CAZEDEY, E.C.L; BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. A first derivative spectrophotometric method for the determination of ciprofloxacin hydrochloride in oftalmic solution. *Physical Chemistry*, v.2, n.6, p.116-122, 2012.

CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v.45, p.235-240, 2009.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.41, p.124-132, 2011.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v.59, n.4, p.181-190, 1999.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Influence of dissolution medium agitation on release profiles of sustained-release tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.27, n.8, p.811-817, 2001.

CURRAN, A.; GUTIERREZ, M.; DEIG, E.; MATEO, G.; LOPEZ, R.M.; IMAZ, A.; CRESPO, M.; OCAÑA, I.; DOMINGO, P.; RIBERA. E. Efficacy, safety and pharmacokinetics of 900/100 mg of darunavir/ritonavir once daily in treatment-experienced patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.65, p.2195-2203, 2010.

D'AVOLIO, A.; SICCARDI, M.; SCIANDRA, M.; BAIETTO L.; BONORA, S.; TRENTINI, L.; Di PERRI G. HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients. *Journal of Chromatography* B, v.859, p.234-240, 2007.

D'AVOLIO, A.; SIMIELE, M.; SICCARDI, M.; BAIETTO, L.; SCIANDRA, M.; BONORA, S.; Di PERRI. G. HPLC–MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.52, p.774-780, 2010.

D'AVOLIO, A.; SIMIELE, M.; SICCARDI, M.; BAIETTO, L.; SCIANDRA, M.; ODDONE, V.; STEFANI, F.R.; AGATI, S.; CUSATO, J.; BONORA, S.; Di PERRI. G. A HPLC–MS method for the simultaneous quantification of fourteen antiretroviral agents in peripheral blood mononuclear cell of HIV infected patients optimized using medium corpuscular volume evaluation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.54, p.779-788, 2011.

DAHAN, A.; MILLER, J.M.; AMIDON, G.L: Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, v.11, p.740-746, 2009.

DRESSMAN, J.B.; REPPAS, C. In vitro–in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.11, Suppl.2, p.S73-S80, 2000.

ELSE, L.; WATSON, V.; TJIA, J.; HUGHES, A.; SICCARDI, M.; KHOO, S.; BACK, D. Validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) assay for the simultaneous determination of existing and new antiretroviral compounds. *Journal of Chromatography* B, v.878, p.1455-1465, 2010.

EMA. European Medicines Agency: Pre-authorization evaluation of medicines for human use. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the investigations of bioequivalence. 2008. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf.

EMAMI, J. In vitro-in vivo correlation: From theory to applications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.9, n.2, p.31-51, 2006.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I. An integrated approach. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, n.5-6, p.755-767, 2001.

EV, L.S. Estabilidade de Medicamentos. In: REIS, A.M.M.; GOMES, M.J.V.M. *Ciências farmacêuticas – uma abordagem em farmácia hospitalar*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2003. p. 235-249.

FAYET, A.; BÉGUIN, A.; ZANOLARI, B.; CRUCHON, S.; GUIGNARD, N.; TELENTI, A.; CAVASSINI, M.; GÜNTHARD, H.F.; BUCLIN, T.; BIOLLAZ, J.; ROCHAT, B.; DECOSTERD, L.A. A LC–tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine. *Journal of Chromatography* B, v.877, p.1057-1069, 2009.

FDA, 1997. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Extended release solid dosageforms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for the Industry, 1997.

FDA, 2000. Food and Drug Administration: Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. 2000. Disponível em: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf.

FDA, 2004. Food and Drug Administration, 2004. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 2004.

FDA, 2005. Food and Drug administration. Center for drug evaluation and research. Aplication number 21-976 (Clinical pharmacology and biopharmaceuticals Review).

FDA. Food and Drug Administration. 2007. Consulta através do site: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm. Acesso em fevereiro de 2014.

FDA 2007a. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. ANDAs: Pharmaceutical solid polymorphism. Chemistry, Manufacturing, and Controls information, 2007.

FDA. Food and Drug Administration: New labeling approved for Prezista (darunavir). 2010. Disponível em:

http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm236771.htm. Acesso em fevereiro de 2014.

FDA, 2010a. Food and Drug Administration: Pediatric focused safety review: darunavir ethanolate (Prezista). 2010a. Disponível em: http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM235901.pdf. Acesso em novembro de 2013.

FELL, A.F. Analysis of pharmaceutical dosage forms by second derivative ultraviolet-visible spectrophotometry. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, v.15, p.260-267, 1978.

FUJIMOTO, H.; HIGUCHI, M.; WATANABE, H.; KOH, Y.; GHOSH, A.K.; MITSUYA, H.; TANOUE, N.; HAMADA, A.; SAITO, H. P-glycoprotein mediates efflux transport of darunavir in human intestinal Caco-2 and ABCB1 gene-transfected renal LLC-PK1 cell lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.32, p.1588-1593, 2009.

FUN, A.; JONG, D.; NIJHUIS, M. The genetic barrier of darunavir is decreased by Gag polymorphisms. *18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Boston, 2011. Disponível em: http://www.retroconference.org/2011/PDFs/603.pdf.

GARCÍA, S.P.; TUNICA, D.G.; SERRA, M.B. Desarrollo y validación de un método para la determinación de darunavir en plasma mediante LC-MS/MS. *Revista del Laboratorio Clínico*, v.4, n.3, p.127-133, 2011.

GHOSH, A.K.; KINCAID, J.F.; CHO, W.; WALTERS, D.E.; KRISHNAN, K.; HUSSAIN, K.A.; KOO, Y.; CHO, H.; RUDALL, C.; HOLLAND, L.; BUTHOD, J. Potent hiv protease inhibitors incorporating high-affinity p2-ligands and (r)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.8, p.687-690, 1998.

GOLDWIRT, L.; CHHUN, S.; REY, E.; LAUNAY, O.; VIARD, J-P.; PONS, G.; JULLIEN, V. Quantification of darunavir (TMC114) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *Journal of Chromatography* B, v.857, p.327-331, 2007.

GYSEGHEM, E.V.; STOKBROEKXB, S.; ARMAS, H.N.; DICKENS, J.; VANSTOCKEM, M.; BAERT, L.; ROSIER, J.; SCHUELLER, L.; Van den MOOTER, G. Solid state characterization of the anti-HIV drug TMC114: Interconversion of

amorphous TMC114, TMC114 ethanolate and hydrate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.38, p.489-497, 2009.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v.51, p.7-12, 1990.

HAUBRICH, R.; BERGER, D.; CHILIADE, P.; COLSON, A.; CONANT, M.; GALLANT, J.; WILKIN, T.; NADLER, J.; PIERONE, G.; SAAG, M.; Van BAELEN, B.; LEFEBVRE, E. Week 24 efficacy and safety of TMC114/ritonavir in treatment-experienced HIV patients. *Aids*, 21, p.F11-F18, 2007.

HONORATO, S.B.; FARFAN, S.; VIANA, A.; FILHO, J.M.; CAMARÃO, G.C. FECHINE, F.V.; MORAES, M.E.A. MORAES, M.O.; FERRO, M.; DABBENE, V., CUFFINI, S.L.; AYALA A.P. Polymorphism Evaluation in Generic Tablets containing Mebendazole by Dissolution Tests. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.23, n.2, p.220-227, 2012.

HAWARE, R.V.; WRIGHT, P.R.; MORRIS, K.R.; HAMAD, M.L. Data fusion of Fourier transform infrared spectra and powder X-ray diffraction patterns for pharmaceutical mixtures. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.56, p.944-949, 2011.

HEINE, R.T.; ALDERDEN-LOS, C.G.; ROSING, H.; HILLEBRAND, M.J.X.; Van GORP, E.C.M.; HUITEMA, A.D.R.; BEIJNEN, J.H. Fast and simultaneous determination of darunavir and eleven other antiretroviral drugs for therapeutic drug monitoring: method development and validation for the determination of all currently approved HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.21, p.2505-2514, 2007.

HEINE, R.T.; ROSING, H.; Van GORP, E.C.M.; MULDER, J.W.; Van der STEEG, W.A.; BEIJNEN, J.H.; HUITEMA, A.D.R. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography* B, v.867, p.205-212, 2008.

HEINE, R.T.; DAVIDS, M.; ROSING, H.; Van GORP, E.C.M.; MULDER, J.W.; Van der HEIDE, Y.T.; BEIJNEN, J.H.; HUITEMA, A.D.R. Quantification of HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in peripheral blood mononuclear cell lysate using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* B, v.877, p.575-580, 2009.

HOGGARD, P.G.; OWE, A. The mechanisms that control intracellular penetration of the HIV protease inhibitors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* v.51, n.3, p.493-496, 2003.

HOLMSTOCK, N.; MOLS, R.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In situ intestinal perfusion in knockout mice demonstrates inhibition of intestinal P-glycoprotein by ritonavir causing increased darunavir absorption. *Drug Metabolism and Disposition*, v.38, n.9, p.1407-1410, 2010.

HUANG, L.F.; TONG, W.Q. Impact of solid states properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, n.3, p.321-334, 2004.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline, 2003. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (Q6A), 1999. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf, acesso em março de 2014.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline, 2003. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2), 2003. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf, acesso em março de 2014.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf, acesso em março de 2014.

JAMEI, M; TURNER, D.; YANG, J.; NEUHOFF, S.; POLAK, S.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; TUCKER, G. Population-based mechanistic prediction of oral

drug absorption. *The American Association of Pharmaceutical Sciences Journal,* v.2, p.2, 2009.

JANSSEN-CILAG. Bula do medicamento Prezista®. Disponível em: http://www.ebulas.com.br/bulas/prezista%E2%84%A2?menuid=558. Acesso em janeiro de. 2014.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, n.1, p.85-96, 2004.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; SANGER-VAN DE GRIEND, C.; Van Den BELD, C.; SOMSEN, G.W.; De JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*, February, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.25, n.7, p.857-868, 1999.

LEVILLAIN, P.; FOMBEYDIE, D. Derivative spectrometry. Principles, advantages and limitations, applications. *Analysis*, v.14, p.1-20, 1986.

LI, S.; HE, H.; PARTHIBAN, L.J.; YIN, H.; SERAJUDDIN, A.T.M. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.94, n.7, p.1396-1417, 2005.

LÖBENBERG, R. The BCS, An overview. *I Simpósio Brasileiro de Normas e Ciência*, São Paulo, 2012.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.R.C. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analítica*, n.1, p.48-51, 2002.

MARTINDALE: the complete drug reference. 33rd ed. London; Chicago: Pharmaceutical, 2009.

MARTINS, J.D.; NERY, C.G.C.; PIANETTI, G.A.; VIANA-JUNIOR, N.S.; VIANNA-SOARES, C.D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.1, p.63-70, 2007.

MEYER, S.; AZIJN, H.; SURLERAUX, D.; JOCHMANS, D.; TAHRI, A.; PAUWELS, R.; WIGERINCK, P.; BÉTHUNE, M-P. TMC114, a novel human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor active against protease inhibitor resistant viruses, including a broad range of clinical isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy,* v.49, p.2314-2321, 2005.

MODI, N.B. In vitro-in vivo correlation. In: CHILUKURI, D.M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D. Ed. *Pharmaceutical Product Development. In vitro-In vivo Correlation*. New York: Informa Healthcare, p.107-124, 2007. (Drugs and The Pharmaceutical Sciences, v.165).

MORETTO, L.D. Fatores que influem na biodisponibilidade de fármacos e medicamentos. *Pharmaceutical Technology,* v.3, n.2, p.46-48, 1999.

New Drugs. Drug News, v.33, n.11, p.627-628, 2008.

NSO-ROCA, A.P.; LARRU, B.; BELLÓN, J.M.; MELLADO, M.J.; RAMOS, J.T.; GONZÁLEZ, M.I.; NAVARRO, M.L.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A.; José M.I. Niveles plasmáticos de antirretrovirales en niños con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Influencia del género y de la edad. *Enfermedades Infecciosas Microbiolgía Clínica*, v.28, p.278-283, 2010.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.39, n.1, p.105-113, 2003.

PREECHAGOON, D.; UDOMPRATEEP, A.; MANWIWATTANAGUL, G. Improved dissolution rate of poorly soluble drug by incorporation of buffers. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* v.26, n.8, p.891-894, 2000.

REDDY, M.P.; RAMIREDDY, N. Spectrophotometric estimation of darunavir in bulk and pharmaceutical formulations. *International Journal of Chemical Sciences*, v.11, n.1, p.614-618, 2013.

REZK, N.L.; WHITE, N.R.; JENNINGS, S.H.; KASHUBA, A.D.M. A novel LC–ESI-MS method for the simultaneous determination of etravirine, darunavir and ritonavir in human blood plasma. *Talanta*, v.79, p.1372-1378, 2009.

RIPAMONTI, D.; ARRIBAS, J.; HILL, A.; PULIDO, F.; MOECKLINGHOFF, C.; NELSON, M. Non-inferior efficacy shown across different efficacy endpoints in the MONET trial of darunavir/ritonavir (DRV/r) monotherapy. Poster PS4/1. 12th European Aids Conference/ EACS, Cologne, Germany, November 2009.

RITTWEGER, M.; ARASTÉH, K. Clinical pharmacokinetics of darunavir. *Clinical Pharmacokinetics*, v.46, n.9, p.739-756, 2007.

ROCHA FRP, TEIXEIRA LSG. Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry. *Química Nova*, v.27, n.5, p.807, 2004.

ROSSI, R.C.; DIAS, C.L.; BAJERSKI, L.; BERGOLD, A.M.; FRÖEHLICH, P.E. Development and validation of discriminating method of dissolution for fosamprenavir tablets based on in vivo data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.54, p.439-444, 2011.

RUIZ, M.E.; GREGORINI, A.; TALEVI, A.; VOLONTÉ, M.G. Dissolution studies of generic medications: new evidence of deviations from the transitivity principle. *Dissolution Technologies*, p.13-24, 2012.

SANCHEZ-ROJAS, F.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, v.35, n.10, p.753-761, 1988.

ŠAŠKOVÁ, K.G.; KOZÍSEK, M.; REZÁCOVÁ, P.; BRYNDA, J.; YASHINA, T.; KAGAN, R.M.; KONVALINKA, J. Molecular characterization of clinical isolates of human immunodeficiency virus resistant to the protease inhibitor darunavir. *Journal of Virology*, v.83, n.17, p.8810-8818, 2009.

SEKAR, V.J.; GUZMAN; S.; STEVENS; T.; DePAEPE; E.; LEFEBVRE, E.; HOETELMANS, R.M.W. Absolute bioavailability of TMC114, administered in the absence and presence of low dose ritonavir. Abstract 86. *7th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy*, Londres, Inglaterra, 20-22 de abril de 2006.

SEKAR, V.J.; SPINOSA-GUZMAN, S.; LEFEBVRE, E.; HOETELMANS, R.M.W. Clinical pharmacology of TMC114 – a new HIV protease inhibitor. Poster TUPE 0083. *16th International AIDS Conference*, Toronto, Canadá, 13-18 de agosto de 2006a.

SEKAR, V.J.; KESTENS, D.; SPINOSA-GUZMAN, S.; De PAUW, M.; De PAEPE, E.; VANGENEUGDEN, T.; LEFEBVRE, E.; HOETELMANS, R.M.W. The effect of different meal types on the pharmacokinetics of darunavir (TMC114)/ritonavir in hiv-negative healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.47, p.479-484, 2007.

SEKAR, V.J.; LEFEBVRE, E.; De PAEPE, E.; De MAREZ, T.; De PAUW, M.; PARYS, W.; HOETELMANS, R.M.W. Pharmacokinetic interaction between darunavir boosted with ritonavir and omeprazole or ranitidine in human immunodeficiency virus-negative healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, n.3, p.958-961, 2007a.

SEKAR, V.J.; ABEELE, C.V.; Van BAELEN, B.; VIS, P.; LAVREYS, L.; De PAUW, M.; DINCQ, S.; VANGENEUGDEN, T.; SPINOSA-GUZMAN, S.; HOETELMANS, R.M.W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of once-daily darunavir in the ARTEMIS study. Poster P42. *9th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy*, Nova Orleans, EUA, 7-9 de abril de 2008.

SEKAR, V.J.; SPINOSA-GUZMAN, S.; De PAEPE, E.; De PAUW, M.; VANGENEUGDEN, T.; LEFEBVRE, E.; HOETELMANS, R.M.W. Darunavir/ritonavir pharmacokinetics following coadministration with clarithromycin in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v.48, p.60-65, 2008a.

SEKAR, V.J.; LEFEBVRE, E.; De PAUW, M.; VANGENEUGDEN, T.; HOETELMANS,. R.M.W. Pharmacokinetics of darunavir/ritonavir and ketoconazole following co-

administration in HIV–healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.66, n.2, p.215-221, 2008b.

SHAH, V.P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; WILLIAMS, R.L. Dissolution profile comparison using similarity factor, f2. *Dissolution Technologies*, v.6, n.3, 1999. Disponível em: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/899Art/DissProfile.html

SHARMA, P.; GARG, S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews,* v.62, p.491-502, 2010.

SINHA, S.; ALI, M.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; KUMAR, A.; ALI, J. Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. *The American Association of Pharmaceutics Scientists Journal*, v.11, p.518-527, 2010.

SOSNIK, A.; CHIAPPETTA, D,A.; CARCABOSO, A.M. Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: what has been done and the challenges standing ahead. *Journal of Control Release*, v.138, p.2-15, 2009.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN C.; CAI, M.N. *Ciências Farmacêuticas. Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TAKAHASHI, M.; KUDAKA, Y.; OKUMURA, N.; HIRANO, A.; BANNO, K.; KANEDA, T. The validation of plasma darunavir concentrations determined by the HPLC method for protease inhibitors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.30, n.10, v.1947-1949, 2007.

TALSKY, G.; MAYRING, L.; KREUZER, H. High resolution, higher-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English,* v.17, n.11, p.785-799, 1978.

TOMI, M.; NISHIMURA, T.; NAKASHIMA, E. Mother-to-fetus transfer of antiviral drugs and the involvement of transporters at the placental barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.100, n.9, p.3708-3718, 2011.

TONNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.225, p.1-14, 2001.

USP 30. US Pharmacopeial Forum, 2004. Pharmacopeial Previews, v. 30, p. 351-363, 2004.

US Pharmacopeial Forum, 2004. Pharmacopeial Previews, v. 30, p. 351-363, 2004.

USP 32. US Pharmacopoeia, NF-25 <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation. 32nd ed. Rockville, MD, US Pharmacopoeial Convention, 2009.

USP 35. United States Pharmacopoeia. 35th ed. National Formulary XXVII. Rockville, MD, US Pharmacopoeial Convention, 2012.

VADAS, E.B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENARO, A.R. Ed. *Remington. A Ciência e a prática em farmácia*. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1022-1031.

VERMEIR, M.; LACHAU-DURAND, S.; MANNENS, G.; CUYCKENS, F.; Van HOOF, B.; RAOOF, A. Absorption, metabolism, and excretion of darunavir, a new protease inhibitor, administered alone and with low-dose ritonavir in healthy subjects. *Drug Metabolism and Disposition*, v.37, n.4, p.809-820, 2009.

WAGNER, J.G. Application of the Loo-Riegelman absorption method. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, v.3, n.1, p. 51-67, 1975.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v.293, p.101–125, 2005.

WHO. World Health Organization. AIDS Epidemic Update, 2009. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/hiv_aids_20091124/en/index.html, http://www.who.int/hiv/data/2009_global_summary.png, (Accesso em novembro de 2012).

WHO. World Health Organization. HIV/AIDS. Data and Statistics. 2013. Disponível em: http://www.who.int/hiv/data/en/, (Accesso em fevereiro de 2014).

WHO. World Health Organization. HIV/AIDS. Fact sheet N°360. Updated October 2013a. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/, (Accesso em fevereiro de 2014).

www.molinspiration.com, acesso em janeiro de 2014.

www.drugbank.ca/drugs/DB01264, acesso em janeiro de 2014.

YEKALA, R.; ADAMS, E.; Van SCHEPDAEL, A.; HOOGMARTENS, J. Quality control of protease inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.97, n.6, p.2012-2021, 2008.

YOUDEN, W.J.; STEINER, E.H. *Statistical manual of AOAC* – Association of Official Analytical Chemistry. Washington, AOAC, 1975.