

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Processo FAPESP: 2012/02749-6

Processo CNPq: 142080/2012-8

Processo CAPES: 11114-12-6 – Doutorado Sandwich

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE DARUNAVIR
ETANOLATO EM COMPRIMIDOS
E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Ana Carolina Kogawa

Araraquara - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE DARUNAVIR
ETANOLATO EM COMPRIMIDOS
E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Aluna: Ana Carolina Kogawa

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como exigência para
obtenção de grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento
de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes
Salgado.

Araraquara – SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K78a Kogawa, Ana Carolina
Análise químico-farmacêutica de darunavir etanolato em comprimidos e de seu complexo de inclusão / Ana Carolina Kogawa. – Araraquara, 2015.
242 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Hérica Regina Nunes Salgado.

1. Darunavir. 2. Darunavir:β-ciclodextrina. 3. Estabilidade. 4. Produtos de degradação.
5. Solubilidade. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE DARUNAVIR
ETANOLATO EM COMPRIMIDOS
E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Araraquara, 07 de abril de 2015.

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Profa. Dra. Silvia Staniscuaski Guterres

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Prof. Dr. Maximiliano da Silva Sangoi

Prof. Dr. Marlus Chorilli

*Ó Senhor **Deus**, tu és o meu defensor e o meu protetor.*

*Tu és o meu **Deus**; eu confio em ti (Salmo 90).*

A ti devo a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei.

Deu-me a chance de encontrar a sabedoria e principalmente oportunizou que eu a dispuseste a serviço do bem comum.

*Aos meus pais, tão queridos,
Lucimar e Antonio Carlos,
pelo amor, apoio, compreensão e incentivo.*

“Eu não existo longe de vocês...”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Doutora Hérica Regina Nunes Salgado, pela confiança, compreensão, amizade, incentivo e colaboração.

Às minhas irmãs, sobrinha e aos meus avós, que mesmo longe sempre estiveram pertos, Ana Claudia Kogawa, Ana Paula Kogawa, Valentina, vó Toninha, Bá e Di. Aos meus familiares, que compartilharam comigo minha caminhada, tia Dalva, tio Lula e Isabel Timóteo.

Aos meus colegas de laboratório, que dividiram comigo aprendizado, alegrias, conquistas, frustrações, tristezas e anseios que a pesquisa nos proporciona, Camila Tavares, Danilo Rodrigues, Eliane Tótolí, Felipe Hugo, Jaqueline Mendonça Nakau, Josilene Corrêa, Tahisa Pedroso. À Maria de Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico e amizade.

Aos docentes do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, em especial a Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e a Profa. Dra. Leila Chiavacci.

Aos docentes da Faculdade de Química de Araraquara, em especial ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Aos docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, em especial ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e a Profa. Dra. Cristiane Masseto de Gaiani, por me receberem com todo o carinho em seus laboratórios e me proporcionarem a oportunidade de aprender técnicas novas.

À Profa. Dra. Marcela Longhi, pela colaboração de parte do meu trabalho e sonho. Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Córdoba, por permitir a realização do complexo de inclusão darunavir: β -ciclodextrina e todas as análises térmicas e espectroscópicas. Aos meus amigos de Córdoba, Ariana Zoppi, Carolina Aloisio e Maria Julia Mora.

À secretaria de pós-graduação, em especial a Cláudia, Joyce, Daniela e Flávia. Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre solícitos e dispostos a ajudar. Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

A Capes, ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

“Qualidade é adequação ao uso (Joseph Juran), é conformidade com as especificações (Philip Crosby), é grau de satisfação proporcionado ao consumidor durante o seu uso (Armand Feigenbaum).”

“Treinamento deve começar e terminar com educação (Ishikawa).”

“Organização é a base para tudo... Não é apenas deixar bonito e sim funcional.” “O lugar mais limpo não é aquele que mais se limpa, e sim o que menos se suja.” “É impossível haver progresso sem mudança e quem não consegue mudar a si mesmo não muda coisa alguma (Pensamento 5 S’s).”

“Se conheces teu inimigo e a ti mesmo, não precisas temer os resultados de centenas de batalhas. Se conheces a ti mesmo, mas não ao teu inimigo, para cada vitória, sofrerás uma derrota. Se não conheces nem a ti mesmo nem ao teu inimigo, então sucumbirás em todas as batalhas (Sun Tzu 500 a.C.).”

RESUMO

O trabalho objetivou a formação do complexo darunavir:β-ciclodextrina e o estudo das consequências desta complexação, além do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa do darunavir em comprimidos (livre) e complexado à β-ciclodextrina. darunavir livre. Durante todo o tempo de pesquisa a forma etanolato do darunavir foi controlada para garantir o uso do mesmo polimorfo e não haver diferenças analíticas. As análises qualitativas foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria no ultravioleta (UV), espectrofotometria no infravermelho (IV), cromatografia líquida (CL) e eletroforese capilar (EC) possibilitando a identificação do darunavir etanolato em comprimidos. Métodos mais dinâmicos e ecologicamente corretos foram validados para a quantificação do darunavir etanolato na forma farmacêutica utilizando o IV e a EC. Os resultados das validações foram analisados comparativamente e as técnicas mostraram-se equivalentes sendo, portanto, intercambiáveis. darunavir:β-ciclodextrina. O darunavir foi complexado à β-ciclodextrina e confirmado através de técnicas térmicas e estudado por métodos espectroscópicos. Suas propriedades foram comparadas às do fármaco livre quanto à solubilidade e o complexo de inclusão mostrou ser 28 vezes mais solúvel que o darunavir quando utilizada a solução tamponante acetato 0,05 M pH 4,5. Este avanço da tecnologia farmacêutica abrange a resolução “*Best medicines for children*” discutida na Assembleia Mundial da Saúde, a qual lançou a campanha global “*Make medicines child size*”. Um método para quantificação de darunavir no complexo foi validado através da CL acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), nele foram identificados seis produtos de degradação sendo dois provenientes da degradação em meio ácido, um da degradação em meio básico e três em meio oxidativo. Uma técnica de CCD desenvolvida foi adequada para a visualização de todos os produtos de degradação do complexo darunavir:β-ciclodextrina observados no método de CL, sendo alcançado de forma mais rápida e com menor custo. O complexo mostrou-se estável quando exposto à temperatura de 30 °C ± 2 °C e umidade de 75 % UR ± 5 % UR por 24 meses. Todo o trabalho desenvolvido nesta tese contou com as ferramentas da qualidade, que são de fundamental importância por ajudar a resolver problemas, otimizar tempo e também detectar novas possibilidades para melhorar um processo ou torná-lo mais efetivo frente ao objetivo pretendido.

Palavras-chave: darunavir, darunavir:β-ciclodextrina, estabilidade, produtos de degradação, solubilidade.

ABSTRACT

The work aimed the formation of complex darunavir: β -cyclodextrin and the study of the consequences of complexation, as well as development and validation of analytical methods for qualitative and quantitative determination of darunavir in tablet (free) and complexed to β -cyclodextrin. darunavir free. The form of darunavir ethanolate was monitored throughout research time to ensure use of the same polymorph and no analytical differences. Qualitative analysis was performed by thin layer chromatography (TLC), ultraviolet spectrophotometry (UV), infrared spectroscopy (IR), liquid chromatography (LC) and capillary electrophoresis (CE) allowing the identification of darunavir ethanolate in tablets. More dynamic and environmentally friendly methods were validated for the quantification of darunavir ethanolate in pharmaceutical form using the IV and CE. The results of the validations were comparatively analyzed and techniques were equivalent and are therefore interchangeable. darunavir: β -ciclodextrina. Darunavir was complexed with β -cyclodextrin and confirmed by thermal techniques and studied by spectroscopic methods. Its properties were compared to the free drug as to solubility of inclusion complex and it is 28 times more soluble than darunavir when using buffer solution of 0.05 M acetate pH 4.5. This advance of pharmaceutical technology covers the resolution "Best medicines for children" discussed in the World Health Assembly, which launched the global campaign "Make medicines child size". A method for quantification of darunavir in the complex was validated by LC coupled with mass spectrometry (LC-MS), with him were identified six degradation products, two from acid degradation, one from basic degradation and three from oxidative degradation. A developed TLC technique was adequate for visualizing all degradation products of complex darunavir: β -cyclodextrin observed in the CL method, being achieved faster and cheaper. Complex darunavir: β -cyclodextrin was stable when exposed to temperature of 30 °C \pm 2 °C and humidity of 75 % RH \pm 5 % RH for 24 months. All the work done in this thesis included the quality tools, which are fundamental because they help solve problems, optimize time and also detect new possibilities to improve a process or make it more effective according to the intended objective.

Keywords: darunavir, darunavir: β -cyclodextrin, degradation products, solubility, stability.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUÇÃO	32
1. OBJETIVOS	35
1.1. Objetivo geral	35
1.2. Objetivos específicos.....	35
2. REVISÃO DA LITERATURA	37
2.1. Estrutura química.....	37
2.2. Formas estruturais	38
2.3. Mecanismo de ação	39
2.4. Farmacocinética.....	40
2.5. Aplicações clínicas	40
2.6. Características dos antirretrovirais	42
2.7. Polimorfismo	43
2.8. Métodos de análise para o darunavir	44
2.9. Ferramentas da qualidade	49
2.9.1. 5 S's.....	50
2.9.2. 5 W e 2 H.....	53
2.9.3. 6 σ	53
2.9.4. Análise de <i>SWOT</i>	54
2.9.5. <i>Benchmarking</i>	54
2.9.6. <i>Brainstorming</i>	55
2.9.7. Cartas de Controle	56
2.9.8. Diagrama de Ishikawa	56
2.9.9. <i>FMEA (Failure Mode and Effects Analysis)</i>	57
2.9.10. Gráfico de Pareto	58
2.9.11. Mapeamento de processos	59

2.9.12. Multivotação	60
2.9.13. Os 5 porquês	60
2.9.14. <i>Poka Yoke</i>	61
2.9.15. <i>QFD (Quality Function Deployment)</i>	62
2.9.16. Tabela de Pares	62
2.9.17. <i>Team Charter</i>	63
2.9.18. Equipe de trabalho	63
2.10. Artigo publicado	64
ESTUDOS COM O DARUNAVIR LIVRE	65
3. INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO.....	66
3.1. Introdução.....	66
3.2. Parte Experimental	68
3.2.1. Material.....	68
3.2.2. Método.....	68
3.3. Resultados.....	69
4.4. Discussão	76
3.5. Conclusão	80
4. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS	81
4.1. Introdução.....	81
4.2. Análise Qualitativa	82
4.3. Parte Experimental	82
4.3.1. Materiais	82
4.3.2. Determinação do Peso Médio.....	82
4.3.2.1. Material.....	82
4.3.2.2. Método.....	83
4.3.2.3. Resultados.....	83
4.3.2.4. Discussão	84
4.3.3. Cromatografia em Camada Delgada.....	84
4.3.3.1. Material.....	84

4.3.3.2. Método.....	85
4.3.3.3. Resultados.....	86
5.3.3.4. Discussão.....	87
4.3.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	89
4.3.4.1. Material.....	89
4.3.4.2. Método.....	89
5.3.4.3. Resultados.....	90
4.3.4.4. Discussão.....	90
4.3.5. Espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	91
4.3.5.1. Material.....	91
4.3.5.2. Método.....	91
4.3.5.3. Resultados.....	91
4.3.5.4. Discussão.....	94
4.3.6. Eletroforese capilar.....	95
4.3.6.1. Material.....	95
4.3.6.2. Método.....	95
4.3.6.3. Resultados.....	98
4.3.6.4. Discussão.....	99
4.4. Conclusão.....	100
4.5. Artigo publicado.....	100
5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS.....	101
5.1. Introdução.....	101
5.1.1 Parâmetros da validação analítica.....	102
5.2. Análise Quantitativa.....	104
5.3. Parte Experimental.....	104
5.3.1. Materiais.....	104
5.3.2. Espectrometria de absorção na região de infravermelho.....	105
5.3.2.1. Material.....	105
5.3.2.2. Método.....	105

5.3.2.3. Validação	106
5.3.2.3.1. Linearidade	106
5.3.2.3.2. Limites de detecção e de quantificação	106
5.3.2.3.3. Especificidade e Seletividade	106
5.3.2.3.4. Precisão.....	106
5.3.2.3.5. Exatidão	107
5.3.2.3.6. Robustez	108
5.3.2.3.7. Doseamento	108
5.3.2.4. Resultados.....	109
5.3.2.5. Discussão	113
5.3.2.6. Conclusão	117
5.3.2.7. Artigo publicado	117
5.3.3. Eletroforese capilar.....	117
5.3.3.1. Materiais	117
5.3.3.2. Método.....	117
5.3.3.3. Validação	118
5.3.3.3.1. Linearidade	118
5.3.3.3.2. Limites de detecção e de quantificação	118
5.3.3.3.3. Especificidade.....	119
5.3.3.3.4. Precisão.....	119
5.3.3.3.5. Exatidão	119
5.3.3.3.6. Robustez	120
5.3.3.3.7. Doseamento	121
5.3.3.4. Resultados.....	122
5.3.3.5. Discussão	130
5.3.3.6. Conclusão	134
5.3.3.7. Artigo publicado	134
5.4. Análise comparativa	134
5.4.1. Artigo publicado	136
ESTUDOS COM O COMPLEXO DARUNAVIR:B-CICLODEXTRINA.....	137

6. COMPLEXO DE INCLUSÃO	138
6.1. Introdução.....	138
6.2. Parte experimental.....	140
6.2.1. Material.....	140
6.2.2. Método.....	140
6.2.2.1. Construção da curva analítica.....	140
6.2.2.2. Diagrama de Solubilidade de Fases (DSF).....	140
6.2.2.3. Complexação e Liofilização.....	141
6.2.2.4. Estudos com o complexo de inclusão.....	141
6.3. Resultados.....	143
6.3.1. Construção da curva analítica.....	143
6.3.2. Diagrama de Solubilidade de Fases (DSF).....	144
6.3.3. Complexação e liofilização.....	145
6.3.4. Estudos com o complexo de inclusão.....	146
6.4. Discussão.....	155
6.5. Conclusão.....	160
6.6. Artigo publicado.....	160
7. TESTE DE SOLUBILIDADE	161
7.1. Introdução.....	161
7.2. Parte experimental.....	162
7.2.1. Material.....	162
7.2.2. Método.....	162
7.3. Resultados.....	163
7.4. Discussão.....	166
7.5. Conclusão.....	167
7.6. Artigo publicado.....	167
8. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO	168
8.1. Introdução.....	168
8.2. Análise Qualitativa e Quantitativa.....	168

8.3. Parte Experimental da Análise Qualitativa.....	168
8.3.1. Material.....	168
8.3.2. Método.....	169
8.3.3. Resultados.....	171
8.3.4. Discussão.....	173
8.4. Parte Experimental da Análise Quantitativa.....	174
8.4.1. Material.....	174
8.4.2. Método.....	174
8.4.2.1. Validação.....	175
8.4.2.2.1. Linearidade.....	175
8.4.2.2.2. Limites de detecção e de quantificação.....	175
8.4.2.2.3. Especificidade.....	175
8.4.2.2.4. Precisão.....	176
8.4.2.2.5. Exatidão.....	176
8.4.2.2.6. Robustez.....	177
8.4.2.2.7. Doseamento.....	178
8.4.3. Resultados.....	178
8.4.4. Discussão.....	188
8.4.5. Conclusão.....	192
9. CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ..	193
9.1. Introdução.....	193
9.2. Parte Experimental.....	194
9.2.1. Material.....	194
9.2.2. Método.....	194
9.3. Resultados.....	196
9.4. Discussão.....	200
9.5. Conclusão.....	202
10. INFLUÊNCIA DA CCD NA IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO COMPLEXO DARUNAVIR:B-CICLODEXTRINA.....	203
10.1. Introdução.....	203

10.2. Parte experimental	204
10.2.1. Material.....	204
10.2.2. Método.....	204
10.3. Resultados.....	205
10.4. Discussão	210
10.5. Conclusão	211
10.6. Artigo publicado	212
11. ESTUDO DE ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO	213
11.1. Introdução.....	213
11.2. Parte Experimental	214
11.2.1. Material.....	214
11.2.2. Método.....	214
11.3. Resultados.....	216
11.4. Discussão	224
11.5. Conclusão	226
CONCLUSÕES.....	227
REFERÊNCIAS	230

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.	34
Figura 2. Estrutura química do darunavir (CAS 206361-99-1).....	37
Figura 3. Grupos funcionais correspondentes aos valores de pKa do darunavir.....	37
Figura 4. Obtenção das formas amorfo, etanolato e hidrato do darunavir.	38
Figura 5. Célula infectada com o HIV, enfocando os seus componentes.	39
Figura 6. Estrutura química do darunavir com destaque para o grupo 3(R), 3a(S), 6 ^a (R)- bistetrahydrofuraniluretanóisótero.	39
Figura 7. Ilustração da variabilidade de um processo, evidenciando o resultado esperado que é o efeito serrate. LSC = limite superior de controle e LIC – limite inferior de controle.	56
Figura 8. Ilustração do Diagrama de Ishikawa.....	57
Figura 9. Ilustração do Gráfico de Pareto.....	58
Figura 10. (A) Ilustração do Diagrama <i>top-down</i> e do (B) Desdobramento Funcional.	60
Figura 11. Ilustração da Tabela de Pares para 5 itens e uma equipe de 8 membros. No canto direito, um exemplo de sistema de pontos.	62
Figura 12. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir MP com as bandas características de absorção no tempo 0.....	70
Figura 13. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir MP com as bandas características de absorção após 30 meses.	71
Figura 14. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir hidrato com as bandas características de absorção.....	71
Figura 15. Curva TG (A) e DTG (B) do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min no tempo 0.	72
Figura 16. Curva TG (A) e DTG (B) do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.	72

Figura 17. Curva TG (A) e DTG (B) do darunavir hidrato sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.	73
Figura 18. Curva DSC do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 150 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min no tempo 0.	73
Figura 19. Curva DSC do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 150 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.	74
Figura 20. Curva DSC do darunavir hidrato sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 150 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.	74
Figura 21. (A) Capilar contendo darunavir etanolato antes da análise e (B) capilar contendo darunavir etanolato depois do aquecimento a 106,4 °C.	75
Figura 22. Difratoograma experimental de difração de raios-X da amostra de darunavir etanolato.	76
Figura 23. Difratoograma experimental de difração de raios-X da amostra de darunavir hidrato.	76
Figura 24. Ilustração da variação do peso dos vinte comprimidos de darunavir.	84
Figura 25. Esquema para aplicação das alíquotas de MP, amostra e placebo na placa com sílica-gel para a análise por CCD.	85
Figura 26. Perfil cromatográfico (A) do placebo, (B) da amostra e (C) da MP, ambos com Rf de 0,83 após visualização em câmara UVA a 365 nm, fase estacionária composta por sílica-gel e fase móvel contendo água purificada e álcool metílico, 70:30 (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido acético glacial.	87
Figura 27. Sobreposição dos espectros da MP, comprimidos e placebo, em álcool etílico, na concentração de 20 µg/mL.	90
Figura 28. Grupamentos funcionais do darunavir.	92
Figura 29. Espectro de IV da MP com as bandas de absorção características.	92
Figura 30. Sobreposição dos espectros de IV da MP, comprimidos e placebo.	94

Figura 31. Ilustração para o cálculo da assimetria do pico.....	97
Figura 32. Sobreposição dos eletroferogramas da MP e amostra, ambos na concentração de 140 µg/mL, para identificação do darunavir pelo método de EC utilizando capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm. Tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida em modo hidrodinâmico na voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	98
Figura 33. Sobreposição dos eletroferogramas da MP, amostra e placebo, todos na concentração de 140 µg/mL, para avaliação da influência dos excipientes na análise de darunavir por EC utilizando capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm. Tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida em modo hidrodinâmico na voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.....	99
Figura 34. Componentes críticos da validação.....	102
Figura 35. Curva analítica de misturas de darunavir etanolato MP e KBr, nas concentrações de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mg, obtida pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho através da banda da carbonila em 1757-1671 cm ⁻¹ . 110	
Figura 36. Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrometria de absorção na região do infravermelho para as pastilhas de darunavir etanolato MP, comprimidos e adjuvantes preparadas em KBr na concentração de 2,5 mg.	111
Figura 37. Trombeta de Horwitz (Fonte: HARRIS, 2007).....	116
Figura 38. Curva analítica de soluções de darunavir MP, nas concentrações de 50; 80; 110; 140; 170 e 200 µg/mL, obtida pelo método de eletroforese capilar.....	123
Figura 39. Eletroferograma da degradação em meio ácido do darunavir amostra na concentração de 140 µg/mL em HCl 0,01 M após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	125
Figura 40. Eletroferograma da degradação em meio básico do darunavir amostra na concentração de 140 µg/mL em NaOH 0,01 M após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante	

borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	125
Figura 41. Eletroferograma da degradação em meio oxidativo do darunavir amostra na concentração de 140 µg/mL em H ₂ O ₂ 3 % após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	126
Figura 42. Detalhe do eletroferograma da degradação em meio oxidativo do darunavir amostra na concentração de 140 µg/mL em H ₂ O ₂ 3 % após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	126
Figura 43. Eletroferograma da degradação em meio térmico do darunavir amostra na concentração de 140 µg/mL em água purificada após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	127
Figura 44. Eletroferograma da degradação fotolítica do darunavir amostra na concentração de 140 µg/mL em água purificada após 8 horas em luz UV a 25 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.	127
Figura 45. Perfil do fluxo laminar de sistemas hidrodinâmicos (A) e do fluxo eletroosmótico de sistemas eletrodinâmicos (B).	130
Figura 46. Estrutura química do darunavir, enfatizando os prótons, A, B, C, D, E e F, para análise de deslocamentos químicos referentes aos ¹ H do darunavir.	138
Figura 47. Estrutura química da β-ciclodextrina.	140
Figura 48. Curva analítica de darunavir etanolato em água purificada, nas concentrações de 10, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 µg/mL, obtida pelo método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta a 268 nm.	144

Figura 49. DSF do darunavir e diferentes concentrações de solução de β -CD em água purificada.	145
Figura 50. Ilustração das etapas da formação do complexo darunavir: β -CD em pó. (A) solução aquosa de darunavir e β -CD na proporção 1:1, (B) congelamento em nitrogênio líquido, (C) acoplamento do frasco no liofilizador e (D) possível complexo de inclusão darunavir: β -CD.	146
Figura 51. Espectros de infravermelho da β -CD, darunavir etanolato, mistura física e complexo de inclusão.	147
Figura 52. Curvas de TG e DTG da (A) β CD, (B) darunavir etanolato, (C) mistura física e (D) complexo de inclusão.	148
Figura 53. Curvas DSC da (A) β CD, (B) darunavir etanolato, (C) mistura física e (D) complexo de inclusão.	149
Figura 54. <i>Clusters</i> das conformações encontradas para o complexo darunavir: β CD.	150
Figura 55. Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo darunavir: β -CD.	152
Figura 56. Difratoograma experimental de difração de raios-X para a amostra de β -CD. .	152
Figura 57. A β -CD foi identificada como sendo a β -CD nonahidratada, a comparação com o padrão simulado (vermelho) da estrutura cristalina descrita por DAMODHARAN e colaboradores (2004), mostra que os dois padrões de difração de raios-X são semelhantes.	153
Figura 58. Gráfico de Rietveld para a amostra de ciclodextrina.	153
Figura 59. Difratoograma de difração de raios-X para a amostra do complexo de inclusão formado.	154
Figura 60. Comparação entre os difratogramas experimentais da amostra de darunavir etanolato livre e do complexo de inclusão obtido.	154
Figura 61. Comparação entre os difratogramas experimentais de duranavir etanolato livre, complexo de inclusão e β -CD.	155
Figura 62. Tipos de Diagrama de Solubilidade de Fases obtidos com fármacos e ciclodextrinas.	156
Figura 63. Tubo de ensaio contendo (A) darunavir: β -ciclodextrina (B) em solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0, (C) após 72 horas em <i>shaker</i>	

sob 60 rpm e 37 °C ± 0,5 °C. (D) Detalhe da presença de precipitado, certificando a saturação da solução.	163
Figura 64. Ilustração para o cálculo do fator de alargamento.	170
Figura 65. Sobreposição dos cromatogramas da MP e amostra, ambos na concentração de 20 µg/mL, para identificação de darunavir pelo método de CLAE utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 µm (250 x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial:acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial 60:40 (v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e leitura em 268 nm.	172
Figura 66. Sobreposição dos cromatogramas da MP, amostra e β-CD, todos na concentração de 20 µg/mL, para avaliação da influência da ciclodextrina na análise do darunavir por CLAE utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 µm (250 x 4,6 mm), água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial:acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial 60:40 (v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e leitura em 268 nm.	172
Figura 67. Curva analítica de soluções de darunavir MP, em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL, obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.	179
Figura 68. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio ácido na concentração de 40 µg/mL em HCl 0,01 M após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.	181
Figura 69. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio básico na concentração de 40 µg/mL em NaOH 0,01 M após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.	182
Figura 70. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio oxidativo na concentração de 40 µg/mL em H ₂ O ₂ 3% após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.	183

Figura 71. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio térmico na concentração de 40 µg/mL em água purificada após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.	184
Figura 72. Cromatogramas da degradação fotolítica do complexo de inclusão na concentração de 40 µg/mL em água purificada após 2, 4 e 8 horas em luz UV a 25 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.	185
Figura 73. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio neutro na concentração de 40 µg/mL em água purificada após 2, 4 e 8 horas em calor seco a 35 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.	186
Figura 74. Importância do teste de estresse: uma perspectiva do QbD.....	194
Figura 75. Cromatograma da degradação em meio ácido do complexo de inclusão utilizando HCl 0,01 M por 8 horas em banho a 80 °C. Os sinais A e B correspondem aos produtos de degradação e seus espectros de massas estão destacados.	196
Figura 76. Cromatograma da degradação em meio oxidativo do complexo de inclusão utilizando H ₂ O ₂ 3 % por 8 horas em banho a 80 °C. Os sinais A, B e C correspondem aos produtos de degradação cujos espectros de massas estão apresentados.....	197
Figura 77. Cromatograma da degradação em meio básico do complexo de inclusão utilizando NaOH 0,01 M por 8 horas em banho a 80 °C. O sinal A corresponde ao produto de degradação e seu espectro de massas está destacado.....	198
Figura 78. Proposta das estruturas baseadas nos resultados obtidos nas análises de CL-EM.	199
Figura 79. Rota de fragmentação proposta e espectros MS/MS mostrando a formação dos íons fragmento no EM/EM dos sais de sódio protonado dos produtos de degradação de 1 a	

3 (quadros A – C, respectivamente) e desprotonado do produto de degradação 4 (quadro D).	200
Figura 80. CCD do darunavir:β-CD após condições de estresse na concentração de 1 mg/mL utilizando água purificada e álcool metílico, 70:30 (v/v) ajustado para pH 2,4 com ácido acético glacial como fase móvel. a) (A) darunavir $R_f=0,66$; (B) darunavir $R_f=0,67$ e produtos de degradação em meio ácido com $R_f=0,73$ e $0,76$; (C) produtos de degradação em meio básico com $R_f=0,53$ e darunavir $R_f=0,67$; (D) H_2O_2 $R_f=0,37$; darunavir $R_f=0,67$ e produtos de degradação em meio oxidativo com $R_f=0,71$; $0,75$ e $0,84$; b) ampliação das manchas observadas.	206
Figura 81. Produtos de degradação em meio ácido, básico e oxidativo do complexo darunavir:β-CD na concentração de 1 mg/mL obtidos por CLAE utilizando água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial e ACN + 0,1 % de ácido acético glacial na proporção de 60:40, v/v como fase móvel. (A) produtos de degradação em meio ácido com $tR=5,1$ e $6,7$ minutos, (B) produto de degradação em meio básico com $tR=7,8$ minutos, (C) H_2O_2 $tR=3,2$ minutos e produtos de degradação em meio oxidativo com $tR=5,1$, $5,5$ e $6,7$ minutos.	207
Figura 82. Cromatograma do CI na concentração de 40 μg/mL utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 μm (250 mm x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial: acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e detecção a 268 nm, no tempo zero.	217
Figura 83. Sobreposição dos cromatogramas do CI na concentração de 40 μg/mL utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 μm (250 mm x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial: acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e detecção a 268 nm, nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses.	218
Figura 84. Espectro de massas do sinal obtido nos cromatogramas dos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses, no modo positivo.....	218
Figura 85. Avaliação da aparência do complexo darunavir:β-ciclodextrina em pó com o tempo, submetidos às condições de estudo de estabilidade de longa duração ($30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$).	219

Figura 86. Curva TG do complexo darunavir: β -ciclodextrina (A) no tempo zero e (B) após 24 meses submetidos às condições de 30 °C \pm 2 °C e 75 % UR \pm 5 % UR.	219
Figura 87. Curva DSC do complexo darunavir: β -ciclodextrina (A) no tempo zero e (B) após 24 meses submetidos às condições de 30 °C \pm 2 °C e 75 % UR \pm 5 % UR.	220
Figura 88. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg com as bandas características utilizando brometo de potássio como branco, no tempo zero.	220
Figura 89. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 3 meses.	221
Figura 90. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 6 meses.	221
Figura 91. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 9 meses.	222
Figura 92. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 12 meses.	222
Figura 93. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 18 meses.	223
Figura 94. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 24 meses.	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos para a determinação do darunavir divulgados na literatura	46
Tabela 2. Impacto do nível sigma de uma empresa na porcentagem de vendas	54
Tabela 3. Bandas do espectro de absorção na região do IV do darunavir em diferentes tempos.....	70
Tabela 4. Valores do intervalo de fusão obtidos para o darunavir etanolato.....	75
Tabela 5. Relação do peso individual dos comprimidos de darunavir, o peso médio e o respectivo desvio padrão relativo	83
Tabela 6. Bandas do espectro de absorção na região do IV do darunavir com as respectivas deformações axiais	93
Tabela 7. Análise de adequabilidade do sistema eletroforético desenvolvido para análise do darunavir em comprimidos.....	98
Tabela 8. Preparo das misturas para o teste de exatidão do método de espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	107
Tabela 9. Valores das absorvâncias de darunavir etanolato determinadas pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho para a construção da curva analítica	109
Tabela 10. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de darunavir MP, utilizando o método de espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	110
Tabela 11. Valores determinados para o parâmetro precisão do darunavir etanolato MP pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	112
Tabela 12. Valores do teste de recuperação do método de espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	112
Tabela 13. Valores calculados através dos testes F e t para variações na marca de KBr, tempo de compressão e pressão pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho para determinação de darunavir em comprimidos	113
Tabela 14. Valores determinados para o doseamento de darunavir etanolato em comprimidos pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho	113

Tabela 15. Recuperação do analito em função da concentração	116
Tabela 16. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de eletroforese capilar	120
Tabela 17. Combinações analisadas para a avaliação da robustez do método de eletroforese capilar para quantificação de darunavir.....	121
Tabela 18. Valores das amplitudes de darunavir etanolato determinadas pelo método de EC para a construção da curva analítica.....	123
Tabela 19. Análise de variância das amplitudes obtidas na curva analítica de darunavir por EC	124
Tabela 20. Valores determinados para o parâmetro precisão do darunavir MP pelo método de eletroforese capilar.....	128
Tabela 21. Valores obtidos no teste de recuperação do darunavir utilizando o método de eletroforese capilar	128
Tabela 22. Concentração de darunavir determinado a partir das oito condições de “s” a “z” para a avaliação da robustez do método de eletroforese capilar.....	129
Tabela 23. Parâmetros de Youden e Steiner para a análise de robustez do método de eletroforese capilar desenvolvido para análise do darunavir na forma farmacêutica comprimidos	129
Tabela 24. Valores determinados para o doseamento de darunavir etanolato em comprimidos (Prezista [®] 300 mg) pelo método de eletroforese capilar	129
Tabela 25. Aplicabilidade, precisão e exatidão dos métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar validados	134
Tabela 26. Valores obtidos na determinação do teor de darunavir etanolato em comprimidos utilizando os métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar	135
Tabela 27. Valores do Teste-F e do Teste-t para o doseamento de darunavir em comprimidos pelos métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar	135

Tabela 28. Valores das absorvâncias de darunavir etanolato determinadas pelo método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta em 268 nm para a construção da curva analítica em água purificada	143
Tabela 29. DSF com diferentes soluções de darunavir e β -CD em água purificada	144
Tabela 30. Análises do componente energético obtida por <i>Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area</i> (MM-PBSA) para análise do complexo darunavir: β -CD por simulações de dinâmica molecular	151
Tabela 31. Mudanças induzidas nos deslocamentos químicos ^1H do darunavir e da β -CD depois da complexação	151
Tabela 32. Força de ligação entre a molécula hóspede e a CD conforme o valor da K_c ..	157
Tabela 33. Valores das absorvâncias do darunavir livre em diferentes solventes na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$	164
Tabela 34. Diluições variadas para obtenção de aproximadamente o mesmo valor de absorvância do complexo darunavir: β -ciclodextrina nos solventes testados, após o teste de solubilidade.....	164
Tabela 35. Valores das absorvâncias da β -ciclodextrina em diferentes solventes	165
Tabela 36. Valores de absorvâncias e concentrações do darunavir livre realizadas com diluição de 2 mL de meio de dissolução	165
Tabela 37. Diferença das concentrações de darunavir livre e complexado à β -ciclodextrina nos solventes testados, após o teste de solubilidade.....	165
Tabela 38. Análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de darunavir no CI.....	171
Tabela 39. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de cromatografia líquida de alta eficiência	177
Tabela 40. Combinações analisadas para a avaliação da robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do darunavir.....	178
Tabela 41. Valores das áreas de darunavir determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência para a construção da curva analítica	179
Tabela 42. Análise de variância das áreas obtidas na curva analítica do darunavir por cromatografia líquida de alta eficiência.....	180

Tabela 43. Valores determinados para o parâmetro precisão do darunavir etanolato MP pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	187
Tabela 44. Valores obtidos no teste de recuperação do darunavir utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	187
Tabela 45. Valores determinados para o doseamento de darunavir no complexo de inclusão pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	187
Tabela 46. Teor de darunavir determinado a partir das oito condições de “s” a “z” para a avaliação da robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência	188
Tabela 47. Parâmetros de Youden and Steiner para a análise de robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	188
Tabela 48. Espectro de CL-EM e estruturas propostas dos produtos de degradação do complexo darunavir:β-CD	208
Tabela 49. Comparação estatística dos resultados das manchas obtidas na técnica de CCD para o darunavir e seus produtos de degradação no CI	209
Tabela 50. Características do darunavir PA observadas no estudo de estabilidade de longa duração desde o tempo zero até o tempo de 24 meses através da técnica de espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	224

LISTA DE ABREVIATURAS

2D ROESY: *two-dimensional Rotating frame Overhauser*

ACN: Acetonitrila

ANOVA: *Analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

β -CD: β -ciclodextrina

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BPL: Boas Práticas de Laboratório

CCD: Cromatografia em camada delgada

CD: Ciclodextrina

CE: Eficiência da complexação

CI: Complexo de inclusão

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLUE-EM: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

DAD: *Diode Array Detector*

DPR: Desvio padrão relativo

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

DSF: Diagrama de Solubilidade de Fases

EC: Eletroforese capilar

EM: Espectro de massas

e.p.m.: Erro padrão da média

FDA: *Food and Drug Administration*

FEO: Fluxo eletrosmótico

FMEA: *Failure Mode and Effects Analysis*

H-RMN: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

HAART: *High Activity Antiretroviral Therapy*

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

ICH: *International Conference on Harmonization*

IP: Inibidor de protease

IV: Infravermelho

Kc: Constante de estabilidade

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MF: Mistura física

MP: Matéria-prima

OARAC: *Office of AIDS Research Advisory Council*

QbD: *Quality by Design*

QFD: *Quality Function Deployment*

r: Coeficiente de correlação linear

R²: Coeficiente de determinação

Rf: Fator de retenção

SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SQR: Substância química de referência

SUS: Sistema Único de Saúde

TG: Termogravimetria

UV: Ultravioleta

WHO: *World Health Organization*

INTRODUÇÃO

O darunavir é um inibidor de protease (IP) utilizado no tratamento da infecção pelo *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Trata-se de um dos pilares da terapia do coquetel para pacientes portadores do vírus.

É um análogo sintético não peptídico do amprenavir que se tornou disponível comercialmente em 2006. No mercado encontram-se darunavir etanolato em suspensão oral de 100 mg/mL e comprimidos de 75, 300, 400 e 600 mg por esta ser a forma mais estável. Ele é comercializado pela Janssen-Cilag com o nome de Prezista[®].

É a nova geração de IP, inibe a protease envolvida na multiplicação do vírus, é ativo contra a maioria dos HIV resistentes a outros IP e a indução e a seleção de mutação que conferem resistência é mais lenta e mais difícil com o uso do darunavir.

O darunavir existe em duas ou mais formas cristalinas, tendo diferentes arranjos e/ou conformações na sua estrutura. Sendo assim, o estudo do polimorfismo do darunavir utilizado nas análises laboratoriais é imprescindível para a detecção de possíveis diferenças analíticas.

Foi realizado estudo de polimorfismo do darunavir para certificação da utilização da mesma forma cristalina ao longo do desenvolvimento dos métodos analíticos. Para este estudo foram utilizadas as técnicas térmicas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raios-X e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).

O darunavir apresenta baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral, por isso necessita de administração em doses relativamente elevadas para o sucesso do efeito terapêutico. A complexação de fármacos utilizando ciclodextrinas é bem-vinda neste aspecto por melhorar a solubilidade e, conseqüentemente, aumentar a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis.

Foram realizados tanto a complexação do darunavir com a β -ciclodextrina como o estudo deste complexo de inclusão através da TG, IV, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (H-RMN) e *Rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy* (ROESY).

Com o complexo darunavir: β -ciclodextrina formado foi realizado estudo de solubilidade comparativo entre ele e o darunavir livre quanto ao meio de dissolução e a percentagem de fármaco dissolvido ou solubilizado.

A estabilidade é uma qualidade requerida a todos os fármacos e consiste no período a partir da data de fabricação e empacotamento da formulação até que a sua atividade química e biológica não seja menor que um nível pré-determinado de teor rotulado e suas propriedades físicas não tenham mudado apreciavelmente e de forma deletéria (VADAS, 2000).

Foi realizado estudo de estabilidade de longa duração para avaliar o comportamento do complexo de inclusão darunavir: β -ciclodextrina desenvolvido.

Várias técnicas analíticas foram discutidas neste trabalho com foco em aplicação nas análises de rotina dos laboratórios de Controle de Qualidade das indústrias farmacêuticas, visando análises de maior valia, confiáveis e eficazes.

Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos para determinação do darunavir, uma vez que ele não apresenta monografia descrita em compêndios oficiais (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; F. BRAS., 2010; EP, 2011; JP, 2011; BP, 2012; USP 35, 2012).

O controle de qualidade na indústria farmacêutica é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final. Como o darunavir, até então, não possui métodos de análise padronizados em compêndios oficiais, este fato justifica novas pesquisas nesta área para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, bem como a análise químico-farmacêutica para este fármaco tanto na matéria-prima como no produto acabado, estudo de estabilidade e avaliação da complexação à β -ciclodextrina.

Ao longo do trabalho, as ferramentas da qualidade foram utilizadas para otimizar tempo, resolver imprevistos, minimizar desvios, aprimorar a organização pessoal e profissional, detectar novas ideias e oportunidades, melhorar processos, inovar, desenvolver espírito de liderança de pessoas e equipes.

Atualmente, saber trabalhar com ferramentas como 5 S's, 5W e 2H, 6 σ , Análise de *SWOT*, *Benchmarking*, *Brainstorming*, Cartas de controle, Diagrama de Ishikawa, *Failure Mode and Effects Analysis* (FMEA), Gráfico de Pareto, Mapeamento de processos,

Multivotação, Os 5 porquês, *Poka Yoke*, *Quality Function Deployment (QFD)*, Tabela de Pares e *Team Charter* são imprescindíveis para o sucesso e reconhecimento tanto na carreira acadêmica como industrial.

Assim sendo, neste trabalho foram discutidos (a) investigação do polimorfo de darunavir utilizado nos estudos; (b) realização e estudo da complexação do darunavir com a β -ciclodextrina; (c) desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação do darunavir, incluindo análises espectroscópicas, eletroforéticas e cromatográficas; (d) realização do estudo de estabilidade de longa duração; (e) realização do estudo de solubilidade comparativa entre o darunavir e seu complexo de inclusão; (f) desenvolvimento de técnicas de identificação qualitativa para a forma farmacêutica e matéria-prima, bem como (g) a utilização de ferramentas da qualidade. Um fluxograma com as atividades desenvolvidas está ilustrado na Figura 1.

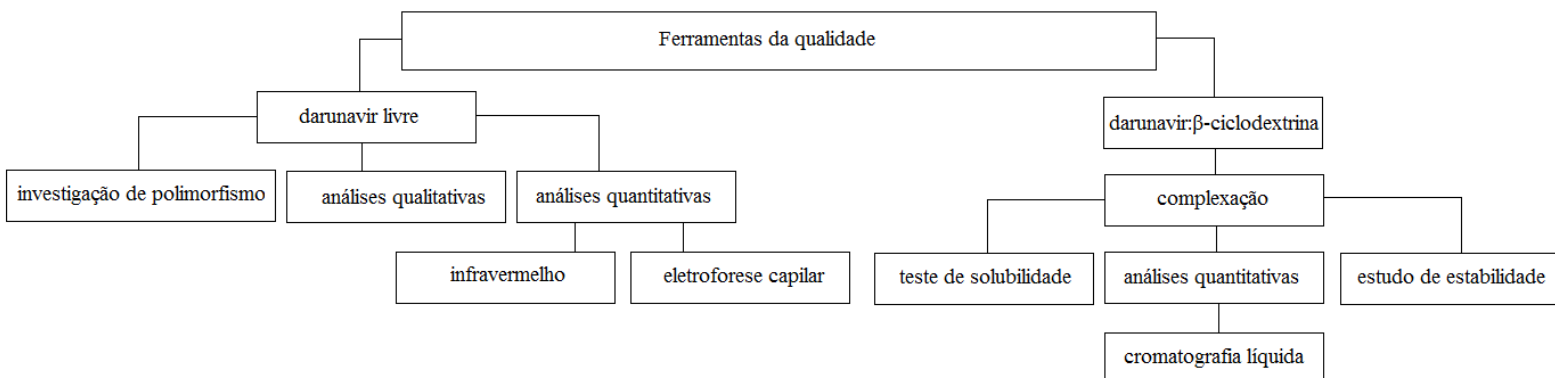


Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Este trabalho objetivou a formação do complexo darunavir: β -ciclodextrina e as consequências desta complexação, além do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa do darunavir em comprimidos e complexado à β -ciclodextrina.

Abordou também a utilidade e a importância das ferramentas da qualidade.

E pretende colaborar com a literatura científica internacional, através da publicação dos resultados deste trabalho e contribuir com órgãos governamentais, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Farmacopeia Brasileira, e com as indústrias farmacêuticas, através da qualificação de seus processos e produtos.

1.2. Objetivos específicos

- **para o darunavir livre**
 - Investigar o polimorfo de darunavir utilizado nas análises.
 - Determinar o intervalo de fusão do darunavir.
 - Desenvolver método por cromatografia em camada delgada - CCD para identificação do darunavir em comprimidos.
 - Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta - UV para identificação do darunavir em comprimidos.
 - Desenvolver e validar método por espectrometria na região do IV para determinação qualitativa e quantitativa do darunavir em comprimidos.
 - Desenvolver e validar método por eletroforese capilar para determinação qualitativa e quantitativa do darunavir em comprimidos.
- **para o darunavir: β -ciclodextrina**
 - Complexar o darunavir à β -ciclodextrina.
 - Realizar análises térmicas e espectroscópicas para caracterização do complexo de inclusão formado.

- Comparar a solubilidade do darunavir complexado à β -ciclodextrina frente ao darunavir livre.
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE para determinação qualitativa e quantitativa do darunavir no complexo de inclusão.
- Identificar os possíveis produtos de degradação do complexo darunavir: β -ciclodextrina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).
- Avaliar a influência da CCD na identificação dos produtos de degradação do complexo darunavir: β -ciclodextrina.
- Realizar estudo de estabilidade de longa duração com o complexo darunavir: β -ciclodextrina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estrutura química

O darunavir (Figura 2) apresenta fórmula molecular $C_{27}H_{37}N_3O_7S$ e peso molecular igual a 547,73 g/mol (GOLDWIRT *et al.*, 2007) (O'NEIL, 2006). Possui o seguinte nome químico: [(1S,2R)-3-[[[(4-aminofenil)sulfonyl](2-metilpropil)amino]-2-hidróxi-1-(fenilmetil)propil]-ácido carbâmico (3R,3aS,6aR)-hexahidrofuro[2,3-b]furan-3-il éster (O'NEIL, 2006).

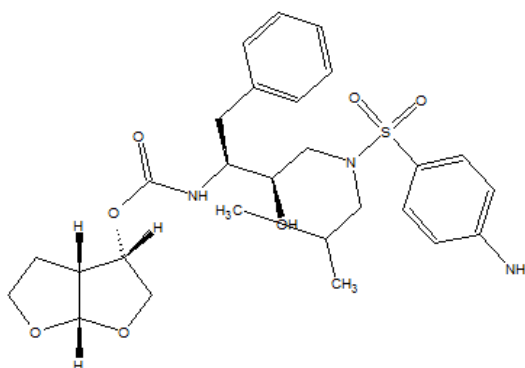


Figura 2. Estrutura química do darunavir (CAS 206361-99-1).

O darunavir apresenta cinco valores de pKa, ou seja, $pK_{a1} = 14,31 \pm 0,20$, $pK_{a2} = 11,43 \pm 0,46$, $pK_{a3} = 7,75 \pm 0,70$, $pK_{a4} = 1,75 \pm 0,10$ e $pK_{a5} = 1,66 \pm 0,70$, como mostrado na Figura 3 (*software* ACD/Labs 6.0).

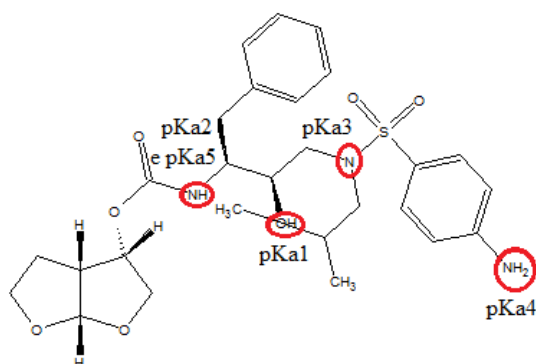


Figura 3. Grupos funcionais correspondentes aos valores de pKa do darunavir.

2.2. Formas estruturais

São conhecidas três formas de darunavir: amorfo, etanolato e hidrato. O darunavir etanolato converte-se na forma hidrato com a umidade relativa do ar moderada ou alta a 25 °C, e converte-se de volta para a forma etanolato em atmosfera de álcool etílico. O nível de hidratação da forma hidrato é determinado pela umidade ambiental. A forma hidrato se transforma na forma amorfa quando a água é removida por secagem à baixa umidade relativa ou aumento da temperatura. O darunavir amorfo obtido por desidratação da forma hidrato através do aumento da temperatura converte-se em hidrato em condições ambiente com moderada ou alta umidade relativa, e em etanolato em atmosfera de álcool etílico. O darunavir etanolato torna-se amorfo em temperatura elevada em ambiente seco (GYSEGHEM *et al.*, 2009). A Figura 4 mostra as rotas simplificadas para a obtenção das três formas de darunavir.

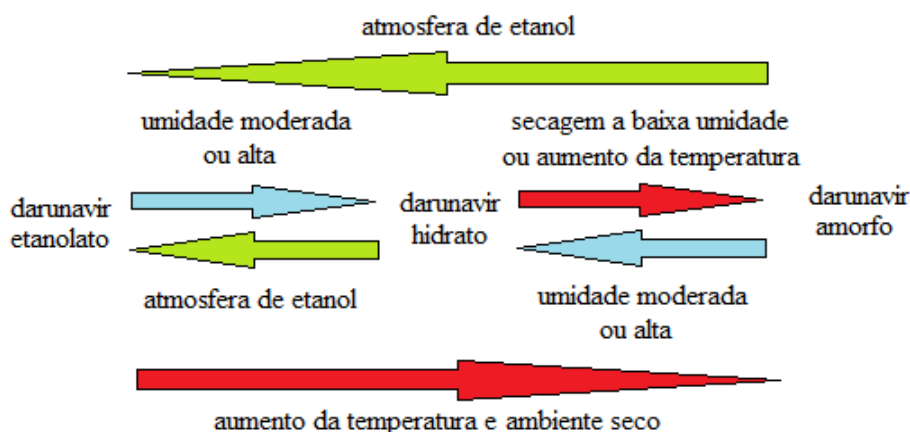


Figura 4. Obtenção das formas amorfo, etanolato e hidrato do darunavir.

Durante o armazenamento, a conversão parcial da forma etanolato para hidrato pode ocorrer, no entanto, isto não afeta a qualidade do produto ou o seu desempenho (REDDY *et al.*, 2013). A forma hidrato é menos estável comparada à forma etanolato, sendo mais susceptível a degradação ou decomposição.

O darunavir comercializado recebe o nome de Prezista[®] e encontra-se na forma etanolato (massa molecular igual a 593,73 g/mol) por ser a forma mais estável, mas as

condições ambientais podem desencadear a sua conversão nas outras formas (GYSEGHEM *et al.*, 2009).

2.3. Mecanismo de ação

O darunavir inibe seletivamente a clivagem do HIV codificado pela poliproteína Gag-Pol (ilustrada na Figura 5) em células infectadas, impedindo assim a formação de partículas virais maduras (GANDURI *et al.*, 2011).

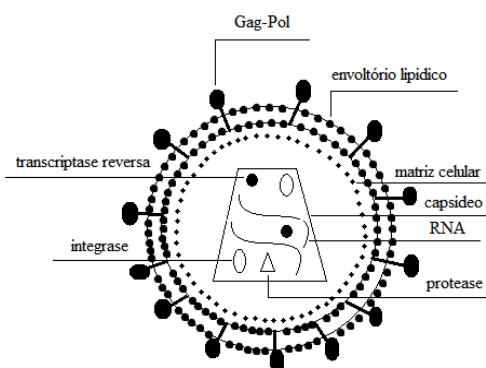


Figura 5. Célula infectada com o HIV, enfocando os seus componentes.

O grupo 3(R), 3a(S), 6^a(R)-bistetetrahidrofuranyluretanóisostero (Figura 6) favorece a formação de fortes ligações de hidrogênio com o centro ativo da protease. Esta união representa uma associação rápida e uma dissociação lenta, o que aumenta a eficácia e duração da ação contra a protease viral. A afinidade desta união é 100 vezes superior que a do amprenavir, outro IP (GARCÍA *et al.*, 2011).

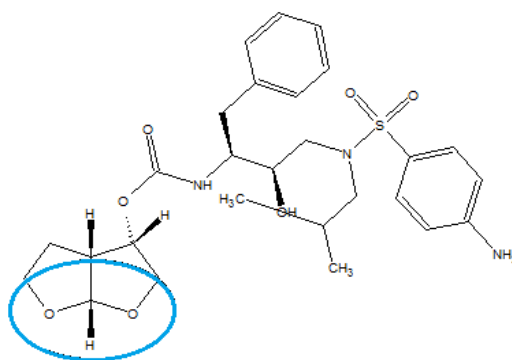


Figura 6. Estrutura química do darunavir com destaque para o grupo 3(R), 3a(S), 6^a(R)-bistetetrahidrofuranyluretanóisostero.

2.4. Farmacocinética

Fármacos IP são um dos pilares da terapia de coquetel (SOSNIK *et al.*, 2009) e o darunavir é a nova geração de sintéticos não-peptídicos inibidores da protease (GYSEGHM *et al.*, 2009). Eles são substratos para bombas de efluxo e assim sua absorção oral é restrita. Por causa de sua afinidade por esses transportadores de remoção, o perfil farmacocinético depende de padrões de farmacogenética e exigem ajuste da dose. Esta é uma questão crucial em pacientes pediátricos (SOSNIK *et al.*, 2009).

Segundo McCoy (2007), os eventos mais comumente relatados do darunavir foram sintomas gastrointestinais, náuseas e cefaleia.

Com relação às propriedades farmacocinéticas, no plasma o darunavir se liga em 95 % das α -ácidoglicoproteínas. O volume de distribuição é de 88 L e quando associado ao ritonavir este valor aumenta para 131 L. O darunavir sofre metabolismo hepático oxidativo mediante o citocromo P450, principalmente o CYP3A4, dando lugar a três metabólitos oxidativos com atividade 10 vezes inferior ao darunavir. Sua eliminação intacta é de 41,2 % nas fezes e 7,7 % na urina (GARCÍA *et al.*, 2011).

As doses citotóxicas são muito maiores do que as doses terapêuticas, permitindo uma ampla margem de segurança ao darunavir. É eficaz contra todos os subtipos de HIV-1 e contra o HIV-2. Também é ativo contra a maioria dos HIV resistentes a outros IP (GOLDWIRT *et al.*, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2007; GARCÍA *et al.*, 2011), e sua robustez contra os mecanismos conhecidos de resistência do HIV também é superior aos outros IP disponíveis. A indução e a seleção de mutações que conferem resistência a este fármaco parecem ser mais lentas e mais difíceis, o que poderia permitir-lhe manter o seu efeito antiviral inalterado por longos períodos (LIAÑO & TENORIO, 2008).

2.5. Aplicações clínicas

Os IP foram um grande avanço terapêutico em meados dos anos 1990 para o tratamento da infecção pelo HIV, o que resultou na esperança de vida para os pacientes que tiveram fracasso nas terapias anteriores.

O darunavir é um análogo sintético não peptídico do amprenavir (McCOY, 2007), que foi projetado especificamente para superar os problemas com os agentes mais antigos

nesta classe, tais como o indinavir (REDDY *et al.*, 2013). Foi aprovado nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) em junho de 2006 e, em fevereiro de 2007, a Comissão Europeia autorizou sua comercialização (HEINE *et al.*, 2007).

Intervenções terapêuticas em HIV têm sido principalmente direcionadas a duas enzimas virais, a transcriptase reversa e a protease (FAYET *et al.*, 2009). Em 2008, as Diretrizes da Associação Britânica de HIV recomendaram aos pacientes sem tratamento prévio, uma combinação de três ou mais agentes antirretrovirais; um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa (ITRNN) ou o ritonavir em associação com um IP junto com dois inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTR) (ELSE *et al.*, 2010).

A *High Activity Antiretroviral Therapy* (HAART) é considerada como um dos mais significativos avanços no campo da terapia contra o HIV (SHARMA & GARG, 2010), que combina pelo menos três antirretrovirais e, por mais de uma década, tem sido usado para prolongar a vida útil dos pacientes infectados. A ingestão crônica de HAART é obrigatória para controlar a infecção (SOSNIK *et al.*, 2009).

O darunavir é efetivo em pacientes previamente tratados com antirretrovirais, mesmo com aqueles que possuem cepas de HIV-1 que são resistentes a mais do que um IP (TAKAHASHI *et al.*, 2007). Sendo assim, ele é um componente essencial de muitas terapias de resgate em pacientes já com experiência de uso de antirretrovirais. O Prezista[®] é uma opção para o *Office of AIDS Research Advisory Council* (OARAC) no tratamento de adultos e adolescentes com ou sem terapia prévia (REDDY *et al.*, 2013).

Seu uso em associação com outros antirretrovirais também está sendo estudado. Vários estudos de fase III em andamento estão mostrando que a combinação darunavir/ritonavir é altamente eficiente e superior à combinação de lopinavir/ritonavir, relacionada à terapia de primeira linha (REDDY *et al.*, 2013). A ação do darunavir é potencializada com a associação do ritonavir e dessa forma foi avaliada sua tolerância e segurança. Foi observado que o darunavir é bem tolerado, com reações adversas inferiores aos outros IP.

A monoterapia do darunavir também foi avaliada. Ele apresenta eficácia não inferior à terapia tripla com darunavir e dois análogos nucleosídicos da transcriptase reversa (GARCÍA *et al.*, 2011).

No mercado encontram-se as formas farmacêuticas comprimidos de darunavir etanolato de 75, 300, 400 e 600 mg e suspensão oral de 100 mg/mL, todos com o nome de Prezista[®]. A dose é de 1000 mg por dia em 1 ou 2 doses e não é adequada para dose pediátrica (SOSNIK *et al.*, 2009).

2.6. Características dos antirretrovirais

A maioria das entidades químicas recém-descobertas, apesar da alta atividade terapêutica, tem baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral, levando à má absorção pelo trato gastrointestinal (SINHA *et al.*, 2010). As características importantes de uma molécula que precisam ser consideradas para efeitos positivos anti-HIV são, dentre outras, a solubilidade e a estabilidade em fluidos biológicos. Quando estas propriedades são desfavoráveis para o desenvolvimento de medicamentos específicos, o processamento e o desenvolvimento de formulações alternativas podem ser empregadas para alcançar o máximo ganho terapêutico (SHARMA & GARG, 2010).

Esses novos fármacos necessitam de uma administração frequente em doses relativamente elevadas sendo a principal causa da não adesão do paciente ao tratamento e um obstáculo para o cumprimento da farmacoterapia (SOSNIK *et al.*, 2009). A HAART prolongada é frequentemente associada com o surgimento de cepas resistentes do HIV. Além disso, há questões importantes de reação adversa ao medicamento e interação medicamentosa associada à terapia antirretroviral. Embora os regimes mais recentes em HAART têm toxicidade significativamente menor, a modulação de lipídios e metabolismo da glicose ainda é um grande problema. Após o tratamento crônico mesmo a toxicidade moderada pode levar a complicações graves. O insucesso do tratamento não só afeta a qualidade de vida do paciente, mas também contribui significativamente para a carga econômica do sistema de saúde (SHARMA & GARG, 2010).

A HAART pediátrica é especialmente difícil. Apenas 12 antirretrovirais foram aprovados para administração em crianças (em oposição aos 25 aprovados para adultos).

Neste contexto, nota-se a necessidade do desenvolvimento de encapsulamento de antirretrovirais e estratégias de liberação; trabalhar os aspectos tecnológicos (por exemplo, baixa solubilidade em água e estabilidade em condições fisiológicas) com o objetivo de reduzir a frequência de dosagem e para melhorar o cumprimento da farmacoterapia existente (SOSNIK *et al.*, 2009). Portanto, há um grande interesse no desenvolvimento de métodos eficientes, confiáveis, econômicos e escalonáveis para aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água (SINHA *et al.*, 2010). Estes métodos estão se tornando complementares ao desenvolvimento de novos medicamentos (SOSNIK *et al.*, 2009).

A maioria dos IP tem alta massa molecular, solubilidade dependente de pH (alta solubilidade em pH ácido) e alto log P (alta lipofilicidade), e todas estas propriedades afetam adversamente a biodisponibilidade oral. Além disso, eles são substratos da glicoproteína-P, um transportador de remoção, efluxo (SHARMA & GARG, 2010). A biodisponibilidade do darunavir é de 37 %, mas quando se combina com o ritonavir aumenta para 82 %. O darunavir é metabolizado principalmente pela CYP3A. O ritonavir inibe a CYP3A, aumentando as concentrações plasmáticas de darunavir de forma considerável (GARCÍA *et al.*, 2011).

2.7. Polimorfismo

É sabido que o polimorfismo de fármacos, capacidade de uma substância existir como duas ou mais formas cristalinas, tendo diferentes arranjos e/ou conformações das moléculas na sua estrutura cristalina (GYSEGHEM *et al.*, 2009), afeta na atividade terapêutica por apresentar diferenças nas propriedades farmacológicas. O estudo de polimorfismo do darunavir utilizado nas análises laboratoriais é importante para a detecção de possíveis diferenças analíticas.

Segundo Gyseghem e colaboradores (2009), o darunavir mostrou comportamento pseudopolimórfico, uma vez que existe na forma de cristais de etanolato e hidrato. A forma não solvatada é amorfa. Pseudopolimorfos são formas cristalinas formadas quando existem moléculas de solvente ou de outras substâncias na rede cristalina do fármaco. A formação de pseudopolimorfos pode ocorrer durante o manuseio, processamento e armazenamento. A

tendência de uma molécula formar solvatos está relacionada com a estrutura molecular, padrões de ligação de hidrogênio e empacotamento cristalino. O solvente serve para estabilizar a estrutura, o processo de dessolvatação não resulta na formação de uma nova forma cristalina e pode gerar uma forma amorfa da substância.

2.8. Métodos de análise para o darunavir

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados é de extrema importância e tem por objetivo fornecer informações confiáveis quanto à natureza e à composição dos materiais em análise (LA ROCA *et al.*, 2007). A validação é parte importante do programa de garantia de qualidade e tem por objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para a proposta pretendida e é seguro ao ser executado (ICH, 2005), sendo os procedimentos incluídos nas normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, e aplicadas nas indústrias farmacêuticas, devendo, também ocorrer conforme a norma de gestão de Boas Práticas de Laboratório (BPL) (SHABIR, 2003).

Nas farmacopeias pesquisadas (F. PORTUGUESA, 2005; F. BRAS, 2010; EP, 2011; JP, 2011; BP, 2012; USP 35, 2012) o darunavir não apresenta monografia descrita. Na literatura foram encontrados métodos por CLAE (GOLDWIRT *et al.*, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2007; GANDURI *et al.*, 2011; SATYANARAYANA *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2013) para detecção do fármaco em plasma e em produto farmacêutico, método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) (GUPTA *et al.*, 2011) e CLAE-EM (GARCÍA *et al.*, 2011) para detecção do fármaco em fluidos biológicos e método por CLAE-EM para detecção simultânea de darunavir e outros fármacos antirretrovirais em plasma (HEINE *et al.*, 2007; FAYET *et al.*, 2009; MARTÍN *et al.*, 2009; REZK *et al.*, 2009; D'AVOLIO *et al.*, 2010; ELSE *et al.*, 2010), sangue, saliva e tecidos (HEINE *et al.*, 2008).

A CLAE-EM permite a determinação rápida e simultânea de múltiplos analitos em uma única corrida. Além do mais, a sua alta sensibilidade facilita o uso de pequenos volumes de amostra e a determinação de analitos em outras matrizes nas quais a

concentração pode estar baixa (HEINE *et al.*, 2007). No entanto, segundo Takahashi e colaboradores (2007) e Goldwirt e colaboradores (2007), o equipamento de CLAE-EM é economicamente dispendioso e indisponível nos laboratórios, por isso a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos como a CLAE. Todavia, algumas fases móveis descritas na literatura (SATYANARAYANA *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2013) são deficientes pois incluem solução tamponante fosfato 50 mM, o que não contribui para uma dinâmica maior da indústria farmacêutica, pois requer maior tempo de preparo, sua vida útil é baixa havendo a necessidade de preparações mais frequentes e promove uma diminuição no tempo de uso da coluna devido às interações. Soluções tamponantes em fase móvel não são uma tendência moderna. Em outro artigo, Goldwirt (2007) e colaboradores utilizaram água e acetonitrila na fase móvel. Contudo, o tempo de detecção do darunavir foi de 17,5 min, um tempo longo visando a vazão mais rápida das análises laboratoriais e industriais.

Na técnica de CLAE-EM alguns autores (HEINE *et al.*, 2007; HEINE *et al.*, 2008; FAYET *et al.*, 2009; MARTÍN *et al.*, 2009; GARCÍA *et al.*, 2011) também recorreram ao uso de solução tamponante na fase móvel, o que traz os questionamentos citados acima sobre prezar a logística mais dinâmica da indústria farmacêutica.

A Tabela 1 mostra alguns métodos para determinação do darunavir.

Tabela 1. Métodos para a determinação do darunavir divulgados na literatura

Método	Condições	Sistema de detecção	t _R (min)	Matriz	Referência
CLAE	Coluna Cluzeau Satisfaction C ₈ (3 x 250 mm) protegida com pré coluna A-103xfilter C ₈ (3x15 mm). Fase móvel: acetone: água 40:60, (v/v), com vazão de 0,6 mL/min e temperatura controlada de 20 °C.	UV, 266 nm	17,5	Plasma	GOLDWIRT <i>et al.</i> , 2007
CLAE	Coluna Radial-Pak Nova-Pak C ₁₈ (8 x 100 mm) protegida com pré - coluna Nova-Pak C ₁₈ . Fase móvel: solução tampomante fosfato (pH 5,9) 50 mM 39 %, álcool metílico 22 % e acetone: água 39 % com vazão de 1,8 mL/min.	UV, 205 nm	3,8	Plasma	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2007
CLAE	Coluna Symmetry Shield RP18 (4,6 x 150 mm). Fase móvel: ácido ortofosfórico 0,1 % e acetone: água 50:50 (v/v) como fase móvel. Vazão de 1,5 mL/min e temperatura controlada de 25 °C.	UV, 265 nm	4,9	Comprimidos	GANDURI <i>et al.</i> , 2011
CLAE	Coluna RP Inertsil ODS-3V C ₁₈ (4,6 x 250 mm). Fase móvel: ortofosfato hidrogeno dipotássio 20 mM + ortofosfato dihidrogeno de potássio 20 mM em água e acetone: água 40:60 (v/v) e vazão de 1,0 mL/min.	UV, 265 nm	5,9	Comprimidos	SATYANARAYANA <i>et al.</i> , 2011
CLAE	Coluna X-Bridge C ₁₈ (4,6 x 150 mm). Fase móvel: solução tampomante formiato de amônio 10 mM (pH 3,0) e acetone: água 55:45 (v/v) e vazão de 1,0 mL/min com temperatura de 30 °C.	UV, 265 nm	5,0	Comprimidos	REDDY <i>et al.</i> , 2013
CLAE	Coluna GraceSmart C ₁₈ (4,6 x 250 mm). Fase móvel: álcool metílico: acetone: água 95:5:5, (v/v) e vazão de 0,7 mL/min.	UV, 264 nm	3,4	Comprimidos	MANE <i>et al.</i> , 2013

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para a determinação do darunavir divulgados na literatura

Método	Condições	Sistema de detecção	t _R (min)	Matriz	Referência
CLAE	Coluna GraceSmart C ₁₈ (4,6 x 250 mm). Fase móvel: álcool metílico:acetonitrila 95:5, (v/v) e vazão de 0,7 mL/min.	UV, 264 nm	3,4	Comprimidos	MANE <i>et al.</i> , 2013
CLAE-EM	Coluna RP C ₁₈ (2 x 150 mm). Fase móvel: gradiente de solução tamponante acetato (pH 5,0) e álcool metílico e vazão de 0,25 mL/min.	Triplo quadrupolo (Sciex) em modo positivo e <i>Multiple reaction monitoring</i> (MRM)	4,5	Plasma	HEINE <i>et al.</i> , 2007
CLAE-EM	Coluna Phenomenex Gemini C ₁₈ (2 x 150 mm) com pré-coluna Phenomenex Security guard Gemini C ₁₈ (2x4,0 mm). Fase móvel: 700 mL de álcool metílico com 440 mL de ácido acético 10 m/M e 860 mL de acetato de amônio 10 m/M em água:álcool metílico 85:15 e 15:85, v/v.	Triplo quadrupolo API 3000 (Sciex) e <i>Multiple reaction monitoring</i> (MRM) em modo positivo	4,5	Sangue, saliva e tecido	HEINE <i>et al.</i> , 2008
CLAE-EM	Coluna Atlantis TM -d C ₁₈ (2,1 x 50 mm). Fase móvel: gradiente com acetato de amônio 2 m/M contendo 0,1 % de ácido fórmico e acetonitrila também com 0,1 % de ácido fórmico.	Triplo quadrupolo com ionização <i>electrospray</i> em modo positivo	7,4	Plasma	FAYET <i>et al.</i> , 2009
CLAE-EM	Coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (2 x 50 mm). Fase móvel: álcool metílico:agua 97:3 (v/v), acetato de amônio 10 m/M e 0,1 % de ácido acético e vazão de 0,5 mL/min.	Espectrômetro de massa Tandem e <i>Multiple reaction monitoring</i> (MRM)	1,9	Plasma	MARTÍN <i>et al.</i> , 2009
CLAE-EM	Coluna Zorbax XDB C ₈ (3 x 50 mm). Fase móvel: (A) 0,01 % de ácido fórmico em água e a fase móvel (B) 0,01 % de ácido fórmico em acetonitrila em gradiente de eluição. Vazão de 0,65 a 0,75 mL/min.	Espectrômetro de massa quadrupolo 1100 com ionização <i>electrospray</i> operando em modo positivo. O darunavir foi detectado por seus ions positivos m/z 548,2	3,0	Plasma	REZK <i>et al.</i> , 2009

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para a determinação do darunavir divulgados na literatura

Método	Condições	Sistema de detecção	t _R (min)	Matriz	Referência
CLAE-EM	Coluna Atlantis T3 C ₁₈ (2,1 x 150 mm) e pré-coluna Phenomenex Security Guard C ₁₈ (3 x 4 mm) a 35 °C. Fase móvel: gradiente de fase móvel (A) composta por água e (B) composta por acetonitrila, ambos com 0,05 % de ácido fórmico.	Ionização por <i>electrospray</i> em modo positivo	12,5	Plasma	D'AVOLIO <i>et al.</i> , 2010
CLAE-EM	Coluna C ₁₈ . Fase móvel: gradiente acetonitrila:água (0,05 % de ácido fórmico) 5:95 e 80:20, v/v, com vazão de 0,4 mL/min.	Triplo quadrupolo operado em modo positivo com detecção e quantificação realizada através do <i>Selective reaction monitoring</i>	2,0	Plasma	ELSE <i>et al.</i> , 2010
CLAE-EM	Coluna X-Bridge™ C ₁₈ (2,1 × 100 mm) a 65 °C. Fase móvel: solução A (acetonitrila) e B (3 mM de acetato de amônio/ácido fórmico 0,1 M), em programa de gradiente. Vazão de 0,4 mL/min.	Triplo quadrupolo Quattro micro. A ionização por <i>electrospray</i> ocorreu em modo positivo. As transições de m/z dos íons detectados foram 548,3 > 392,4 para o darunavir. O processamento de dados foi realizado por meio da Missa Lynx™ V software 4.0	1,1	Plasma	GARCÍA <i>et al.</i> , 2011
CLUE-EM	Coluna Waters Acquity CLUE BEH C ₁₈ (2,1x50 mm) a 40 °C. Fase móvel: (A) 0,5 % de ácido fórmico em água e (B) 0,5 % de ácido fórmico em acetonitrila:álcool metílico 70:30, 50:50, 30:70 e 50:50 (v/v).	Espectrômetro de Massas Quattro Premier XE equipado com <i>electrospray</i> operando em modo positivo. A quantificação foi realizada usando <i>Multiple reaction monitoring</i> (MRM).	0,9	Plasma	GUPTA <i>et al.</i> , 2011

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência, CLUE-EM = cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas, CLAE-EM = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

2.9. Ferramentas da qualidade

Ferramentas da Qualidade são técnicas utilizadas com a finalidade de mensurar, definir, analisar e propor soluções para os problemas que interferem no bom desempenho dos processos de trabalho.

Na realização deste trabalho as ferramentas foram imprescindíveis. Elas estavam presentes em todos os momentos, tanto para execução da parte prática como no comportamento pessoal e profissional.

Nós, que trabalhamos com qualidade, temos por obrigação conhecê-las e aplicá-las diariamente. As ferramentas da qualidade devem estar em tudo o que fazemos, da forma em que pensamos e como agimos.

Qualidade é aquele produto ou serviço que atende perfeitamente, de forma confiável, de forma acessível, de forma segura e no tempo certo às necessidades do cliente (CAMPOS, 1992).

Na década de 50 iniciou-se um questionamento sobre o custo que a não qualidade imprimia às organizações, pois até então a premissa de que os defeitos tinham um custo era o único enfoque priorizado. No entanto, como era possível mensurar qual seria o grau de qualidade suficiente?

Em resposta a este questionamento, Joseph Juran, em 1951, lança o livro "Quality Control Handbook", em que, pela primeira vez, desenvolve-se uma visão dos custos da qualidade, enfocando em custos evitáveis e inevitáveis.

Os custos inevitáveis foram associados à prevenção, ou seja, à inspeção, à amostragem, à classificação e a outras iniciativas de controle da qualidade. Os custos evitáveis eram aqueles dos defeitos e das falhas dos produtos, representados através do material sucateado, das horas de trabalho necessárias para se refazer o produto e repará-lo e do processamento das reclamações e prejuízos financeiros resultantes de clientes insatisfeitos (JURAN & GODFREY, 1999).

Nos anos 90, Moller (1992) um dos grandes precursores no incentivo ao treinamento e educação para a qualidade reforça que a qualidade está crescendo com todo o mundo e que 20 a 30 % do faturamento das empresas são gastos na produção e reparo de trabalhos mal feitos, corrigindo defeitos, desprezando produtos defeituosos, resolvendo

conflitos internos e lidando com reclamações, prejudicando muitas vezes a imagem da empresa, onde o custo é incalculável.

A qualidade é conhecida há muito tempo, porém só recentemente ela surge como função gerencial.

As ferramentas da qualidade ajudam a estabelecer melhorias de qualidade. Afinal, recursos significativos são desperdiçados debatendo-se problemas relacionados à aceitação do desvio padrão, necessidade de testes adicionais de controle de qualidade e estabelecimento de critérios de aceitação.

A seguir serão descritas as seguintes ferramentas da qualidade: 5 S's, 5W e 2H, 6 σ , Análise de *SWOT*, *Benchmarking*, *Brainstorming*, Cartas de controle, Diagrama de Ishikawa, *FMEA*, Gráfico de Pareto, Mapeamento de processos, Multivotação, Os 5 porquês, *Poka Yoke*, *QFD*, Tabela de Pares e *Team Charter*.

2.9.1. 5 S's

São 5 palavras em japonês, *seiri*; *seiton*; *seiso*; *seiketsu* e *shitsuke*. As três primeiras dizem respeito às ações físicas e operacionais e as duas últimas dizem respeito à ação comportamental ou psicológica.

É um programa que visa principalmente à qualidade de vida de todas as pessoas na organização. São práticas de ações simples, fáceis, de aplicação imediata, conseguindo melhorar os ambientes de trabalho bem como tornar a convivência humana mais fácil, isto é, trabalhar em equipe.

O primeiro S é *Seiri*, o senso de utilização, que diz para separar o material necessário do desnecessário, descartar o desnecessário e guardar o necessário conforme frequência de uso.

“Se usa todo dia, deixe bem próximo. Se usa uma vez por semana, deixe em algum armário próximo. Se usa uma vez por mês, deixe em algum armário longe”.

Para implantação do *Seiri*, é preciso ser criterioso, aplicar a metodologia para todas as coisas no setor (bancadas de serviço, gavetas, prateleiras, armários de arquivos), fazer 5 S eletrônico, compartilhar coisas (chaves de trabalho, caixas de ferramentas, grampeadores).

As vantagens do *Seiri* são melhora no tempo de procura, reaproveitamento de recursos, aumento de segurança, ambiente de trabalho mais agradável, facilidade no transporte interno e melhora no fluxo de produção.

O segundo S é *Seiton*, o senso de ordenação/arrumação. É arrumar e identificar tudo aquilo que se utiliza. Ordenar o necessário. Definir e identificar um local para cada material.

Para implantação do *Seiton*, é preciso colocar todos os materiais necessários no lugar certo, através de códigos, cores, recipientes, visando evitar confusões, padronizar a maneira de guardar, de estocar materiais, relatórios ou ferramentas, levando em consideração o peso e o formato a fim de facilitar a retirada e colocação, sem correr riscos de acidentes (quedas, distensões), organizar de tal maneira que qualquer um encontre, ordenar é saber usar e guardar. Nunca esquecer que depois do uso, tudo deve voltar sempre ao seu lugar. Utilizar sempre que possível a comunicação visual, para facilitar a guarda e estocagem de alguns materiais, sinalizar corredores, locais de carrinhos, áreas de estocagem e extintores.

As vantagens do *Seiton* são o acesso aos materiais com maior facilidade e rapidez. Possibilita identificar os objetos que foram retirados do seu local de guarda, melhorar a comunicação entre funcionários, diminuir riscos de acidentes de trabalho após a padronização e identificação de faixas, etiquetas, facilitar o trânsito de pessoas e materiais pelo local de trabalho, evitar a compra de materiais e componentes desnecessários e evitar danos a materiais e produtos armazenados, aumentar a racionalização de trabalho, diminuir o cansaço físico e mental e melhorar o ambiente, além de diminuir a incidência de erros.

O terceiro S é *Seiso*, o senso de limpeza. A limpeza, neste caso, tem a finalidade de inspeção, de descobrir vazamentos, irregularidades, rupturas e desgaste.

Limpar é a melhor maneira de inspecionar o local de trabalho. Limpar é não sujar, manter a limpeza geral, ter zelo pelo material de trabalho, protegê-lo, usar corretamente os materiais.

Para implantação do *Seiso*, deve-se limpar tudo (local de trabalho, equipamentos, mesas, armários e arquivos), zelar pelos equipamentos de trabalho, deixando-os sempre limpos e em condições adequadas para serem usados novamente, usar devidamente

materiais e equipamentos (não forçar a potência além do limite), inspecionar, por que quando é feita a limpeza completa em um equipamento é que se observam pequenos defeitos.

As vantagens do *Seiso* incluem a satisfação em trabalhar num ambiente limpo, ter o funcionamento adequado dos equipamentos, prevenir acidentes e eliminar condições inseguras, pois o caminho estará livre e limpo, definir responsabilidade, eliminar o desperdício ao utilizar materiais e equipamentos da maneira correta e facilitar a inspeção dos equipamentos.

O quarto S é *Seiketsu*, o senso de saúde/bem estar. É manter tudo o que foi feito nos três primeiros S's.

É preservar todas as conquistas anteriores, conservar a vida mantendo as funções orgânicas, físicas e mentais em situação normal (estado sadio), zelar pela higiene pessoal, estar em segurança.

Para implantação do *Seiketsu* é necessário ter os três S's anteriores bem implantados e praticá-los cada vez melhor. Estar permanentemente vigilante quanto às condições do posto de trabalho, computadores, equipamentos, vidrarias, mesas e arquivos. Não deixar alimentos expostos sobre papéis e/ou documentos. Seguir e melhorar os procedimentos de trabalho. Seguir regras estabelecidas pelo grupo.

As vantagens do *Seiketsu* incluem a melhora do ambiente de trabalho e a produtividade, a melhora da segurança e eliminação de condições inseguras e a prevenção de doenças.

O quinto S é *Shitsuke*, o senso de autodisciplina. É praticar o 5 S's no dia-a-dia. É mudança de comportamento, é melhoria contínua, é trabalho em equipe, é simplificar, ter coragem e persistência, bons hábitos.

Para a implantação do *Shitsuke*, já se deve praticar os quatro S's no dia-a-dia. Assim como o local de trabalho mudou, é necessário questionamentos a respeito do comportamento individual, ao cumprimento de horários (sempre haverá alguém esperando), ao companheirismo e solidariedade (apoiar os colegas) e destas atitudes depende o bom ambiente de trabalho. Participar e colaborar com a melhoria contínua no trabalho, envolvendo os colegas sempre que houver problemas a resolver. É necessário parar, pensar,

buscar sempre a forma mais simples e eficaz de fazer as coisas. Treinar bons hábitos e atitudes como cumprimentar as pessoas e agradecer. Ter coragem para mudar, tenacidade para manter e persistência para aperfeiçoar sempre o que já foi conquistado.

As vantagens do *Shitsuke* são a previsibilidade dos resultados, o cumprimento das normas éticas, a busca do aperfeiçoamento dos colaboradores e o incentivo à capacidade criativa dos funcionários.

2.9.2. 5 W e 2 H

É uma ferramenta utilizada para planejamento, cujas palavras em inglês, começam com W e H.

Registros do seu uso foram encontrados no "Tratado sobre Oratória" escrito por Marcus Fabius Quintilianus (entre os anos 30 e 100 d.C.). Esse tratado se refere a textos para discursos. Quintilianus observou que, para se obter a compreensão do público sobre qualquer tema era necessária a utilização do hexágono de perguntas contido em seu tratado. As seis perguntas básicas a serem respondidas para o êxito da comunicação eram o que, quem, quando, onde, por que e como.

Hoje, esta ferramenta consiste na resposta de sete questões. No que consiste o projeto (What)? Quando será efetuado (When)? Qual a razão ou o porquê do plano (Why)? Onde será realizado (Where)? Quem realizará o projeto (Who)? Como será realizado (How)? Quanto custará (How Much)?

2.9.3. 6 σ

É uma ferramenta para atingir a excelência no desempenho, buscar o *best in class*, sendo uma estratégia de negócio que requer uma mudança organizacional. Através dela é possível reduzir a variabilidade e melhorar drasticamente os processos.

Sigma (σ) é uma letra grega usada para demonstrar a variabilidade de processos. Um processo 6 σ se comporta tão bem, que tem praticamente zero chance de cometer falhas (Tabela 2).

Tabela 2. Impacto do nível sigma de uma empresa na porcentagem de vendas

Sigma	Defeitos por milhão de oportunidades	Custo da qualidade
2	308.537 (não competitiva)	Não aplicável
3	66.807	25 a 40% das vendas
4	6.210 (média da indústria)	15 a 25% das vendas
5	233	5 a 15% das vendas
6	3,4 (classe mundial)	Máximo 1% das vendas

O início do 6 σ se deu em 1986 pela Motorola nos Estados Unidos e sua aplicação rendeu ganhos de US\$ 2,2 bilhões para a empresa entre o final da década de 1980 e início da década de 1990. Hoje, esta ferramenta é utilizada por muitas empresas, visando eliminar custos e não contabilizá-los. Pois, segundo W. Edwards Deming, 85 % das razões para as falhas encontradas pelos clientes são relatadas como deficiências em sistemas e processos ao invés do empregado. Assim, a regra de gerenciamento é para mudar o processo ao invés de atormentar os indivíduos para fazer melhor.

A estrutura do programa conta com 1 Master Black Belt, 1 Black Belt para cada 100 funcionários, Greens Belts e Yellows Belts.

A mentalidade 6 σ visa eliminar a fábrica oculta criada pela variação dos processos. Fábrica oculta é tudo o que não faz parte do processo normal, não contribui para o produto final, mas que, igualmente, gera custo para a empresa. Ela atua como um *iceberg* do custo da qualidade.

2.9.4. Análise de SWOT

Trata-se de uma ferramenta em que nos analisamos frente ao mercado e/ou aos concorrentes. Com ela, é possível detectar nossas forças (*Strength*), fraquezas (*Weakness*), oportunidades (*Opportunity*) e ameaças (*Threats*).

2.9.5. Benchmarking

É o processo de buscar continuamente os melhores métodos, práticas e processos, usá-los como referência e adaptá-los às nossas necessidades.

O *Benchmarking* (interno e externo) ajuda a definir os objetivos de desempenho. É um processo contínuo de comparação dos produtos, serviços e práticas empresariais entre os mais fortes concorrentes ou empresas reconhecidas como líderes.

É um processo de pesquisa que permite realizar comparações de processos e práticas “companhia-a-companhia” para identificar o melhor e alcançar um nível de superioridade ou vantagem competitiva.

O *Benchmarking* é um processo de aprendizado, um trabalho intensivo, que consome tempo e requer disciplina.

Tem como objetivos aprender com os “melhores”, fixar novos padrões de desempenho de acordo com as melhores práticas conhecidas, aplicar os conhecimentos de outros para alcançar novos padrões de desempenho e melhorá-los continuamente, facilitar o conhecimento interno da própria empresa, promover o conhecimento do meio competitivo, facilitar a gestão por objetivos e constituir um exemplo de mudança que reduz resistência interna.

2.9.6. *Brainstorming*

Trata-se da geração livre de ideias, num espaço de tempo entre 30 e 60 minutos, dependendo da complexidade do assunto e da motivação da equipe. Usualmente, é um trabalho em equipe e as equipes variam entre quatro e oito pessoas.

O *Brainstorming* é útil quando se deseja gerar, em curto prazo, uma grande quantidade de ideias sobre um assunto a ser resolvido, possíveis causas de um problema, abordagens a serem usadas ou ações a serem tomadas.

Após o *Brainstorming*, as ideias afins são reunidas e classificadas em temas e categorias; dentro de cada categoria, procura-se combinar ideias similares e eliminar duplicidades; selecionam-se as melhores ideias para serem analisadas, melhoradas e aproveitadas e fornecer ao grupo um *feedback* sobre o resultado final do *brainstorming* e mostrar como as contribuições foram valiosas.

2.9.7. Cartas de Controle

Também chamada de cartas de Shewhart, CEP (controle estatístico de processo) ou gráficos de controle, são gráficos no eixo XY confeccionados a partir da média, desvio padrão ou amplitude dos dados obtidos num processo produtivo qualquer. Tem o objetivo de monitorar a estabilidade do processo produtivo. Trata-se de uma ferramenta de diagnóstico.

Walter A. Shewhart, físico, engenheiro, estatístico e considerado o pai desta ferramenta da qualidade disse que a variabilidade é normal e propôs o gráfico abaixo (Figura 7) para aceitar produtos adequados e rejeitar produtos defeituosos num processo produtivo.

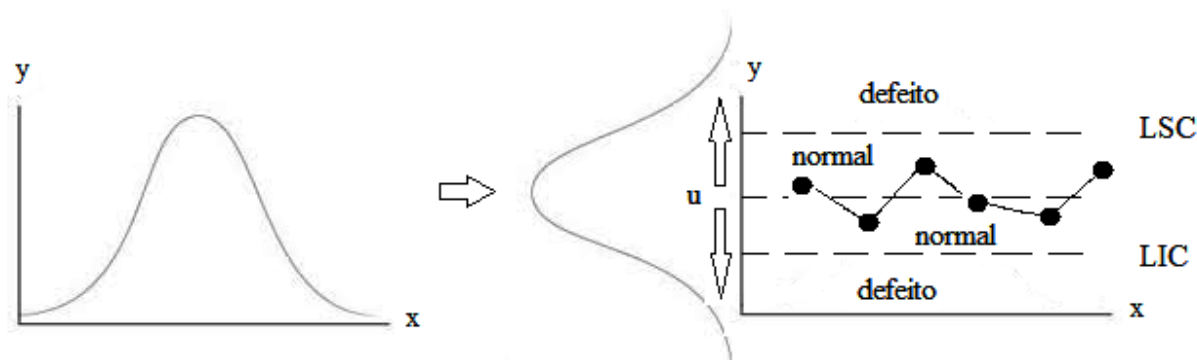


Figura 7. Ilustração da variabilidade de um processo, evidenciando o resultado esperado que é o efeito serrate. LSC = limite superior de controle e LIC – limite inferior de controle.

O gráfico deve ser feito com a média ou desvio padrão dependendo do impacto desta medida no produto final, porque é válido lembrar que a média é uma medida de tendência central e, às vezes, ela pode ser a mesma, mas o desvio padrão é diferente.

2.9.8. Diagrama de Ishikawa

Talvez o Diagrama de Ishikawa seja a ferramenta mais útil para identificar as causas-raiz de um problema. Foi criado por Kaoru Ishikawa em 1943. É uma ferramenta visual (Figura 8) para organizar as informações, a fim de estabelecer e esclarecer as relações entre um efeito e suas causas principais. Ajuda a chegar a um entendimento

comum do problema e sua(s) causa(s)-raiz ou impulsionadores potenciais. Esta ferramenta também é conhecida como Ishikawa, espinha de peixe e causa e efeito.

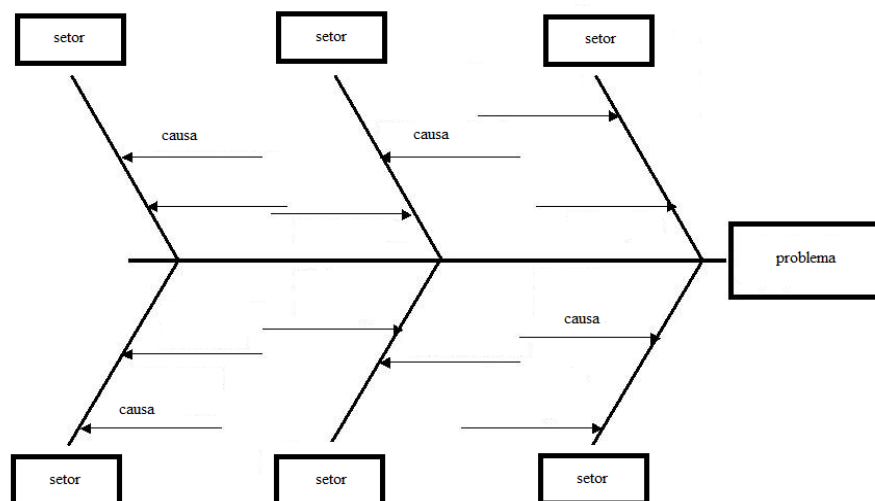


Figura 8. Ilustração do Diagrama de Ishikawa.

Para construir um Diagrama de Ishikawa, deve-se escrever o enunciado do problema na cabeça do “peixe.” Em seguida, determinar as categorias principais (causas) do efeito em cada vértebra da espinha do peixe. Por fim, identificar as causas-raiz potenciais do problema.

2.9.9. FMEA (Failure Mode and Effects Analysis)

É uma técnica para assegurar que todas as possíveis falhas de projeto, processo ou sistema e seus efeitos, foram consideradas e analisadas, objetivando a redução ou eliminação das chances dele vir a ocorrer, com ações corretivas recomendadas, antes do início da produção.

É uma ferramenta preventiva, que evita a ocorrência de falhas no projeto e/ou no processo, prioriza as ações de melhoria a partir da análise consistente das falhas potenciais, objetiva eliminar e/ou detectar as falhas antes de iniciar o processo, reduz as chances do projeto ou do processo falhar e aumenta a confiabilidade no projeto e no processo.

O *FMEA* é escolhido porque permite eliminar ou reduzir as possíveis falhas. Desta maneira, a ocorrência de falhas no produto, sistema ou processo são reduzidas, melhorando assim a sua confiabilidade.

É aplicado na introdução de novos projetos e processos, na alteração significativa nos projetos e processos, quando existe problemas de qualidade no processo e no desenvolvimento ou mudança de fornecedores.

Para aplicar o *FMEA*, as fontes de informações são os dados históricos de falhas ocorridas em processos e produtos semelhantes, as reclamações de clientes, os relatórios de produtos devolvidos em garantia (análise de devoluções) e as experiência dos membros do grupo de trabalho.

2.9.10. Gráfico de Pareto

O princípio de Pareto diz que “um número pequeno de causas (20 %) é responsável pela maior parte do problema (80 %)”. Poucos mas vitais, muitos mas triviais. Joseph M. Juran mostrou que o princípio é universal, sugeriu este princípio e deu o nome em homenagem ao Pareto.

O gráfico de Pareto é uma forma especial de gráfico de barras (Figura 9) e deve ser utilizado sempre que temos que estabelecer prioridades a partir de um número variado de informações e dados.

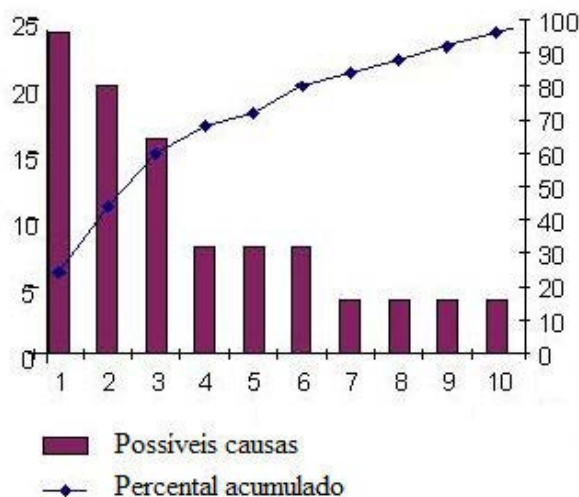


Figura 9. Ilustração do Gráfico de Pareto.

Assim, considerando o processo de melhoria da qualidade, o gráfico de Pareto é utilizado na seleção de problemas que serão projetos de melhoria; na identificação do problema; na identificação das causas fundamentais dos problemas e na comparação entre o antes e o depois de uma ação corretiva para avaliar o impacto das mudanças efetuadas no processo.

A estratificação de Pareto é uma ferramenta de análise que equipes podem usar para focalizar o problema bem como os seus resultados.

2.9.11. Mapeamento de processos

É uma ferramenta visual que lista todas as entradas e as principais variáveis de saída de processo, identifica os passos do processo que agregam ou não valor para o cliente, mostra as principais saídas de cada passo, lista as principais entradas e as classifica e adiciona as especificações de operação e os objetivos do processo para as entradas variáveis e críticas.

O mapeamento nunca termina. Deve-se mantê-lo atualizado, se houver alterações é necessário revisar o mapeamento de processo e tê-lo sempre junto nos momentos de análises e decisões.

As duas ferramentas de mapeamento de processo mais utilizadas são: o Diagrama *top-down* que documenta um processo chave e seus respectivos sub-processos e o Desdobramento Funcional que documenta os sub-processos, a sequência de etapas individuais e os responsáveis.

Os símbolos são fundamentais para se realizar um Mapa de Desdobramento Funcional, como mostrado na Figura 10. Utilizando-se os símbolos é possível ter um Desdobramento Funcional preciso e descritivo.

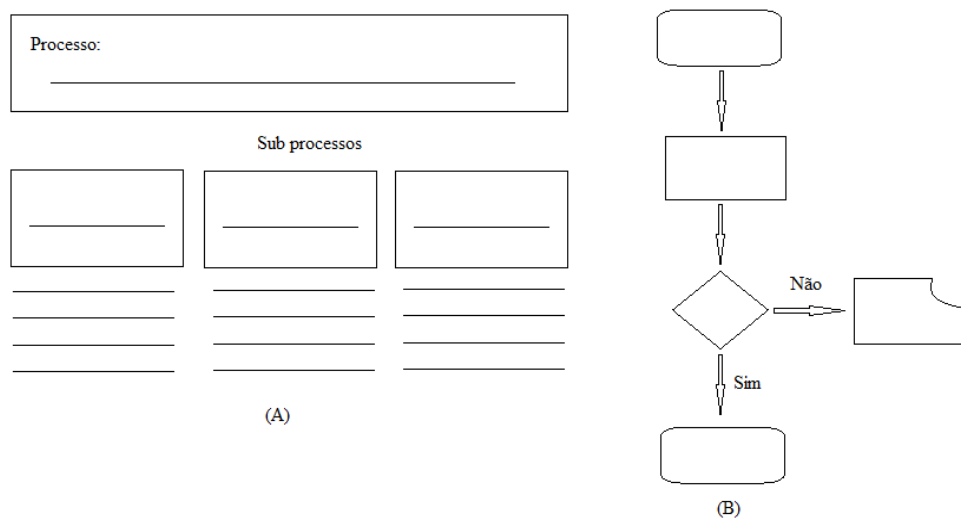


Figura 10. (A) Ilustração do Diagrama *top-down* e do (B) Desdobramento Funcional.

O retângulo é um símbolo de atividade, o losango é um símbolo de decisão, o retângulo de cantos arredondados é um símbolo que representa o início e o fim do fluxograma, o retângulo com um corte na ponta é um símbolo de documento que representa um documento pertencente ao processo, as setas são as linhas de fluxo que representam os caminhos do processo que ligam elementos do mesmo e o círculo é um elemento conector usado para indicar uma continuação do fluxograma.

2.9.12. Multivotação

É um recurso utilizado em equipe para eleger as melhores alternativas, a partir de uma relação existente.

Se houver “n” alternativas, cada membro da equipe vota em “n/2” opções que ele julgue melhor. Ao final, as que receberem mais votos são as melhores. Pode-se repetir mais rodadas de votação se necessário, com a finalidade de reduzir as alternativas eleitas, refinar o resultado ou obter maior consenso em torno das eleitas.

2.9.13. Os 5 porquês

Os “5 porquês” é uma técnica para encontrar a causa raiz de um defeito ou problema. Esta ferramenta é muito usada na área de qualidade, mas na prática se aplica em

qualquer área. É uma boa técnica para resolver problemas simples e tomar os primeiros passos para problemas mais complexos.

O princípio é muito simples. Diante de um problema, deve-se realizar cinco interações perguntando o porquê daquele problema, sempre questionando a causa anterior. Também é importante entender que esta é uma ferramenta limitada. Fazer cinco perguntas não substitui uma análise de qualidade detalhada. Uma das principais críticas à ferramenta, é que pessoas diferentes provavelmente chegarão a causas raiz diferentes com estas perguntas. Por isso, o ideal é que as perguntas sejam feitas com participação de toda a equipe, para que gere um debate em torno das causas verdadeiras.

2.9.14. Poka Yoke

É um sistema a prova de erro. É impedir o defeito, detectar, descobrir e atuar na causa.

O paradigma da falha é pensar que as pessoas são falíveis e, portanto, cometem erros. No entanto, o pensamento Poka Yoke é que as pessoas são falíveis e, portanto, devemos criar maneiras de evitar que os erros aconteçam.

“Nenhum programa de eliminação de erros terá sucesso se os operadores não se sentirem completamente engajados desde o início” Skip Pettry, Ford.

“É preciso acabar com o hábito de achar culpados pelas falhas”. “Deve-se deixar de encarar a pessoa que comunica um defeito como mensageiro da má notícia e recompensá-la por ter evidenciado uma causa de falha” Bruce Hamton, United Electric.

“A equipe que elabora um poka yoke deve contar com pessoas que possam contribuir, quaisquer que sejam as suas posições dentro da empresa” Paul Plant, United Electric.

“Poka yoke é a tentativa de tornar tudo o que se faz a prova de erro”. “Não há como chegar a 3,4 PPM, que é o objetivo do seis sigma, sem a completa eliminação das falhas no processo produtivo” Ross Robson.

“O poka yoke ajuda também na eliminação da produção excedente, pois se sabemos que não haverá problemas durante a manufatura, não precisamos colocar peças a mais na linha” Mark Horton, TRW.

2.9.15. QFD (*Quality Function Deployment*)

É uma ferramenta que foi criada na década de 60 pelo japonês Yoji Akao e tem como objetivo principal permitir que a equipe identifique e priorize as necessidades dos clientes e/ou acionistas em seus projetos de melhoria.

2.9.16. Tabela de Pares

Esta técnica representa outra ferramenta útil para priorizar uma lista de itens qualitativamente.

É eleita quando as preferências da equipe não puderem ser determinadas informalmente. Se a lista de itens for maior do que cinco, deve-se utilizar a multivotação ou uma técnica semelhante para reduzir, primeiro, a lista a cinco itens, e somente depois usar a Tabela de Pares, mostrada na Figura 11. Esta ferramenta força a equipe a comparar os itens e classificá-los individual e comparativamente. Os resultados combinados dessas tabelas de pares ajudam a esclarecer quais devem ser as prioridades da equipe.

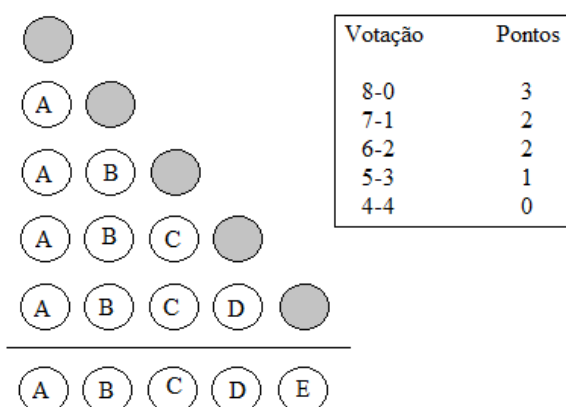


Figura 11. Ilustração da Tabela de Pares para 5 itens e uma equipe de 8 membros. No canto direito, um exemplo de sistema de pontos.

Para a construção da Tabela de Pares, marcam-se cada item de “A” até “E”, por exemplo. Depois, marcam-se as colunas e carreiras de “A” até “E”. Para cada tabela de pares, a equipe vai indicar a preferência por um item sobre o outro. A fim de indicar ainda

mais a força de cada preferência, estabelece-se concordância sobre um sistema de pontos que dê mais peso às preferências fortes do que às moderadas ou fracas.

Comparam-se os itens entre si, um por vez. Através de um sinal com as mãos, a equipe deve votar sua preferência por cada comparação possível. Após cada voto, o líder da equipe deve registrar os resultados, escrevendo a letra (no campo apropriado) que indica qual foi o item preferido da equipe e o número que mostra a força da preferência da equipe. Após completar todas as comparações, conta-se o número total de pontos atribuídos a cada letra. Os totais de pontos vão ilustrar a preferência coletiva da equipe.

2.9.17. Team Charter

É uma ferramenta para registrar um projeto que define porque deveríamos fazer isto, qual a sua importância, que problema há, que melhoria podemos ter, quais são os objetivos e metas de melhoria, quais são os limites do projeto, até onde se pode chegar, quanto tempo levará cada módulo, quem participará do projeto e em que área trabalham.

2.9.18. Equipe de trabalho

Algumas ferramentas só apontam o problema, são chamadas de ferramentas de diagnóstico. Dentre elas, podemos citar as Cartas de Controle. Outras mostram a causa, a raiz da questão e dentre elas podemos citar Diagrama de Ishikawa, Gráfico de Pareto, Os 5 porquês e *Poka Yoke*. Por este motivo é que se aconselha utilizar mais de uma ferramenta da qualidade, para detectar o problema e resolvê-lo.

Além das ferramentas da qualidade descritas, também é fundamental que uma equipe seja eficaz.

Os membros devem conversar a respeito e concordar como a equipe vai operar. Os objetivos que forem estabelecidos devem ser discutidos e a equipe planejar como atingi-los. Os membros da equipe devem poder expressar seus sentimentos, bem como suas ideias, sem censura. Os limites devem ser identificados e discutidos. As discordâncias devem ser abordadas, construtivamente. Todos devem contribuir para o sucesso da equipe. As pessoas devem ser responsáveis por liderar, quando necessário, as pessoas devem seguir em apoio ao líder.

Um bom membro de equipe, foca no objetivo do grupo, ouve sem julgar, apoia os colegas membros da equipe, é um membro ativo, é capaz de comprometer-se que é diferente de estar simplesmente envolvido, mantém bom relacionamento e toma a liderança para propor novas ideias e melhorias.

Um bom líder de equipe pensa em termos de sistemas, encoraja e apoia a confiança entre todos os membros, capacita a equipe e cada um de seus membros, identifica e resolve problemas.

O analista é a maior fonte de incerteza. Hoje se dá mais valor ao instrumental do que ao comportamental. Dessa forma, as ferramentas da qualidade vêm para ajudar no bem estar pessoal que culmina em um bom ambiente de trabalho, uma boa relação interpessoal e, por conseguinte, na execução mais centrada e correta do trabalho em nosso dia a dia.

A proposta é de que todos trabalhem como multiplicadores de inovação, ideias e, principalmente, qualidade.

2.10. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Salgado, H.R.N. Characteristics, complexation and analytical methods of darunavir. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.4, n.1, p.1276-1286, 2014.

Estudos com o darunavir livre

3. INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO

3.1. Introdução

A capacidade de uma substância existir em mais de uma estrutura cristalina é chamada de polimorfismo. Por isso, o polimorfismo possui uma conotação cristalográfica e só ocorre no estado sólido (CUFFINI *et al.*, 2009). Muitos fármacos são capazes de apresentar formas polimórficas (JANNUZZI *et al.*, 2008).

Um composto químico multicomponente solvato trata-se de um sólido que possui moléculas de solvente e do fármaco incorporadas na estrutura cristalina. Os hidratos são um caso particular do solvato, no qual a molécula de solvente é a água (CUFFINI *et al.*, 2009). Segundo Gysegheem e colaboradores (2009), o darunavir mostrou comportamento pseudopolimórfico existindo na forma de cristais de etanolato e hidrato.

Existe a necessidade de controlar o estado sólido, pois desvios de qualidade ocasionados pelo polimorfismo podem ocorrer na produção dos insumos, na fabricação do medicamento ou mesmo no período em que o medicamento fica armazenado na prateleira do estabelecimento comercial (CUFFINI *et al.*, 2009). Os polimorfos podem mudar de forma em determinadas etapas, alterando as características do fármaco e comprometendo a eficácia e segurança do produto acabado (JANNUZZI *et al.*, 2008). O manuseio, processamento e/ou armazenamento do darunavir pode acarretar na mudança de forma do polimorfo (GYSEGHEM *et al.*, 2009). Desta forma, o polimorfismo pode interferir em todas as formas farmacêuticas.

Esta interferência é devido às variações que as propriedades dos polimorfos podem ter. Por sua vez, as diferenças nas propriedades são oriundas das diferentes conformações e/ou interações intra e intermoleculares, que modificam os empacotamentos das moléculas nos polimorfos (CUFFINI *et al.*, 2009). Polimorfos diferentes de um mesmo fármaco podem apresentar diferenças significativas de solubilidade, processabilidade e estabilidade física e química. Essas diferenças físico-químicas podem alterar o comportamento da molécula em um meio biológico (JANNUZZI *et al.*, 2008).

Assim sendo, o polimorfismo pode ocasionar desvios de qualidade durante o processo produtivo e influenciar o desempenho dos medicamentos (ARAUJO *et al.*, 2012).

A *International Conference on Harmonization (ICH)* (1999) emitiu a *ICH Guidance Q6A* que visa melhorar o controle do polimorfismo nos medicamentos novos e já existentes. Para a FDA, as questões relacionadas ao polimorfismo devem estar contempladas tanto na fase clínica como na fase de registro de medicamentos inovadores. A ANVISA também possui documentações em que o tema polimorfismo é abordado, RDC nº 136, de 29 de maio de 2003, RE nº 893, de 29 de maio de 2003, RDC nº 16, de 02 de março de 2007, RDC nº 17, de 02 de março de 2007 e RDC nº 57, de 17 de novembro de 2009.

O estudo do polimorfo do darunavir utilizado nas análises laboratoriais é importante para a detecção de possíveis diferenças analíticas (GYSEGHEM *et al.*, 2009). Por isso a realização de uma investigação da forma do polimorfo do darunavir utilizado ao longo do desenvolvimento e validação de metodologias analíticas é justificada.

Para minimizar a possibilidade de ocorrerem surpresas desagradáveis, o estado sólido do fármaco deve ser sempre estudado e compreendido. Desvios de qualidade oriundos do polimorfismo podem trazer graves consequências para o setor farmacêutico. Portanto, é importante caracterizar o estado sólido das substâncias da melhor forma possível (CUFFINI *et al.*, 2009).

Enquanto que a estabilidade química é avaliada corretamente no desenvolvimento, a estabilidade física é muitas vezes deixada de lado ou realizada de forma inadequada. Por isso, cabe ressaltar que a estabilidade física também é importante, tanto para o insumo ativo como para o produto final. A falta do controle do polimorfismo pode acarretar em desvios de qualidade (CUFFINI *et al.*, 2009). Portanto, foram realizadas análises frequentes de IV, TG e DSC, afim de verificar a forma do darunavir utilizado, uma vez que este trabalho propõe o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos. Para que estes sejam confiáveis, houve a preocupação da comprovação da forma utilizada ser sempre a mesma utilizada desde o início das atividades. Assim, foi realizada a comparação e análise dos espectros de IV e das curvas de TG e DSC do darunavir etanolato de 2012 a 2014.

O IV médio é bastante difundido na área farmacêutica e utilizado há muito tempo para caracterizar quimicamente os insumos farmacêuticos, pois as regiões das bandas de absorção dos grupos funcionais são conhecidas com precisão (CUFFINI *et al.*, 2009). E dentre as técnicas de análise térmica utilizadas na área farmacêutica podem-se citar a TG e

a DSC. O ponto ou intervalo de fusão é uma avaliação físico-química útil na identificação de fármacos, pois fornece informações do grau de pureza e é utilizada para pesquisar a presença de possíveis contaminantes na amostra.

A difratometria de raios-X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, com aplicação em diversos campos do conhecimento. Sendo assim, foi realizada a difratometria de raios-X do darunavir etanolato e comparado aos difratogramas do darunavir de patente e artigos.

É válido lembrar que, geralmente, o uso de uma única técnica não permite informações suficientes sobre um dado sistema, sendo importantes informações complementares obtidas através de outras análises. Por isso, foram eleitas as técnicas de IV, TG e DSC, intervalo de fusão e difração de raios-X para a investigação.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Material

A matéria-prima (MP) utilizada foi o darunavir etanolato, teor de 97,0 %, extraído da forma farmacêutica comprimidos de darunavir 300 mg, comercialmente conhecido como Prezista[®], por extração com álcool etílico e posterior evaporação (BERGINC *et al.*, 2010). A extração etanólica pôde ser aplicada porque os componentes do placebo têm fraca solubilidade em álcool etílico e o darunavir é solúvel neste solvente.

3.2.2. Método

Na análise por IV foi utilizado o espectrofotômetro IR Prestige-21 (Shimadzu[®]). Foram pesados em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]) 2,5 mg de MP e diluídos em brometo de potássio (KBr), previamente dessecado até peso constante em estufa (Nova Ética[®]), para formar pastilhas de 150 mg cada. As análises e comparações dos espectros foram realizadas em transmitância, a fim de avaliar a presença ou ausência dos picos característicos do darunavir.

As curvas de TG foram obtidas através do SDT Q600 V8.3 Build 101 e as curvas de DSC com fluxo de calor foram obtidas no DSC Q100 (TA Instruments[®]). Foram pesados de 1 a 3 mg de amostra e colocados em cadinho de alumina. A faixa de temperatura utilizada na TG foi de 30 a 600 °C e na DSC foi de 25 a 150 °C, ambas sob atmosfera

dinâmica de nitrogênio (vazão de 100 mL/min) e razão de aquecimento de 2 °C/min. A MP foi analisada 6 vezes com intervalos de aproximadamente 6 meses entre elas. As análises e comparações das curvas foram realizadas visando o comportamento térmico do darunavir.

A determinação do intervalo de fusão foi realizada em equipamento LS Logen Scientific e tubos capilares de 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento. Foi adicionada uma pequena quantidade de pó dentro do tubo capilar. O pó foi compactado cuidadosamente para garantir o valor correto do intervalo de fusão de todo o material. O tubo capilar foi colocado na célula de aquecimento e observou-se a fusão do fármaco através de uma lupa. Um termômetro foi acoplado à célula para acompanhar a temperatura do início e do término do evento.

Na difração de raios-X foi utilizado equipamento Anodo rotatório Rigaku RINT2000, com monocromador curvo de grafite no feixe difratado, fenda de divergência e espalhamento de 0,25 °, fenda de recepção de 0,3 mm e fenda Soller de 2,5 ° de divergência na radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$), operando com 40 KV e 70 mA de tensão e corrente do tubo, respectivamente e espelho focalizador (Gobel Mirror), para o conhecimento da forma apresentada. As amostras foram acondicionadas em um porta amostra de 2 cm de diâmetro e 1 mm de profundidade.

3.3. Resultados

A pureza do darunavir extraído foi confirmada por espectroscopia na região do infravermelho e mostrou espectro idêntico à substância química de referência.

As deformações das bandas indicadas no espectro na região do IV estão relacionadas na Tabela 6 (Capítulo IV, página 93). As bandas características do darunavir etanolato foram observadas nos tempos 6, 12, 18, 24 e 30 meses e comparadas àquelas obtidas no tempo 0 (zero), como mostra a Tabela 3 e as Figuras 12 e 13.

Tabela 3. Bandas do espectro de absorção na região do IV do darunavir em diferentes tempos

Banda (cm^{-1})	Tempo (meses)					
	0	6	12	18	24	30
A	3470	3450	3467	3475	3533	3470
B	3368 e 3255	3380 e 3270	3362 e 3252	3360 e 3250	3361 e 3252	3362 e 3248
C	3061 e 2969	3070 e 2990	3063 e 2963	2950 e 2880	2988 e 2964	3030 e 2961
D	1709	1700	1705	1700	1703	1709
E	1633	1650	1630	1630	1643	1630
F	1597	1600	1595	1600	1597	1597
G	1536	1550	1545	1540	1551	1533
H	1501	1500	1502	1500	1504	1504
I	1459	1450	1452	1450	1448	1454
J	1093	1050	1092	1090	1088	1088

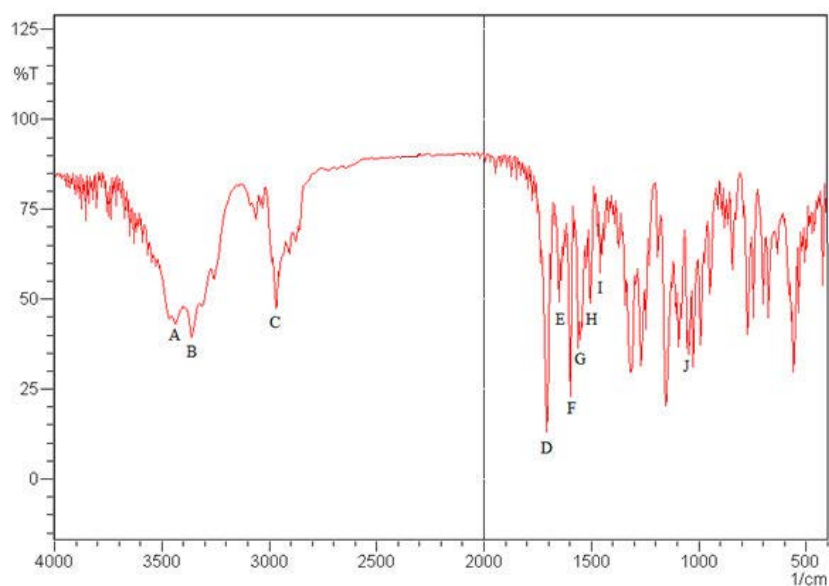


Figura 12. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir MP com as bandas características de absorção no tempo 0.

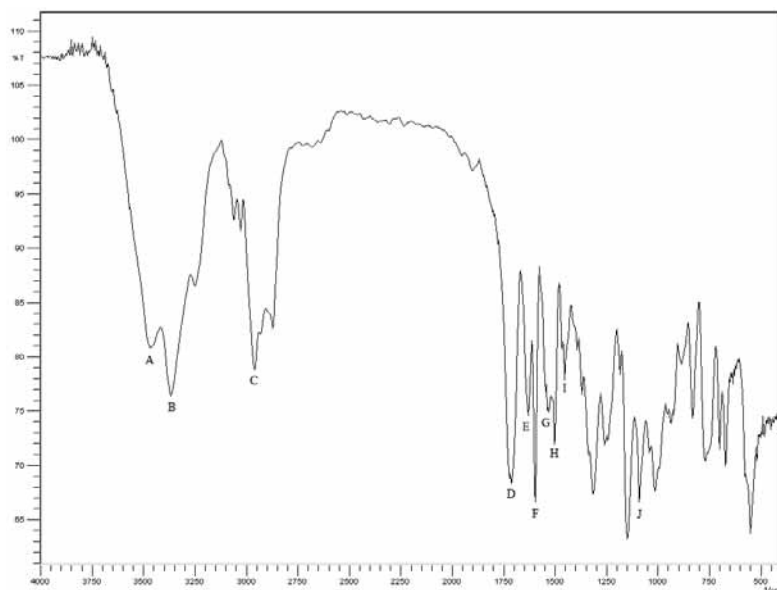


Figura 13. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir MP com as bandas características de absorção após 30 meses.

A Figura 14 apresenta as bandas características do darunavir hidrato.

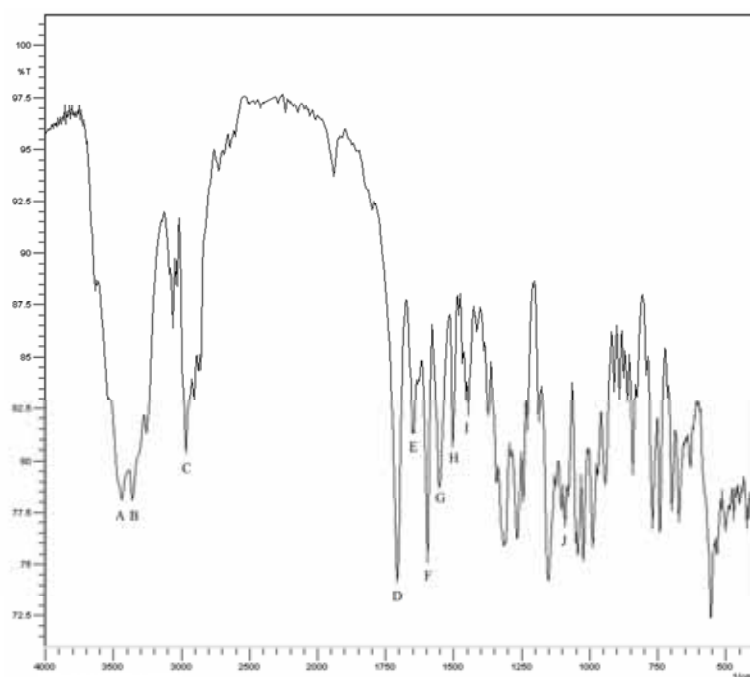


Figura 14. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir hidrato com as bandas características de absorção.

As Figuras de 15 a 17 apresentam o termograma e a termogravimetria derivada e as Figuras de 18 a 20 apresentam a calorimetria diferencial de varredura do darunavir, ambas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

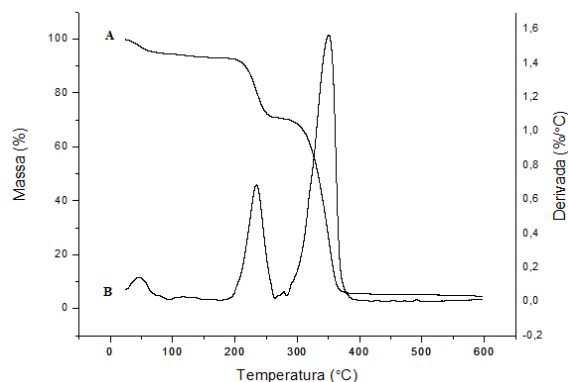


Figura 15. Curva TG (A) e DTG (B) do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min no tempo 0.

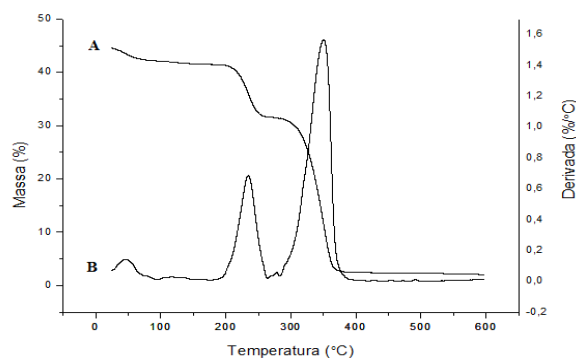


Figura 16. Curva TG (A) e DTG (B) do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.

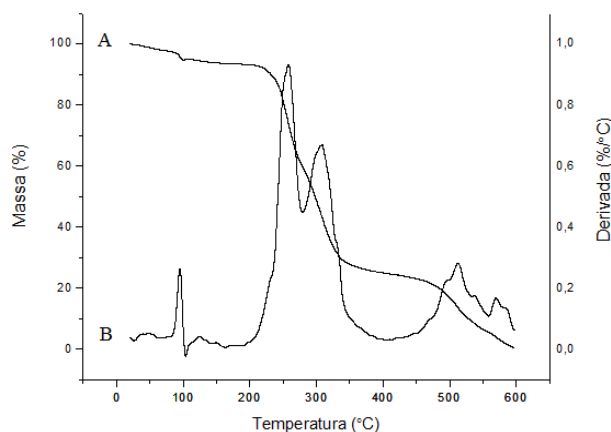


Figura 17. Curva TG (A) e DTG (B) do darunavir hidratado sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.

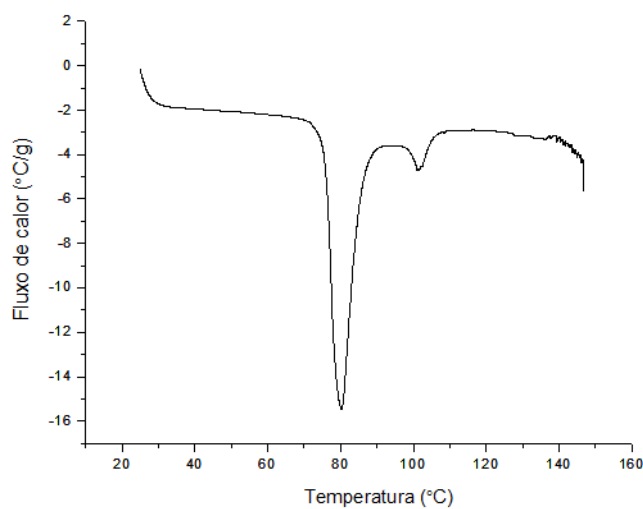


Figura 18. Curva DSC do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 150 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min no tempo 0.

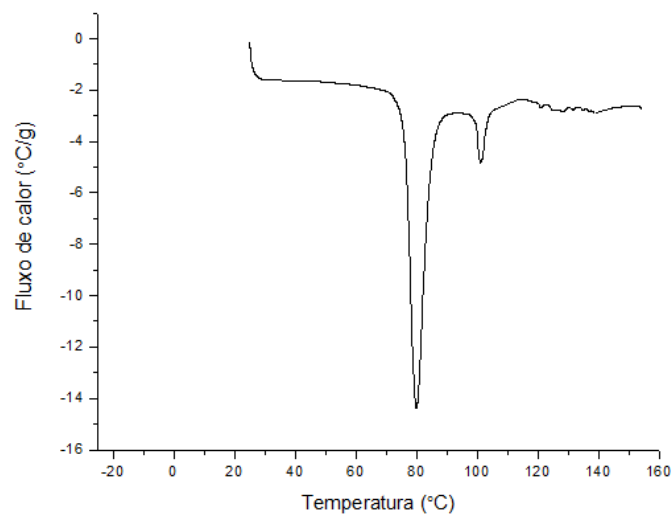


Figura 19. Curva DSC do darunavir MP sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 150 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.

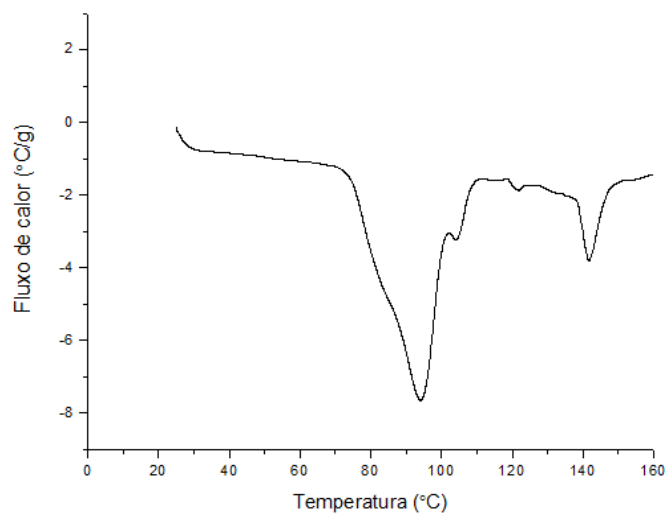


Figura 20. Curva DSC do darunavir hidrato sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 100 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 150 °C com razão de aquecimento de 2 °C/min após 30 meses.

A Tabela 4 mostra o intervalo de fusão do darunavir etanolato.

Tabela 4. Valores do intervalo de fusão obtidos para o darunavir etanolato

Ensaio	Intervalo de fusão (°C)	Média ± e.p.m*
1	103 – 106	
2	104 – 107	
3	103 – 107	102,8 ± 0,37 – 106,4 ± 0,24
4	102 – 106	
5	102 – 106	

*e.p.m = erro padrão da média

A Figura 21 mostra o capilar contendo darunavir etanolato antes da análise e o capilar contendo darunavir etanolato depois da fusão a 106,4 °C.

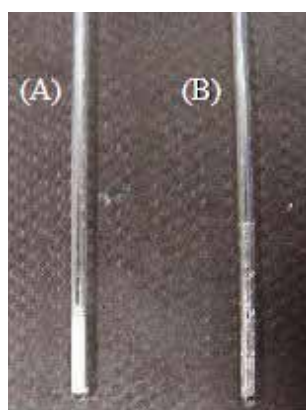


Figura 21. (A) Capilar contendo darunavir etanolato antes da análise e (B) capilar contendo darunavir etanolato depois do aquecimento a 106,4 °C.

O intervalo de fusão do darunavir hidrato foi entre 91 e 95 °C, aproximadamente.

As Figuras 22 e 23 apresentam os difratogramas de raios-X do darunavir etanolato e hidrato obtidos experimentalmente.

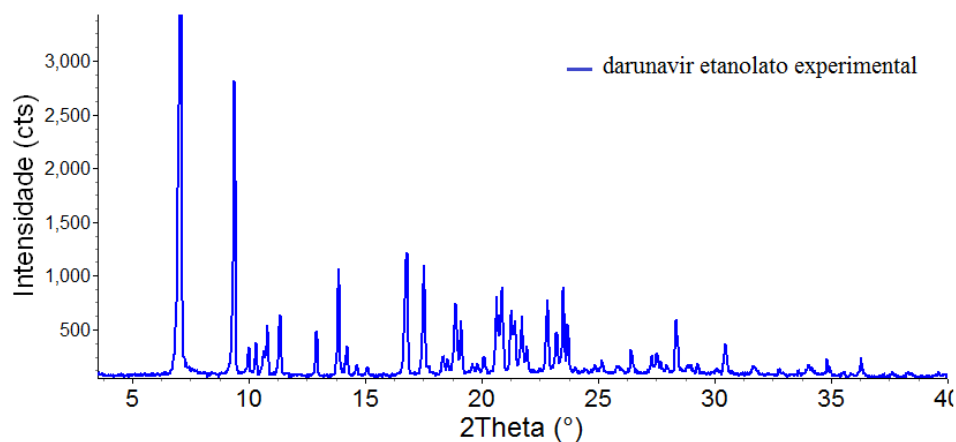


Figura 22. Difratograma experimental de difração de raios-X da amostra de darunavir etanolato.

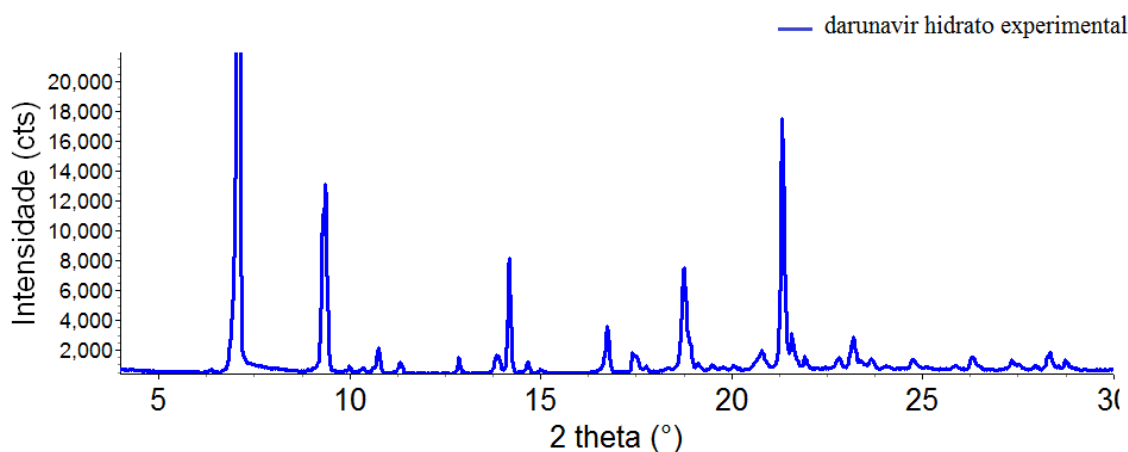


Figura 23. Difratograma experimental de difração de raios-X da amostra de darunavir hidrato.

4.4. Discussão

O polimorfismo é a capacidade de uma molécula cristalizar em duas ou mais formas, as quais possuem propriedades diferentes e sua presença no desenvolvimento e validação de métodos analíticos acarreta no impacto direto dos resultados, gerando metodologias não confiáveis e um controle de qualidade do medicamento nada seguro.

O espectro IV fornece bandas características de certos grupos de átomos que ocorrem geralmente na mesma frequência e é através destas bandas que se torna possível comparar e avaliar estruturas.

Nos espectros de IV obtidos após 6, 12, 18, 24 e 30 meses continuaram a aparecer, como na análise de tempo 0 (zero), as bandas referentes à amina primária, álcool, alcanos, anel benzênico, éster, amida secundária e sulfóxido. Nenhuma outra banda característica apareceu nos espectros, o que caracterizaria a formação de um novo grupo de átomos. Os semelhantes espectros de IV do darunavir etanolato analisado durante os anos deste trabalho provam a manutenção da forma do fármaco utilizado durante o período de estudo.

Uma análise de IV do darunavir hidrato foi realizada para comparação com o espectro de IV do darunavir etanolato e as mesmas bandas características apareceram, caracterizando o mesmo fármaco. No entanto, apenas esta técnica, não diferencia as formas de darunavir, sendo necessárias técnicas complementares para a distinção da forma etanolato e hidrato.

Os métodos termoanalíticos têm sido amplamente utilizados na área farmacêutica em estudos de fármacos, adjuvantes, caracterização térmica e até para quantificação de fármacos (WESOLOWSKI, 1992; YOSHII, 1997).

A termogravimetria é uma técnica termoanalítica que apresenta as modificações de massa de uma amostra em função da temperatura e/ou do tempo de exposição. Os termogramas são curvas que relatam estas modificações de massa *versus* temperatura e possibilitam informações referentes à estabilidade térmica, pureza da substância, compostos intermediários e resíduo final (SALGADO *et al.*, 2005).

A termogravimetria derivada é a primeira derivada da curva TG e proporciona uma identificação mais adequada da decomposição do composto (GIRON, 1990; CANOTILHO *et al.*, 1992). Afinal, nem todos os eventos térmicos que ocorrem durante o aquecimento de uma amostra são acompanhados de mudança de massa (BROWN, 1995).

Os parâmetros termoanalíticos para a determinação de componentes de um medicamento podem incluir três fenômenos. A desidratação, que ocorre entre 60 e 300 °C e é observada pela perda de água de cristalização e acompanhada pela formação de um composto intermediário de composição conhecida. A descarboxilação, que ocorre entre 60

e 200 °C ou entre 600 e 800 °C e é observado perda de gás carbônico. E, finalmente, a perda de massa, que é resultante da formação de compostos intermediários da reação ou devido à total evaporação, sublimação e combustão dos componentes (WENDLANDT, 1986).

DSC é a técnica pela qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e ao material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas à programação controlada de temperatura. Existem dois tipos de DSC, de compensação de potência e de fluxo de calor. A principal diferença de interpretação entre os dois métodos do DSC está na forma de apresentação dos resultados. Ou seja, no DSC com compensação de potência foi adotada a convenção termodinâmica, em que um evento endotérmico ($\Delta H > 0$) é caracterizado por um pico ascendente na curva DSC, enquanto que no DSC com fluxo de calor, esse mesmo evento é representado na curva DSC por um pico descendente. Além disso, no DSC com fluxo de calor o sinal é originado da diferença da temperatura entre a amostra e a referência e no DSC com compensação de potência o sinal é proveniente do calor diferencial fornecido pela amostra e referência.

As curvas TG mostraram três estágios de perda de massa com aquecimento que correspondem à saída de álcool etílico, à saída de água e à decomposição do composto. Nas curvas DTG observaram-se pico endotérmico com perda de massa correspondente à saída de álcool etílico e à saída de água em até 60 °C e outros dois picos endotérmicos, em aproximadamente 200 e 300 °C, atribuídos à decomposição do composto fundido. Uma vez que através das curvas de DSC foi possível notar dois picos endotérmicos em 80 e 100 °C sem perda de massa correspondente à fusão em duas etapas, o que corrobora os resultados do ensaio de intervalo de fusão.

As curvas de DSC do darunavir etanolato mostram sinal endotérmico em cerca de 101,7 °C, causada pela evaporação de álcool etílico, colapso e liquefação do produto. A temperatura de dessolvatação é superior ao ponto de ebulição do solvente puro sugerindo que a remoção do álcool etílico é um tanto que dificultada cineticamente. Para o darunavir hidrato, o sinal endotérmico está em cerca de 75,0 °C (GYSEGHEM *et al.*, 2009).

Os comportamentos térmicos semelhantes do darunavir analisado durante os anos deste trabalho, através das curvas de TG/DTG e DSC e sob as mesmas condições, provam a manutenção da forma do darunavir utilizada durante o período de estudo.

Para o darunavir hidrato, nas curvas DTG observou-se pico endotérmico com perda de massa em até 100 °C e outros três picos endotérmicos, em aproximadamente 250, 350 e 500 °C. Através das curvas de DSC foi possível notar pico endotérmico em aproximadamente 95 °C sem perda de massa correspondente à fusão, resultado que desencontra aqueles de Gyseghem e colaboradores (2009). No entanto, a faixa de fusão do darunavir etanolato (~100 °C) continua sendo maior à faixa de fusão do darunavir hidrato (~95 °C), provando a estabilidade superior da forma etanólica.

Os resultados também podem ser discordantes pelo fato da amostra ter sido analisada após 30 meses de sua obtenção. Não podemos descartar a possibilidade de mudanças da forma cristalina, bem como a presença de produtos de degradação, o que forneceria diferentes gráficos de TG e DSC, dado que o darunavir hidrato é uma forma menos estável frente às condições ambientais de temperatura e umidade.

Os raios-X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo. O fóton de raios-X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; cada elétron atua, portanto, como centro de emissão de raios-X.

As comparações dos difratogramas de darunavir etanolato experimental, forma A do darunavir etanolato constante na patente US 7700645B2 e analisado por Gyseghem e colaboradores (2009) indicam ser a mesma estrutura cristalina. Pequenas diferenças de intensidade podem ser atribuídas à orientação preferencial e tamanho médio de cristalinos diferentes entre as amostras.

O darunavir hidrato experimental foi comparado à forma C do darunavir hidrato constante na patente US 2013/0029945A1 e mostraram-se semelhantes, podendo ser utilizado nas comparações com o darunavir etanolato experimental para controlar sua forma polimórfica ao longo deste trabalho.

Na comparação entre os difratogramas de darunavir etanolato e hidrato experimentais a principal diferença fica evidenciada nas intensidades entre 9 e 11 ° 2 θ .

O darunavir etanolato utilizado neste trabalho foi armazenado em geladeira em pote de vidro com tampa de rosca.

3.5. Conclusão

O darunavir etanolato utilizado ao longo deste trabalho manteve-se inalterado, como mostrado através da espectroscopia na região do infravermelho, das técnicas térmicas de termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura com fluxo de calor e difração de raios-X, promovendo a confiabilidade dos métodos desenvolvidos e validados nesta tese.

4. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

4.1. Introdução

A consciência da importância do Controle de Qualidade é histórica, pois, em 1352, João, o Bom, rei da França, legislou sobre a necessidade de serem controladas as preparações farmacêuticas (PRISTA *et al.*, 2003). Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, o controle de qualidade evoluiu significativamente.

O Controle de Qualidade é imprescindível para o desempenho adequado de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos, em relação à sua segurança, eficácia e aceitabilidade. A ANVISA exige a implementação de Boas Práticas de Fabricação, conforme as normas técnicas oficialmente estabelecidas. Além disso, preconiza a realização de ensaios de controle de qualidade em todos os processos de fabricação (F. BRAS., 2010; PINTO *et al.*, 2010).

O Controle de Qualidade deve acompanhar todo o processo desde a aquisição da matéria-prima até sua transformação em produto acabado que ficará à disposição do consumidor (WATSON, 2005) assegurando sua qualidade e conseqüentemente sua eficácia até o término do prazo de validade.

Na indústria farmacêutica, enquanto as análises de identificação e qualidade são realizadas, alguns setores como Produção e Vendas devem aguardar para continuar o processo de fabricação do produto acabado e iniciar o procedimento de vendas e liberação para o mercado consumidor, respectivamente. Dessa forma, métodos de análise rápidos, de fácil aplicação e eficazes tornam-se de extrema importância, pois permitem o trabalho desenvolvido pelos setores industriais mais dinâmicos.

É válido lembrar que na indústria farmacêutica os setores estão interligados e são dependentes entre si. Se o Controle de Qualidade liberar resultados mais rápidos, a produção terminará o processo de fabricação do produto acabado mais rapidamente e o setor de vendas colocará o lote no mercado antes. Com este panorama o desenvolvimento de métodos mais rápidos e de fácil aplicação passa a ser interessante (KOGAWA & SALGADO, 2012).

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados é de extrema importância e tem por objetivo fornecer informações quanto à natureza e à composição dos materiais em análise (LA ROCA *et al.*, 2007).

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para identificação, determinação do teor e estudo das características físicas e químicas do fármaco, é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final (KOGAWA & SALGADO, 2013a).

4.2. Análise Qualitativa

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram desenvolvidos para a identificação qualitativa do darunavir etanolato em comprimidos.

A análise qualitativa foi realizada através do desenvolvimento dos métodos de cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta, espectrometria na região do infravermelho e eletroforese capilar.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Materiais

A substância química de referência (SQR) utilizada foi o darunavir, teor de 98,0 %, lote SRP07000d, da empresa britânica Sequoia Research Products.

A MP utilizada foi o darunavir etanolato, teor de 97,0 %, extraído da forma farmacêutica comprimidos.

A forma farmacêutica utilizada foram comprimidos de darunavir 300 mg, lote AEZOCOO, comercialmente conhecido como Prezista[®] da empresa Janssen-Cilag.

O placebo da forma farmacêutica era composto de celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, crospovidona, estearato de magnésio, álcool polivinílico, PEG 3350, dióxido de titânio e talco.

4.3.2. Determinação do Peso Médio

4.3.2.1. Material

O material utilizado na determinação do peso médio foram comprimidos de darunavir 300 mg (Prezista[®]), descrito no item 4.3.1.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

4.3.2.2. Método

A determinação do peso médio foi realizada em balança semi-analítica, BG1000 (Gehaka[®]), conforme a Farmacopeia Brasileira (2010).

Vinte comprimidos foram pesados, individualmente, e calculados o desvio padrão relativo e o peso médio.

4.3.2.3. Resultados

A Tabela 5 relaciona o peso individual de vinte comprimidos com o peso médio e o desvio padrão relativo.

Tabela 5. Relação do peso individual dos comprimidos de darunavir, o peso médio e o respectivo desvio padrão relativo

Comprimido	Peso individual (mg)	Peso médio (mg)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
1	648,3			
2	649,5			
3	652,0			
4	649,5			
5	653,9			
6	650,9			
7	648,1			
8	646,8			
9	644,6			
10	644,8	647,81	3,49	0,54
11	641,1			
12	648,2			
13	648,5			
14	653,0			
15	646,6			
16	646,6			
17	542,2			
18	648,5			
19	650,4			
20	642,7			

A Figura 24 ilustra a variação do peso dos vinte comprimidos de darunavir.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

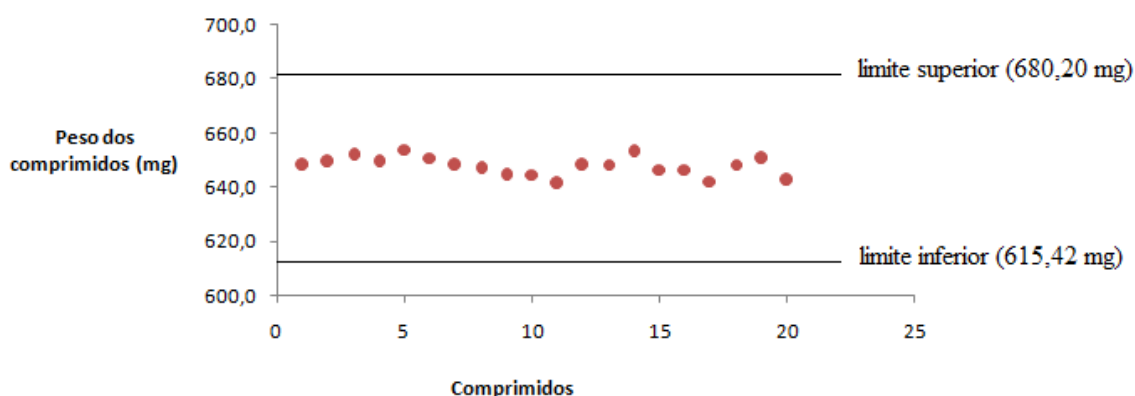


Figura 24. Ilustração da variação do peso dos vinte comprimidos de darunavir.

4.3.2.4. Discussão

A variação de peso dos comprimidos de darunavir encontra-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010), sendo a variação permitida de $\pm 5,0$ %.

Assim, para os comprimidos de darunavir estudados, os quais apresentaram peso médio de 647,81 mg, permite-se o peso máximo de 680,20 mg e peso mínimo de 615,42 mg. Como foram obtidos pesos máximo e mínimo de 651,31 e 644,31, respectivamente, é possível concluir que os comprimidos estão dentro do especificado para variação de peso. O desvio padrão relativo (DPR) apresentou valor de 0,54 %, o que comprova o cumprimento da especificação.

O peso médio foi realizado para verificar se os comprimidos estavam dentro dos parâmetros farmacopeicos e o seu valor será útil em cálculos de peso de massa do produto acabado.

4.3.3. Cromatografia em Camada Delgada

4.3.3.1. Material

Os materiais utilizados na CCD foram a MP, os comprimidos e o placebo, descritos no item 4.3.1.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

4.3.3.2. Método

Foram pesados 40,00 mg de MP e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 400 µg/mL.

Para a solução amostra, foram pesados 86,37 mg de comprimidos de darunavir etanolato que equivalem a 40,00 mg de darunavir etanolato MP e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 400 µg/mL.

Foram pesados 46,37 mg de placebo e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo a mesma concentração de placebo que estaria presente na solução de amostra.

O sistema de fase móvel proposto foi preparado a partir da mistura de água purificada e álcool metílico na proporção de 70:30 (v/v), respectivamente, com ajuste do pH para 3,0 com ácido acético glacial.

Para o ensaio, inicialmente, procedeu-se a saturação da cuba de vidro com o sistema de fase móvel.

A migração cromatográfica foi realizada em placas com sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm) e espessura de 0,25 mm (Merck®). As placas foram primeiramente colocadas em estufa a 105 °C por uma hora para a sua ativação.

Com auxílio de seringa de 100 µL, foram transferidas alíquotas da solução de MP, amostra e placebo para as placas de acordo com a Figura 25.

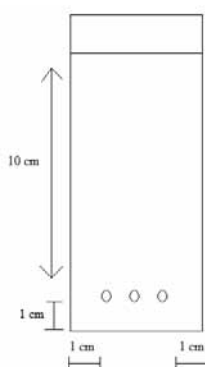


Figura 25. Esquema para aplicação das alíquotas de MP, amostra e placebo na placa com sílica-gel para a análise por CCD.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

Após a migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, deixando o solvente evaporar. As placas foram reveladas em câmara UVA a 365 nm para a comparação das manchas quanto à forma, posição e tamanho.

Foram determinados os fatores de retenção (Rf) da MP, dos comprimidos e do placebo. O valor de Rf foi obtido através do quociente entre a distância de migração do fármaco e a distância percorrida pelo eluente, segundo a Equação 1.

$$Rf = df/de \quad (1)$$

Em que:

Rf = fator de retenção

df = distância percorrida pelo fármaco

de = distância percorrida pela fase móvel

4.3.3.3. Resultados

O sistema solvente eleito foi água purificada e álcool metílico 70:30 (v/v), com pH ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial.

O valor de Rf obtido após a migração cromatográfica foi 0,83, tanto para a MP quanto para a forma farmacêutica comprimidos. O formato e tamanho das manchas foram iguais tanto para a MP como para a amostra. No placebo não foi detectada nenhuma mancha ao longo da distância percorrida pela fase móvel. Foram realizadas três análises, obtendo-se o mesmo resultado em todas as placas.

Os perfis cromatográficos das amostras após visualização em câmara UVA a 365 nm podem ser observados na Figura 26.



Figura 26. Perfil cromatográfico (A) do placebo, (B) da amostra e (C) da MP, ambos com Rf de 0,83 após visualização em câmara UVA a 365 nm, fase estacionária composta por sílica-gel e fase móvel contendo água purificada e álcool metílico, 70:30 (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido acético glacial.

5.3.3.4. Discussão

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. A CCD é uma técnica de fase normal em que a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

A CCD é uma técnica flexível, pois permite a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores. Apresenta-se como uma importante ferramenta capaz de identificar compostos, sendo de fácil execução, versátil e de baixo custo. Outra aplicação da CCD refere-se à possibilidade de verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (WATSON, 2005).

O darunavir não está descrito na Farmacopeia Portuguesa (2005), na Farmacopeia Brasileira (2010), na Farmacopeia Europeia (2011), na Farmacopeia Japonesa (2011), na BP (2012) e na USP 35 (2012), como também, não foi encontrado trabalho na literatura que descrevesse a técnica de CCD para este fármaco.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

Assim, após testes com vários sistemas solventes (água:álcool etílico 50:50, v/v; água:álcool etílico 20:80, v/v; água:álcool etílico 10:90, v/v; álcool etílico 100, v; água:álcool etílico 80:20, v/v; água:álcool etílico 65:35, v/v; água:álcool etílico 60:40, v/v; água:álcool etílico 70:30, v/v; água:álcool metílico 20:80, v/v; água:álcool metílico 75:25, v/v; água:álcool metílico 68:32 v/v; diclorometano:álcool metílico 50:50, v/v; diclorometano:álcool etílico 50:50, v/v; diclorometano: álcool etílico 80:20, v/v; água:álcool etílico:diclorometano 30:60:10, v/v/v; água:álcool etílico:diclorometano 60:35:5, v/v/v; água:álcool etílico:diclorometano 75:22:3, v/v/v; água:álcool metílico 70:30, v/v pH 6,5; água:álcool metílico 75:25, v/v pH 2,0 com ácido acético; água:álcool metílico 72:28, v/v pH 3,0 com ácido acético; água:álcool metílico 75:25, v/v pH 3,0 com ácido acético) foi eleito o mais adequado para a identificação do darunavir, para obtenção de manchas não disformes e com valor de Rf suficiente para permitir a visualização de outras manchas ao longo da distância percorrida pelo darunavir, podendo ser impurezas e/ou produtos de degradação na amostra. Dessa forma, a fase móvel contendo água purificada e álcool metílico (70:30, v/v), com pH ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial, foi eleita.

Foi utilizado o ácido acético na fase móvel para garantir que a maioria dos pKa do darunavir (1,66; 1,75; 7,75; 11,43 e 14,31) fosse atingido priorizando a sua forma não ionizada, resultando em uma resolução cromatográfica melhor.

A visualização das manchas foi facilmente realizada em câmara com luz UVA, não havendo dificuldades para o cálculo do valor do Rf.

O resultado obtido sugere que a MP e a amostra possuem a mesma identidade e em ambos não ocorre a presença de impurezas e/ou produtos de degradação, pois não há o aparecimento de outras manchas, exceto as do fármaco em questão.

O método de CCD desenvolvido sugere a identificação do darunavir etanolato na forma farmacêutica em estudo.

4.3.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

4.3.4.1. Material

Os materiais utilizados na espectrofotometria na região do UV foram a MP, os comprimidos e o placebo, descritos no item 4.3.1.

4.3.4.2. Método

As amostras foram pesadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo®).

Foram pesados 20,00 mg de MP e transferidos para balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 400 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 500 µL para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com álcool etílico obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL.

O peso médio de vinte comprimidos de darunavir etanolato foi de 647,81 mg. Posteriormente, os comprimidos foram triturados e pesados 43,19 mg de darunavir amostra. Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 400 µg/mL. Cerca de 25 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 500 µL para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com álcool etílico obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL.

O placebo foi analisado juntamente com a MP e a amostra para avaliar sua influência na análise espectrofotométrica na região do UV. Foram pesados 23,19 mg de placebo e transferidos para balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo a mesma concentração de placebo que estaria presente na solução de amostra. Cerca de 25 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 500 µL para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com álcool etílico, obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL.

Os espectros foram obtidos a partir da varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Shimadzu UV mini – 1240 e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

A identificação da MP e comprimidos foi realizada através da sobreposição dos espectros obtidos e comparação quanto ao seu perfil característico e comprimentos de onda de máxima absorção.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

5.3.4.3. Resultados

A Figura 27 apresenta a sobreposição dos espectros da MP, comprimidos e placebo, em álcool etílico, na concentração de 20 µg/mL. É possível observar que os adjuvantes dos comprimidos não possuem absorção no comprimento de onda utilizado na análise espectrofotométrica na região do UV.

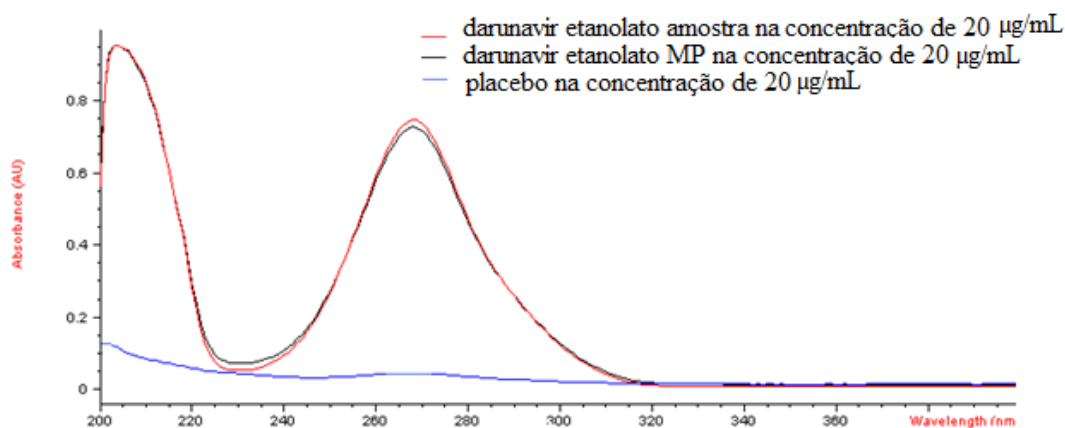


Figura 27. Sobreposição dos espectros da MP, comprimidos e placebo, em álcool etílico, na concentração de 20 µg/mL.

4.3.4.4. Discussão

A espectrofotometria na região do UV apresenta uma série de aplicações nas análises farmacêuticas. A identificação de um fármaco pode ser feita através da análise do seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200 a 400 nm). É um método útil na identificação e quantificação de fármacos, além de ser um ensaio rápido, simples e de fácil execução.

Os espectros de absorção obtidos nas análises de MP e comprimidos demonstraram perfis semelhantes, sugerindo a mesma identidade das amostras. Tanto a MP como a amostra apresentaram absorção em 205 e 268 nm quando utilizado álcool etílico como solvente.

O placebo dos comprimidos de darunavir etanolato não apresentou influência na análise espectrofotométrica do fármaco na região do UV.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

Assim, o método demonstrou ser útil na identificação de darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimidos.

4.3.5. Espectrometria de absorção na região do infravermelho

4.3.5.1. Material

Os materiais utilizados na espectrometria de absorção na região do IV foram a MP, os comprimidos e o placebo, descritos no item 4.3.1.

4.3.5.2. Método

Para o desenvolvimento do método de IV, as amostras e o KBr foram pesados em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]).

Foram tomados 1,0 mg de MP e diluído em 149 mg de KBr, 2,159 mg de amostra e diluído em 147,84 mg de KBr e 1,159 mg de placebo e diluído em 148,84 mg de KBr, previamente dessecado em estufa (Nova Ética[®]) até peso constante, para confeccionar pastilhas de 150 mg cada.

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro IRPrestige-21 (Shimadzu[®]) e as leituras foram realizadas em transmitância, a fim de avaliar a presença de bandas características e a intensidade dos picos.

4.3.5.3. Resultados

O darunavir possui nove grupamentos funcionais, os quais estão destacados na Figura 28.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

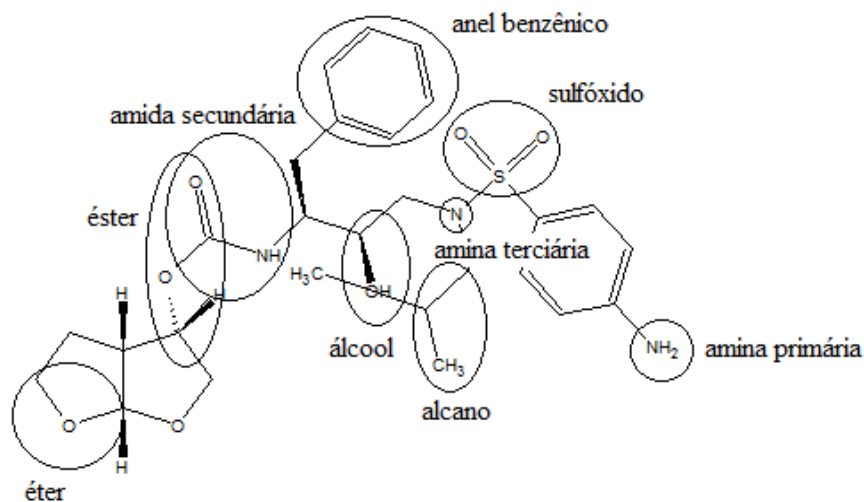


Figura 28. Grupos funcionais do darunavir.

A Figura 29 mostra o espectro de IV da MP e a indicação das bandas de absorção características.

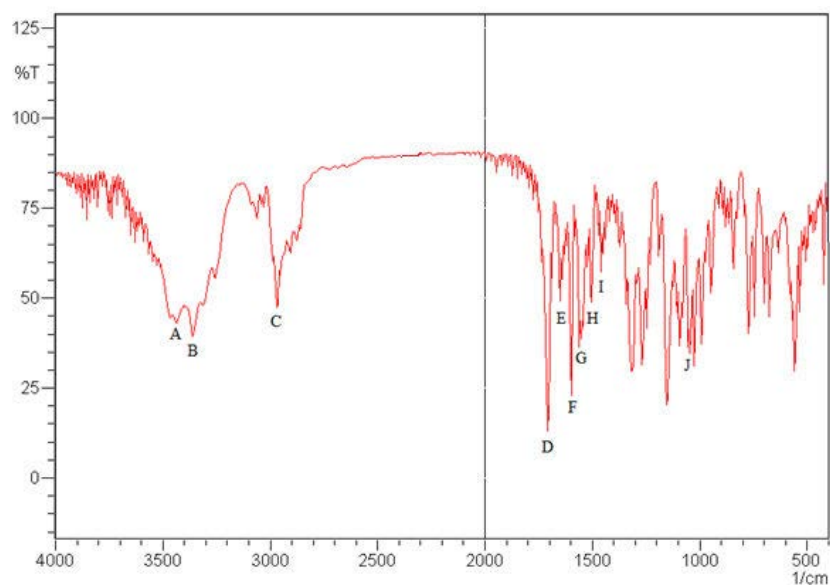


Figura 29. Espectro de IV da MP com as bandas de absorção características.

A Tabela 6 relaciona as deformações das bandas indicadas no espectro de absorção no IV para o darunavir.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

Tabela 6. Bandas do espectro de absorção na região do IV do darunavir com as respectivas deformações axiais

	Banda (cm⁻¹)	Deformação axial	Região (cm⁻¹)
A	3470	Amina primária	3400
B	3255 e 3368	Amina primária e álcool	3300 e 3400-3300, respectivamente
C	2969 e 3061	Alcano e anel benzênico	2900 e 3080-2900, respectivamente
D	1709	Éster	1720
E	1633	Amida secundária	1650
F	1597	Anel benzênico	1600
G	1536	Anel benzênico	1580
H	1501	Anel benzênico	1500
I	1459	Anel benzênico	1450
J	1093	Sulfóxido conjugado	1080-1020

A amina primária possui duas bandas características, uma em 3400 e outra em 3300 cm⁻¹. A função álcool possui uma banda larga entre 3400 e 3300 cm⁻¹.

Alcanos são visualizados através de banda em 2900 cm⁻¹, a qual se refere a carbono e hidrogênio. Anel benzênico possui banda em 3080 cm⁻¹ referente à ligação carbono-carbono (C-C), 2900 cm⁻¹ referente a carbono e hidrogênio (C-H) e quatro bandas referentes à ligação dupla carbono-carbono (C=C) 1600, 1580, 1500 e 1450 cm⁻¹.

A função éster possui banda característica em 1720 cm⁻¹ referente à carbonila (C=O). Amida secundária possui banda em 1650 cm⁻¹ referente à carbonila (C=O).

O sulfóxido possui banda característica entre 1060 e 1040 cm⁻¹, mas na presença de conjugação este valor é deslocado de 10 a 20 cm⁻¹ para frequência mais baixa.

A função éter não se determina e a função amina terciária é difícil de detectar, pois não apresenta bandas características (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

A Figura 30 mostra a sobreposição dos espectros de IV da MP, amostra e placebo.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

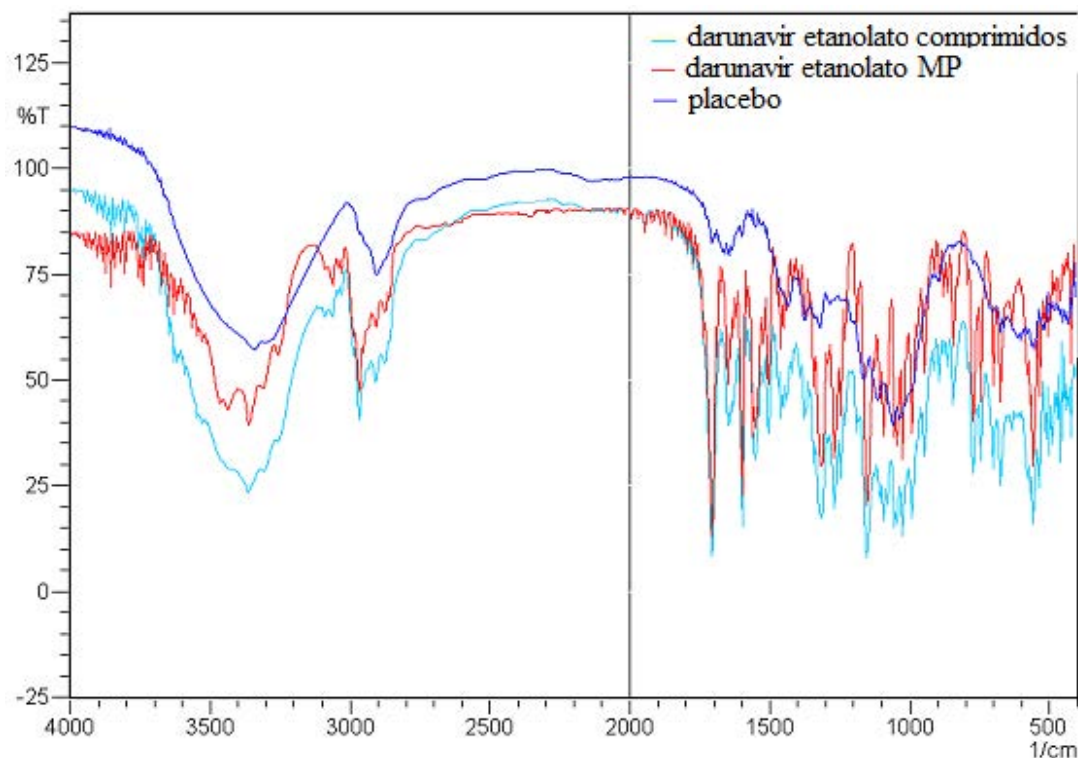


Figura 30. Sobreposição dos espectros de IV da MP, comprimidos e placebo.

É possível observar a semelhança dos espectros de IV da MP e da amostra (Figura 30), bem como a intensidade da banda da carbonila do éster em aproximadamente 1700 cm^{-1} .

4.3.5.4. Discussão

A chamada radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. A porção de maior utilidade para o farmacêutico no Controle de Qualidade em análises quali ou quantitativas está situada entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

Mesmo uma molécula muito simples pode dar um espectro muito complexo. É possível aproveitar esta complexidade para comparar o espectro de uma substância ao de um composto padrão. A correlação pico a pico é uma excelente evidência para a identidade das amostras. É muito pouco provável que duas substâncias que não sejam enantiômeras dêem o mesmo espectro de infravermelho (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

A espectrometria na região do IV é um método de identificação de excelência no controle de qualidade de fármacos e medicamentos.

Se descontarmos o espectro do placebo e notarmos as bandas características da MP é possível encontrá-las todas na amostra. Os espectros de IV devem ser analisados como um todo e, assim, é realizada a identificação da molécula de darunavir na amostra por comparação com o padrão.

4.3.6. Eletroforese capilar

4.3.6.1. Material

Os materiais utilizados na eletroforese capilar (EC) foram a MP, os comprimidos e o placebo, descritos no item 4.3.1.

4.3.6.2. Método

Para o desenvolvimento do método de EC, as amostras foram pesadas em balança analítica modelo CPA225D (Sartorius®).

Foram preparadas soluções de MP em álcool metílico na concentração de 400 µg/mL em balão volumétrico de 50 mL e colocadas em aparelho ultrassom por 30 minutos. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 500 µL para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com álcool metílico obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL.

A partir do valor do peso médio de 20 comprimidos de darunavir (647,81 mg), foi pesado o equivalente a 43,19 mg de amostra, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e colocados em aparelho ultrassom por 30 minutos com álcool metílico. Cerca de 25 mL desta solução estoque foram filtrados em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 500 µL para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com álcool metílico obtendo-se concentração final de 20 µg/mL.

O placebo foi analisado juntamente com a MP e a amostra para avaliar sua influência na análise do darunavir por EC. Foi preparada uma solução com a mistura de adjuvantes na concentração de 400 µg/mL em balão volumétrico de 50 mL e colocada em aparelho ultrassom por 30 minutos com álcool metílico. Cerca de 25 mL desta solução estoque foram filtrados em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

500 µL para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com álcool metílico obtendo-se a mesma concentração de placebo que estaria presente na solução de amostra.

Para a preparação do eletrólito de corrida foram utilizados água purificada, borato de sódio (J.T.Baker[®]) e ácido bórico (J.T.Baker[®]).

As soluções e o eletrólito de corrida foram sonicados em aparelho ultrassom SoniClean 2PS (Sanders Medical[®]) e filtrados em membranas com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore[®]).

Foram utilizados sistema de eletroforese capilar P/ACE[™] MDQ (Beckman Coulter[®]) com *Diode Array Detector* (DAD) e capilar de sílica fundida revestido com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm (Kern[®]).

Na análise do *System Suitability*, foram avaliados os parâmetros eletroforéticos de assimetria do pico e número de pratos para o desenvolvimento e posterior validação do método de EC para a quantificação do darunavir etanolato em comprimidos.

A adequabilidade do sistema eletroforético foi realizada através da injeção de seis replicatas de soluções de MP na concentração de 140 µg/mL. Os parâmetros eletroforéticos foram calculados segundo as Equações 2 e 3 (USP 35, 2012).

A assimetria do pico (A_s) é a medida da assimetria do pico cromatográfico, sendo avaliada a 10 % da altura do pico, como mostram a Equação 2 e a Figura 31.

$$A_s = CB/AC \quad (2)$$

A_s = assimetria do pico

CB = distância do ponto médio até o ponto posterior a 10 % da altura do pico

AC = distância do ponto frontal até o ponto médio a 10 % da altura do pico

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

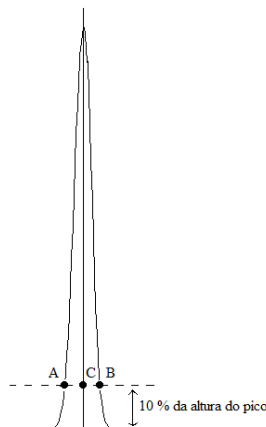


Figura 31. Ilustração para o cálculo da assimetria do pico.

O valor da A_s deve estar entre 0,9 e 1,2, sendo admitidos valores até 1,6 (SANDER & WISE, 1987).

A eficiência apresentada pelo capilar é medida em termos do número de pratos (N). Um prato é equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. É a medida da largura do pico em relação ao seu tempo de migração. É o parâmetro que mais precisamente define a qualidade de um sistema eletroforético. O cálculo fornece um número indicativo da *performance* do capilar e é calculado pela Equação 3.

$$N = 16 (tr/w)^2 \quad (3)$$

w = largura do pico medido na sua base

Através do cálculo é possível concluir que quanto mais estreito for o pico eletroforético, maior será a eficiência.

O número de pratos obtidos pode ser afetado pelo tamanho das partículas da fase estacionária, pelas condições de enchimento do capilar, pelas condições de análise, pelo tamanho da amostra, pelo tipo de soluto e pelo comprimento do capilar. A expressão para o cálculo do número de pratos só é válida para picos simétricos. Isso faz com que a medida de simetria seja um parâmetro eletroforético de relevância (SILVA JÚNIOR, 2007).

Foram obtidos eletroferogramas com estas soluções no comprimento de onda de 200 nm, utilizando capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 50 μm e comprimento

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

total de 21 cm e tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida em modo hidrodinâmico na voltagem de +20 kV.

A identificação da MP e amostra foi realizada através da sobreposição dos eletroferogramas obtidos e comparação quanto ao seu perfil característico e tempo de migração. Também foi avaliada a influência do placebo na análise do darunavir por EC.

4.3.6.3. Resultados

A adequabilidade do sistema eletroforético é importante por proporcionar a confiabilidade do método. Os resultados do *System Suitability* encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Análise de adequabilidade do sistema eletroforético desenvolvido para análise do darunavir em comprimidos

Parâmetros	Resultados
Assimetria do pico (< 2)	0,99
Número de pratos (> 2000)	3.3197,83
Amplitude (mAU)	6929,33 (DPR* 2,8 %)
Tempo de migração (minutos)	0,71 (DPR* 0,0 %)

*DPR = desvio padrão relativo

A identificação da amostra foi determinada pelo seu respectivo tempo de migração, comparado com o tempo de migração da MP (Figura 32).

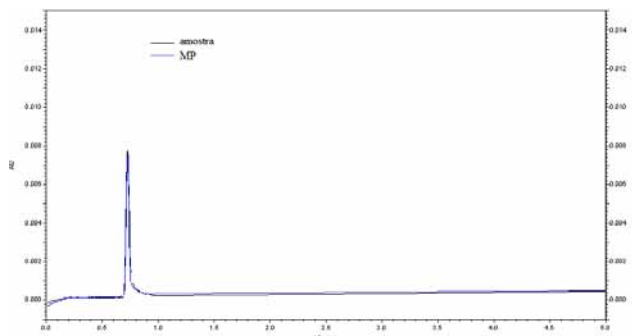


Figura 32. Sobreposição dos eletroferogramas da MP e amostra, ambos na concentração de 140 µg/mL, para identificação do darunavir pelo método de EC utilizando capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm. Tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida em modo hidrodinâmico na voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

Ambos os eletroferogramas, da solução de MP e amostra, apresentaram tempo de migração de aproximadamente 0,8 minutos.

A Figura 33 apresenta a sobreposição dos eletroferogramas de darunavir MP, comprimidos e placebo na concentração de 140 µg/mL, mostrando que os adjuvantes dos comprimidos não influenciam na análise do darunavir etanolato por EC no comprimento de onda de 200 nm utilizado no método.

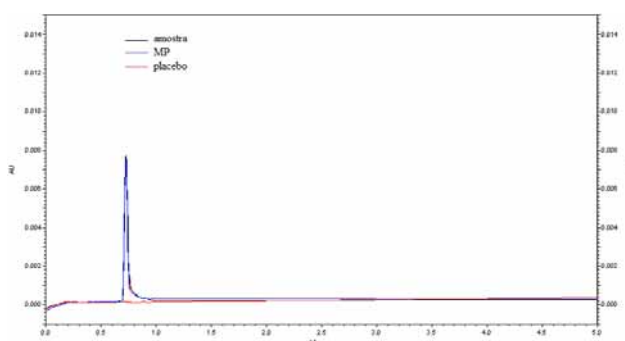


Figura 33. Sobreposição dos eletroferogramas da MP, amostra e placebo, todos na concentração de 140 µg/mL, para avaliação da influência dos excipientes na análise de darunavir por EC utilizando capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm. Tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida em modo hidrodinâmico na voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

4.3.6.4. Discussão

A EC é uma técnica de separação de alta eficiência baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis quando estes estão dissolvidos ou suspensos em um eletrólito, através do qual é aplicada um campo elétrico.

As características da EC incluem velocidade, alta eficiência, ampla aplicação, automação, tanto amostra como volume de reagentes em pequenas quantidades e menor custo dos capilares comparados as coluna da CLAE.

São vantagens da EC as separações de alta eficiência, as colunas capilares duradouras, a utilização de amostras e reagentes em pequena quantidade (nL), a quantificação da amostra em tempo curto, a capacidade de analisar diferentes tipos de amostras, os vários modos de separação, a possibilidade de utilizar ampla faixa de pH e ser um método econômico.

CAPÍTULO IV– DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA O DARUNAVIR EM COMPRIMIDOS

O número de pratos, a assimetria do pico, o tempo de migração e a amplitude foram considerados para a escolha dos parâmetros apropriados para a determinação do darunavir na forma farmacêutica comprimidos.

Os eletroferogramas obtidos nas análises da MP e comprimidos demonstraram perfis semelhantes. Tanto a MP como a amostra apresentaram tempo de migração em aproximadamente 0,8 minutos, sugerindo a mesma identidade das amostras quando utilizado capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm e tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida em modo hidrodinâmico na voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

Dessa forma, conclui-se que o método é adequado para a identificação de darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimido.

4.4. Conclusão

A pureza das substâncias utilizadas como referência é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos (ICH, 2005).

Os métodos qualitativos desenvolvidos são adequados para a identificação do darunavir etanolato na MP e na forma farmacêutica comprimidos, sendo rápidos e de fácil aplicação, o que aumenta a logística das análises dos laboratórios e indústrias farmacêuticas.

4.5. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Salgado, H.R.N. Desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos para a análise de darunavir comprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p.207-213, 2013.

5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

5.1. Introdução

A introdução de métodos analíticos exige a adoção de procedimentos de validação que conferem confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação. O desenvolvimento de métodos que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade destes produtos tanto no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional como em farmácias magistrais públicas e privadas.

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 (ERMER, 2001), porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional também devem ser consideradas.

Segundo a RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente e consistentemente leva aos resultados esperados. A validação é parte essencial das BPF, um elemento da garantia da qualidade associado a um produto ou processo em particular.

Validar um método significa inovar, agregar valor, mostrar que tal processo apresenta mais valia. Muitas vezes, a validação é requerida a fim de reduzir ou eliminar os inconvenientes dos métodos convencionais, aumentar a confiabilidade de um processo ou reduzir custos. Para isso, a formação de pessoal qualificado com foco em inovação e voltado para a necessidade da indústria é imprescindível. Profissionais que possuem este tipo de visão devem ser valorizados e incentivados, uma vez que se todos estiverem comprometidos com este objetivo, a logística de atividades fluirá melhor e mais rapidamente, beneficiando todos os setores industriais e os reflexos são percebidos pela população consumidora e pela sociedade.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Os componentes críticos da validação estão demonstrados na Figura 34. A validação de um método exige por parte do analista, treinamento, experiência e *know-how*; por parte da amostra, que seja homogênea; por parte da preparação da amostra, que seja eficiente e por parte de todo o equipamento/sistema, que esteja qualificado e adequado.

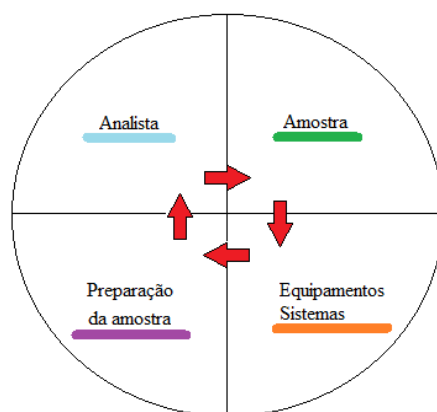


Figura 34. Componentes críticos da validação.

As Universidades têm executado um papel fundamental servindo como centros de pesquisa para o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, contribuindo às atividades de controle sanitário e ao enriquecimento científico na área (IFPMA, 1997).

5.1.1 Parâmetros da validação analítica

Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (ISO, 1999).

A validação de métodos analíticos é exigida como requisito fundamental no credenciamento para a qualidade assegurada e demonstração de competência técnica, segundo a ICH (1996), ISO (1999), INMETRO (2011) e ANVISA (2003). De acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, ela deve apresentar aspectos de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez adequadas à análise.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r), interseção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e DPR. O critério mínimo aceitável do r deve ser = 0,99.

Limite de detecção é o menor conteúdo que pode ser medido com razoável certeza estatística (AOAC, 2002). É a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas do teste (NATA, 2012).

O limite de quantificação é o conteúdo igual ou superior ao menor ponto de concentração na curva analítica (AOAC, 2002) ou a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão aceitável (repetibilidade) e exatidão sob as condições estabelecidas do teste (NATA, 2012).

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em uma análise quantitativa, a seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de adjuvantes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. A especificidade, por sua vez, é um caso específico da seletividade.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser classificada como repetibilidade ou precisão intradia e precisão intermediária ou interdia. A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o DPR de uma série de

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

medidas. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5 %.

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Pode ser determinada pelo método de adição de padrão, no qual se adicionam quantidades conhecidas do padrão de referência ao medicamento, e pelo método do placebo contaminado, no qual quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão de referência adicionado à amostra.

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso rotineiro. Na avaliação da robustez constata-se a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas e, assim, as precauções que devem ser incluídas no procedimento para controlar o processo.

5.2. Análise Quantitativa

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram validados para a determinação quantitativa de darunavir etanolato em comprimidos.

A análise quantitativa foi realizada através da validação dos métodos de espectrometria na região do infravermelho e eletroforese capilar.

5.3. Parte Experimental

5.3.1. Materiais

A SQR utilizada foi o darunavir, teor de 98,0 %, lote SRP07000d, da empresa britânica Sequoia Research Products.

A MP utilizada foi o darunavir etanolato, teor de 97,0 %, extraído da forma farmacêutica comprimidos.

A forma farmacêutica utilizada foram comprimidos de darunavir 300 mg, lote AEZOCOO, comercialmente conhecido como Prezista[®] da empresa Janssen-Cilag.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

O placebo foi composto de celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, crospovidona, estearato de magnésio, polivinil álcool, PEG 3350, dióxido de titânio e talco.

5.3.2. Espectrometria de absorção na região de infravermelho

5.3.2.1. Material

Os materiais utilizados na espectrometria na região do infravermelho (IV) foram a MP, os comprimidos e o placebo, descritos no item 5.3.1.

5.3.2.2. Método

Para a validação do método de IV, as amostras e o KBr foram pesados em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]). Para facilitar a pesagem e minimizar os erros na balança foi realizada uma diluição de 1:10 antes do início de todos os testes.

Foram pesados 70 mg de MP e diluídos em 630 mg de KBr previamente dessecado em estufa (Nova Ética[®]) por 24 horas. Após homogeneização, a mistura foi colocada em estufa por 30 minutos. Em seguida, foi pesada a quantidade necessária para cada teste e diluída em KBr, mais uma vez, para completar o valor de 150 mg, referente a uma unidade de pastilha.

Para o produto acabado, foram pesados 151,15 mg, ou seja, o equivalente a 70 mg de MP através do valor do peso médio de 647,81 mg, e diluídos em 478,85 mg de KBr previamente dessecado em estufa por 24 horas. Após homogeneização, a mistura foi colocada em estufa por 30 minutos. Em seguida, foi pesada a quantidade necessária para cada teste e diluída em KBr para completar o valor de 150 mg, referente a uma unidade de pastilha.

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro IRPrestige-21 (Shimadzu[®]) e as leituras das amostras foram realizadas através da absorvância da banda da carbonila em aproximadamente 1700 cm⁻¹.

Os parâmetros analíticos de linearidade, limites de detecção e de quantificação, especificidade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados para a validação do método, segundo a RE n° 899, a AOAC (2002), ICH (2005) e o INMETRO (2007).

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

5.3.2.3. Validação

5.3.2.3.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em três diferentes dias e em triplicata. As concentrações utilizadas foram 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mg de darunavir em KBr.

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da *Analysis of Variance* (ANOVA).

5.3.2.3.2. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) do darunavir etanolato foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), conforme a Equação 4:

$$LD = (3,3s)/l \quad (4)$$

O limite de quantificação (LQ) do darunavir etanolato foi obtido com base nos mesmos dados, ou seja, desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), segundo a Equação 5:

$$LQ = (10s)/l \quad (5)$$

5.3.2.3.3. Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência dos adjuvantes (MP) e na presença dos adjuvantes (amostra).

5.3.2.3.4. Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios de repetibilidade e precisão intermediária de darunavir na concentração de 2,5 mg.

A precisão intradia foi realizada em sextuplicata e calculado o DPR, segundo a Equação 6. Para avaliação da precisão intermediária, o teste foi realizado durante três dias seguidos por diferentes analistas e os resultados foram analisados através de seu DPR.

$$DPR(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

5.3.2.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo cálculo de recuperação.

Foram preparadas misturas estoque de MP e amostra na diluição de 1:10. Destas misturas foram retiradas 15 mg e acrescentadas a elas 135 mg de KBr para obtenção de MP e de produto acabado nas concentrações teóricas de 1,5 mg por pastilha. A partir da mistura estoque de darunavir etanolato comprimidos, foram retiradas porções de 15 mg adicionadas de 5 mg de porções estoque de MP, completados com KBr para obtenção de pastilhas de 150 mg com concentração teórica de 2,0 mg por pastilha. Alterando apenas a porção da mistura estoque de MP, procedeu-se da mesma forma para obtenção de mais duas misturas através de porções de 10 mg (concentração teórica de 2,5 mg por pastilha) e 15 mg (concentração teórica de 3,0 mg por pastilha). As preparações das amostras estão exemplificadas na Tabela 8.

Tabela 8. Preparo das misturas para o teste de exatidão do método de espectrometria de absorção na região do infravermelho

	Quantidade adicionada de darunavir amostra na diluição de 1:10 (mg)	Quantidade adicionada de darunavir MP na diluição de 1:10 (mg)	Concentração teórica final (mg) ^a
Amostra	1,5	-	1,5
R1	1,5	0,5	2,0
R2	1,5	1,0	2,5
R3	1,5	1,5	3,0
Padrão	-	1,5	1,5

^acada nível de concentração foi preparado em triplicata

A percentagem de darunavir etanolato recuperado foi calculada pela Equação 7 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left\{ \frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right\} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

Cr = concentração da pastilha de amostra adicionada de MP (mg)

Ca = concentração da pastilha de amostra (mg)

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

C_p = concentração teórica da pastilha de MP adicionada (mg)

5.3.2.3.6. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação da marca de KBr (Synth[®] e Shimadzu[®]), tempo de compressão (10 e 15 minutos) e pressão (90 e 100 kN). Os resultados obtidos pela variação destes parâmetros operacionais foram analisados por teste F (Snedecor) e teste t (Student).

5.3.2.3.7. Doseamento

A partir do valor do peso médio de 20 comprimidos de darunavir etanolato (647,81 mg) foram pesados 151,15 mg, o equivalente a 70 mg de darunavir etanolato MP. Esta quantidade foi diluída em 478,85 mg de KBr e mantida em estufa a 105°C por 30 minutos. Foram pesados 25 mg desta mistura e diluída em 125 mg de KBr para obtenção de concentração final de 2,5 mg de darunavir e, assim, produzidas pastilhas de 150 mg cada.

Foram pesados 70 mg de MP. Esta quantidade foi diluída em 630 mg de KBr e mantida em estufa a 105 °C por 30 minutos. Foi pesado 25 mg dessa mistura e diluída em 125 mg de KBr para obtenção de concentração final de 2,5 mg de darunavir etanolato por pastilha de 150 mg cada.

Foram preparadas seis pastilhas. O cálculo da concentração e do teor de darunavir nas pastilhas foi feito através das Equações 8 e 9, respectivamente.

$$Ca = Aa \times \frac{Cp}{Ap} \quad (8)$$

Em que:

Ca = concentração da pastilha de amostra (mg)

Aa = absorvância da pastilha de amostra

Cp = concentração teórica da pastilha de MP (mg)

Ap = absorvância da pastilha de MP

$$Ca\% = \frac{(Ca \times 100)}{Ct} \quad (9)$$

Em que:

$Ca\%$ = concentração percentual de darunavir etanolato nas pastilhas

Ca = concentração de darunavir etanolato encontrado nas pastilhas (mg)

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

C_t = concentração teórica de darunavir etanolato nas pastilhas (mg)

5.3.2.4. Resultados

Linearidade

A curva analítica de darunavir etanolato MP foi construída com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas com concentrações de 1,5 a 3,5 mg por pastilha obtidas durante os ensaios de linearidade.

A Tabela 9 mostra os valores obtidos na construção da curva analítica para o darunavir etanolato MP pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho e a Figura 35 mostra a curva analítica correspondente.

Tabela 9. Valores das absorvâncias de darunavir etanolato determinadas pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho para a construção da curva analítica

Concentração (mg)	Absorvâncias	Média das absorvâncias	DPR (%)
1,5	0,367	0,359	4,10
	0,342		
	0,367		
2,0	0,491	0,484	1,90
	0,487		
	0,473		
2,5	0,605	0,608	0,48
	0,610		
	0,610		
3,0	0,713	0,725	1,42
	0,713		
	0,731		
3,5	0,816	0,826	2,02
	0,846		
	0,818		

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 0,2354x + 0,0120$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9983 e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9991, para o darunavir etanolato MP.

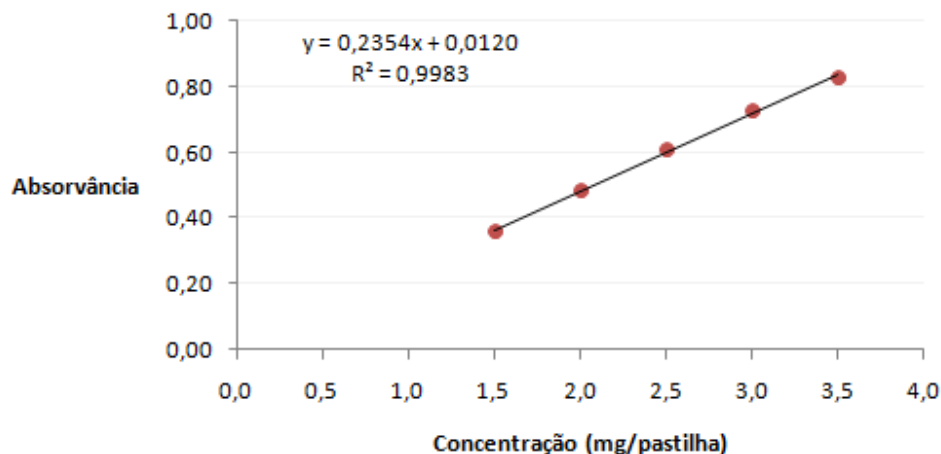


Figura 35. Curva analítica de misturas de darunavir etanolato MP e KBr, nas concentrações de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mg, obtida pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho através da banda da carbonila em $1757\text{-}1671\text{ cm}^{-1}$.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de darunavir etanolato MP é mostrada na Tabela 10.

Tabela 10. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de darunavir MP, utilizando o método de espectrometria de absorção na região do infravermelho

Fontes de Variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab (0,05)
Entre concentrações	4	0,50	0,12	23,49*	3,48
Regressão Linear	1	0,49	0,49	93,48*	4,96
Desvio de Linearidade	3	0,00	0,00	0,16	3,71
Dentro (Resíduo)	10	0,05	0,00	-	-
Total	14	0,55	-	-	-

*significativo para $p < 5\%$

Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 0,12 mg e 0,36 mg, respectivamente.

Especificidade e Seletividade

A Figura 36 apresenta a comparação dos espectros de absorção das pastilhas de darunavir etanolato MP, amostra e excipiente, em KBr através da banda da carbonila em $1757\text{-}1671\text{ cm}^{-1}$.

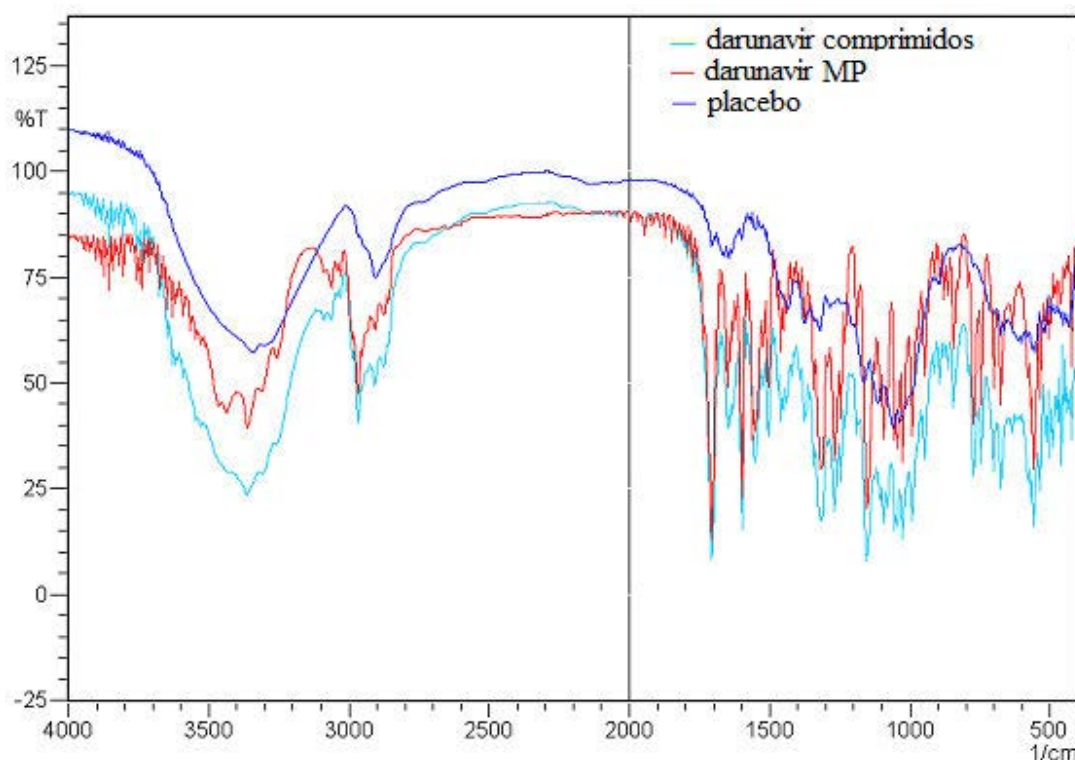


Figura 36. Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrometria de absorção na região do infravermelho para as pastilhas de darunavir etanolato MP, comprimidos e adjuvantes preparadas em KBr na concentração de 2,5 mg.

Precisão

A precisão intradia e a precisão interdia foram realizadas através da repetibilidade e da precisão intermediária, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 11.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Tabela 11. Valores determinados para o parâmetro precisão do darunavir etanolato MP pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho

Banda	Teste	Absorvâncias						DPR (%)
		1	2	3	4	5	6	
Carbonila (C=O) 1757-1671 cm ⁻¹	Repetibilidade	0,576	0,580	0,570	0,609	0,611	0,584	2,975 (n=6)
	Precisão intermediária	0,591	0,587	0,613	0,661	0,648	0,610	3,613 (n=12)
		0,604	0,605	0,610	0,637	0,605	0,621	

Exatidão

Na Tabela 12 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho.

Tabela 12. Valores do teste de recuperação do método de espectrometria de absorção na região do infravermelho

	darunavir MP adicionado (mg)	darunavir MP recuperado (mg)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	0,50	0,50	100,33		
R2	1,00	1,00	100,03	99,81	1,89
R3	1,50	1,49	99,07		

Robustez

As médias das variações na marca de KBr, tempo de compressão e pressão para avaliar o parâmetro robustez foram analisadas estatisticamente e os resultados encontram-se na Tabela 13.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Tabela 13. Valores calculados através dos testes F e *t* para variações na marca de KBr, tempo de compressão e pressão pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho para determinação de darunavir em comprimidos

Test	Marca do KBr		Tempo de compressão (min)		Pressão (kN)	
	Synth	Shimadzu	15	10	95	85
F_{cal}		1,00		1,56		1,96
F_{tab}		161,45		161,45		161,45
t_{cal}		0,87		0,78		-0,58
t_{tab}		4,30		4,30		4,30

Doseamento

O doseamento foi realizado através da comparação das absorvâncias obtidas na análise das pastilhas de darunavir etanolato MP e darunavir etanolato amostra, ambas na concentração de 2,5 mg por pastilha. Os resultados encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Valores determinados para o doseamento de darunavir etanolato em comprimidos pelo método de espectrometria de absorção na região do infravermelho

Dia	Conteúdo de darunavir etanolato ^a		Média	DPR (%)
	mg	%		
1	2,48	99,26		
2	2,47	98,98	98,88	0,44
3	2,46	98,40		

^acada valor corresponde a média de seis determinações

5.3.2.5. Discussão

A radiação no infravermelho em frequência menor que aproximadamente 100 cm⁻¹ converte-se em energia de rotação molecular, quando absorvida por uma molécula orgânica. O processo de absorção é quantizado e o espectro de rotação das moléculas consiste em uma série de linhas.

A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10.000 a 100 cm⁻¹ converte-se em energia de vibração molecular, quando absorvida. O processo também é quantizado, mas o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas em vez de linhas, porque cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. As linhas se sobrepõem dando lugar às bandas observadas. São

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

estas as bandas de vibração-rotação que utilizamos, particularmente as que ocorrem entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

As intensidades das bandas podem ser expressas como transmitância ou absorvância. A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorvância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância.

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite a obtenção de informações estruturais úteis (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A espectroscopia no infravermelho oferece a possibilidade de obtenção de espectros com relativa rapidez, além de fornecer informações interessantes, tanto do ponto de vista analítico, qualitativo ou quantitativo. Esta técnica tem sido utilizada cada vez mais para fins quantitativos, aumentando o seu uso que, antigamente, era restrito somente à análise qualitativa. Um fator importante é o custo relativamente acessível de um espectrômetro de infravermelho, além de ser uma técnica não destrutiva com geração mínima de resíduos (ZENI, 2005).

Todas estas vantagens agregam forte comprometimento na sustentação desta alternativa qualitativa e quantitativa, no monitoramento do processo produtivo de empresas do ramo farmacêutico que fabriquem ou manipulem fármacos em grande escala, sendo esta metodologia fácil de ser implantada em ambiente industrial visando sistemas de qualidade (SOUZA & FERRÃO, 2006).

A espectrometria de absorção na região de infravermelho é uma técnica de fácil execução e custo reduzido. Pode ser utilizada para a análise quantitativa de fármacos presentes em formulações farmacêuticas, desde que não ocorra interferência dos adjuvantes (WATSON, 2005).

No desenvolvimento do método espectrométrico de absorção na região do infravermelho para o darunavir etanolato foram testadas concentrações que variaram de 1,0

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

a 3,5 mg. Foram escolhidas as concentrações de 1,5 a 3,5 mg, uma vez que esta faixa apresentou linearidade de resposta.

Para avaliar a linearidade do método construiu-se o gráfico de concentração *versus* absorvância, o qual demonstrou proporcionalidade entre estes dois fatores. A equação da reta foi $y = 0,2354x + 0,012$ e o coeficiente de correlação 0,9991. A linearidade foi evidenciada pela ANOVA, a qual demonstrou haver regressão linear entre as concentrações e desvio de linearidade não significativo.

A especificidade do método foi confirmada pela comparação dos espectros de darunavir etanolato MP e comprimidos. Houve ausência da interferência dos adjuvantes na banda da carbonila (C=O, 1757-1671 cm^{-1}) utilizada para a quantificação do fármaco. O resultado da sobreposição dos espectros mostrou que os adjuvantes não interferem nas leituras das análises.

Os valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do darunavir etanolato são uma estimativa (LD = 0,12 mg e LQ = 0,36 mg) e indicam a sensibilidade do método para a determinação do fármaco.

A precisão pôde ser confirmada pelo valor obtido para o teste de precisão intradia de 0,588 e não há diferença estatisticamente significativa, para um nível de significância de 5 %, entre as médias dos valores obtidos no teste de precisão intermediária (0,616), validando assim a precisão do método espectrométrico de absorção na região do infravermelho para análise do darunavir etanolato.

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2007).

Assim, a exatidão está sempre associada a valores de precisão, entre estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços, a exemplo dos estudos de Horwitz (RIBANI *et al.*, 2004).

Horwitz e colaboradores (1980) estabeleceram uma relação matemática para expressar a dependência entre valores do DPR e a concentração do analito, pelo exame de resultados cumulativos de estudos colaborativos envolvendo uma grande faixa de

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

compostos. Os valores obtidos por esta relação matemática foram dispostos em um gráfico e deram origem à chamada Trombeta de Horwitz, como ilustrada na Figura 37 (HORWITZ *et al.*, 1980).

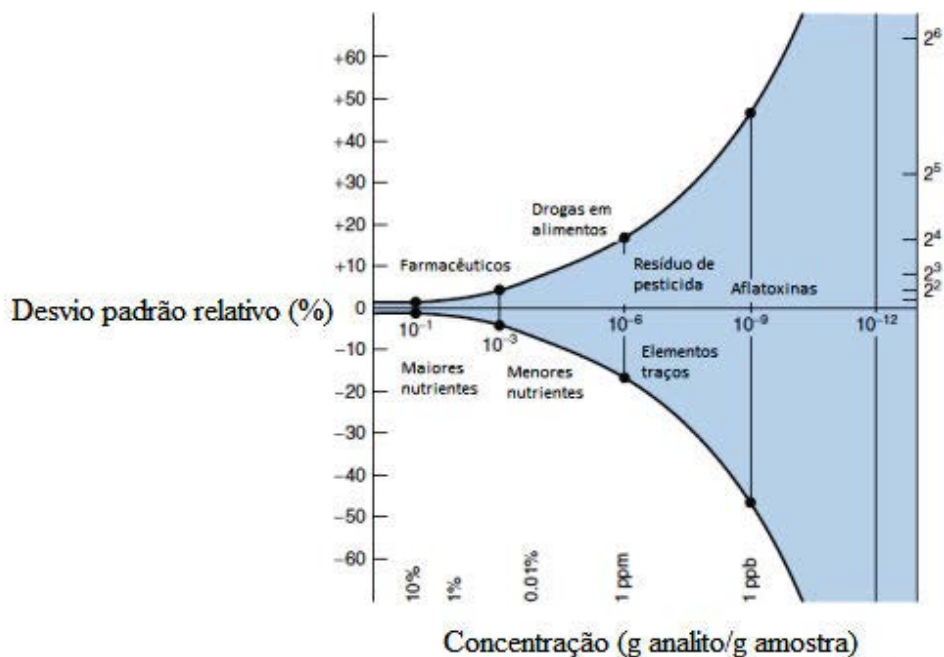


Figura 37. Trombeta de Horwitz (Fonte: HARRIS, 2007).

Existem valores críticos aceitáveis de acordo com a concentração do analito em estudo. Esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Tais valores, sugeridos pelo manual da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Recuperação do analito em função da concentração

Concentração de analito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
≥ 10	98 - 102
≥ 1	97 - 103
$\geq 0,1$	95 - 105
$\geq 0,01$	90 - 107
$\geq 0,001$ - $\geq 0,00001$	80 - 110
$\geq 0,000001$	60 - 115
$\geq 0,0000001$	40 - 120

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

A concentração do darunavir etanolato no ensaio de exatidão esteve entre 0,3 e 1,0 % e, neste caso, o intervalo aceitável de recuperação é de 97 a 103 %. Dessa forma, o método pode ser considerado exato por apresentar uma média de 99,81 %.

A robustez do método foi confirmada pela variação da marca de KBr Synth[®] para Shimadzu[®], tempo de compressão de 15 para 10 minutos e pressão de 95 para 85 kN na confecção das pastilhas. Os resultados mostram que não há diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o método pode ser considerado robusto quando variados estes parâmetros operacionais.

No doseamento, o teor de darunavir etanolato presente nas amostras de comprimidos analisadas foi de 98,88 %.

5.3.2.6. Conclusão

Os parâmetros estudados para a validação do método espectrométrico de absorção na região do infravermelho mostraram ser adequados para a quantificação de darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimido.

5.3.2.7. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Salgado, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v. 3, n. 1, p.1-6, 2013.

5.3.3. Eletroforese capilar

5.3.3.1. Materiais

Os materiais utilizados na eletroforese capilar (EC) foram a MP, os comprimidos e o placebo, descritos no item 5.3.1.

5.3.3.2. Método

Para a validação do método de EC, as amostras foram pesadas em balança analítica modelo CPA225D (Sartorius[®]).

Foram pesados 5,00 mg de MP e transferidos para balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com 5 mL de álcool etílico e o restante com água purificada, obtendo concentração de 200 µg/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas e diluídas em água purificada.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Para o produto acabado, foi pesado 10,80 mg de amostra (o equivalente a 5,00 mg de MP, segundo o resultado do peso médio). Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com 5 mL de álcool etílico e o restante com água purificada, obtendo concentração de 200 µg/mL. Cerca de 20 mL desta solução estoque foram filtrados em papel de filtro e a partir desta solução, alíquotas foram retiradas e diluídas em água purificada.

Foi utilizado capilar de sílica fundida não revestido com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm. Antes de cada leitura o capilar era ativado com a passagem de 30 segundos com solução de NaOH 0,01 M e em seguida 30 segundos com água purificada. O método foi validado no P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter®) com DAD.

As soluções foram sonicadas em aparelho ultrassom SoniClean 2PS (Sanders medical®) e filtradas em membranas com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore®).

Os parâmetros analíticos de linearidade, limites de detecção e de quantificação, especificidade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados para a validação do método, segundo a RE nº 899, a AOAC (2002), ICH (2005) e o INMETRO (2007).

5.3.3.3. Validação

5.3.3.3.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em três diferentes dias e em triplicata. As concentrações utilizadas foram 50, 80, 110, 140, 170 e 200 µg/mL.

A equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As áreas utilizadas na determinação da curva analítica foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

5.3.3.3.2. Limites de detecção e de quantificação

O LD do darunavir etanolato foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média, conforme a Equação 4.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

O LQ do darunavir etanolato também foi obtido com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação média, de acordo com a Equação 5.

5.3.3.3.3. Especificidade

A especificidade do método proposto foi comprovada através da degradação forçada da forma farmacêutica comprimidos.

Foram preparadas soluções de darunavir etanolato amostra em HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, H₂O₂ 3 % e água purificada na concentração de 140 µg/mL e submetidas a banho na temperatura de 80 °C. Também foram preparadas soluções de darunavir etanolato amostra em água purificada na concentração de 140 µg/mL e submetidas à luz UVB na temperatura de 25 °C. Alíquotas destas soluções foram retiradas no tempo de 8 horas e analisadas imediatamente pelo método de EC.

5.3.3.3.4. Precisão

Foram realizadas seis soluções estoque de darunavir etanolato MP, das quais foram retiradas seis alíquotas de cada uma para obtenção de soluções com concentração teórica de 140 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para avaliação da precisão intradia e calculado o DPR. Durante três dias seguidos, para avaliação da precisão inter-analista, o teste foi realizado por analistas diferentes e os resultados foram analisados estatisticamente.

Foram pesados 5,00 mg de darunavir etanolato MP e transferidos para balão volumétrico de 25 mL adicionando 5 mL de álcool etílico e completando-se o volume com água purificada, obtendo-se concentração de 200 µg/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 700 µL e transferidas para balão volumétrico de 1 mL completando-se o volume com água purificada para a preparação das soluções com concentração de 140 µg/mL.

5.3.3.3.5. Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de adição.

Foram preparadas soluções estoque de darunavir etanolato MP e amostra na concentração de 400 µg/mL. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada uma e transferidas para balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se dois balões com 1 mL cada, um de MP e o outro de produto acabado. Foram completados com água purificada e obtidas

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

soluções com concentrações teóricas de 80 µg/mL. A partir da solução estoque de darunavir etanolato amostra, foram retiradas alíquotas de 1 mL e transferidas para balão volumétrico de 5 mL adicionadas de 0,4 mL de solução estoque de darunavir etanolato MP, completados com água purificada para obtenção de solução com concentração teórica de 112 µg/mL. Alterando apenas o volume da solução estoque de MP, procedeu-se da mesma forma para obtenção de mais duas soluções através de alíquotas de 0,75 mL (concentração teórica de 140 µg/mL) e 1,1 mL (concentração teórica de 168 µg/mL).

As preparações das amostras estão exemplificadas na Tabela 16.

Tabela 16. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de eletroforese capilar

	Volume adicionado de darunavir etanolato amostra na concentração 400 µg/mL (mL)	Volume adicionado de darunavir etanolato MP na concentração 400 µg/mL (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^{a,b}
Amostra	1,0	-	80
R1	1,0	0,40	112
R2	1,0	0,75	140
R3	1,0	1,10	168
Padrão	-	1,0	80

^a diluída em balão volumétrico de 5 mL

^b cada nível de concentração foi preparado em triplicata

5.3.3.3.6. Robustez

Os parâmetros modificados para a avaliação da robustez foram: comprimento de onda: A (200 nm) e a (202 nm), temperatura: B (20 °C) e b (19 °C), voltagem: C (20 kV) e c (22 kV), tempo de passagem de NaOH 0,01 M: D (30 segundos) e d (25 segundos), tempo de passagem de água purificada: E (30 segundos) e e (25 segundos), tempo de passagem de tampão: F (1 minuto) e f (50 segundos), concentração do tampão: G (25 mM) e g (24 mM), conforme descrito na Tabela 17.

A análise foi realizada em triplicata e as concentrações de darunavir etanolato presente na amostra foram determinadas a partir da curva analítica.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Tabela 17. Combinações analisadas para a avaliação da robustez do método de eletroforese capilar para quantificação de darunavir

	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	200 nm	200 nm	200 nm	200 nm	202 nm	202 nm	202 nm	202 nm
B/b	20 °C	20 °C	19 °C	19 °C	20 °C	20 °C	19 °C	19 °C
C/c	20 kV	22 kV	20 kV	22 kV	20 kV	22 kV	20 kV	22 kV
D/d	30 s	30 s	25 s	25 s	25 s	25 s	30 s	30 s
E/e	30 s	25 s	30 s	25 s	25 s	30 s	25 s	30 s
F/f	60 s	50 s	50 s	60 s	60 s	50 s	50 s	60 s
G/g	25 mM	24 mM	24 mM	25 mM	24 mM	25 mM	25 mM	24 mM
	s	t	u	v	w	x	y	z

Os parâmetros A, a, B, b, C, c, D, d, E, e, F, f, G, g foram calculados a partir das Equações 10 a 23.

$$A = \left(\frac{s+t+u+v}{4} \right) \quad (10) \quad a = \left(\frac{w+x+y+z}{4} \right) \quad (11)$$

$$B = \left(\frac{t+u+x+y}{4} \right) \quad (12) \quad b = \left(\frac{u+v+y+z}{4} \right) \quad (13)$$

$$C = \left(\frac{s+u+w+y}{4} \right) \quad (14) \quad c = \left(\frac{t+v+x+z}{4} \right) \quad (15)$$

$$D = \left(\frac{s+t+y+z}{4} \right) \quad (16) \quad d = \left(\frac{u+v+w+x}{4} \right) \quad (17)$$

$$E = \left(\frac{s+u+x+z}{4} \right) \quad (18) \quad e = \left(\frac{t+v+w+y}{4} \right) \quad (19)$$

$$F = \left(\frac{s+v+w+z}{4} \right) \quad (20) \quad f = \left(\frac{t+u+x+y}{4} \right) \quad (21)$$

$$G = \left(\frac{s+v+x+y}{4} \right) \quad (22) \quad g = \left(\frac{t+u+w+z}{4} \right) \quad (23)$$

5.3.3.3.7. Doseamento

A partir de um *pool* de darunavir etanolato amostra foram pesados 21,59 mg e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, adicionados de 5 mL de álcool etílico e o volume completado com água purificada, obtendo concentração teórica de 400 µg/mL.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Partindo desta solução, volumes de 3,5 mL foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração final de 140 µg/mL. As leituras das soluções foram realizadas em EC com DAD no comprimento de onda de 200 nm.

Foram preparadas seis soluções. O cálculo da concentração e do teor de darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimidos foi realizado através das Equações 8 e 9, respectivamente.

$$Ca = Aa \times \frac{Cp}{Ap} \quad (8)$$

Em que:

Ca = concentração da solução de amostra (µg/mL)

Aa = amplitude da solução de amostra

Cp = concentração teórica da solução de MP (µg/mL)

Ap = amplitude da solução de MP

$$Ca\% = \frac{(Ca \times 100)}{Ct} \quad (9)$$

Em que:

$Ca\%$ = concentração percentual de darunavir etanolato na solução amostra

Ca = concentração de darunavir etanolato encontrado na solução amostra (µg/mL)

Ct = concentração teórica de darunavir etanolato na solução de MP (µg/mL)

5.3.3.4. Resultados

Linearidade

A curva analítica de darunavir etanolato MP foi construída com as médias dos valores das amplitudes de três curvas analíticas com concentrações de 50 a 200 mg obtidas durante os ensaios de linearidade.

A Tabela 18 mostra os valores obtidos na construção da curva analítica para o darunavir etanolato MP pelo método de EC e a Figura 38 mostra a curva analítica correspondente.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Tabela 18. Valores das amplitudes de darunavir etanolato determinadas pelo método de EC para a construção da curva analítica

Concentração (µg/mL)	Amplitude (mAU)	Média da amplitude	DPR (%)
50	403	408	4,9
	391		
	430		
80	800	801	4,9
	762		
	841		
110	1183	1173	4,3
	1118		
	1219		
140	1480	1529	3,9
	1512		
	1594		
170	1971	1937	2,7
	1877		
	1963		
200	2402	2338	4,6
	2214		
	2399		

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, foi $y = 12,7779x + 232,7376$, com R^2 igual a 0,9996 e r igual a 0,9998, para o darunavir MP.

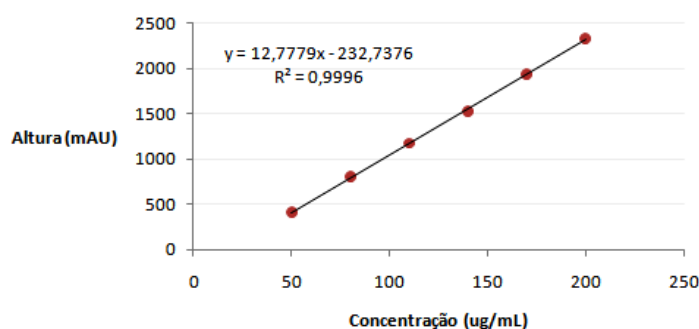


Figura 38. Curva analítica de soluções de darunavir MP, nas concentrações de 50; 80; 110; 140; 170 e 200 µg/mL, obtida pelo método de eletroforese capilar.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

A validade da regressão linear da curva analítica média obtida foi calculada através da ANOVA dos valores das amplitudes determinadas na obtenção da curva analítica de darunavir etanolato por EC relacionadas na Tabela 19.

Tabela 19. Análise de variância das amplitudes obtidas na curva analítica de darunavir por EC

Fontes de Variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab (0,05)
Entre concentrações	5	7718139,03	1543627,81	34,52*	3,11
Regressão Linear	1	7711357,30	7711357,30	172,46*	4,75
Desvio de Linearidade	4	6781,73	1695,43	0,04	3,26
Dentro (Resíduo)	12	44713,03	3726,08	-	-
Total	17	7762852,06	-	-	-

*significativo para $p < 5\%$

Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 7,29 µg/mL e 22,09 µg/mL, respectivamente.

Especificidade

As Figuras de 39 a 44 mostram, respectivamente, os eletroferogramas obtidos nas degradações em meios ácido, básico, oxidativo e térmico em banho a 80 °C por 8 horas e degradação fotolítica pela exposição à luz UVB a 25 °C, também por 8 horas, da solução de darunavir etanolato amostra na concentração de 140 µg/mL.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

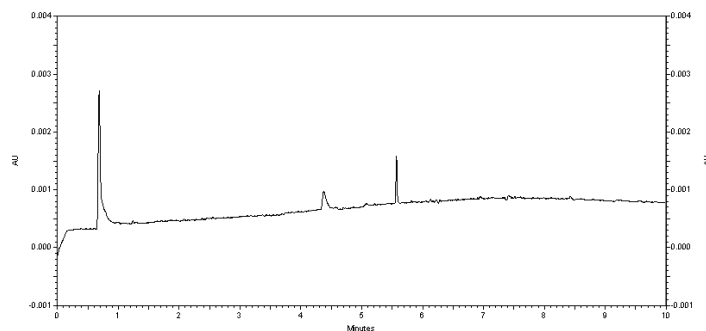


Figura 39. Eletroferograma da degradação em meio ácido do darunavir amostra na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,01 M após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

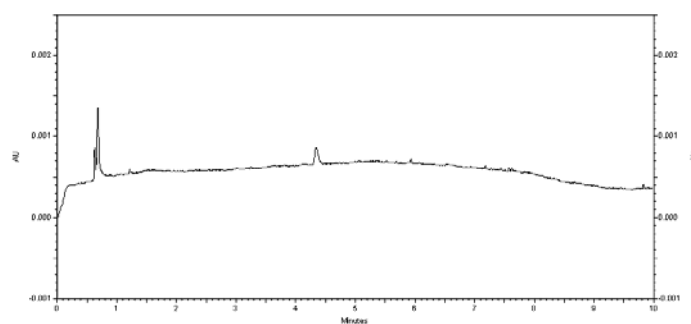


Figura 40. Eletroferograma da degradação em meio básico do darunavir amostra na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,01 M após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

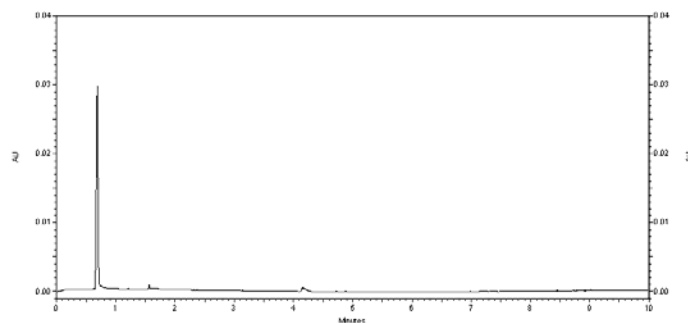


Figura 41. Eletroferograma da degradação em meio oxidativo do darunavir amostra na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O_2 3 % após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

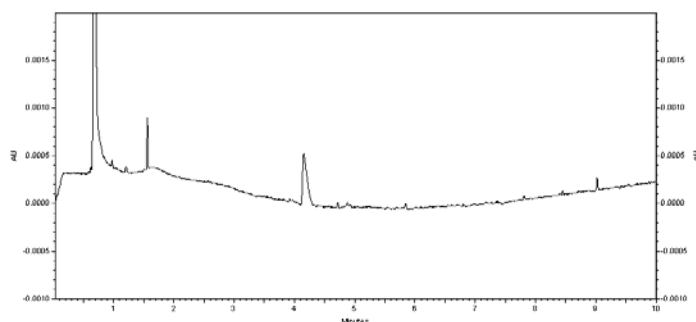


Figura 42. Detalhe do eletroferograma da degradação em meio oxidativo do darunavir amostra na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O_2 3 % após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

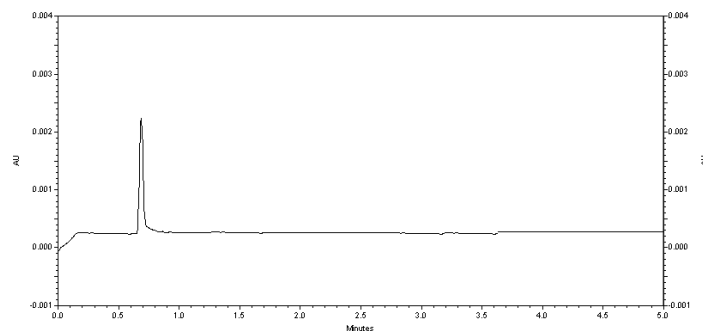


Figura 43. Eletroferograma da degradação em meio térmico do darunavir amostra na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada após 8 horas em banho a 80 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

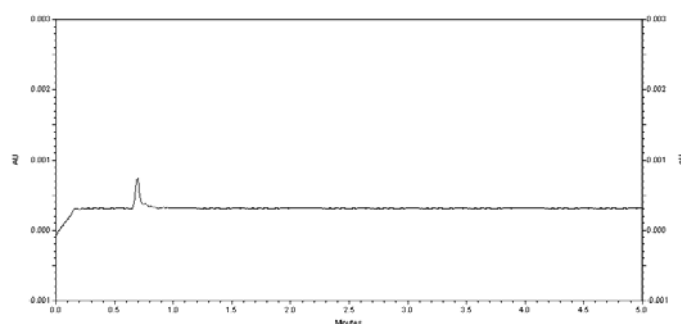


Figura 44. Eletroferograma da degradação fotolítica do darunavir amostra na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada após 8 horas em luz UV a 25 °C utilizando capilar com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV e leitura em 200 nm.

Precisão

As precisões intradia e interdia foram realizadas através da repetibilidade e da precisão intermediária, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 20.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Tabela 20. Valores determinados para o parâmetro precisão do darunavir MP pelo método de eletroforese capilar

Comprimento de onda	Nível	Amplitude do pico						DPR (%)
		1	2	3	4	5	6	
200 nm	Repetibilidade	1426	1463	1412	1460	1407	1395	2,00 (n=6)
	Precisão	1602	1458	1574	1476	1423	1429	3,78
	Intermediária	1557	1522	1505	1456	1497	1479	(n=12)

Exatidão

A Tabela 21 mostra os valores obtidos no teste de recuperação para o darunavir etanolato utilizando EC.

Tabela 21. Valores obtidos no teste de recuperação do darunavir utilizando o método de eletroforese capilar

	darunavir MP adicionado (µg/mL)	darunavir MP recuperado (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	32	32,53	101,66		
R2	60	60,19	100,31	100,84	3,07
R3	88	88,47	100,53		

Robustez

Na análise da robustez do método por EC os parâmetros avaliados foram comprimento de onda, temperatura, voltagem, tempo de passagem de NaOH 0,01 M, tempo de passagem de água purificada, tempo de passagem de solução tamponante e concentração da solução tamponante.

Os resultados obtidos estão representados nas Tabelas 22 e 23 e as condições alteradas cumpriram com os critérios de aceitação.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Tabela 22. Concentração de darunavir determinado a partir das oito condições de “s” a “z” para a avaliação da robustez do método de eletroforese capilar

	Condições								Média	DP
	s	t	u	v	w	x	y	z		
Amplitude (mAU)	1834,0	1828,8	1625,2	1685,5	1946,2	1643,0	1748,8	1715,0		
Concentração (µg/mL)	161,74	161,34	145,41	150,12	170,53	146,80	155,07	152,43	155,43	8,58

Tabela 23. Parâmetros de Youden e Steiner para a análise de robustez do método de eletroforese capilar desenvolvido para análise do darunavir na forma farmacêutica comprimidos

Concentração de darunavir ^a (µg/mL)	Diferença	Especificação	Robustez
A 154,65	a 156,21	-1,55	robusto
B 152,15	b 150,76	1,40	robusto
C 158,19	c 152,67	5,52	robusto
D 157,64	d 153,21	4,43	< 17,16 ^b robusto
E 151,59	e 159,26	-7,67	robusto
F 158,71	f 152,15	6,55	robusto
G 153,43	g 157,42	-3,99	robusto

^ade acordo com as Equações de 10 a 23. ^b2 desvios padrão, mencionado na Tabela 22

Doseamento

O doseamento foi realizado através da comparação das amplitudes dos picos obtidas na análise das soluções de darunavir etanolato MP e amostra, ambas na concentração de 140 µg/mL. Os resultados encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Valores determinados para o doseamento de darunavir etanolato em comprimidos (Prezista[®] 300 mg) pelo método de eletroforese capilar

Dia	Conteúdo de darunavir ^a		Média	DPR (%)
	µg/mL	%		
1	138,84	99,17	100,44	1,10
2	141,67	101,19		
3	141,36	100,97		

^acada valor corresponde a média de seis determinações

5.3.3.5. Discussão

De acordo com o professor Calvin Giddings, eletroforese capilar é o melhor exemplo de otimizar os mecanismos de transporte para produzir separações altamente eficientes.

Os capilares podem ser de pyrex, teflon ou sílica. O escolhido para a realização das análises foi o capilar de sílica, pois ele apresenta dimensões precisas, resistência mecânica, maleabilidade e resistência ao ataque químico. O capilar de sílica apresenta pKa de 5,9 e uma mobilidade de fluxo eletrosmótico de aproximadamente 8, em uma escala de 0 a 10, quando utilizado soluções com pH entre 9 e 12.

Em sistemas hidrodinâmicos, como na CLAE, a velocidade ao longo do eixo radial é maior que próximo às paredes, assim o gradiente de velocidade vai de zero à máxima velocidade no centro do tubo. Em sistemas eletrodinâmicos, como a EC, não existe diferença de pressão e não há formação de gradiente de velocidade através do tubo capilar (Figura 45).

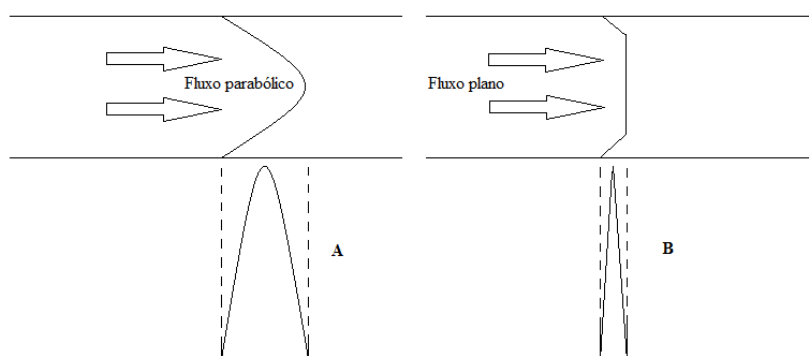


Figura 45. Perfil do fluxo laminar de sistemas hidrodinâmicos (A) e do fluxo eletrosmótico de sistemas eletrodinâmicos (B).

Vários conceitos simples são importantes para a compreensão dos processos físicos que ocorrem após a passagem de uma corrente elétrica através de uma solução iônica. Estes processos são muito mais complexos do que a passagem de corrente através de um metal. Nos metais, os elétrons carregam toda a corrente de forma uniforme e leve. Na solução de fluido, a corrente é transportada por cátions e ânions. Condução em solução de fluido ainda é descrita pela lei de Ohm, $E = IR$, em que E é a tensão de campo ou aplicada, I é a

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

corrente que passa através do solução e R é a resistência do meio fluido (WEINBERGER, 2000).

O recíproco da resistência é a condutividade. Kohlrausch descobriu que a condutividade da solução resulta da migração independente dos íons. Quando uma corrente passa através de uma solução iônica, ânions migram para o ânodo (eletrodo positivo), enquanto cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) em quantidades iguais (WEINBERGER, 2000).

Na EC o pH da solução tamponante, a concentração do eletrólito, a temperatura, o campo elétrico e a presença de solventes orgânicos afetam a mobilidade do fluxo eletroosmótico (FEO).

Quando amostras de baixa condutividade são injetadas, um processo conhecido como *staking* ou empilhamento ocorre. Isto aumenta a sensibilidade do método de EC.

A velocidade do FEO eletroosmótico é altamente dependente do pH da solução tamponante, quanto mais básico, mais rápido é este fluxo.

Em pH elevado, os grupos silanóis estão completamente ionizados, gerando um forte potencial zeta e uma densa dupla camada elétrica. Como resultado, o FEO aumenta à medida que o pH da solução tamponante é elevado.

Quando existe um controle de temperatura, quanto maior a concentração da solução tamponante, menor será o fluxo eletroosmótico. No entanto, quando não existe este controle, ocorre o inverso, a maior concentração da solução tamponante gera um maior fluxo eletroosmótico, pois aumentam a largura e a temperatura do capilar e conseqüentemente diminui a viscosidade da solução, o que aumenta o fluxo eletroosmótico, como pode ser observado através da Equação 24.

$$\mu_{eo} = \xi \times \varepsilon / 4 \times \pi \times \eta \quad (24)$$

Em que:

μ_{eo} = fluxo eletroosmótico

ξ = potencial zeta da interface líquido-sólido

ε = constante dielétrica

η = viscosidade

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Por isso, utiliza-se a concentração da solução tamponante, geralmente entre 10 e 100 mM, 100 vezes maior que a concentração da amostra.

O efeito da tensão aplicada no perfil da velocidade, segue a Equação 25.

$$V_{eo} = \mu_{eo} \times E \quad (25)$$

Em que:

V_{eo} = velocidade do fluxo eletrosmótico

μ_{eo} = fluxo eletrosmótico

E = campo elétrico

Todavia, altas correntes elevam a produção de calor, o que aumenta o gradiente de temperatura dentro do capilar, além de diminuir a viscosidade da solução tamponante, aumentando o fluxo eletrosmótico, gerando tempos de migração não reprodutíveis. Também podem contribuir para a decomposição da amostra. Dessa forma, recomenda-se a utilização de 30 kV.

Solventes orgânicos podem modificar o FEO por causa de seu impacto sobre a viscosidade da solução tamponante e o potencial zeta. Álcoois lineares, tais como álcool metílico, álcool etílico ou álcool isopropílico, geralmente diminuem o FEO, porque eles aumentam a viscosidade do eletrólito. No entanto, é difícil prever o efeito da presença dos solventes orgânicos, uma vez que se deve considerar, por exemplo, sua constante dielétrica, viscosidade e concentração.

Enquanto que na CLAE são utilizados volumes típicos de 10 a 20 μ L, na EC os volumes são de 10 a 100 nL. Por outro lado, as limitações da EC são a baixa sensibilidade, devido ao pequeno caminho óptico, e o limite de detecção no UV, que é cerca de 10 a 100 vezes menor que na CLAE.

No desenvolvimento do método de EC para o darunavir etanolato foram testadas concentrações que variaram de 40 a 650 μ g/mL. Foram escolhidas as concentrações de 50 a 200 μ g/mL.

Os resultados obtidos na validação do método demonstraram que as soluções de darunavir etanolato apresentaram correlação linear entre as amplitudes dos picos e as concentrações, no intervalo utilizado.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Os gráficos de concentração *versus* amplitude foram plotados e demonstraram linearidade na faixa de 50 a 200 µg/mL. A equação da reta para o darunavir etanolato foi $y = 12,7779x - 232,7376$, com r de 0,9998. Os dados de linearidade foram validados pela ANOVA que comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos.

A precisão pode ser confirmada através do DPR menor que 5 % (BRASIL, 2003) na repetibilidade (2,00 %) e na precisão intermediária (3,78 %), validando assim a precisão do método de EC para análise do darunavir etanolato.

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do darunavir etanolato (LD = 7,29 µg/mL e LQ = 22,09 µg/mL) indicam a sensibilidade do método para determinação do fármaco.

Amostras de comprimidos de darunavir etanolato foram submetidas à degradação em meio ácido, alcalino, oxidativo, neutro e fotolítico e mostraram a suscetibilidade do fármaco.

A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros) (BRITO *et al.*, 2003).

A concentração do darunavir etanolato no ensaio de exatidão esteve entre 8 e 22 % e de acordo com os valores críticos aceitáveis sugeridos pelo manual da AOAC, o intervalo aceitável de recuperação é de 98 a 102 % (Tabela 15) e, dessa forma, o método pode ser considerado exato por apresentar uma média de 100,84 %.

A robustez indica a capacidade do método analítico em fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas alterações. O conjunto de parâmetros testados não apresentou mudanças significativas nos teores de darunavir etanolato. Dessa forma, o método pode ser considerado robusto.

O teor médio determinado de darunavir presente em comprimidos de 300 mg (Prezista[®]) analisado foi de 100,44 %.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

5.3.3.6. Conclusão

Os parâmetros estudados para a validação do método em EC atenderam às especificações para a adequada quantificação de darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimidos.

5.3.3.7. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Aguiar, F.A.; Gaitani, C.M.; Salgado, H.R.N. Validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of darunavir in tablets and comparison with the of infrared absorption spectroscopic method. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p.283-297, 2014.

5.4. Análise comparativa

A comparação de metodologias é necessária para determinar se a variabilidade dos métodos difere de forma significativa. A USP 35 (2012) recomenda avaliar os parâmetros de precisão e exatidão para provar a equivalência das metodologias.

A Tabela 25 apresenta os diferentes parâmetros determinados para métodos quantitativos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar validados.

Tabela 25. Aplicabilidade, precisão e exatidão dos métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar validados

Parâmetro	Métodos	
	IV	EC
Faixa de leitura	1757 – 1671 cm ⁻¹	200 nm
Faixa de concentração	1,5 – 3,5 mg	50 – 200 µg/mL
n	5	6
Equação: y=ax+b		
a	0,2354	12,7779
b	0,0120	-232,7376
r	0,9991	0,9998
Precisão intradia (DPR %)	2,98	2,00
Precisão interdia (DPR %)	3,61	3,78
Exatidão (%)	99,81	100,84

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS
PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Os métodos podem ser considerados satisfatórios, pois na comparação os valores de DPR para a precisão são menores que 5 % e a exatidão é próxima a 100 % (HORWITZ *et al.*, 1980; BRASIL, 2003).

Outra forma de se comprovar ou não a equivalência dos métodos é comparar os dados de doseamento, expostos na Tabela 26, através do Teste-F de Fisher e do Teste-*t* de *Student* para dados paramétricos.

Tabela 26. Valores obtidos na determinação do teor de darunavir etanolato em comprimidos utilizando os métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar

Parâmetro	Métodos	
	IV	EC
Teor (%)	99,26	99,17
	98,98	101,19
	98,40	100,97
Teor médio (%)	98,88	100,44
DPR (%)	0,44	1,10

Os resultados do tratamento estatístico estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Valores do Teste-F e do Teste-*t* para o doseamento de darunavir em comprimidos pelos métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e eletroforese capilar

Teste	P value	calculado	tabelado
F	0,14	6,38	19,00*
<i>t</i>	0,08	2,27	2,78*

*significativo para $p < 5\%$

Na comparação entre médias para variáveis quantitativas contendo duas amostras, o teste de variâncias de Fisher para amostras independentes mostrou variâncias iguais para os dados de doseamento do darunavir etanolato em comprimidos através das técnicas de IV e EC, em que $F_{cal} < F_{tab}$. Assim, o Teste-*t* utilizado foi o homocedástico.

Os resultados obtidos através do Teste-*t* de *Student* demonstraram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para o nível de significância de 5 %.

CAPÍTULO V – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA O DARUNAVIR ETANOLATO EM COMPRIMIDOS

Sendo assim, os métodos validados são equivalentes e, portanto, intercambiáveis para a determinação quantitativa de darunavir etanolato em comprimidos.

Apesar dos métodos demonstrarem intercambialidade, cada um possui características próprias. É válido evidenciar que a principal diferença entre estes métodos está nas vantagens e limitações de um em relação ao outro. O preço também deve ser considerado, um equipamento de *Fourier Transform Infrared Spectrophotometer* custa aproximadamente R\$ 110.000,00 e um EC automático com detector DAD custa aproximadamente R\$ 120.000,00. O custo dos reagentes também deve ser considerado, em uma análise de espectrometria na região do infravermelho apenas se utiliza brometo de potássio, enquanto que na EC é ampla a escolha dos reagentes a ser utilizado, variando entre solventes às soluções tamponantes.

O método de espectrometria de absorção na região do infravermelho apresenta menor tempo de análise e não utiliza solventes orgânicos, mas apresenta baixa especificidade em relação a possíveis produtos de degradação. O método de eletroforese capilar tem por característica a baixa sensibilidade e exige pessoal qualificado, entretanto com esta técnica é possível trabalhar com amostras na ordem de nL.

5.4.1. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Salgado, H.R.N. Comparative study over methods developed for quantification of darunavir in tablets by environmental friendly infrared and capillary electrophoretic techniques. **Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p.99-105, 2015.

Estudos com o complexo darunavir: β -ciclodextrina

6. COMPLEXO DE INCLUSÃO

6.1. Introdução

O darunavir (Figura 46) tem baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral, portanto requer administração em doses relativamente elevadas (comprimidos de 75, 300, 400 e 600 mg, sendo que é possível a administração de 1000 mg por dia em 1 ou 2 doses) para o sucesso do efeito terapêutico.

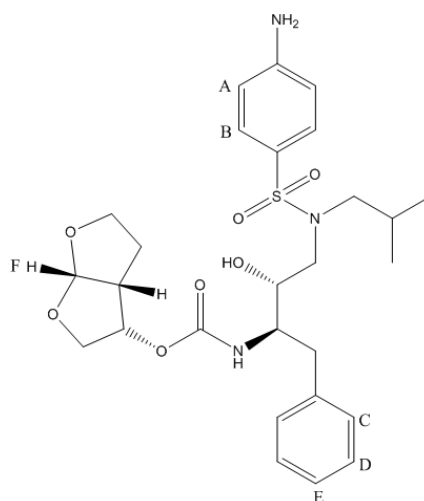


Figura 46. Estrutura química do darunavir, enfatizando os prótons, A, B, C, D, E e F, para análise de deslocamentos químicos referentes aos ^1H do darunavir.

Neste contexto, observa-se a necessidade para o desenvolvimento de encapsulamento de fármacos antirretrovirais e estratégias de entrega, a fim de reduzir a dose e a frequência de dosagem e, assim, melhorar o cumprimento da farmacoterapia existente (SOSNIK *et al.*, 2009).

Há um grande interesse no desenvolvimento de métodos eficientes, confiáveis, de baixo custo e escalonáveis para aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água (SINHA *et al.*, 2010). Estes métodos estão se tornando complementares ao desenvolvimento de novos medicamentos (SOSNIK *et al.*, 2009).

O conceito que prioriza o planejamento da qualidade do produto farmacêutico desde a sua concepção denomina-se *Quality by Design* (QbD). Ele aborda o desenvolvimento e a

produção de medicamentos baseada na ciência e no risco. O termo *Quality by Design* foi criado na década de 1960 por Joseph M. Juran, que acreditava que a maioria dos problemas referentes à qualidade de um produto está relacionada ao modo com que ele foi desenvolvido. Para Juran, o produto deve ser concebido e construído levando-se em consideração a qualidade, segurança e efetividade.

O QbD visa desenvolver produtos que levarão a uma economia a longo prazo, pois o objetivo do QbD é explorar amplas informações para saber como se comporta tal produto e assim não ter surpresas desagradáveis.

Aos poucos, este conceito começa a ser adotado pelos guias internacionais para a indústria farmacêutica, inclusive no Brasil. O QbD foi proposto primeiramente pela agência reguladora dos Estados Unidos (*FDA*, a partir de 2002) e seguida pela agência reguladora da comunidade europeia (*EMA*) e pela agência reguladora do Japão (*PMDA*). O processo vem sendo conduzido pelo ICH, entidade em que participam grupos destas três agências reguladoras. O ICH já desenvolveu três guias que orientam para os conceitos de QbD, ICH Q8 Desenvolvimento Farmacêutico (2009), ICH Q9 Gerenciamento do risco da qualidade (2006) e ICH Q10 Sistema Farmacêutico da Qualidade (2007).

Estes guias começaram a ser utilizados pelas agências reguladoras dos Estados Unidos e União Europeia a partir de 2012. No Brasil, por enquanto, alguns conceitos começaram a ser incentivados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (REVISTA DO FARMACÊUTICO, 2013).

A abordagem geralmente aplicada para aumentar a solubilidade de fármacos é a formação de complexos com macromoléculas, dos quais o encapsulamento molecular com β -ciclodextrina (β -CD, Figura 47) constitui uma alternativa para o desenvolvimento de novas formas de dosagem farmacêuticas (BREWSTER & LOFTSSON, 2007; LOFTSSON & BREWSTER, 2010; LOFTSSON & BREWSTER, 2012).

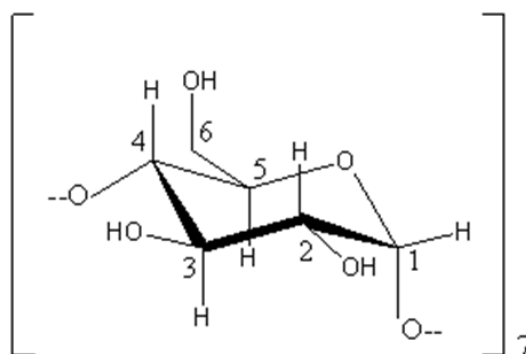


Figura 47. Estrutura química da β -ciclodextrina.

Com base nesses fatos, o objetivo do presente capítulo foi investigar a possibilidade de obtenção de um complexo de inclusão (CI) entre o darunavir etanolato e a β -CD.

Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Químicas da Universidad Nacional de Córdoba, na cidade de Córdoba, Argentina, sob a supervisão da Profa. Dra. Marcela Longhi, como parte do doutorado sanduíche.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Material

A MP utilizada foi o darunavir etanolato, teor de 97,0 %, e a ciclodextrina utilizada foi a forma β da empresa Roquette (França).

6.2.2. Método

Para o desenvolvimento e estudo da complexação do darunavir à β -CD foram necessárias às seguintes etapas:

6.2.2.1. Construção da curva analítica

Foi realizada a construção de uma curva analítica para a solução de darunavir etanolato em água purificada com o objetivo de obter o coeficiente de absorvidade (ξ). Foi utilizada água purificada como solvente e foram construídas três curvas analíticas em triplicata para obtenção do valor do coeficiente de absorvidade da solução.

6.2.2.2. Diagrama de Solubilidade de Fases (DSF)

Foi pesado uma quantidade de 0,075 g de β -CD (massa molecular de 1135 g/mol) e transferido para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração de $6,608 \times 10^{-5}$ mol/mL.

Desta solução, foram retiradas alíquotas de 0,050; 0,075; 0,100; 0,150; 0,175 e 0,200 mL e transferidas para *ependorf* com 1 mg de darunavir etanolato MP adicionadas de 0,150; 0,125; 0,100; 0,050 e 0,025 mL de água purificada, obtendo concentrações respectivas de β -CD no valor de 3,304; 5,956; 6,608; 9,912; 11,564 e 13,216 mmol/mL em cada *ependorf*.

O DSF consistiu na adição de diferentes concentrações de soluções de β -CD na mesma quantidade de darunavir etanolato. Estas soluções foram acondicionadas e colocadas em banho aquecido a 25 °C por 4 dias. Após este período, as soluções foram centrifugadas e foi feita uma diluição para posterior leitura em espectrofotômetro na região do ultravioleta. Com os valores das concentrações de darunavir e β -CD foi possível calcular a estequiometria da reação fármaco-complexante, além de calcular a constante de estabilidade (K_c) através da Equação 26:

$$K_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{\text{ordenada da origem} \times (1 - \text{coeficiente angular})} \quad (26)$$

6.2.2.3. Complexação e Liofilização

A complexação foi realizada através da união de fármaco no complexante na proporção 1:1, conforme o resultado da estequiometria obtida no teste de DSF, e então o béquer contendo a solução darunavir: β -ciclodextrina foi colocada no ultrassom por 30 minutos. A solução foi congelada e transferida para o liofilizador K 105 da marca Liotop[®], a uma temperatura de - 35 °C, até obtenção do suposto complexo de inclusão na forma de pó.

6.2.2.4. Estudos com o complexo de inclusão

Com o complexo de inclusão em pó foram realizados testes de IV, TG e DSC para a confirmação da complexação e RMN e difração de raios-X para estudar a forma como o fármaco está complexado à β -CD.

Para a análise de IV foi utilizado brometo de potássio (KBr) para confecção das pastilhas e o equipamento Nicolet5 SXC FT-IR Spectrometer (Nicolet[®]). Todos os espectros de TG foram obtidos e processados usando EZ OMNIC E.S.P v.5.1 *software*. Para o estudo térmico de TG/DTG as curvas foram obtidas no equipamento TGA 2950 (T. A. Instruments[®]).

Nas técnicas de IV e TG foram analisados o darunavir, a β -CD, a mistura física (MF) do darunavir etanolato com a β -CD e o CI para comparação de seus perfis.

A MF do darunavir com a β -CD foi realizada em cadinho de ágata com pistilo também de ágata através de mistura mecânica, de forma leve para não proporcionar conversão da forma do darunavir etanolato utilizado pela força aplicada na ação.

As análises de IV foram realizadas com pastilhas de 2,5 mg de amostra e 147,5 mg de KBr. Na análise de TG foi utilizado cadinho de platina, razão de aquecimento de ~ 10 °C e atmosfera dinâmica de N_2 .

Os estudos de RMN e ROESY foram desenvolvidos no Avance II High Resolution Spectrometer (Bruker®). Os espectros foram medidos a 298 K. Mudanças nos deslocamentos químicos de 1H para o darunavir e para a β -CD ($\Delta\delta$), que originaram-se devido à sua complexação, foram calculados utilizando a Equação 27:

$$\Delta\delta = \delta_{complexo} - \delta_{livre} \quad (27)$$

A geometria do complexo de inclusão foi estudada através de experimentos *two-dimensional rotating frame Overhauser* (2D ROESY).

Estudos teóricos foram desenvolvidos aplicando modelagem molecular e técnica de *docking* usando Gaussian03 e Autodock3. Simulações da dinâmica molecular e análises energéticas foram aplicadas usando o *software* Amber9.

O complexo darunavir: β -CD foi submetido à difração de raios-X em equipamento Anodo rotatório Rigaku RINT2000, com monocromador curvo de grafite no feixe difratado, fenda de divergência e espalhamento de $0,25$ °, fenda de recepção de $0,3$ mm e fenda Soller de $2,5$ ° de divergência na radiação $CuK\alpha$ ($\lambda=1,5406$ Å), operando com 40 KV e 70 mA de tensão e corrente do tubo, respectivamente e espelho focalizador (Gobel Mirror), para o conhecimento da forma apresentada. As amostras foram acondicionadas em um porta amostra de 2 cm de diâmetro e 1 mm de profundidade.

6.3. Resultados

6.3.1. Construção da curva analítica

A Tabela 28 apresenta os valores das absorvâncias das soluções de darunavir etanolato em água purificada.

Tabela 28. Valores das absorvâncias de darunavir etanolato determinadas pelo método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta em 268 nm para a construção da curva analítica em água purificada

Concentração (µg/mL)	Concentração (mmol/mL)	Absorvâncias	Média das absorvâncias	DPR (%)
10	0,168	0,290	0,293	1,29
		0,291		
		0,297		
16	0,269	0,431	0,437	1,21
		0,441		
		0,439		
20	0,337	0,550	0,553	0,55
		0,552		
		0,556		
24	0,404	0,668	0,667	1,06
		0,673		
		0,659		
28	0,472	0,771	0,765	0,86
		0,766		
		0,758		
32	0,539	0,865	0,863	0,23
		0,861		
		0,863		
36	0,606	0,963	0,962	0,52
		0,967		
		0,957		
40	0,674	1,056	1,056	0,00
		1,056		
		1,056		

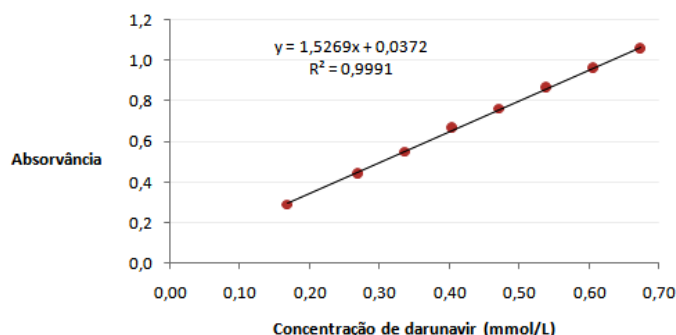


Figura 48. Curva analítica de darunavir etanolato em água purificada, nas concentrações de 10, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 $\mu\text{g/mL}$, obtida pelo método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta a 268 nm.

Dessa forma, com os valores de absorvância média e concentração molar é possível calcular o ξ com a Equação 28.

$$\xi = [\text{absorvância média}/(\text{concentração molar} \times 1)] \quad (28)$$

Portanto, o ξ para a água purificada é 16283,93, a média dos ξ das concentrações de 10, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.2. Diagrama de Solubilidade de Fases (DSF)

A Tabela 29 apresenta os valores de absorvâncias das soluções de darunavir etanolato com diferentes quantidades de β -CD e a Figura 49 mostra a influência dos acréscimos de β -CD na concentração de darunavir etanolato.

Tabela 29. DSF com diferentes soluções de darunavir e β -CD em água purificada

Absorvância	Concentração de darunavir (mmol/mL)	Concentração de β -CD (mmol/mL)	Volume de β -CD (mL)
0,226	0,277	0	0
0,511	0,628	3,304	0,050
0,655	0,804	5,956	0,075
0,806	0,989	6,608	0,100
1,156	1,419	9,912	0,150
1,350	1,658	11,564	0,175
1,505	1,848	13,216	0,200

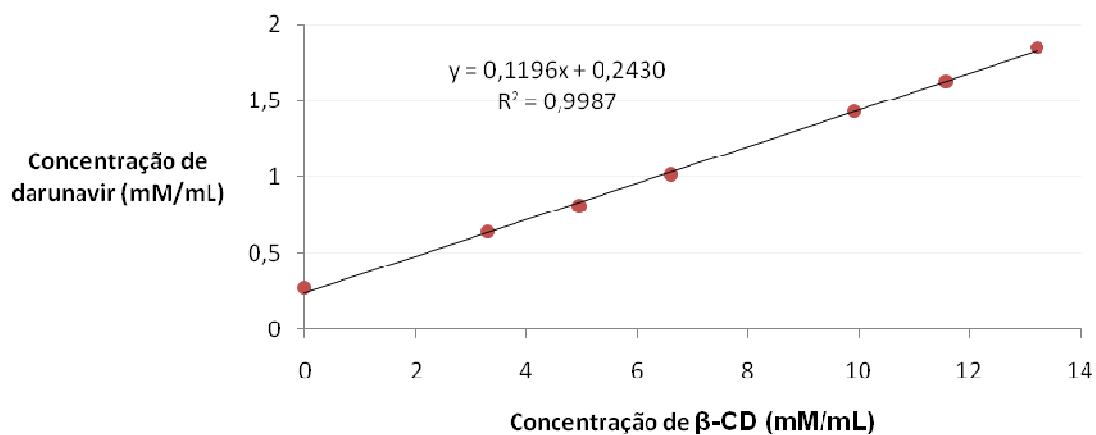


Figura 49. DSF do darunavir e diferentes concentrações de solução de β-CD em água purificada.

Como a linha de tendência foi linear com coeficiente de determinação de 0,9987 é possível concluir que a estequiometria de complexação do darunavir com a β-CD é de 1:1.

Além disso, com a equação $y = 0,1196x + 0,2430$ da Figura 24, também é possível calcular a K_c , segundo a Equação 26. A K_c encontrada foi de 526,48.

6.3.3. Complexação e liofilização

Após os resultados do DSF, a complexação foi então realizada na proporção 1:1 e a solução foi congelada e liofilizada (Figura 50) para os testes de confirmação do complexo de inclusão formado.



Figura 50. Ilustração das etapas da formação do complexo darunavir:β-CD em pó. (A) solução aquosa de darunavir e β-CD na proporção 1:1, (B) congelamento em nitrogênio líquido, (C) acoplamento do frasco no liofilizador e (D) possível complexo de inclusão darunavir:β-CD.

6.3.4. Estudos com o complexo de inclusão

O complexo de inclusão foi caracterizado por IV e TG, os quais confirmaram a formação do complexo.

Os espectros e os comportamentos térmicos da β-CD, darunavir etanolato, mistura física (mistura mecânica de β-CD e darunavir) e complexo de inclusão estão representados nas Figuras 51, 52 e 53, respectivamente.

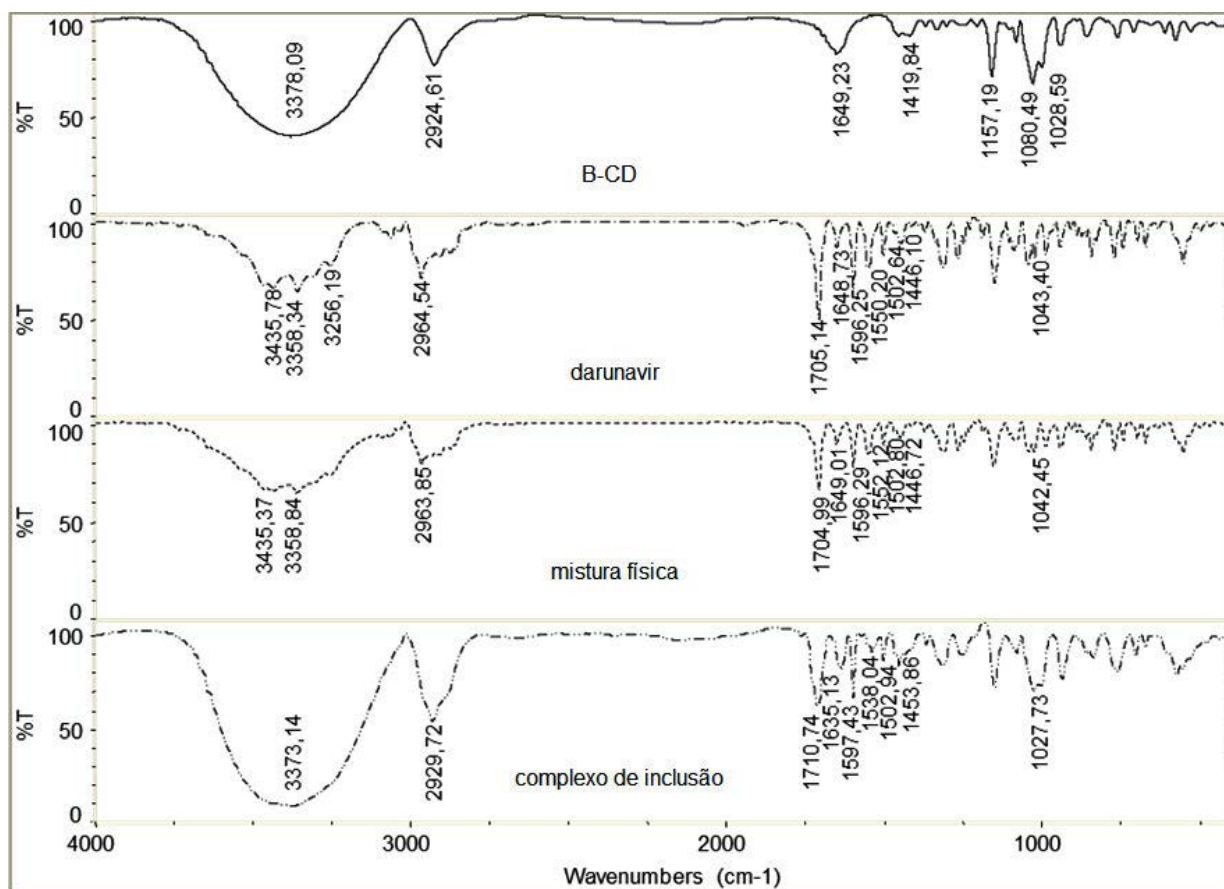


Figura 51. Espectros de infravermelho da β -CD, darunavir etanolato, mistura física e complexo de inclusão.

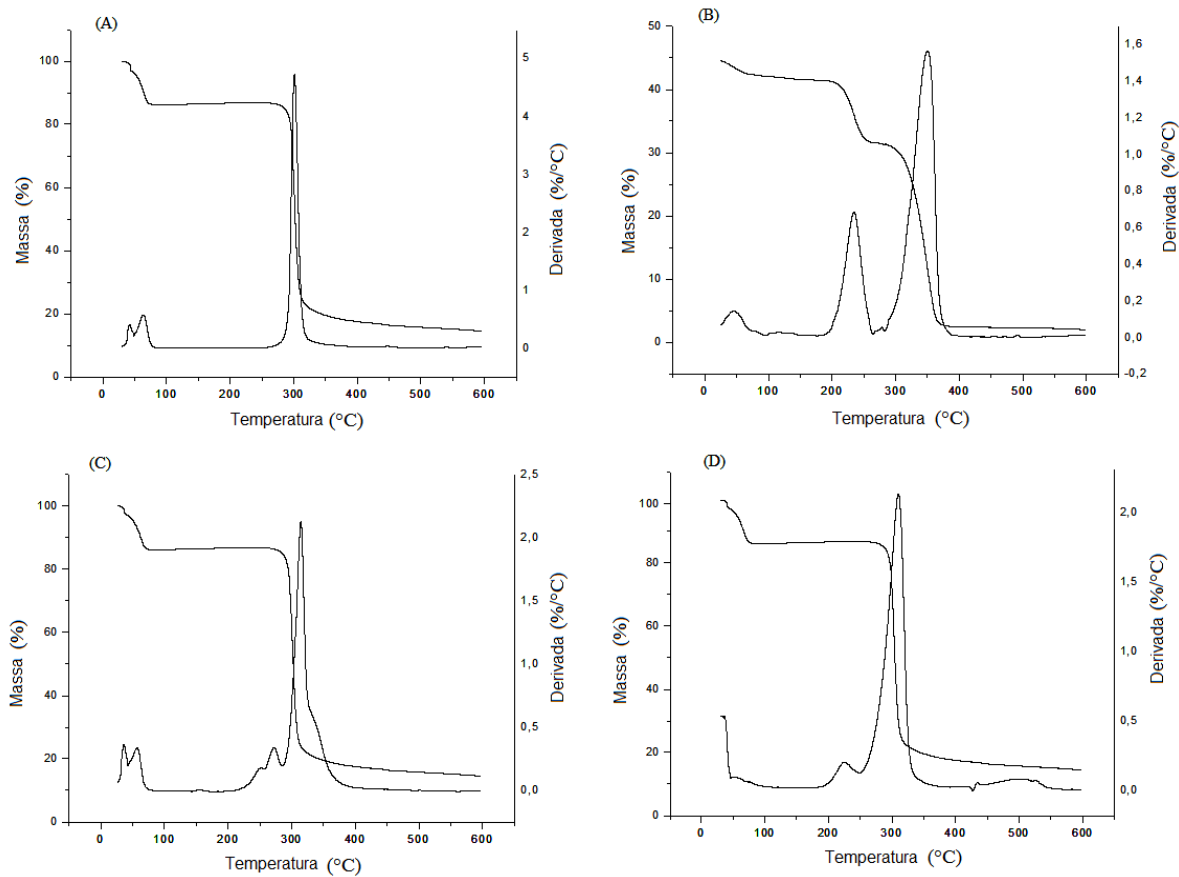


Figura 52. Curvas de TG e DTG da (A) β CD, (B) darunavir etanolato, (C) mistura física e (D) complexo de inclusão.

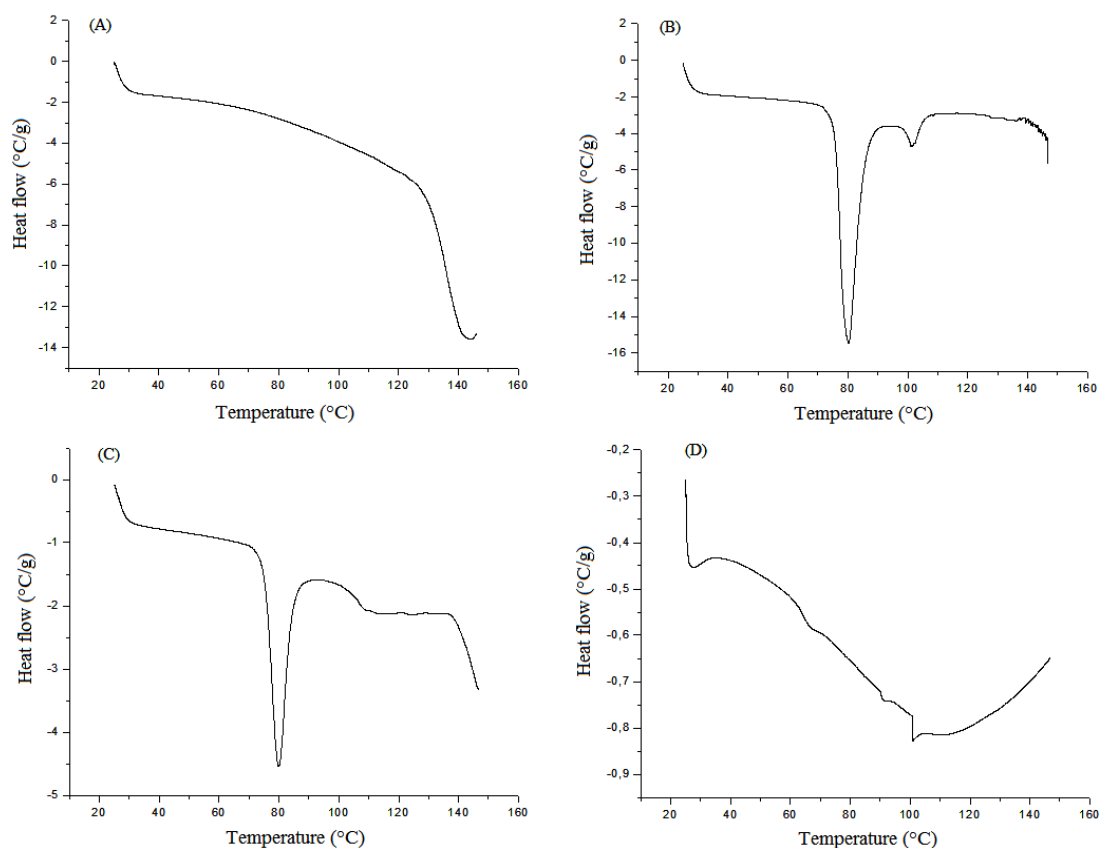


Figura 53. Curvas DSC da (A) β CD, (B) darunavir etanolato, (C) mistura física e (D) complexo de inclusão.

Através dos estudos de *docking* (acoplamento) foram encontrados três *clusters* (agrupamentos) de conformações para o complexo darunavir: β -CD (Figura 54), com a porção de darunavir sendo acoplada na cavidade hidrofóbica da β -CD como segue: *cluster-a*: porção hexahidrofúril, *cluster-b*: anel aminobenzeno e *cluster-c*: porção sulfonamida.

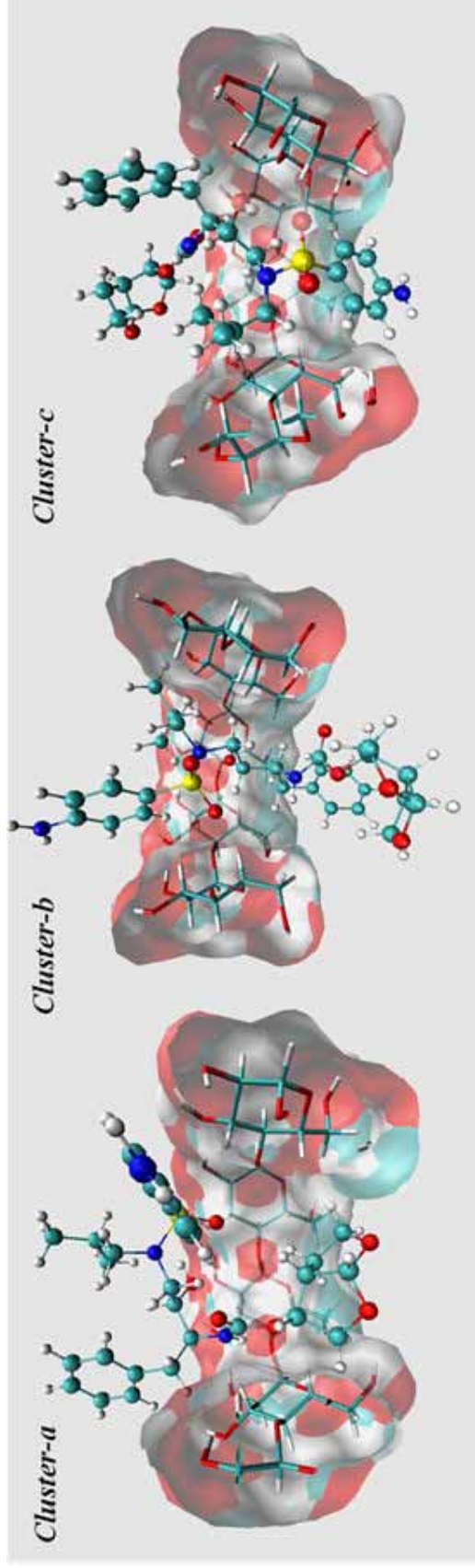


Figura 54. *Clusters* das conformações encontradas para o complexo darunavir:βCD.

CAPÍTULO VI – COMPLEXO DE INCLUSÃO

Através da modelagem de acoplamento a conformação mais estável foi identificada analisando a energia livre de ligação correspondente (Tabela 30), com *cluster-b* sendo favorecido energeticamente (-26,5 kcal/mol), e *cluster-a* e *cluster-c* exibindo afinidades previstas menores (-23,5 e -17,3 kcal/mol, respectivamente).

Tabela 30. Análises do componente energético obtida por *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA) para análise do complexo darunavir:β-CD por simulações de dinâmica molecular

Componente	Valor (kcal/mol)		
	<i>cluster-a</i>	<i>cluster-b</i>	<i>cluster-c</i>
Energia eletrostática	-17,4	-10,1	-7,4
Van der Waals	-36,5	-40,2	-32,4
Total de energia da fase gasosa	53,9	-50,3	-39,8
Contribuição apolar (solvatação)	-3,5	-4,0	-3,5
Contribuição eletrostática (solvatação)	33,9	27,9	26,0
Contribuição total da solvatação	30,4	23,8	22,5
Estimativa da energia de ligação	-23,5	-26,5	-17,3

Por ¹H RMN foi evidenciado que as ressonâncias do darunavir e da β-CD foram modificadas mediante a complexação (Tabela 31), sugerindo a formação do complexo de inclusão. Além disso, a análise de ROESY 2D mostrou correlação entre prótons internos da β-CD e prótons aromáticos do darunavir etanolato (Figura 55), que está em acordo com o modo de inclusão descrito para o *cluster-b* por modelagem de acoplamento.

Tabela 31. Mudanças induzidas nos deslocamentos químicos ¹H do darunavir e da β-CD depois da complexação

Próton do darunavir	Δδ (ppm)	Próton interno da β-CD	Δδ (ppm)
H _A	-0,0120	H ₁	-0,0001
H _B	-0,0219	H ₂	0,0013
H _C -H _E	0,0605	H ₃	-0,0038
H _D	-0,0746	H ₄	0,0026
H _F	-0,0019	H ₅	-0,0304
H _{(CH3)2}	-0,0066	H ₆	0,0018

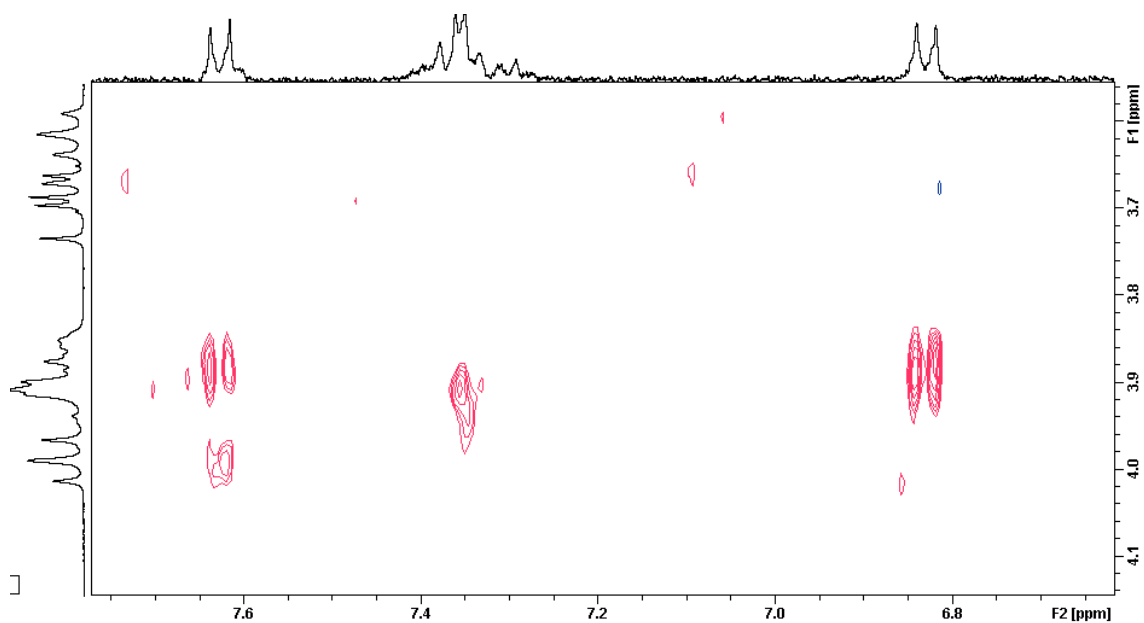


Figura 55. Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo darunavir:β-CD.

As Figuras de 56 a 59 mostram os difratogramas da β-CD e do complexo de inclusão obtido.

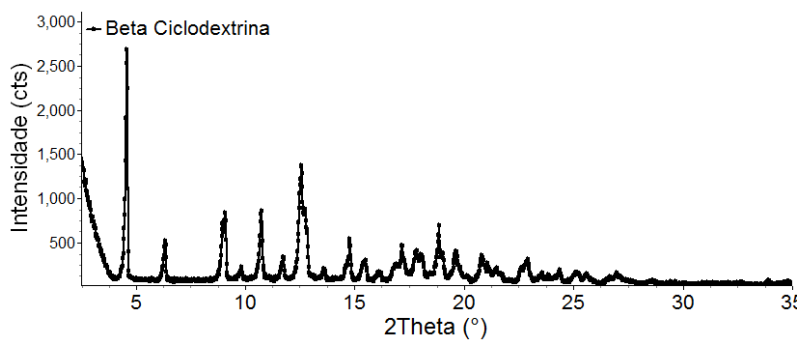


Figura 56. Difratograma experimental de difração de raios-X para a amostra de β-CD.

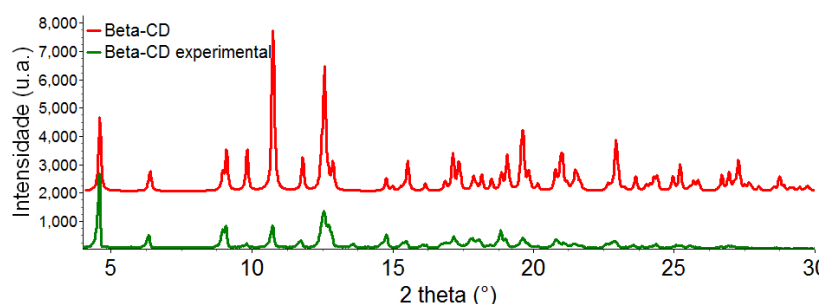


Figura 57. A β -CD foi identificada como sendo a β -CD nonahidratada, a comparação com o padrão simulado (vermelho) da estrutura cristalina descrita por DAMODHARAN e colaboradores (2004), mostra que os dois padrões de difração de raios-X são semelhantes.

O refinamento de Rietveld gera o gráfico de Rietveld, que é uma utilização mais precisa para a identificação de certo material. Por raios-X geralmente comparamos o difratograma observado com padrões encontrados nos bancos de dados.

Com Rietveld, além de fazer uma simples sobreposição com um padrão de difração conhecido para a identificação, usamos informações químicas nos cálculos que aumentam a precisão da identificação.

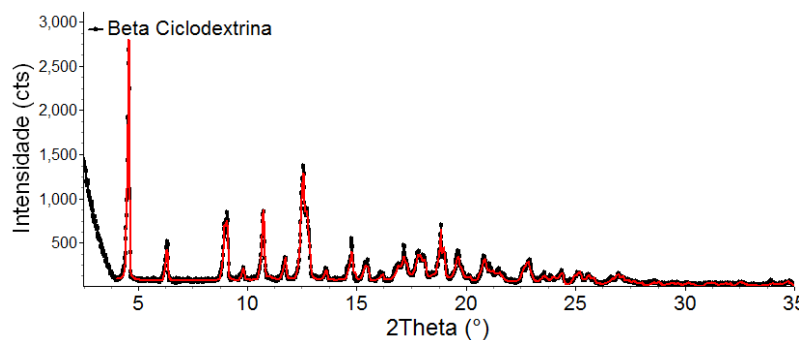


Figura 58. Gráfico de Rietveld para a amostra de ciclodextrina.

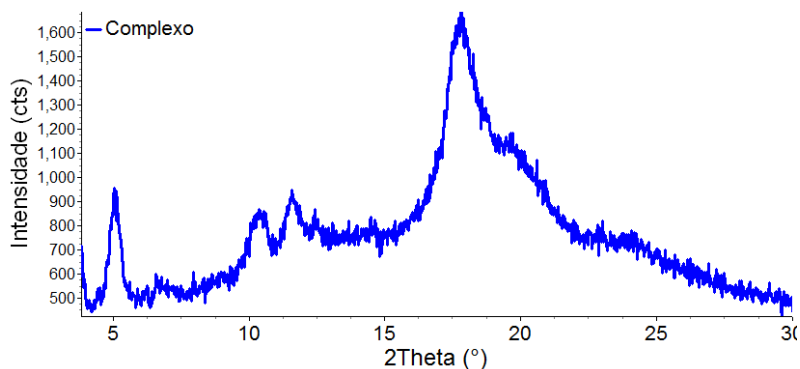


Figura 59. Difratograma de difração de raios-X para a amostra do complexo de inclusão formado.

As Figuras 60 e 61 mostram as sobreposições dos difratogramas experimentais do darunavir etanolato livre, do complexo de inclusão formado e da β -CD.

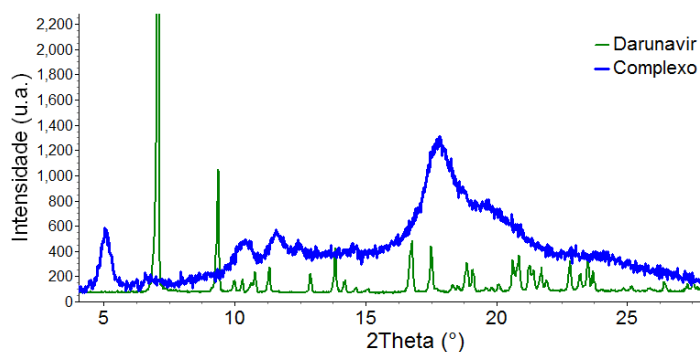


Figura 60. Comparação entre os difratogramas experimentais da amostra de darunavir etanolato livre e do complexo de inclusão obtido.

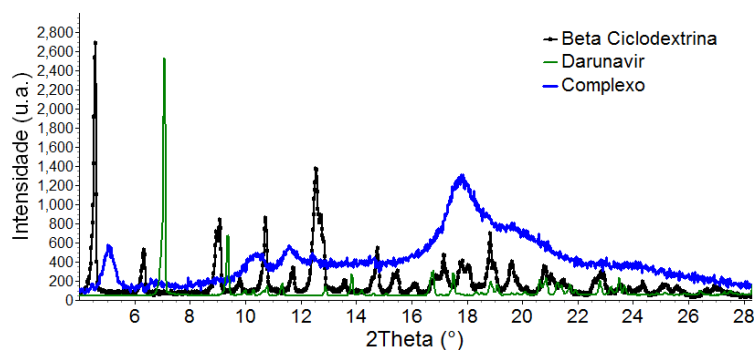


Figura 61. Comparação entre os difratogramas experimentais de duranavir etanolato livre, complexo de inclusão e β -CD.

No difratograma apresentado na Figura 61, o darunavir etanolato (verde) e a β -CD (preto) apresentam padrões de difração de raios-X cristalinos, enquanto que o complexo formado (azul) apresenta um padrão semi-cristalino com grande quantidade de fase amorfa, mas com alguns picos característicos [5,05 °; 10,35 °; 11,55 ° e 17,79 ° (2 θ)]. Estes picos não coincidem com os picos do darunavir etanolato nem da ciclodextrina indicando que um novo arranjo cristalino ocorreu.

6.4. Discussão

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4. As CDs que são obtidas com maior rendimento são comumente conhecidas como CDs naturais e contêm seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD), respectivamente. A β -CD é a mais utilizada nas formulações comerciais atualmente disponíveis.

As ciclodextrinas atualmente são classificadas como excipiente e têm sido utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, as quais proporcionam incremento de solubilidade e consequente aumento da taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, estabilidade,

redução de irritações bem como diminuição ou eliminação de odores ou sabores desagradáveis em formulações líquidas (LYRA *et al.*, 2010).

O DSF é uma das ferramentas mais utilizadas na concentração de complexos de inclusão com CDs, sendo obtidos através de resultados de solubilidade da molécula hóspede em soluções com concentrações crescentes de CDs (VEIGA *et al.*, 2006).

Segundo o modelo de Higuchi e Connors (1965), os diagramas podem ser do tipo A, quando a solubilidade da molécula hóspede aumenta conforme o aumento da concentração da CD, indicando a formação de complexos solúveis, ou do tipo B, quando o complexo formado é insolúvel e a concentração da molécula hóspede diminui com o aumento da concentração da CD (Figura 62).

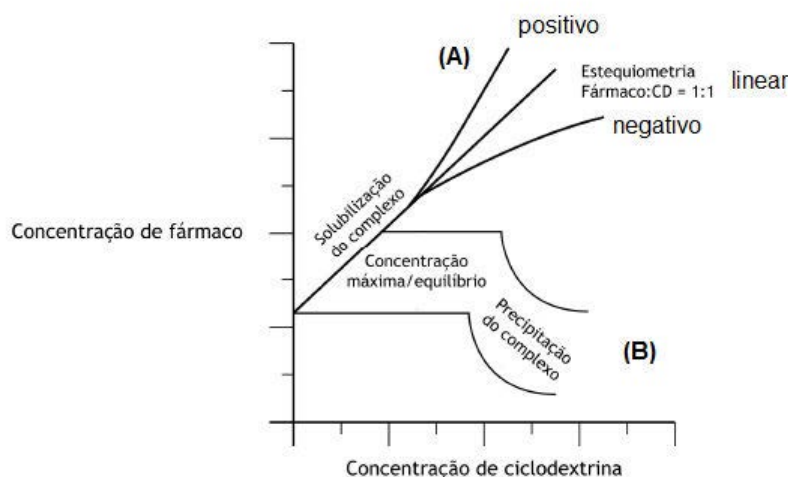


Figura 62. Tipos de Diagrama de Solubilidade de Fases obtidos com fármacos e ciclodextrinas.

Os diagramas do tipo A podem, ainda, ser classificados como linear, quando são representados por uma reta; negativo quando após uma determinada concentração há tendência de queda; e positivo quando se forma uma reta ascendente que após uma determinada concentração, apresenta uma declive mais acentuado.

Nos diagramas do tipo A linear, o aumento de solubilidade é linear em função da concentração de CD, e se o declive for menor ou igual a 1, assume-se uma estequiometria

de 1:1. Por outro lado, se o declive for maior que 1, há formação de complexos de ordem superior a 1 em relação à molécula hóspede (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Quando o diagrama apresenta a conformação do tipo linear pode-se calcular a constante de estabilidade (K_c , Equação 26), em que a ordenada da origem corresponde à solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

O diagrama do tipo linear é o mais comum quando se trata de complexos de inclusão com CDs e o cálculo de K_c é feito para determinar a força da ligação da molécula hóspede com a hospedeira. Na Tabela 32 estão descritos os valores de K_c e a força de ligação (CARRIER *et al.*, 2007).

Tabela 32. Força de ligação entre a molécula hóspede e a CD conforme o valor da K_c

Valor de K_c (M^{-1})	Força de ligação
<500	Muito fraca
500–1000	Fraca
1000–5000	Moderada
5000–20000	Forte
>20000	Muito forte

Para moléculas hóspedes pouco solúveis, como é o caso do darunavir etanolato, que apresentam diagrama do tipo linear, podem ocorrer diferenças entre a solubilidade em meio aquoso e a intercepção da reta do diagrama em y, resultando em valores de K_c diferentes. Como alternativa, pode-se calcular o valor de eficiência de complexação (CE, Equação 29) que considera apenas o valor do coeficiente angular da equação da reta do diagrama.

$$CE = \frac{\text{coeficiente angular}}{(1 - \text{coeficiente angular})} \quad (29)$$

No entanto, o emprego do cálculo de CE não é a forma mais utilizada de avaliar a complexação de fármacos com CDs, por outro lado o cálculo de K_c é encontrado em um número muito maior de trabalhos.

Variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas através de metodologias analíticas, que permitem detectar a formação dos complexos. Para caracterização da formação de complexo de inclusão em estado sólido

pode-se utilizar métodos térmicos, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e análise das propriedades de dissolução, já em estado líquido espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de ultravioleta e visível e diagrama de solubilidade de fase (LYRA *et al.*, 2010).

A incorporação das CDs em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Os avanços na tecnologia industrial permitem fabricar CDs naturais com elevado grau de pureza. A β -CD está cotizada em aproximadamente USD 5/kg (CUNHA-FILHO *et al.*, 2007).

O darunavir etanolato apresenta baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral. Dessa forma, a complexação dele com a β -ciclodextrina foi realizada e estudada.

A complexação de fármacos utilizando ciclodextrinas é bem-vinda neste aspecto por melhorar a solubilidade e, conseqüentemente, aumentar a taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis.

Através dos resultados do DSF, foi obtida a estequiometria 1:1 para a complexação entre o darunavir e a β -CD e a força de ligação entre eles foi fraca, com valor de $K_c = 526,48$. Com o intuito de comparação, em um trabalho sobre a caracterização do complexo efavirenz: β -ciclodextrina, um antirretroviral inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo, foi obtida K_c igual a 288, o que relata uma força de ligação muito fraca (SATHIGARI *et al.*, 2009).

O espectro de infravermelho da MF é a sobreposição dos espectros da β -CD e do darunavir livre. A MF apresenta banda ligeiramente mais larga que o fármaco livre entre 3000 e 3700 cm^{-1} como a β -CD e todas as bandas características do darunavir em 3470, 3368, 3255, 2969, 1709, 1633, 1597, 1536, 1501, 1459 e 1093 cm^{-1} (KOGAWA & SALGADO, 2013a; KOGAWA & SALGADO, 2013b).

Já o espectro do complexo mostra diferenças dos espectros do darunavir etanolato e da mistura física. O complexo de inclusão apresenta banda larga entre 3000 e 3750 cm^{-1} como a β -CD, mas mantém todas as bandas características do darunavir etanolato, provando que o fármaco está presente no complexo.

Com relação ao comportamento térmico da β -CD, ela perde água nas temperaturas entre 40 and 70 °C, com decomposição ocorrendo acima de 300 °C como evidenciado pela perda de massa observada nas curvas de TG. A curva de DSC do darunavir mostrou dois picos endotérmicos a 80 °C e 100 °C, devido ao ponto de fusão do darunavir hidrato e darunavir etanolato, respectivamente (GYSEGHEM *et al.*, 2009).

Analisando as curvas de DSC e TG da mistura física entre darunavir etanolato e β -CD, os eventos característicos observados para os compostos puros foram encontrados. Por outro lado, no complexo, a curva TG exhibe dois eventos de perda de massa, o primeiro a 50 °C e o segundo a 300°C, enquanto a perda de massa observada em 200 °C para o darunavir etanolato não está presente na curva do complexo. Além do mais, por DSC foi observado que os picos endotérmicos do darunavir puro a 80 °C e 100 °C não estão presentes no complexo, indicando que o evento de fusão não ocorreu, que deve ser devido às mudanças na forma cristalina do sólido ou pela complexação. Estes padrões de curvas observados estão em acordo com os dados da espectroscopia de infravermelho e assim confirmam a formação de um complexo entre darunavir e β -CD.

Através dos estudos espectroscópicos de acoplamento foram encontrados três grupamentos de conformações para o complexo darunavir: β -CD, *cluster-a* (porção hexahidrofúril), *cluster-b* (anel aminobenzeno) e *cluster-c* (porção sulfonamida). A conformação mais estável foi o *cluster-b*. Por ¹H RMN foi evidenciado que as ressonâncias do darunavir e da β -CD foram modificadas mediante a complexação, sugerindo a formação do complexo de inclusão. Corroborando a isso, na análise de ROESY 2D nota-se a correlação entre prótons internos da β -CD e prótons aromáticos do darunavir em acordo com o modo de inclusão para o *cluster-b*.

Nas análises de difração de raios-X percebe-se que o material resultante é semi-cristalino onde podemos observar alguns picos largos indicando um pequeno tamanho médio de cristalino e o halo característico de amorfo. Na comparação dos difratogramas de darunavir livre e do complexo de inclusão formado, este não apresenta os picos do fármaco puro, tendo formado uma estrutura semi-cristalina diferente.

6.5. Conclusão

O trabalho realizado permitiu o estudo da complexação entre o darunavir e a β -CD a um nível molecular. A combinação das técnicas teóricas e experimentais confirmaram a formação de um complexo de inclusão entre eles.

6.6. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Zoppi, A.; Quevedo, M.A.; Longhi, M.R.; Salgado, H.R.N. Complexation between darunavir ethanolate and β -cyclodextrin experimental and theoretical studies. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p.298-309, 2014.

7. TESTE DE SOLUBILIDADE

7.1. Introdução

A dissolução refere-se ao processo pelo qual as moléculas do fármaco são liberadas da fase sólida e entram na fase de solução, sendo este processo dependente de tempo que representa o passo final para a liberação da substância ativa (MARTIN & SINKO, 2008). No entanto, a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica depende das suas características de solubilidade.

Solubilidade é a capacidade de um soluto dissolver-se em um solvente, fornecendo uma solução homogênea.

Este parâmetro é utilizado tanto para a classificação de fármacos segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como para o desenvolvimento farmacotécnico das formulações. A classificação, de acordo com o SCB, do darunavir ainda não está definida.

Fatores como pKa, pH do meio, polimorfismo, granulometria, forma farmacêutica, adjuvantes, processos de fabricação, trânsito intestinal, motilidade, volume e composição dos líquidos intestinais afetam a solubilidade dos fármacos.

O complexo darunavir: β -ciclodextrina foi obtido com o objetivo de melhorar a solubilidade do darunavir etanolato visando posteriormente a administração de doses mais baixas e aumento da adesão do paciente ao tratamento. Com a utilização de doses menores, a possibilidade de reações adversas e interações medicamentosas associadas com a terapia anti-retroviral são diminuídas. Vale lembrar que em tratamentos crônicos, a toxicidade moderada pode levar a complicações graves (SHARMA & GARG, 2010).

Crianças menores de sete anos, geralmente, são incapazes de ingerir os medicamentos sólidos, especialmente comprimidos de 300, 400 ou 600 mg, como é o caso do darunavir. Para tornar os medicamentos de adultos adequados às crianças, os comprimidos ou cápsulas, muitas vezes, são tratados para ajustar as dosagens e facilitar a deglutição. No entanto, as formulações líquidas, essenciais para a farmacoterapia pediátrica, são motivo de preocupação crescente em segurança, eficácia e qualidade, devido às desvantagens organolépticas que levam à evasão e à redução da aderência a regimes terapêuticos antirretrovirais. Outra preocupação é o decréscimo da biodisponibilidade do

fármaco, que também tem sido encontrada em muitos casos (SOSNIK *et al.*, 2009). Assim, o aumento da solubilidade do darunavir quando complexado com a β -ciclodextrina, beneficiaria um outro grupo de pacientes, as crianças. A última Assembleia Mundial da Saúde aprovou a resolução "Best medicines for children", e lançou recentemente a campanha global "Make medicines child size" (SOSNIK *et al.*, 2009). Estes eventos promovem a discussão sobre este tema tão importante e estimulam pesquisas para a otimização de fármacos já existentes.

O objetivo deste capítulo foi definir a solubilidade do CI, de acordo com os critérios estabelecidos pelo SCB, além de comparar seus resultados com aqueles obtidos com o fármaco livre, previamente estudado por nosso grupo de pesquisa.

7.2. Parte experimental

7.2.1. Material

O material utilizado foi o CI darunavir: β -CD, obtido no capítulo VI.

7.2.2. Método

Para o estudo de solubilidade do complexo darunavir: β -CD foi utilizado *shaker* MA 420 (Marconi[®]), espectrofotômetro UV 1800 (Shimadzu[®]) e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

A solubilidade foi determinada em três soluções tamponantes (na faixa de pH 3,0 a 6,8, pHs 3,0; 4,5 e 6,8) e em água purificada, a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando excesso do CI e período prolongado de agitação pelo método de *shaker flask* em plataforma de agitação orbital com incubadora. A determinação da concentração do fármaco em solução foi realizada após filtração em membrana de poro $0,45\text{ }\mu\text{m}$ através de método espectrofotométrico previamente validado (CORRÊA 2014; CORRÊA *et al.*, 2014).

Uma quantidade de pó equivalente a 5 mg de darunavir foi pesada em balança analítica modelo DV215CD (Ohaus[®]) de um *pool* do CI darunavir: β -CD e transferido para tubo de ensaio. Em tubos separados, 300 μL de água purificada, solução tamponante acetato 0,05 M pH 4,5, solução tamponante fosfato 0,2 M pH 6,8 e solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0 foram adicionadas e os tubos foram vedados com *parafilme* e colocados no *shaker* a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 rpm por 72 horas. Após este

período, os tubos foram retirados do *shaker* e o conteúdo filtrado em membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 μm de poro e 13,0 mm de diâmetro. Alíquotas de 20 μL do filtrado foram diluídas em quantidades variadas de meio de dissolução até obtenção de absorvância de aproximadamente 0,5 quando realizada a leitura em espectrofotômetro a 267 nm em ordem zero. As soluções também foram lidas em 276 nm em primeira ordem, sempre utilizando os meios de dissolução como brancos.

Para o cálculo da concentração foi preparada solução padrão contendo darunavir livre na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ em cada solvente testado com o acréscimo de 20 % de álcool metílico, exceto na solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0, uma vez que o fármaco solubilizou-se sem a necessidade do solvente orgânico.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos no teste utilizando o fármaco livre.

7.3. Resultados

Foram testados quatro solventes no teste de solubilidade, água purificada, solução tamponante acetato 0,05 M pH 4,5, solução tamponante fosfato 0,2 M pH 6,8 e solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0 (Figura 63). Após 72 horas em *shaker* sob 60 rpm e 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$ os tubos de ensaio contendo o CI e os solventes apresentaram precipitado.

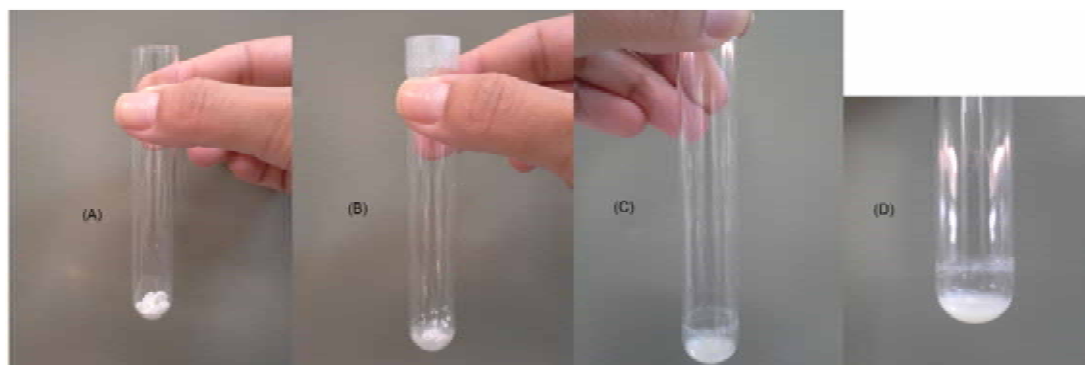


Figura 63. Tubo de ensaio contendo (A) darunavir: β -ciclodextrina (B) em solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0, (C) após 72 horas em *shaker* sob 60 rpm e 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$. (D) Detalhe da presença de precipitado, certificando a saturação da solução.

Os valores das absorvâncias do darunavir livre na concentração de 15 µg/mL nos solventes testados estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33. Valores das absorvâncias do darunavir livre em diferentes solventes na concentração de 15 µg/mL.

Concentração (µg/mL)	Solventes	Absorvância média*		Concentração (µg/mL)
		267 nm	276 nm	
15	Água purificada	0,670	0,024	17,98
	Solução tamponante pH 4,5	0,548	0,021	16,83
	Solução tamponante pH 6,8	0,483	0,020	12,94
	Solução tamponante pH 3,0	0,568	0,023	16,83

*Valores correspondentes a triplicata

Fonte: CORRÊA et al., 2014.

A Tabela 34 mostra as comparações de diluições e concentrações realizadas com os diferentes solventes testados para obtenção do mesmo valor de absorvância.

Tabela 34. Diluições variadas para obtenção de aproximadamente o mesmo valor de absorvância do complexo darunavir:β-ciclodextrina nos solventes testados, após o teste de solubilidade

Solventes	Diluição (mL)	Absorvância média*		DPR (%)	Concentração (µg/mL)
		267 nm	276 nm		
Água purificada	6,0	0,5162	0,017	1,16	3.834,72
Solução tamponante pH 4,5	7,0	0,5140	0,018	3,68	5.064,63
Solução tamponante pH 6,8	5,5	0,5080	0,018	2,87	3.302,46
Solução tamponante pH 3,0	4,0	0,5311	0,021	3,48	3.089,40

*Valores correspondentes a triplicata

Para provar que a β-CD não absorve nos comprimentos de onda utilizados, o teste completo foi realizado com ela, assim como as diluições e leitura. Os valores encontram-se na Tabela 35.

Tabela 35. Valores das absorvâncias da β -ciclodextrina em diferentes solventes

Solventes	Absorvância média*		Absorção (%)
	267 nm	276 nm	
Água purificada	0,004	0,000	0,76
Solução tamponante pH 4,5	0,006	0,000	1,13
Solução tamponante pH 6,8	0,002	0,000	0,39
Solução tamponante pH 3,0	0,004	0,000	0,75

*Valores correspondentes a triplicata

O darunavir livre apresentou baixa solubilidade nos solventes testados, apresentando valores de absorvâncias abaixo de 0,2 com 2 mL de meio de dissolução, conforme mostra a Tabela 36.

Tabela 36. Valores de absorvâncias e concentrações do darunavir livre realizadas com diluição de 2 mL de meio de dissolução

Solventes	Diluição (mL)	Absorvância média*		DPR (%)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
		267 nm	276nm		
Água purificada	2,0	0,0563	0,002	4,13	166,83
Solução tamponante pH 4,5	2,0	0,0605	0,002	1,19	180,77
Solução tamponante pH 6,8	2,0	0,0390	0,002	10,58	147,15
Solução tamponante pH 3,0	2,0	0,1744	0,007	3,59	585,71

*Valores correspondentes a triplicata

Sendo assim, o CI apresenta solubilidade 28 vezes maior que o darunavir livre quando utilizada a solução tamponante acetato 0,05 M pH 4,5, 23 vezes quando utilizada a água purificada, 22 vezes quando utilizada solução tamponante fosfato 0,2 M pH 6,8 e 5 vezes quando utilizada a solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0, como demonstrado na Tabela 37.

Tabela 37. Diferença das concentrações de darunavir livre e complexado à β -ciclodextrina nos solventes testados, após o teste de solubilidade

Solventes	Concentração darunavir ($\mu\text{g/mL}$)		Solubilidade
	complexado	livre	
Água purificada	3.834,72	166,83	23 vezes maior
Solução tamponante pH 4,5	5.064,63	180,77	28 vezes maior
Solução tamponante pH 6,8	3.302,46	147,15	22 vezes maior
Solução tamponante pH 3,0	3.089,40	585,71	5 vezes maior

7.4. Discussão

A solubilidade de um fármaco dependerá de suas propriedades moleculares e de sua capacidade em formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água.

Segundo a FDA (2000b), a solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dosagem mais alta de uma forma farmacêutica de liberação imediata no volume de 250 mL, ou menos, de uma solução tamponante que apresente pH na faixa de 1,0 a 7,5 sob temperatura de 37 °C.

O ensaio de solubilidade de um fármaco deve ser realizado através dos métodos de equilíbrio, potenciométrico ou dissolução intrínseca. O método de equilíbrio é o mais utilizado, para o qual a concentração de saturação do fármaco, a velocidade e o tempo de agitação são fundamentais (FDA, 2000b).

No teste de solubilidade do complexo darunavir: β -ciclodextrina realizado foram testados quatro solventes, a água purificada (pH 8,0), uma solução tamponante acetato 0,05 M pH 4,5, uma solução tamponante fosfato 0,2 M pH 6,8 e uma solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0. O darunavir livre apresenta pH 5,0 e cinco valores de pKa, 1,66; 1,76; 7,75; 11,43 e 14,31. O CI apresenta pH 4,5. Fármacos fracamente ácidos, expostos a um meio de dissolução que possui pH maior que o pKa do fármaco, tendem a apresentar aumento da solubilidade. Assim, a biodisponibilidade é afetada por alterações no pH durante a dissolução do fármaco, e até mesmo por alterações ocorridas nas formulações de formas farmacêuticas (MARTINEZ & AMIDON, 2002). Em todos os meios de dissolução testados o CI apresentou solubilidade no mínimo 5 vezes maior que o fármaco livre.

O darunavir: β -ciclodextrina apresentou forma semi-cristalina com picos de cristalino e halo característico de amorfo, segundo o teste de difração de raios-X apresentado no capítulo VI, e fármacos amorfos geralmente são melhores absorvidos, uma vez que as moléculas estão ordenadas ao acaso, necessitando de menor energia para separá-las, culminando em uma dissolução mais rápida (STULZER *et al.*, 2007). O darunavir apresenta forma solvatada (GYSEGHEM *et al.*, 2009), com certa ordenação das moléculas o que demanda maior energia para separá-las. Por estes motivos, o CI apresentou maior solubilidade em todos os solventes testados quando comparado ao darunavir livre.

Sathigari e colaboradores (2009) estudaram a complexação do efavirenz com a β -ciclodextrina, no entanto não realizaram o teste de solubilidade para compararmos com os resultados aqui obtidos. É válido lembrar que a complexação darunavir: β -ciclodextrina contou apenas com a β -ciclodextrina como adjuvante.

A determinação da solubilidade dos fármacos é parte fundamental no SCB e, atualmente, também assume grande importância política, uma vez que este teste, juntamente com o de permeabilidade, constitui critério essencial para bioisenção na obtenção de registro de medicamentos genéricos e similares. A bioisenção possibilita a diminuição de custos e tempo de desenvolvimento de medicamentos, o que beneficia o paciente, por ter acesso a medicamentos mais baratos que leva ao cumprimento da farmacoterapia, e o Sistema Único de Saúde (SUS), por ter maior diversidade de medicamentos para o tratamento de um número maior de enfermidades.

7.5. Conclusão

O teste de solubilidade do CI foi realizado pelo método do equilíbrio apresentou solubilidade maior que o fármaco livre em todos os meios de dissolução testados, o que faz este recente avanço da tecnologia farmacêutica um marco importante para a utilização do anti-retroviral e para a saúde pública.

É importante destacar que a falha do tratamento não só afeta a qualidade de vida dos pacientes, mas também contribui significativamente para a carga econômica do sistema de saúde (SHARMA & GARG, 2010). Portanto, a complexação desenvolvida é extremamente interessante, tanto do ponto de vista tecnológico como financeiro (KOGAWA *et al.*, 2014).

7.6. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Corrêa, J.C.R.; Salgado, H.R.N. Influence of darunavir: β -cyclodextrin complex on the solubility of darunavir. **Research and Reviews: Journal of Pharmacology and Toxicological Studies**, v.2(4), p.50-55, 2014.

8. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

8.1. Introdução

A validação de método analítico é a etapa a qual demonstra que o método é adequado ao uso pretendido e trata-se de um aspecto primordial da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002). Um processo de validação bem definido e documentado oferece, às exigências regulatórias, evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Desta forma, a validação é parte importante do programa de garantia de qualidade e tem por objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para a proposta pretendida e é seguro ao ser executado (ICH, 2005). A validação é, assim, a ferramenta usada para demonstrar que um método analítico específico mede realmente o que foi destinado a medir, e, portanto, é adequada para a sua função/finalidade (TAVERNIERS *et al.*, 2004).

8.2. Análise Qualitativa e Quantitativa

No presente capítulo será apresentado o método que foi desenvolvido e validado para a identificação e quantificação do darunavir no complexo darunavir: β -CD.

A análise qualitativa e quantitativa foi realizada através do desenvolvimento e validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência.

8.3. Parte Experimental da Análise Qualitativa

8.3.1. Material

A MP utilizada foi o darunavir etanolato, teor de 97,0 %, extraído da forma farmacêutica comprimidos.

O complexo de inclusão utilizado foi o darunavir: β -CD, teor de 95,0 %, descrito no capítulo VI.

O placebo do complexo foi composto de β -CD da empresa Roquette.

8.3.2. Método

Para o desenvolvimento do método de CLAE, as amostras foram pesadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]).

Foram pesados 10,00 mg de MP e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 100 µg/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 2 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com álcool etílico para a preparação das soluções com concentração de 20 µg/mL.

A complexação do darunavir à β-ciclodextrina segue a proporção de 1:1 em mols. Assim, 10,00 mg de MP correspondem a 29,12 mg de CI. Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 100 µg/mL do darunavir. Cerca de 50 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 2 mL para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com álcool etílico para obtenção da concentração final de 20 µg/mL.

A β-CD foi analisada juntamente com a MP e o CI para avaliar sua influência na análise. Foram pesados 19,12 g de β-CD e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 100 µg/mL. Cerca de 50 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 2 mL para balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com álcool etílico para obtenção da mesma concentração de placebo que estaria presente na solução de amostra.

Para a preparação da fase móvel foram utilizados água purificada, acetonitrila (ACN) (J.T.Baker) e ácido acético glacial (Quemis).

As soluções e a fase móvel preparada foram sonicadas em aparelho ultrassom Ultrasonic Cleaner (Unique[®]) e filtradas em membranas com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore[®]) e 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore[®]), respectivamente. Foi utilizado aparelho de vácuo (Marconi[®]) para filtrar a fase móvel utilizada na análise. Uma seringa de 100 µL (Hamilton[®]) foi utilizada para realizar as injeções.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Foram utilizados bomba cromatográfica 1525 (Waters[®]), injetor manual 7725i (Rheodyne Breeze[®]), detector UV-Vis 2487 (Waters[®]) e coluna Phenomenex Luna CN 5 µm (250 x 4,6 mm).

A conformidade do sistema cromatográfico ou *System Suitability*, estabelecido pelo ICH (2005), é essencial para assegurar o desempenho satisfatório do cromatógrafo durante a realização das análises.

Assimetria do pico, fator de alargamento, fator de retenção e número de pratos foram os parâmetros avaliados para o desenvolvimento e posterior validação do método de CLAE para a quantificação do darunavir no CI.

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi realizada através da injeção de seis replicatas de soluções de MP na concentração de 40 µg/mL. Os parâmetros cromatográficos foram calculados segundo as Equações 2, 3, 30 e 31 (USP 35, 2012).

O fator de alargamento (T) é definido pela soma da distância do ponto frontal até o ponto médio com a distância do ponto médio até o ponto posterior, dividido por duas vezes a distância do ponto frontal até o ponto médio. Todas as medidas foram feitas a 5 % da altura do pico máximo, como mostram a Equação 30 e a Figura 64.

$$T = a + \frac{b}{2} \times a \quad (30)$$

T = fator de alargamento

a = distância do ponto frontal até o ponto médio a 5 % da altura do pico

b = distância do ponto médio até o ponto posterior a 5 % da altura do pico

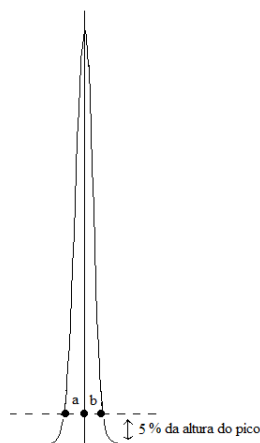


Figura 64. Ilustração para o cálculo do fator de alargamento.

O fator de retenção (k) é a medida da posição do pico de interesse relativo ao composto não retido, de acordo com a Equação 31.

$$k = (tr - t0)/t0 \quad (31)$$

k = fator de retenção

tr = tempo de retenção do pico de interesse

$t0$ = tempo do composto não retido

Foram obtidos cromatogramas com estas soluções no comprimento de onda de 268 nm, utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 μ m (250 x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial e acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial 60:40 (v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min. Foi adicionado 0,1 % de ácido acético à fase móvel para minimizar as interações soluto-silanol, pela ação de um ácido competidor.

A identificação da MP e do CI foi realizada através da sobreposição dos cromatogramas obtidos e comparação quanto ao seu perfil característico e tempo de retenção. Também foi avaliada a influência da β -ciclodextrina na análise do darunavir por CLAE.

8.3.3. Resultados

A adequabilidade do sistema cromatográfico é de extrema importância para assegurar resultados confiáveis, reprodutíveis e seguros (PASCHOAL & RATH, 2008). Os resultados do *System Suitability* encontram-se na Tabela 38.

Tabela 38. Análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de darunavir no CI

Parâmetros e especificações	Resultados
Assimetria do pico (< 2)	1,00
Fator de alargamento (≤ 2)	1,01
Fator de retenção (> 2)	2,05
Número de pratos (> 2000)	11.259
Tempo de retenção (minutos)	7,2 (DPR* 0,16 %)

*DPR = desvio padrão relativo

A identificação do darunavir no CI foi determinada pelo seu respectivo tempo de retenção, comparado com o tempo de retenção da MP (Figura 65).

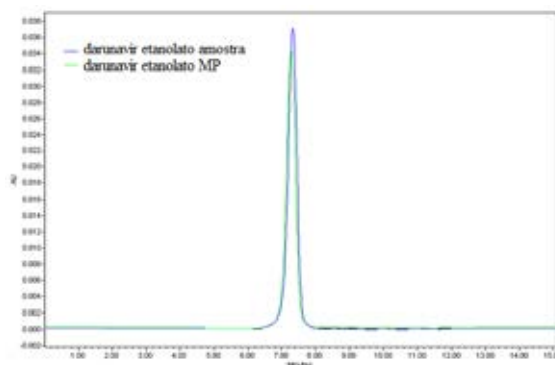


Figura 65. Sobreposição dos cromatogramas da MP e amostra, ambos na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, para identificação de darunavir pelo método de CLAE utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 μm (250 x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial:acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial 60:40 (v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e leitura em 268 nm.

Ambos os cromatogramas, da solução de MP e amostra, apresentaram tempo de retenção de aproximadamente 7,2 minutos.

A Figura 66 apresenta a sobreposição dos cromatogramas da MP, CI e β -CD na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando que a ciclodextrina não influencia na análise do darunavir por CLAE no comprimento de onda utilizado no método, 268 nm.

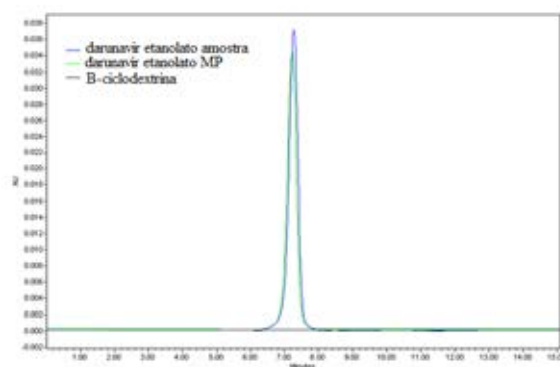


Figura 66. Sobreposição dos cromatogramas da MP, amostra e β -CD, todos na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, para avaliação da influência da ciclodextrina na análise do darunavir por CLAE utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 μm (250 x 4,6 mm), água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial:acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial 60:40 (v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e leitura em 268 nm.

8.3.4. Discussão

A adequação do sistema ou *System Suitability* visa verificar a validação do instrumento e da metodologia analítica simultaneamente e tem como objetivo mostrar que o método apresenta precisão e exatidão (LANÇAS, 2004).

A adequabilidade do sistema cromatográfico é essencial para assegurar que os parâmetros eleitos na CLAE estejam aptos para identificar e quantificar o fármaco em análise. O *System Suitability* apresentou resultados satisfatórios estando de acordo com o preconizado pela FDA (2000a, 2004), no qual os parâmetros sugeridos são assimetria do pico e fator de alargamento ≤ 2 , fator de retenção > 2 e número de pratos > 2000 .

Foram considerados o número de pratos, a assimetria do pico e os fatores de alargamento e capacidade para a escolha dos parâmetros apropriados para a determinação do darunavir no CI.

A CLAE utilizada é uma técnica de fase reversa, dado que a fase móvel é mais polar, o que faz com que os componentes menos polares possuam maior t_R . A coluna Phenomenex Luna CN utilizada nos testes apresenta reprodutibilidade comprovada *run-to-run* e *lot-to-lot* para compostos contendo grupos carboxila, carbonila e amina. Variando a natureza dos grupos funcionais da fase estacionária, é possível obter diferentes tipos de seletividade. Estes grupos podem ser polares, como o grupo amino ($-NH_2$) e o grupo ciano ($-CN$). Tais fases estacionárias podem ser utilizadas tanto para cromatografia em modo normal ou em fase reversa.

O método de CLAE, apesar de ser mais frequentemente aplicado para a análise quantitativa, pode ser muito útil na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da respectiva substância de referência. Se as substâncias analisadas são idênticas, obrigatoriamente apresentarão o mesmo tempo de retenção, quando analisadas sob as mesmas condições.

Os cromatogramas obtidos nas análises da MP e CI demonstraram perfis semelhantes e tanto a MP como a amostra apresentaram tempo de retenção de aproximadamente 7,2 minutos, sugerindo a mesma identidade das amostras quando utilizada coluna Phenomenex Luna CN (5 μ m 250 x 4,6 mm), água purificada + 0,1 % de

ácido acético glacial e acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial 60:40 (v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e leitura em 268 nm.

Assim, o método demonstrou ser útil na identificação de darunavir no CI formado.

8.4. Parte Experimental da Análise Quantitativa

8.4.1. Material

Os materiais utilizados na CLAE foram a MP, descrita no item 8.3.1., e o CI darunavir: β -CD, descrito no capítulo VI.

8.4.2. Método

Para o desenvolvimento do método de CLAE, as amostras foram pesadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]).

Foram pesados 10,00 mg de MP e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 100 μ g/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas e diluídas em álcool etílico.

Para o produto acabado, foi pesado 29,12 mg de CI (o equivalente a 10,00 mg de MP). Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo concentração de 100 μ g/mL. Cerca de 50 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, alíquotas foram retiradas e diluídas em álcool etílico.

Foram utilizados bomba cromatográfica 1525 (Waters[®]), injetor manual 7725i (Rheodyne Breeze[®]), detector UV-Vis 2487 (Waters[®]), coluna Phenomenex Luna CN 5 μ m (250 x 4,6 mm) e as leituras das amostras foram realizadas através da área do pico em 268 nm na vazão de 1 mL/min.

As soluções e a fase móvel preparadas foram sonicadas em aparelho ultrassom Ultrasonic Cleaner (Unique[®]) e filtradas em membranas com poro de 0,45 μ m e 13 mm de diâmetro (Millipore[®]) e 0,45 μ m e 47 mm de diâmetro (Millipore[®]), respectivamente. Foi utilizado aparelho de vácuo (Marconi[®]) para filtrar a fase móvel composta de água + 0,1 % de ácido acético glacial e ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v). Uma seringa de 100 μ L (Hamilton[®]) foi utilizada para realizar as injeções.

Os parâmetros analíticos de linearidade, limites de detecção e de quantificação, especificidade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados para a validação do método, segundo a RE n° 899 (2003), a AOAC (2002), ICH (2005) e o INMETRO (2007).

8.4.2.1. Validação

8.4.2.2.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em três diferentes dias e em triplicata. As concentrações utilizadas foram 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL.

A equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As áreas utilizadas na determinação da curva analítica foram estatisticamente avaliadas pela ANOVA.

8.4.2.2.2. Limites de detecção e de quantificação

O LD do darunavir etanolato foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), conforme a Equação 4.

O LQ do darunavir etanolato foi obtido com base nos mesmos dados descritos acima, de acordo com a Equação 5.

8.4.2.2.3. Especificidade

A especificidade do método proposto foi comprovada através da degradação forçada do CI. O propósito do teste de degradação forçada é desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade, além de ser útil na determinação da estabilidade intrínseca do princípio ativo, na determinação das vias de degradação do princípio ativo e da amostra e na elucidação estrutural de potenciais produtos de degradação.

Foram preparadas soluções de CI em HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, H₂O₂ 3% e água purificada na concentração de 40 µg/mL e submetidas a banho em temperatura de 80 °C. Também foram preparadas soluções de CI em água purificada na concentração de 40 µg/mL e submetidas à luz UVB em temperatura de 25 °C e ao calor seco em temperatura de 35 °C.

Alíquotas destas soluções foram retiradas nos tempos de 2, 4 e 8 horas e analisadas imediatamente pelo método de CLAE.

8.4.2.2.4. Precisão

Para avaliação da precisão intradia foram realizadas seis soluções estoque de darunavir etanolato MP, das quais foram retiradas seis alíquotas de cada uma para obtenção de soluções com concentração teórica de 40 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais e calculado o DPR.

Para avaliação da precisão intermediária, durante três dias seguidos, o teste foi realizado por dois diferentes analistas e os resultados foram analisados estatisticamente.

Foram pesados 10,00 mg de darunavir etanolato MP e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo-se concentração de 100 µg/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com álcool etílico para a preparação das soluções com concentração de 40 µg/mL.

8.4.2.2.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de adição.

Foram preparadas soluções estoque de darunavir etanolato MP e CI na concentração de 100 µg/mL. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 2 mL de cada uma e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se uma solução de MP e outra de amostra. Foram completados com álcool etílico e obtidas soluções com concentrações teóricas de 20 µg/mL.

A partir da solução estoque de CI, foram retiradas alíquotas de 2 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL adicionadas de 1,2 mL de solução estoque de darunavir MP, completados com álcool etílico para obtenção de solução com concentração teórica de 32 µg/mL. Alterando apenas o volume da solução estoque de MP, procedeu-se da mesma forma para obtenção de mais duas soluções através de alíquotas de 2 mL (concentração teórica de 40 µg/mL) e 2,8 mL (concentração teórica de 48 µg/mL).

As preparações das amostras estão exemplificadas na Tabela 39.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Tabela 39. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de cromatografia líquida de alta eficiência

	Volume adicionado de CI de concentração 100 µg/mL (mL)	Volume adicionado de MP de concentração 100 µg/mL (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^{a,b}
Amostra	2,0	-	20
R1	2,0	1,2	32
R2	2,0	2,0	40
R3	2,0	2,8	48
Padrão	-	2,0	20

^adiluída em balão volumétrico de 10 mL

^bcada nível de concentração foi preparado em triplicata

A percentagem de darunavir etanolato recuperado foi calculada pela Equação 7 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left\{ \frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right\} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

Cr = concentração da solução de amostra adicionada de MP (µg/mL)

Ca = concentração da solução de amostra (µg/mL)

Cp = concentração teórica da solução de MP adicionada (µg/mL)

8.4.2.2.6. Robustez

O teste de Youden não só permite avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2007).

Os parâmetros modificados para a avaliação da robustez foram: comprimento de onda (268 nm): A (269 nm) e a (267 nm), vazão (1,0 mL/min): B (1,02 mL/min) e b (0,98 mL/min), proporção de acetonitrila (40 %): C (41 %) e c (39 %), proporção de ácido acético (1 %): D (1,05 %) e d (0,95 %), conforme descritos na Tabela 40.

A análise foi realizada em triplicata e as concentrações de darunavir presentes na amostra foram determinadas a partir da curva analítica.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Tabela 40. Combinações analisadas para a avaliação da robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do darunavir

	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	269 nm	269 nm	269 nm	269 nm	267 nm	267 nm	267 nm	267 nm
B/b	0,98	0,98	1,02	1,02	0,98	0,98	1,02	1,02
	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min
C/c	39 %	41 %	39 %	41 %	39 %	41 %	39 %	41 %
D/d	0,95 %	0,95 %	1,05 %	1,05 %	1,05 %	1,05 %	0,95 %	0,95 %
	s	t	u	v	w	x	y	z

Os parâmetros A, a, B, b, C, c, D, d, foram calculados a partir das Equações de 32 a 39.

$$A = (s + t + u + v)/4 \quad (32) \qquad a = (w + x + y + z)/4 \quad (33)$$

$$B = (s + t + w + x)/4 \quad (34) \qquad b = (u + v + y + z)/4 \quad (35)$$

$$C = (s + u + w + y)/4 \quad (36) \qquad c = (t + v + x + z)/4 \quad (37)$$

$$D = (s + t + y + z)/4 \quad (38) \qquad d = (u + v + w + x)/4 \quad (39)$$

8.4.2.2.7. Doseamento

De um *pool* de CI foram pesados 29,12 mg e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com álcool etílico, obtendo concentração teórica de 100 µg/mL.

Partindo desta solução, volumes de 4 mL foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL obtendo-se soluções com concentração final de 40 µg/mL. As leituras das soluções foram realizadas em CLAE com detector UV no comprimento de onda de 268 nm.

Foram preparadas seis soluções. O cálculo da concentração e do teor de darunavir no CI foi realizado através das Equações 8 e 9, respectivamente.

8.4.3. Resultados

Linearidade

A Tabela 41 mostra os valores obtidos na construção da curva analítica para o darunavir etanolato MP por CLAE e a Figura 67 mostra a curva analítica correspondente.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Tabela 41. Valores das áreas de darunavir determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência para a construção da curva analítica

Concentração (µg/mL)	Áreas	Média das áreas	DPR (%)
10	301429	286012	4,70
	280410		
	276436		
20	577900	569153	1,88
	557188		
	572372		
30	849251	846891	1,56
	832618		
	858802		
40	1154074	1131555	2,03
	1108252		
	1132340		
50	1453218	1424297	1,79
	1404980		
	1414692		
60	1704120	1713197	0,82
	1729411		
	1706060		

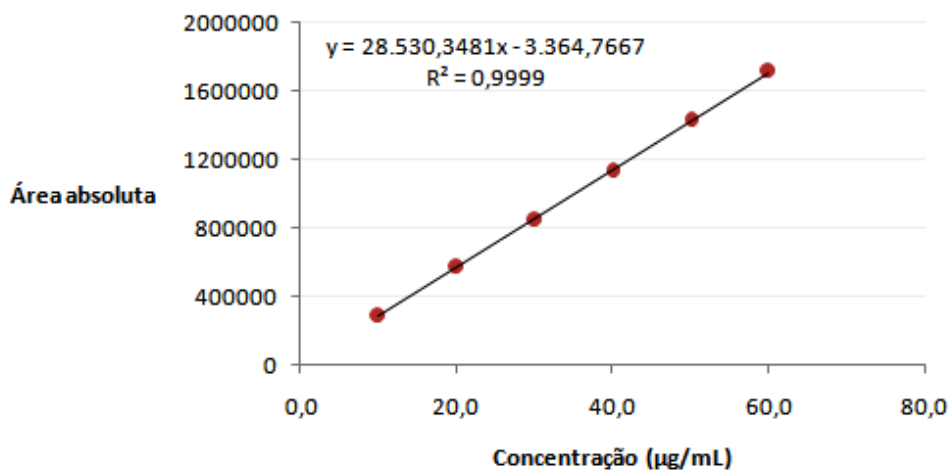


Figura 67. Curva analítica de soluções de darunavir MP, em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL, obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 28.530,3x - 3.364,8$, com R^2 igual a 0,9999 e r igual a 0,9999 para o darunavir MP.

A validade da regressão linear da curva analítica média obtida foi calculada através da ANOVA dos valores das áreas determinadas na obtenção da curva analítica do darunavir por CLAE relacionadas na Tabela 42.

Tabela 42. Análise de variância das áreas obtidas na curva analítica do darunavir por cromatografia líquida de alta eficiência

Fontes de Variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab (0,05)
Entre concentrações	5	$4,3 \times 10^{12}$	$8,5 \times 10^{11}$	231,59*	3,11
Regressão Linear	1	$4,3 \times 10^{12}$	$4,3 \times 10^{12}$	1157,78*	4,75
Desvio de Linearidade	4	$7,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	0,05	3,26
Dentro (Resíduo)	12	$3,7 \times 10^9$	$3,1 \times 10^8$	-	-
Total	17	$4,3 \times 10^{12}$	-	-	-

*significativo para $p < 5\%$

Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 1,13 µg/mL e 3,43 µg/mL, respectivamente.

Especificidade

As Figuras de 68 a 73 mostram, respectivamente, os cromatogramas obtidos nas degradações em meio ácido, básico, oxidativo e térmico em banho a 80 °C por 2, 4 e 8 horas e degradação da solução de CI na concentração de 40 µg/mL pelas exposições à luz UVB a 25 °C e ao calor seco a 35 °C, ambos também, por 2, 4 e 8 horas.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

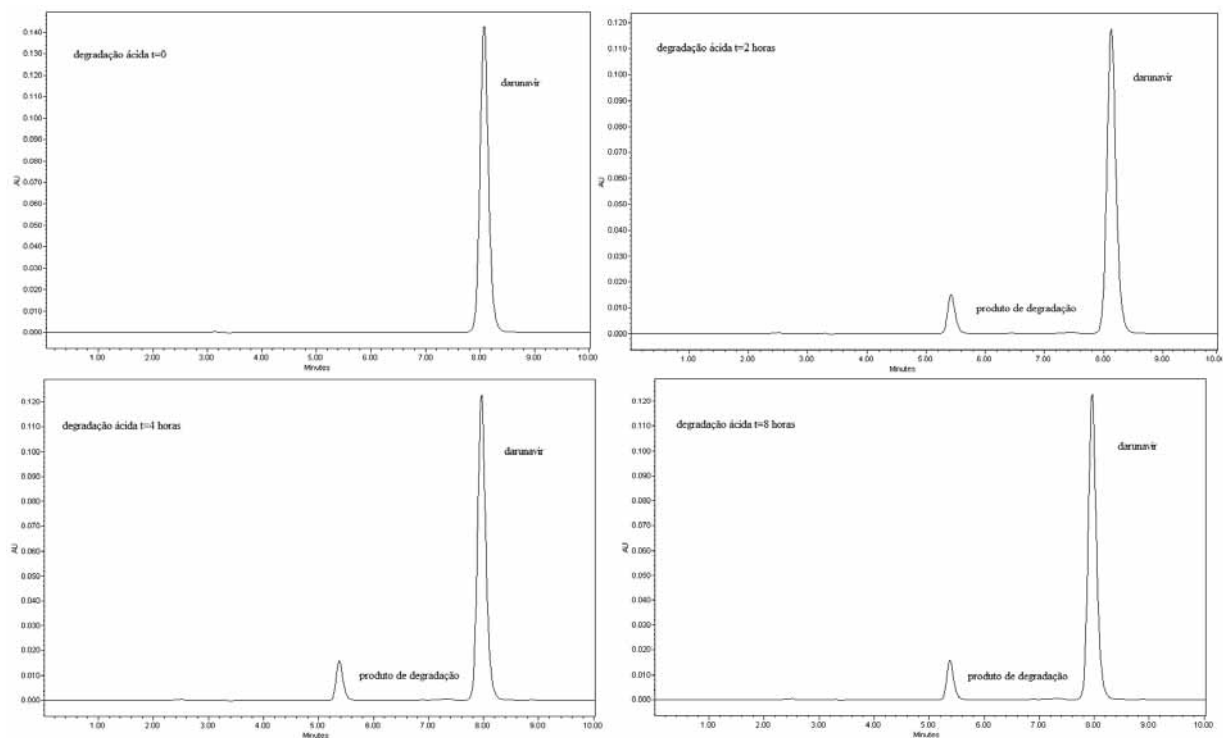


Figura 68. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio ácido na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,01 M após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

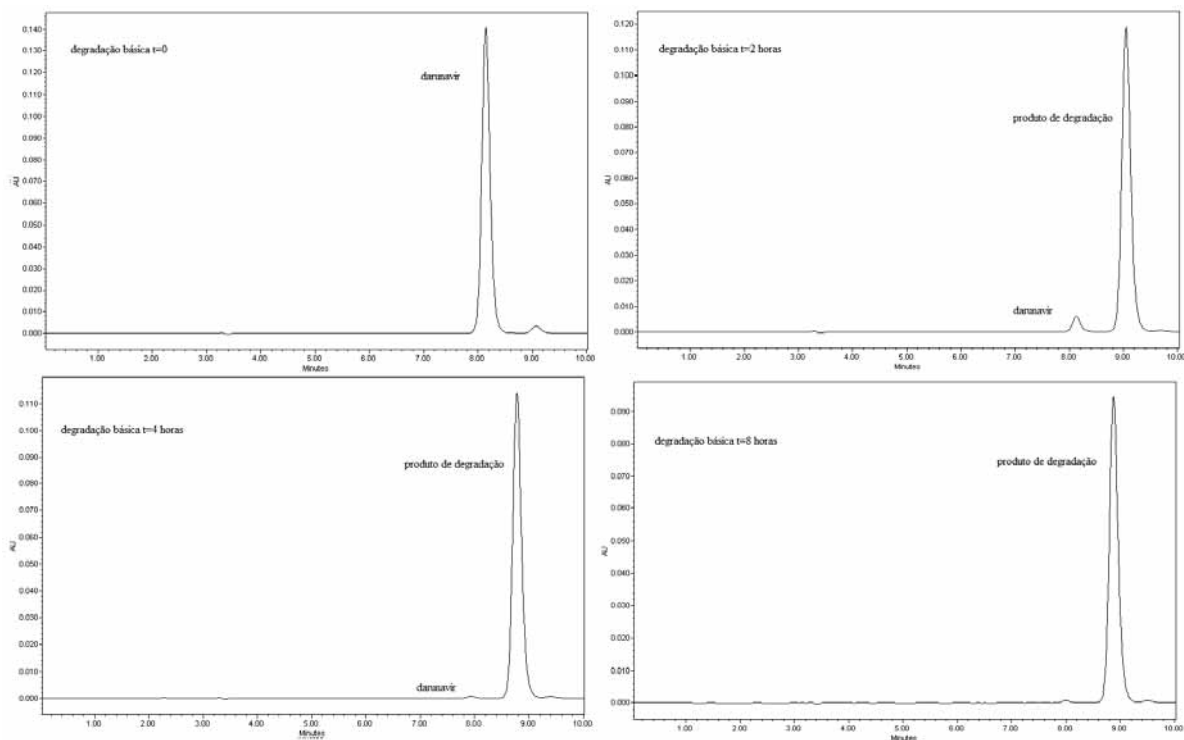


Figura 69. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio básico na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,01 M após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

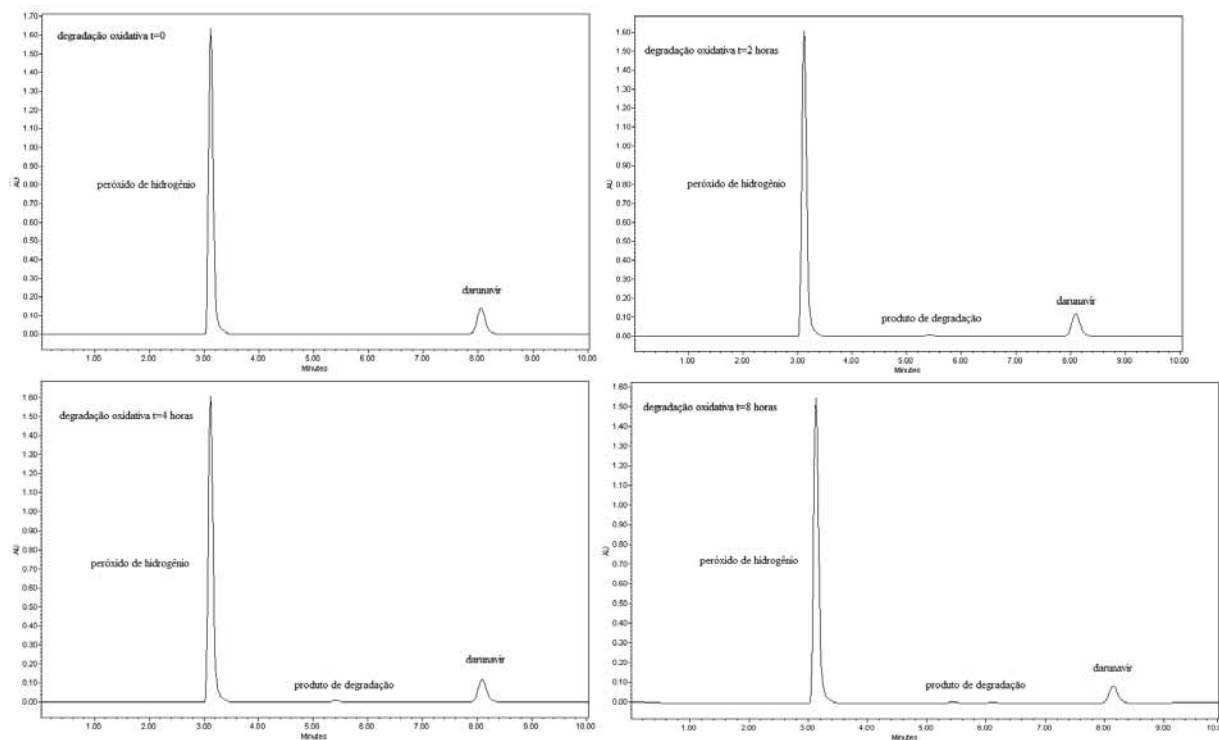


Figura 70. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio oxidativo na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O_2 3% após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

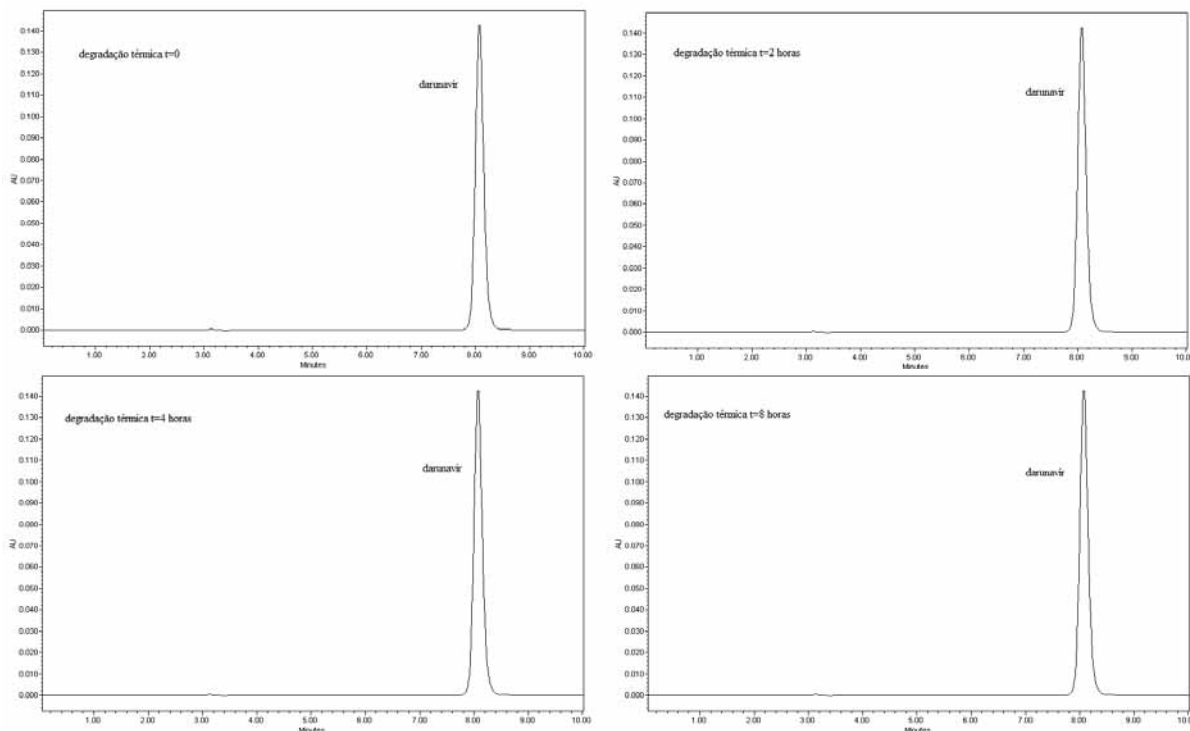


Figura 71. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio térmico na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada após 2, 4 e 8 horas em banho a 80 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

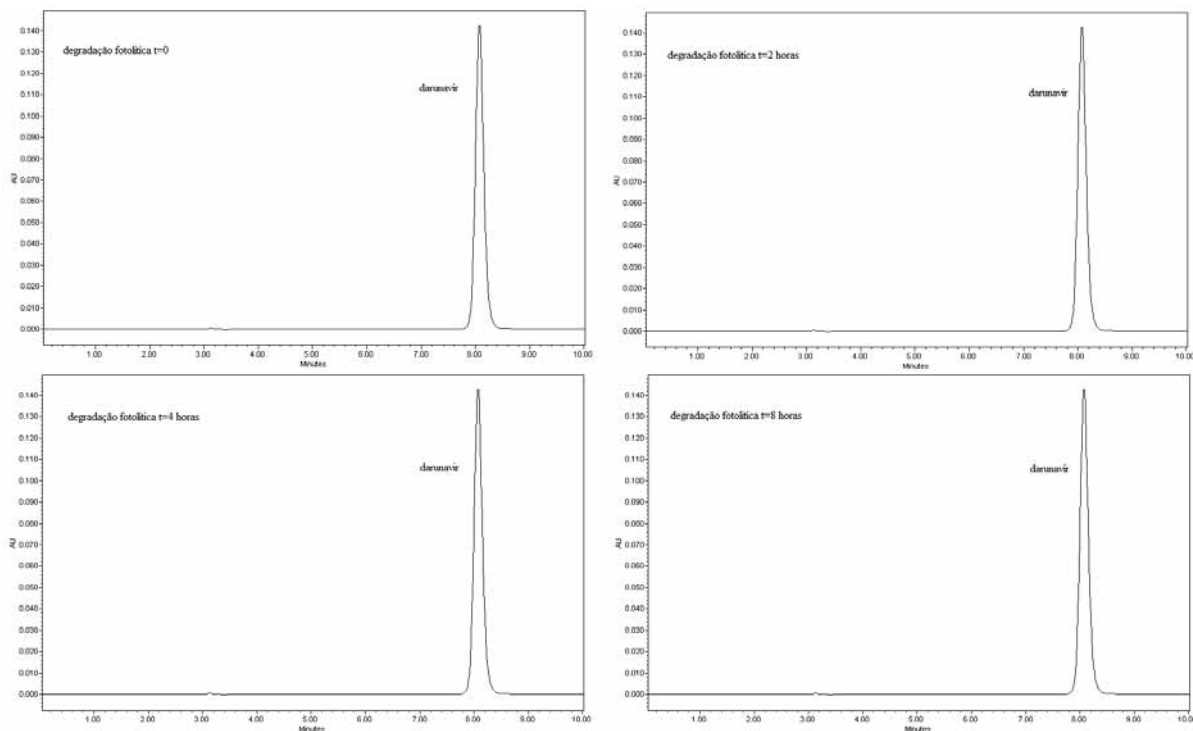


Figura 72. Cromatogramas da degradação fotolítica do complexo de inclusão na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada após 2, 4 e 8 horas em luz UV a 25 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

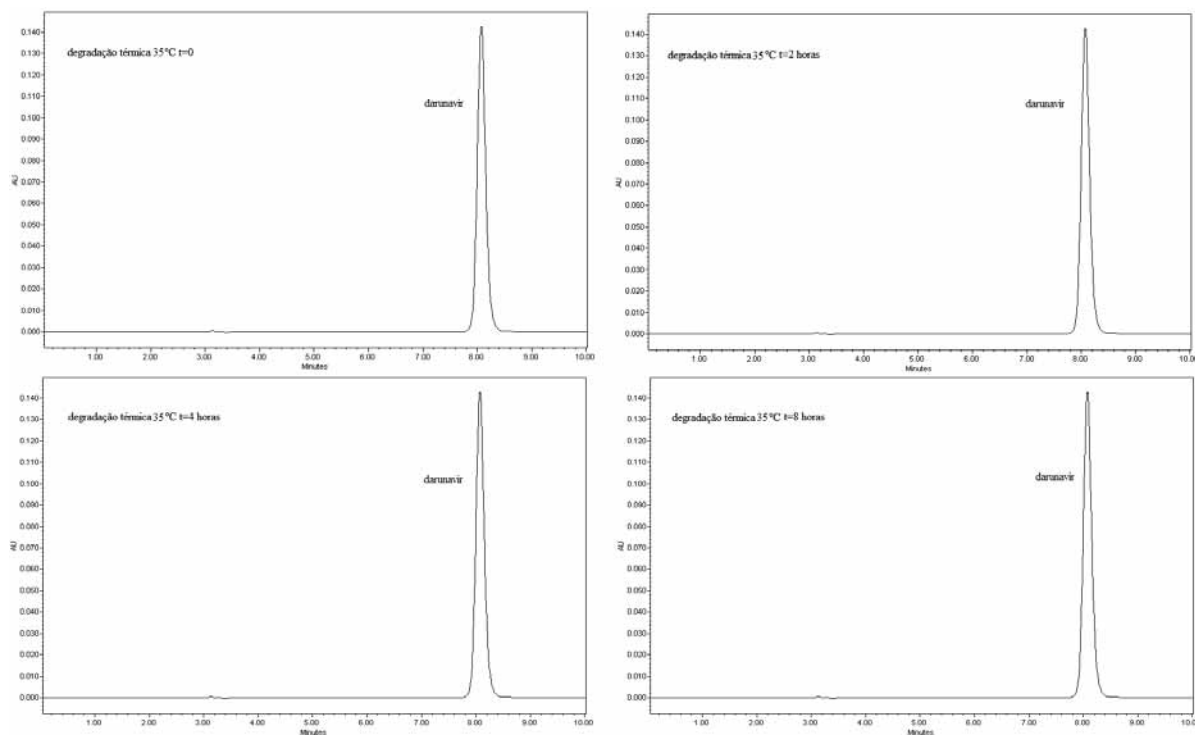


Figura 73. Cromatogramas da degradação do complexo de inclusão em meio neutro na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada após 2, 4 e 8 horas em calor seco a 35 °C utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial : ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 268 nm.

Precisão

As precisões intradia e interdia foram realizadas através da repetibilidade e da precisão intermediária, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 43.

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Tabela 43. Valores determinados para o parâmetro precisão do darunavir etanolato MP pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência

Comprimento de onda	Nível	Área do pico						DPR (%)
		1	2	3	4	5	6	
268 nm	Repetibilidade	1137578	1116486	1142957	1123887	1115820	1155258	1,46 (n=6)
	Precisão Intermediária	1149269	1103915	1125696	1112965	1125154	1141613	1,90 (n=12)
		1108961	1127874	1130446	1163747	1170600	1154273	

Exatidão

A Tabela 44 mostra os valores obtidos no teste de recuperação para o darunavir utilizando CLAE.

Tabela 44. Valores obtidos no teste de recuperação do darunavir utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência

	darunavir MP adicionada (µg/mL)	darunavir MP recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	12	12,07	100,59		
R2	20	19,99	99,97	99,88	1,21
R3	28	27,75	99,10		

Doseamento

O doseamento foi realizado através da comparação das áreas absolutas obtidas na análise das soluções de darunavir etanolato MP e CI, ambas na concentração de 40 µg/mL. Os resultados encontram-se na Tabela 45.

Tabela 45. Valores determinados para o doseamento de darunavir no complexo de inclusão pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência

Dia	Conteúdo de darunavir ^a		Média	DPR (%)
	µg/mL	%		
1	40,65	101,62		
2	39,25	98,12	99,82	1,76
3	39,90	99,74		

^acada valor corresponde a média de seis determinações

CAPÍTULO VIII – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE DARUNAVIR NO COMPLEXO DE INCLUSÃO

Robustez

Na análise da robustez do método por CLAE os parâmetros avaliados foram vazão, comprimento de onda, proporção de acetonitrila e proporção de ácido acético ambos utilizados no preparo da fase móvel.

A condição 1 diz que o teor de darunavir (99,82 %, média do valor obtido na análise de doseamento) deve estar entre 94,83 % (99,82 % - 5 %) e 104,81 % (99,82 % + 5 %). A condição 2 diz que $A-a$, $B-b$, $C-c$ e $D-d$ devem ser menores que 2,99 (3 % de 99,82 %). O método é considerado robusto se as condições 1 e 2 forem atendidas (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos estão representados nas Tabelas 46 e 47 e as condições cumpriram com os critérios de aceitação.

Tabela 46. Teor de darunavir determinado a partir das oito condições de “s” a “z” para a avaliação da robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência

	s	t	u	v	w	x	y	z
A/a	269 nm	269 nm	269 nm	269 nm	267 nm	267 nm	267 nm	267 nm
B/b	0,98 mL/min	0,98 mL/min	1,02 mL/min	1,02 mL/min	0,98 mL/min	0,98 mL/min	1,02 mL/min	1,02 mL/min
C/c	39 %	41 %	39 %	41 %	39 %	41 %	39 %	41 %
D/d	0,95 %	0,95 %	1,05 %	1,05 %	1,05 %	1,05 %	0,95 %	0,95 %
Teor (%)	98,54	100,27	95,97	96,68	100,87	101,35	97,53	98,90

Tabela 47. Parâmetros de Youden and Steiner para a análise de robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência

Teor de darunavir ^a (%)	Diferença	Robustez	Média (%)	DP	DPR (%)
A 97,86	a 99,66	- 1,80	98,76	0,98	0,99
B 100,26	b 97,27	2,99			
C 98,23	c 99,30	- 1,07			
D 98,81	d 98,72	- 0,09			

^ade acordo com as Equações de 32 a 39

8.4.4. Discussão

O darunavir não apresenta monografia descrita nos compêndios oficiais (F. PORTUGUESA, 2005; F. BRAS, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2011;

FARMACOPEIA JAPONESA, 2011; BP, 2012; USP 35, 2012). Na literatura existem métodos para quantificação do darunavir e outros antirretrovirais em plasma, sangue, saliva, tecidos e forma farmacêutica utilizando CLAE. No entanto, não há métodos de análise descritos para a quantificação de darunavir no complexo darunavir: β -CD.

A proposta, então, foi desenvolver e validar um método de CLAE com detecção UV para a quantificação de darunavir no CI objetivando otimizar a constituição da fase móvel, diminuir o desgaste da coluna, o tempo de análise e o gasto de reagentes.

A avaliação crítica dos métodos de CLAE revelou que a especificidade e a resolução de todas as impurezas e produtos de degradação conhecidas eram a maior preocupação, as quais seriam requisitos essenciais para a determinação de impurezas. Além disso, a utilização de alta concentração de reagente de par iônico na fase móvel reduz significativamente a vida útil da coluna, resultando em análises de rotina caras. Portanto, sentiu-se a necessidade de desenvolver métodos de CLAE simples, eficientes, sensíveis, seletivos e baratos (THOMAS *et al.*, 2012).

Torna-se cada vez mais interessante para as indústrias farmacêuticas a utilização de métodos simples e fáceis de execução, rápidos, precisos e exatos no Controle de Qualidade de fármacos e medicamentos.

Entre os modernos métodos de análise, a CLAE ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

No desenvolvimento do método de CLAE para o darunavir etanolato foram testadas concentrações que variaram de 1 a 60 $\mu\text{g/mL}$. Foram escolhidas as concentrações de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$, coluna Luna CN de 250 mm por 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 μm pois quanto menor o tamanho da partícula e maior o comprimento da coluna aumenta-se o número de pratos e fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético glacial e ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v). A adição do ácido fez com que as interações secundárias diminuíssem e o pico retido fosse mais adequado para o desenvolvimento e validação do método.

Os resultados obtidos na validação do método demonstraram que as soluções de darunavir etanolato apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, no intervalo utilizado.

Os gráficos de concentração *versus* área absoluta foram plotados e demonstraram linearidade na faixa de 10 a 60 µg/mL. A equação da reta para o darunavir foi $y = 28530x - 3364,8$, com coeficiente de correlação de 0,9999. Os dados de linearidade foram validados pela ANOVA que demonstrou regressão linear significativa e desvio de linearidade não significativo ($p < 0,05$).

A precisão pode ser confirmada pela média do valor obtido para o teste de precisão intradia de 1131998 e a não diferença estatisticamente significativa, ao nível de significância de 5 %, entre as médias dos valores obtidos no teste de precisão inter-analista (1134543), validando assim a precisão do método de CLAE para análise do CI.

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do darunavir no CI formado ($LD = 1,13 \mu\text{g/mL}$ e $LQ = 3,43 \mu\text{g/mL}$) indicam a sensibilidade do método para a determinação do fármaco.

A especificidade do método pode ser determinada com a adição de impurezas e produtos de degradação, obtidos experimentalmente ou induzindo a sua formação (ERMER, 2001). O CI foi submetido à degradação em meio ácido, alcalino, oxidativo, neutro e fotolítico. Nos três primeiros meios de degradação houve maior decréscimo da área absoluta do pico de darunavir e nos dois últimos menor susceptibilidade do fármaco, confirmando a especificidade do método. Estes estudos de degradação forçada mostraram o comportamento do fármaco perante a água purificada em banho a 80 °C, luz UVB a 25 °C e calor seco a 35 °C, bem como em HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, H₂O₂ 3 % todos em banho a 80 °C.

O estudo de degradação forçada permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada; verifica a pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo no medicamento; fornece informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto; avalia os fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento e permite uma análise crítica do perfil de degradação do medicamento (BRASIL, 2013).

Análises utilizando DAD e espectrômetro de massas foram realizadas. Através de seus resultados, nenhum componente coeluiu com o darunavir. Desta forma, sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser utilizado nos estudos de estabilidade.

O DAD possui algumas vantagens em relação ao detector UV. Neste, o comprimento de onda é selecionado e nem sempre é o mais adequado para todos os componentes, o que resulta na perda de sensibilidade de alguns. Com o DAD, é possível selecionar o melhor comprimento de onda para cada um dos componentes, otimizando dessa forma a sensibilidade. Isso é extremamente importante no controle de qualidade dos produtos farmacêuticos.

Na maioria dos casos, os degradantes primários são mais importantes do que os degradantes secundários e terciários. Obsessão nos degradantes minoritários causa “dor de cabeça” no desenvolvimento de métodos desnecessários.

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação da exatidão de processos analíticos (BRITO *et al.*, 2003).

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

A concentração do darunavir no ensaio de exatidão esteve entre 12,0 e 28,0 % e, neste caso, o intervalo aceitável de recuperação é de 98 a 102 %. Dessa forma, o método pode ser considerado exato por apresentar média de 99,88 %.

A robustez indica a capacidade do método analítico em fornecer resultados reprodutíveis quando sujeito a pequenas alterações. O conjunto de parâmetros testados não apresentou mudanças significativas nos teores de darunavir. Assim, o método pode ser considerado robusto.

A quantidade de darunavir etanolato presente no complexo de inclusão analisado foi de 99,82 %.

8.4.5. Conclusão

Os parâmetros estudados para a validação do método de CLAE atenderam às especificações para a adequada quantificação do darunavir no complexo de inclusão formado.

9. CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

9.1. Introdução

Em 1967, ano que marcou o início do “Velho Mundo” da história da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), a ionização ocorria no vácuo. Um ano depois iniciaria o “Novo Mundo” da história da CL-EM e a ionização seria realizada à pressão atmosférica. Na história da CL-EM, a divisão entre estas duas abordagens persistiria por quase duas décadas até que alguns exploradores do “Velho Mundo” finalmente atravessariam o tempo.

Nos anos que antecederam o desenvolvimento de um verdadeiro sistema CL-EM, McFadden disse que o trabalho capilar de espectro de massas (EM) feito por Tal'Rose, em 1967, era incompatível com os sistemas de CL, porque ele acreditava que para se ter uma boa CL era necessário bombeamento de 1 mL/min através de colunas de 4,6 mm, o que resultava em um grande volume para ir do estado líquido para o gasoso. Desta maneira foi lançado o desafio: Quem seria o primeiro a resolver a incompatibilidade fundamental entre o mundo da fase gasosa de EM e o mundo da fase líquida de CL? Quando o “Velho Mundo” da ionização baseada em vácuo e do “Novo Mundo” de ionização a pressão atmosférica, finalmente, se uniram, tudo mudou radicalmente (BOSCO, 2010).

Técnicas combinadas, como a cromatografia líquida com espectrometria de massas, evoluíram como ferramentas versáteis para a caracterização de impurezas de fármacos, produtos de degradação, metabólitos, poluentes ambientais e contaminantes alimentares (MODHAVE *et al.*, 2011).

A presença de impurezas em fármacos pode ter um impacto significativo na qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. Esforços devem ser feitos para identificar e caracterizar todas as impurezas desconhecidas no fármaco, devido à crescente demanda das agências reguladoras para a fabricação de fármacos de elevada pureza.

O perfil de impureza de fármacos é uma das questões mais importantes na moderna análise farmacêutica para o desenvolvimento de tecnologia de processo para a fabricação de substâncias de alta pureza.

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

No presente capítulo serão apresentados os estudos de CL-EM para a caracterização de produtos de degradação do complexo darunavir: β -ciclodextrina formados sob várias condições de estresse, uma vez que o teste de estresse é uma perspectiva do QbD, como pode ser visto no esquema da Figura 74.

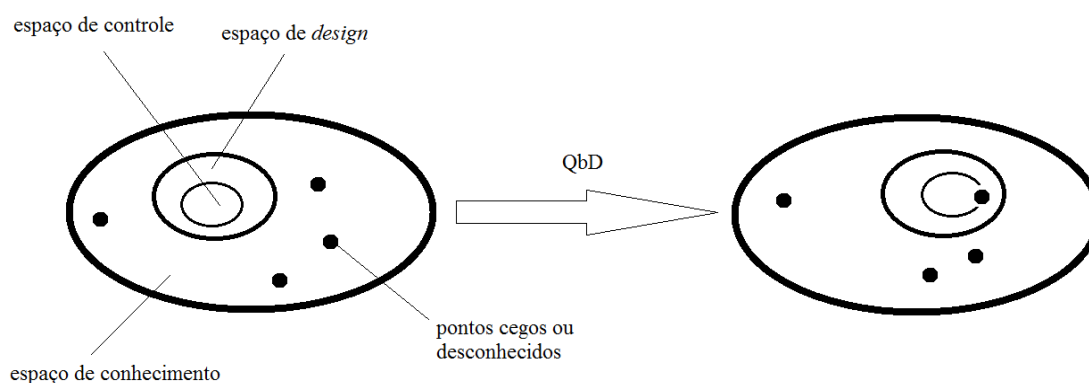


Figura 74. Importância do teste de estresse: uma perspectiva do QbD.

O espaço de *design*, ilustrado na Figura 74, ajuda a entender e a obter conhecimento sobre um processo para encontrar uma região paramétrica de robustez confiável para o seu desempenho futuro (ICH, 2009). Nele está contido o espaço de controle, o qual deve contemplar os pontos cegos ou desconhecidos de uma análise, para que não haja surpresas desagradáveis.

Um estudo de estresse bem desenhado tem o potencial de preencher a lacuna de conhecimento na degradação do fármaco.

9.2. Parte Experimental

9.2.1. Material

O material utilizado foi o CI darunavir: β -CD, cuja a obtenção está descrita no capítulo VI.

9.2.2. Método

Para a caracterização dos possíveis produtos de degradação do complexo darunavir: β -CD, as amostras foram pesadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]).

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Para o preparo das amostras foram pesados 29,12 mg de CI e transferidos para balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo solução estoque de 4000 µg/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 2,5 mL e transferidas para balões volumétricos de 10 mL para a preparação das soluções com concentração de 1000 µg/mL, completando-se o volume com HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M e H₂O₂ 3%, separadamente.

A degradação forçada do CI foi realizada pela adição de soluções de HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M e H₂O₂ 3% submetidas a banho na temperatura de 80 °C. Alíquotas destas soluções foram retiradas após 8 horas e analisadas por CL-EM.

No entanto, antes das amostras serem injetadas no cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas foram, separadamente, aplicadas em placa preparativa de CCD, ativadas em estufa a 105 °C por uma hora, para remoção da β-ciclodextrina.

Procedeu-se a saturação da cuba de vidro com o sistema de fase móvel composto de uma mistura de água purificada e álcool metílico na proporção de 70:30 (v/v), ajustado para pH 2,4 com ácido acético glacial. Com auxílio de um capilar, foram transferidas as amostras para a placa. Após a migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, deixando o solvente evaporar. Em câmara UVA a 365 nm, as manchas foram demarcadas com o auxílio de uma espátula de ponta fina. Em seguida, as manchas foram raspadas e colocadas em um frasco de vidro (um para cada condição), no qual foi adicionado álcool metílico. Foi homogeneizado e mantido em repouso para decantar a sílica. O sobrenadante foi seco em vapor de nitrogênio e adicionado 200 µL da mistura água e álcool metílico (1:1, v/v), filtrado em membrana de poro 0,22 µm e injetado no CL-EM.

A análise de CL-EM foi realizada no sistema de CL Shimadzu[®] conectado a um espectrômetro de massas *ion trap* AmaZon SL Bruker[®] operando por ionização *electrospray* em modo positivo, nitrogênio como nebulizador (60 psi) e gás de secagem (10 L/min, 320 °C). A voltagem do capilar foi ajustada para 3500 V. Foi utilizada coluna Phenomenex Luna CN 5 µm (250 x 4,6 mm). A fase móvel foi composta de água purificada e ACN (60:40, v/v). Após a estabilização do sistema, foram injetados 20 µL das soluções de CI.

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

9.3. Resultados

As amostras das degradações em meios ácido, básico e oxidativo foram submetidas à análise de CL-EM para identificar os produtos de degradação gerados.

A Figura 75 mostra o cromatograma da degradação em meio ácido, o sinal com tempo de retenção em 7,3 minutos corresponde ao darunavir e os sinais em 5,1 (A) e 6,7 (B) minutos foram atribuídos aos produtos de degradação. O EM dos sinais dos produtos de degradação exibiram m/z 588 $[M+Na]^+$ e 616 $[M+Na]^+$, respectivamente.

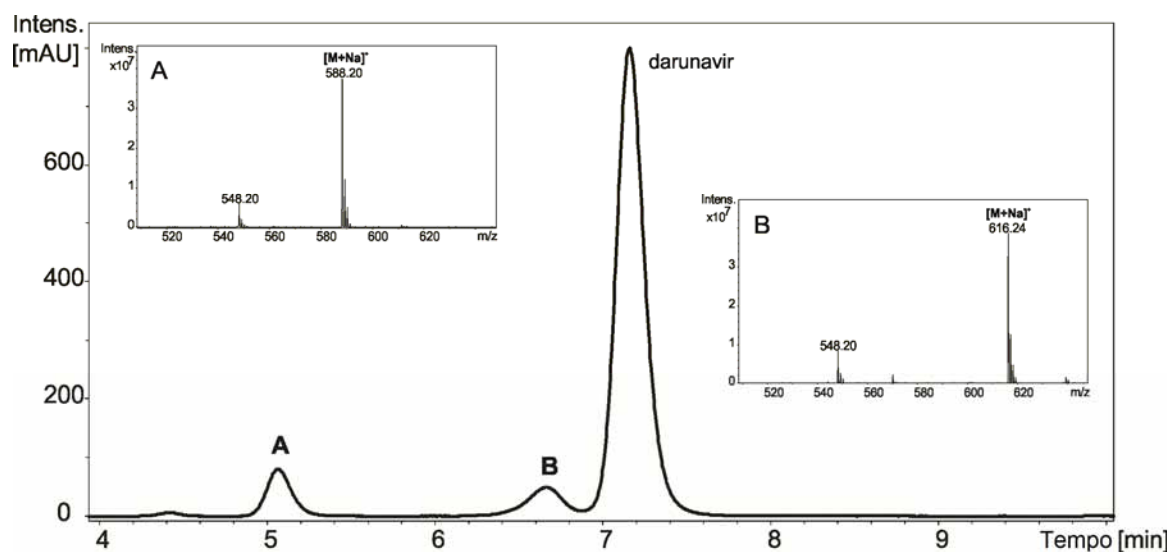


Figura 75. Cromatograma da degradação em meio ácido do complexo de inclusão utilizando HCl 0,01 M por 8 horas em banho a 80 °C. Os sinais A e B correspondem aos produtos de degradação e seus espectros de massas estão destacados.

O cromatograma da degradação em meio oxidativo (Figura 76) mostra quatro sinais. Três deles foram atribuídos aos mesmos compostos mostrados na degradação em meio ácido, uma vez que possuem o mesmo tempo de retenção e o mesmo EM. O outro produto de degradação com tempo de retenção em 5,5 (B) minutos tem m/z 604 $[M+Na]^+$, o qual foi relatado nas estruturas propostas na Figura 78.

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

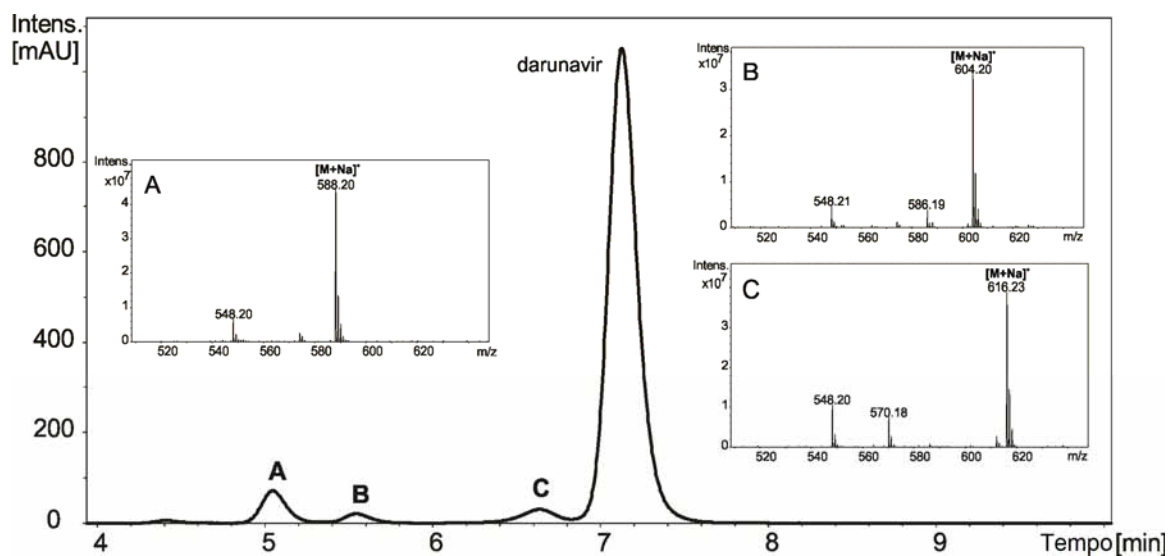


Figura 76. Cromatograma da degradação em meio oxidativo do complexo de inclusão utilizando H_2O_2 3 % por 8 horas em banho a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Os sinais A, B e C correspondem aos produtos de degradação cujos espectros de massas estão apresentados.

Na degradação em meio básico, o cromatograma apresentou dois sinais (Figura 77). Um deles refere-se ao darunavir e o sinal com tempo de retenção em 7,8 (A) minutos foi atribuído a produto de degradação. O m/z 416 $[\text{M}-\text{H}]^-$ foi observado no EM no modo negativo e a estrutura proposta está mostrada na Figura 78.

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

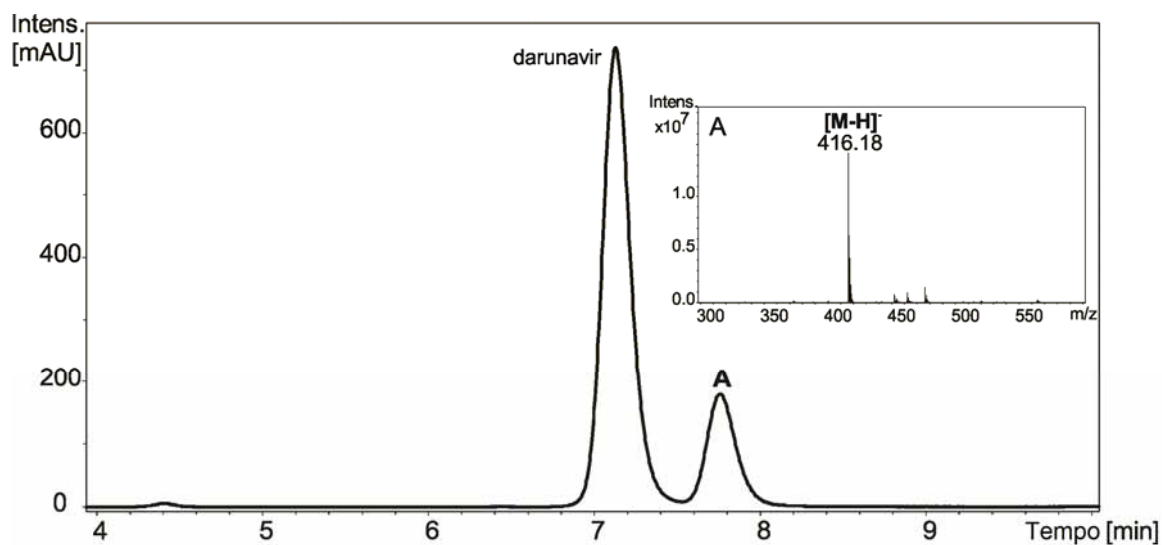


Figura 77. Cromatograma da degradação em meio básico do complexo de inclusão utilizando NaOH 0,01 M por 8 horas em banho a 80 °C. O sinal A corresponde ao produto de degradação e seu espectro de massas está destacado.

A Figura 78 mostra as estruturas propostas para os produtos de degradação.

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

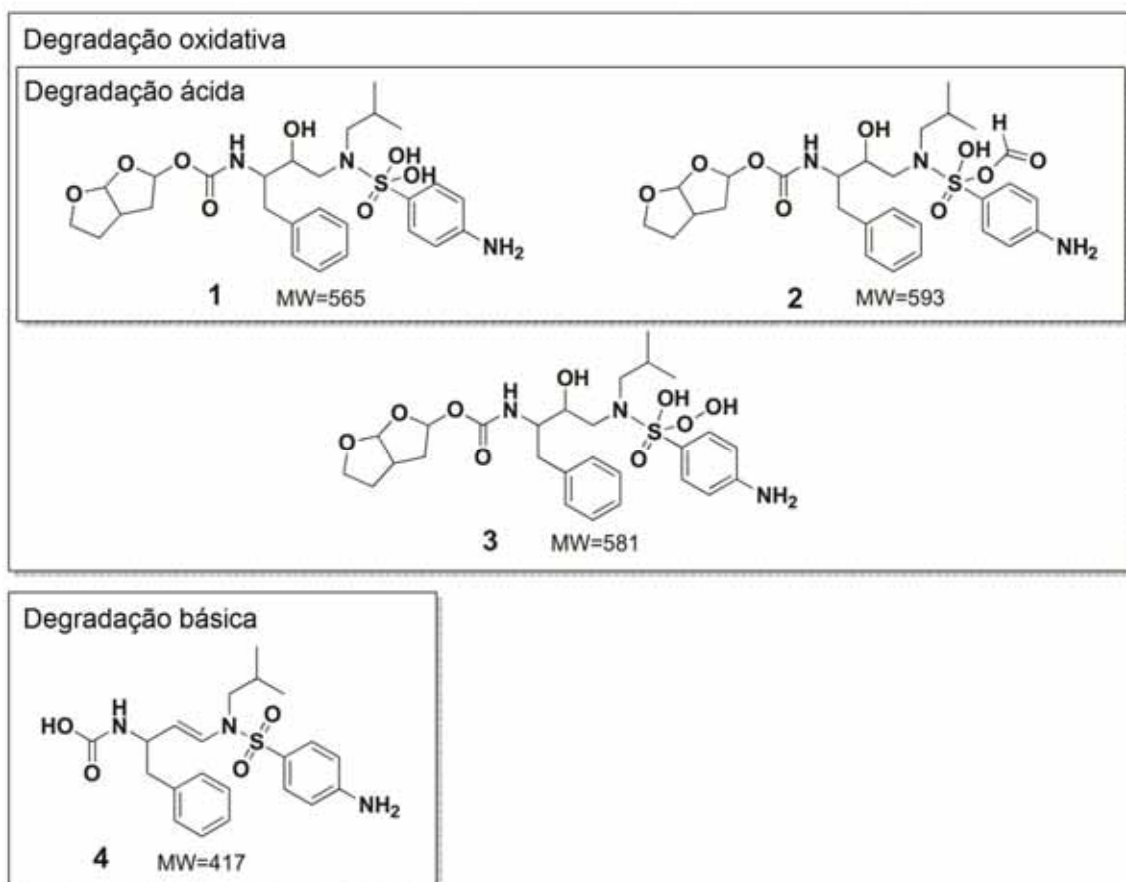


Figura 78. Proposta das estruturas baseadas nos resultados obtidos nas análises de CL-EM.

As análises de CL-EM/EM foram realizadas a fim de provar as estruturas propostas. Para todos os produtos de degradação, de 1 a 4 (Figura 78), a proposta do mecanismo de fragmentação está exposta na Figura 79.

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

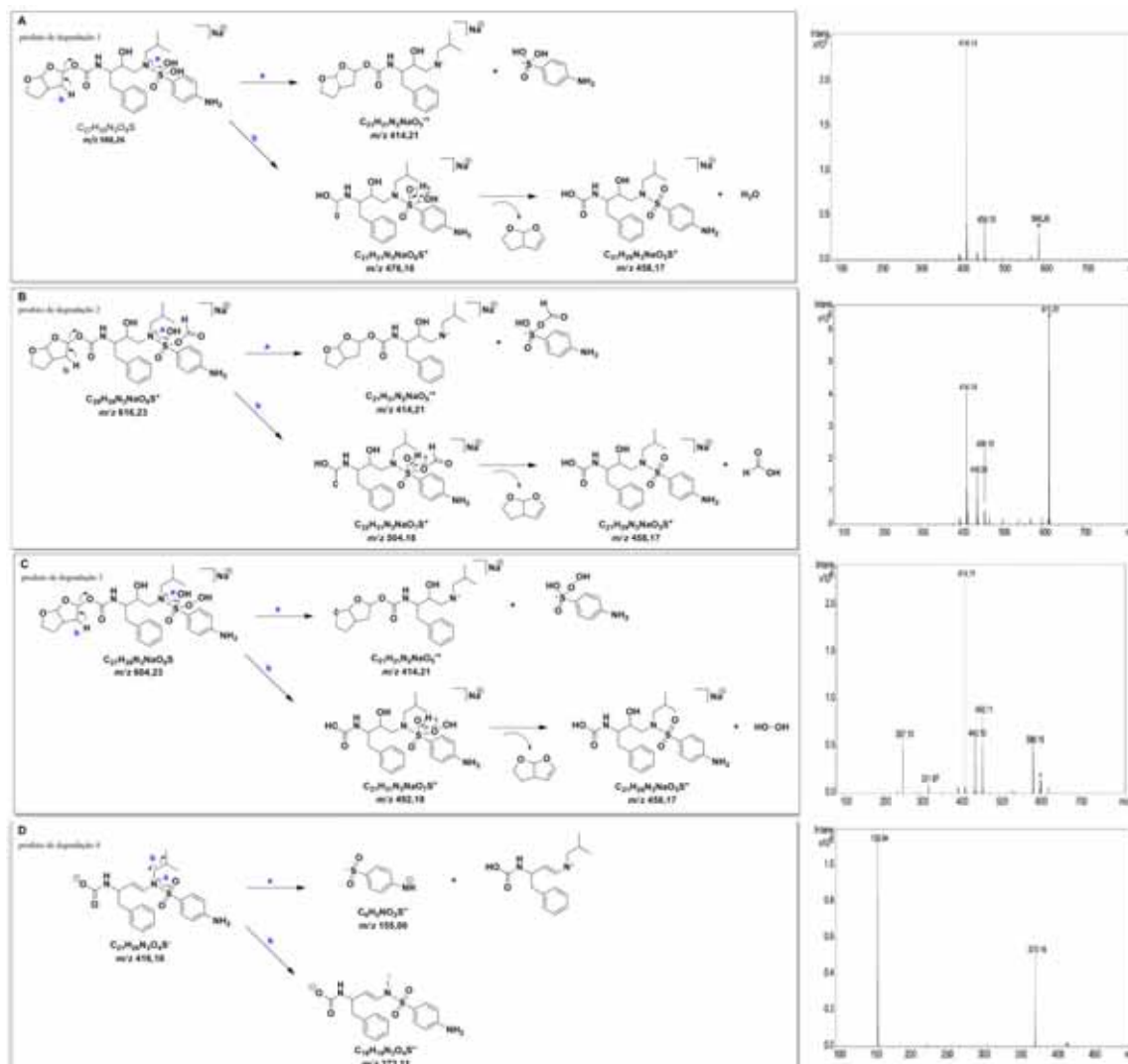


Figura 79. Rota de fragmentação proposta e espectros MS/MS mostrando a formação dos íons fragmento no EM/EM dos sais de sódio protonado dos produtos de degradação de 1 a 3 (quadros A – C, respectivamente) e desprotonado do produto de degradação 4 (quadro D).

9.4. Discussão

De acordo com os resultados, foi possível notar que os produtos das degradações ácida e oxidativa gerados envolvem o átomo de enxofre. Recentemente, foi demonstrado por espectrometria de massas com ionização *electrospray* que reações preferenciais no átomo de enxofre aumentam seu estado de oxidação em derivados de acridinas (PIGATTO *et al.*, 2011). Dessa forma, o átomo de enxofre do darunavir (molécula alvo) pode sofrer

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

adição nucleofílica no modelo da reação oxidativa resultando em diferentes produtos. O primeiro indício na EM demonstrou uma maior capacidade coordenativa pelos produtos de degradação. Isto foi associado pela presença de íons adutos de sódio e potássio, e a molécula protonada não foi logo observada. Na verdade, pode-se explicar pelo aumento do número de heteroátomo próximo ao reforço da capacidade de coordenação.

Estudos sistemáticos de poliéster mostram que, quando os sítios de coordenação eram mais do que cinco átomos os adutos formados eram extremamente estáveis. Em alguns casos, mesmo com redução de pH drástica ou aumento da fonte de energia, podem deslocar o equilíbrio químico para gerar compostos protonados (LOPES *et al.*, 2002a; LOPES *et al.*, 2002b).

Desta forma, estas informações reforçam o fato de que a oxidação do enxofre pode levar a um aumento da população de heteroátomo na região da molécula específica. Finalmente, a análise dos fragmentos dos íons mostrou que, no caso das degradações ácida e oxidativa ocorreram perdas neutras, levando às características dos principais sinais m/z 458 e 414. Assim, sugere-se que o caminho de fragmentação seja similar (Figura 79). No primeiro caso (letra a), a polarização da ligação S=O gera uma estrutura de ressonância extrema, por isso, é possível ver as migrações de elétrons e as clivagens das ligações, que pode levar à perda de um radical neutro como ocorre para outras estruturas nos experimentos de ESI-MS/MS (PIGATTO *et al.*, 2011).

Sobre o produto 4, o mecanismo de degradação foi diferente da degradação em meio ácido e oxidativa não ocorrendo no átomo de enxofre. O produto de degradação gerado sofre hidrólise no grupo carbonila e perde água por eliminação E2.

Além disso, o mecanismo de fragmentação foi um pouco diferente, porque a análise foi feita no modo negativo. Neste modo de análise por espectrometria de massas foi melhor do que no positivo para este produto, e nos ajudou a sugerir o produto de degradação da estrutura, devido ao caráter ácido. Por isso, foi útil obter a molécula desprotonada e propor o mecanismo de fragmentação, mostrado na Figura 79.

A massa/carga do produto é m/z 416, porque tem três átomos de N, mas os fragmentos são ímpares, por isso implica que a eliminação de espécies radicalares ocorrem. Neste caso, a regra do elétron não é conservada e os íons m/z 373 e 155 foram produzidos

CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

(VESSECCHI *et al.*, 2010). Desta forma, os dois caminhos propostos foram baseados nas fragmentações dos radicais que corroboram a estrutura sugerida.

9.5. Conclusão

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas permitiu identificar todos os produtos de degradação gerados por diferentes condições de degradação do complexo darunavir:β-CD.

10. INFLUÊNCIA DA CCD NA IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO COMPLEXO DARUNAVIR:β-CICLODEXTRINA

10.1. Introdução

Entre os modernos métodos de análise, a CLAE, ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas.

A CCD é uma ferramenta importante para identificar compostos, sendo de fácil execução, versátil, barata e permite verificar a presença de impurezas e produtos de degradação.

O equipamento de CLAE é caro em comparação com o custo necessário para realizar a técnica de CCD. Assim, se existe a possibilidade de identificação e investigação de produtos de degradação através da técnica de CCD, isto seria muito válido e traria mais valia ao ensaio. O desenvolvimento de métodos mais baratos ou acessíveis, confiáveis e funcionais, hoje em dia, mais e mais, é preferido na indústria farmacêutica por reduzir custos e otimizar equipamentos.

O complexo darunavir:β-CD não possui método de CCD descrito em compêndios oficiais e na literatura encontra-se apenas um trabalho descrevendo esta técnica (feito nesta tese), mas para identificar o fármaco livre (KOGAWA & SALGADO, 2013a) e não o complexo de inclusão.

A estabilidade dos medicamentos é extremamente importante para o sucesso do efeito terapêutico. Atualmente, o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade apropriados tem aumentado consideravelmente (SALEM *et al.*, 2013).

Assim, este trabalho reporta pela primeira vez um método de CCD indicativo de estabilidade que sugere a identificação do darunavir complexado à β-CD e seus produtos de degradação. Estes resultados foram comparados com os resultados obtidos pelo método de CLAE, em que seus produtos de degradação foram identificados por CL-EM.

10.2. Parte experimental

10.2.1. Material

O material utilizado foi o CI darunavir:β-CD, cuja obtenção está descrita no capítulo VI.

10.2.2. Método

Quantidades de pó equivalente a 100 mg de darunavir foram pesadas em balança analítica modelo 410 (Kern[®]) de um *pool* do CI darunavir:β-CD e transferidas para quatro balões volumétricos de 100 mL. Foram adicionados 50 mL de álcool etílico, HCl 0,01 M, NaOH 0,01M e H₂O₂ a 3 % e sonicados durante 30 minutos em banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner (Unique[®]) para completa dissolução. Em seguida, a mistura foi diluída para o volume de 100 mL com o mesmo solvente para a preparação das soluções com concentração de 1000 µg/mL.

A degradação do CI foi realizada através das soluções de HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M e H₂O₂ 3 % e submetidas a banho na temperatura de 80 °C. Alíquotas destas soluções foram retiradas após 8 horas e filtradas através de membrana de poro 0,45 µm para análise simultânea em CCD e CLAE.

A placa de sílica gel 60 F254 (20 x 20 cm) com espessura de 0,25 mm (Merck[®]) foi ativada a 105 °C durante 1 hora e, em seguida, 5 µL das amostras preparadas em álcool etílico, HCl 0,01 M, NaOH 0,01M e H₂O₂ a 3 % foram aplicadas na placa. Logo, procedeu-se a saturação da cuba de vidro com o sistema de fase móvel consistindo em água purificada e álcool metílico, (70:30 v/v), ajustado para pH 2,4 com ácido acético glacial. Após a migração da fase móvel, a placa foi removida da cuba de vidro para permitir a evaporação do solvente. As placas foram visualizadas em câmara UVA a 365 nm para avaliação das manchas e determinação do R_f do darunavir e de seus produtos de degradação. O valor de R_f foi obtido de acordo com a Equação V.

A análise cromatográfica foi realizada no sistema de CL Shimadzu[®] com coluna Phenomenex[®] CN Luna (250 x 4,6 mm) conectado a um espectrômetro de massas *ion trap* AmaZon SL Bruker[®] operando por ionização *electrospray* em modo positivo, nitrogênio como nebulizador (60 psi) e gás de secagem (10 L/min, 320 °C). A alta voltagem capilar foi ajustada para 3500 V. A fase móvel foi uma mistura de água + 0,1 % de ácido acético

CAPÍTULO X – INFLUÊNCIA DA CCD NA IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO COMPLEXO DARUNAVIR:β-CICLODEXTRINA

glacial e ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v), vazão de 1,0 mL/min, comprimento de onda fixo em 268 nm e volume de injeção de 20 µL.

10.3. Resultados

Os valores de R_fs obtidos após a migração cromatográfica foram de 0,66 para o darunavir, 0,73 e 0,76 para os produtos de degradação em meio ácido, 0,53 para os produtos de degradação em meio básico e 0,71, 0,75 e 0,84 para os produtos de degradação em meio oxidativo.

Os perfis cromatográficos das amostras após visualização na câmara UVA a 365 nm podem ser observados na Figura 80.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pode ser visualizado tanto nas placas de CCD, R_f=0,37, como nos cromatogramas da CLAE, t_R= 3,2 min.

Na análise de CCD proposta foram observados os mesmos produtos de degradação obtidos no método de CLAE previamente realizado (Figura 81). Em ambos os métodos foram encontrados dois produtos de degradação derivados da condição ácida (t_R=5,1 e 6,7 minutos), um da condição básica (t_R=7,8 minutos) e três da condição oxidativa (t_R=5,1, 5,5, 6,7 minutos).

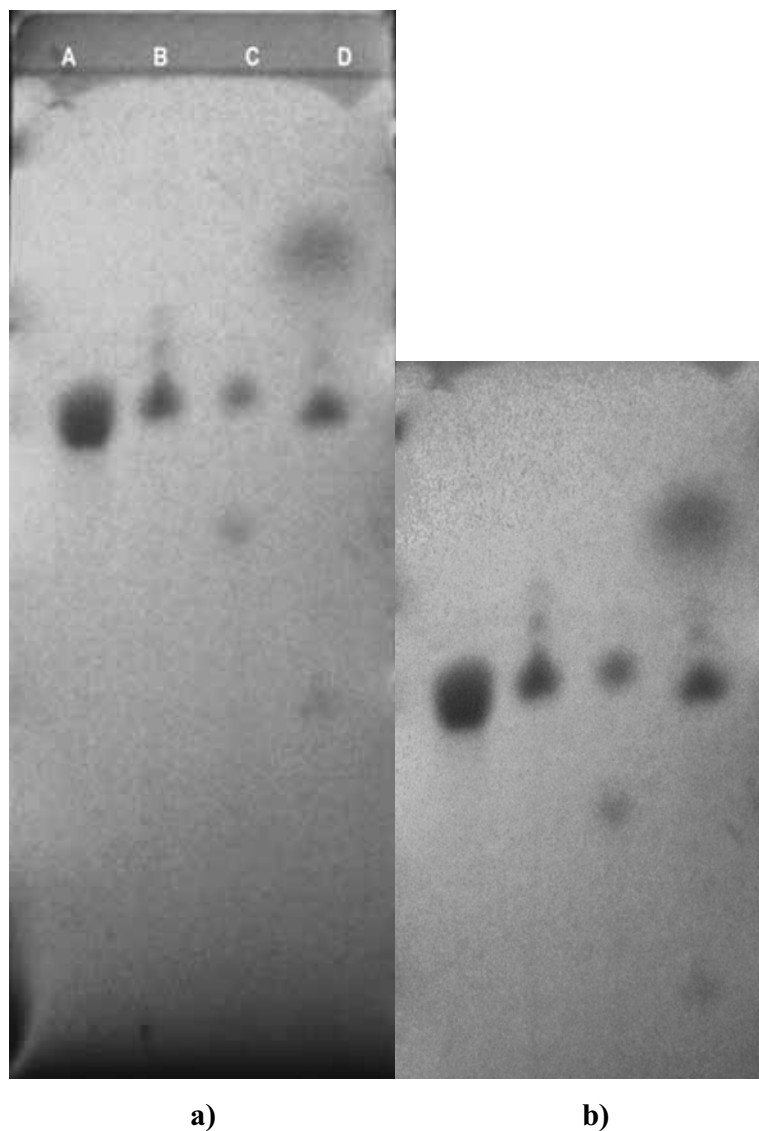


Figura 80. CCD do darunavir:β-CD após condições de estresse na concentração de 1 mg/mL utilizando água purificada e álcool metílico, 70:30 (v/v) ajustado para pH 2,4 com ácido acético glacial como fase móvel. **a)** (A) darunavir $R_f=0,66$; (B) darunavir $R_f=0,67$ e produtos de degradação em meio ácido com $R_f=0,73$ e $0,76$; (C) produtos de degradação em meio básico com $R_f=0,53$ e darunavir $R_f=0,67$; (D) H_2O_2 $R_f=0,37$; darunavir $R_f=0,67$ e produtos de degradação em meio oxidativo com $R_f=0,71$; $0,75$ e $0,84$; **b)** ampliação das manchas observadas.

CAPÍTULO X – INFLUÊNCIA DA CCD NA IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO COMPLEXO DARUNAVIR:β-CICLODEXTRINA

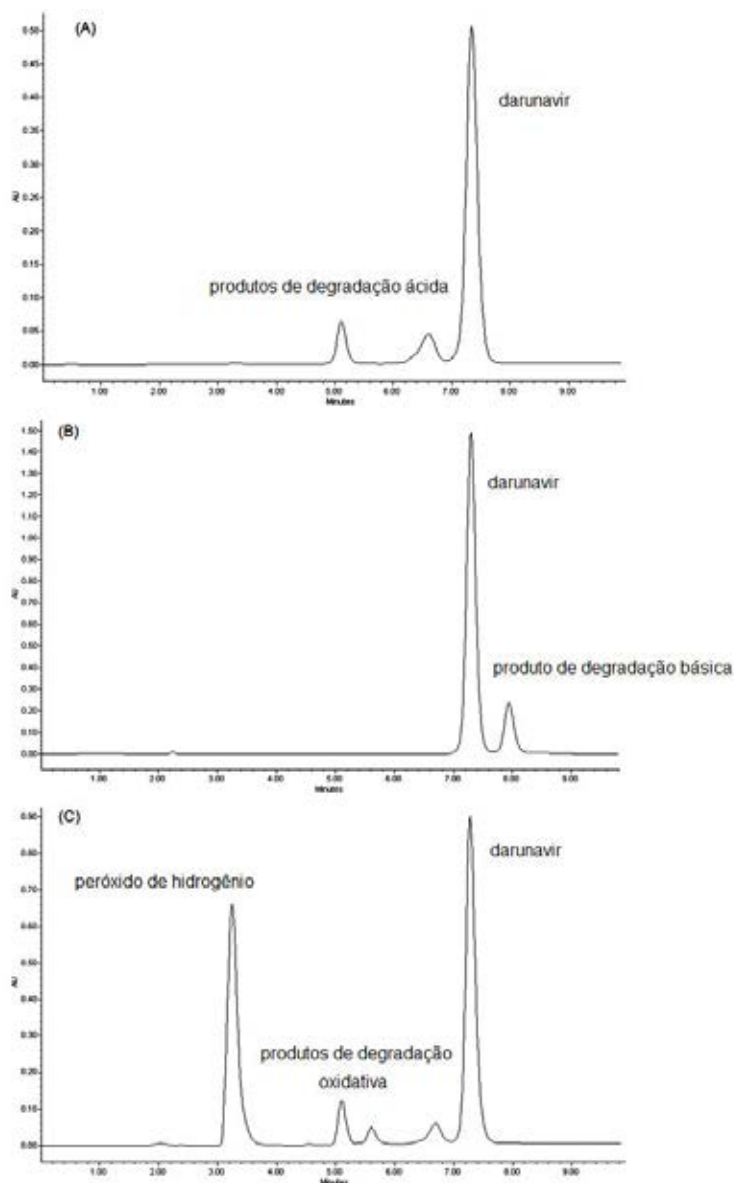


Figura 81. Produtos de degradação em meio ácido, básico e oxidativo do complexo darunavir:β-CD na concentração de 1 mg/mL obtidos por CLAE utilizando água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial e ACN + 0,1 % de ácido acético glacial na proporção de 60:40, v/v como fase móvel. (A) produtos de degradação em meio ácido com tR=5,1 e 6,7 minutos, (B) produto de degradação em meio básico com tR=7,8 minutos, (C) H₂O₂ tR=3,2 minutos e produtos de degradação em meio oxidativo com tR=5,1, 5,5 e 6,7 minutos.

CAPÍTULO X – INFLUÊNCIA DA CCD NA IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO COMPLEXO DARUNAVIR:β-CICLODEXTRINA

Amostras das degradações em meio ácido, básico e oxidativo foram submetidas à análise de CL-EM para identificar os produtos de degradação gerados (Tabela 48). A degradação em meio ácido gerou dois produtos, o primeiro mostrou m/z 588 $[M+Na]^+$ e o outro 616 $[M+Na]^+$. Dois dos três produtos de degradação em meio oxidativo mostraram o mesmo tempo de retenção dos produtos da degradação em meio ácido e o mesmo m/z 588 $[M+Na]^+$ e o outro 616 $[M+Na]^+$. O terceiro apresentou m/z 604 $[M+Na]^+$. A degradação em meio básico gerou um produto com m/z 416 $[M-H]^-$ (observado no EM no modo negativo).

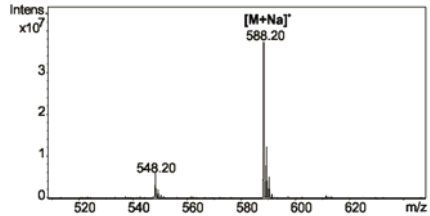
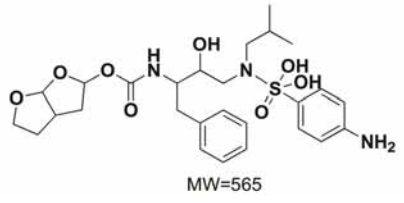
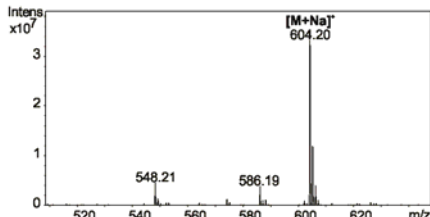
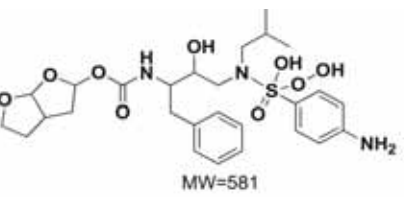
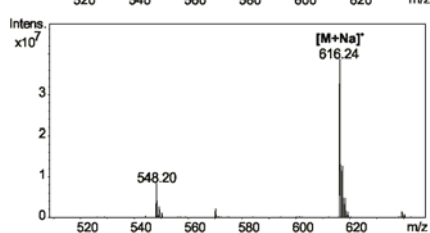
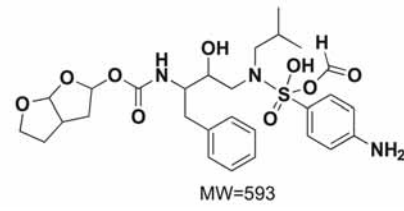
Tabela 48. Espectro de CL-EM e estruturas propostas dos produtos de degradação do complexo darunavir:β-CD

Produto de degradação	Espectro de massas	Estruturas propostas
Ácido $t_R = 5,1$ min		
Ácido $t_R = 6,7$ min		
Básico $t_R = 7,8$ min		

Continua na próxima página

CAPÍTULO X – INFLUÊNCIA DA CCD NA IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO COMPLEXO DARUNAVIR:β-CICLODEXTRINA

Tabela 48 (continuação). Espectro de CL-EM e estruturas propostas dos produtos de degradação do complexo darunavir:β-CD

Produto de degradação	Espectro de massa	Estruturas propostas
Oxidativo $t_R = 5,1$ min		 MW=565
Oxidativo $t_R = 5,5$ min		 MW=581
Oxidativo $t_R = 6,7$ min		 MW=593

O valor de R_f da técnica de CCD para o darunavir e seus produtos de degradação foram analisados para mostrar que seus valores são estatisticamente diferentes. Os resultados foram analisados por teste t de *Student* (Tabela 49) e confirmaram a diferença entre as manchas.

Tabela 49. Comparação estatística dos resultados das manchas obtidas na técnica de CCD para o darunavir e seus produtos de degradação no CI

Produtos	R_f	Teste t de <i>Student</i>	
		F_{cal}	$F_{tab} (0,05)$
darunavir	0,66		
Degradação em meio ácido	0,73	7,35*	2,78
	0,76	11,02*	2,78
Degradação em meio básico	0,53	17,15*	2,78
Degradação em meio oxidativo	0,71	4,90*	2,78
	0,75	9,80*	2,78
	0,84	20,82*	2,78

*significativo para $p < 5\%$

10.4. Discussão

Hoje a técnica de CLAE é preferida na rotina de análises de controle de qualidade para a identificação e investigação dos produtos de degradação de fármacos e medicamentos. No entanto, se houver outro método mais acessível, de baixo custo e confiável, para demonstrar os mesmos resultados, deve ser considerado como alternativa para substituir o CLAE ou reduzir a geração de resíduos (TÓTOLI & SALGADO, 2013; SVERSUT *et al.*, 2014).

A CCD é uma técnica flexível, porque permite o uso de vários sistemas eluentes e agentes reveladores. Trata-se de uma ferramenta importante para identificar compostos, sendo de fácil execução, versátil e de baixo custo (DHANESHWAR *et al.*, 2009). Outra aplicação da CCD se refere à possibilidade de verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (WATSON, 2005).

Vários sistemas solventes foram testados e foi eleito o melhor tanto para a identificação do complexo darunavir:β-CD como para a detecção dos possíveis contaminantes através do aparecimento de outras manchas ao longo da distância percorrida. Assim, a fase móvel contendo água purificada e álcool metílico, 70:30 (v/v), ajustado para pH 2,4 com ácido acético glacial foi escolhida. A visualização das manchas foi facilmente observada em câmara UVA.

Todos os produtos das degradações em meios ácido, básico e oxidativo do complexo darunavir:β-CD observados no método de CLAE foram reproduzidos no método de CCD desenvolvido.

Além do mais, análises de CL-EM foram feitas. De acordo com os resultados obtidos, foi possível sugerir os produtos de degradação por molécula cationizada no modo positivo e molécula desprotonada no modo negativo (Tabela 42). Pelas análises de CLAE e CCD pode-se perceber o mesmo tempo de retenção para dois produtos da degradação em meio ácido e oxidativo. Dessa forma, foi observado dois compostos com a mesma massa molecular para estas condições de degradação e apenas um composto diferente na degradação em meio oxidativo. A degradação em meio básico ocorre por um mecanismo diferente e a análise foi feita no modo negativo, dado que a ionização foi mais favorável.

No sistema de CLAE, ao utilizar uma coluna de fase reversa, os produtos apolares ficam retidos por mais tempo na coluna, gerando maior t_R . Na CCD os componentes mais polares eluem mais facilmente com a fase móvel, gerando valores de R_f maiores e deixando mais rapidamente retidos os componentes apolares, com valores de R_f menores. Por esta razão, o aparecimento do darunavir e seus produtos ocorrem inversamente na CLAE e na CCD.

Os valores de R_f das manchas dos produtos de degradação foram analisados de acordo com suas diferenças por teste t e todos mostraram R_f estatisticamente diferentes para o R_f do darunavir, para um nível de significância de 5 %. Isto mostra que a retenção dos produtos comparados ao darunavir é diferente, o que facilita a observação das manchas na placa.

Ao utilizar a técnica de CCD desenvolvida, foi possível visualizar todos os produtos de degradação observados no método de CLAE. Este resultado foi alcançado mais rapidamente, com menor custo e gerando menos resíduos. Para isso, não foi necessário equipamento de CLAE, coluna, *software* e tempo de preparo e lavagem da coluna.

A investigação de métodos alternativos, como este, deve ser valorizada, bem como reflexões sobre o impacto socioeconômico das decisões analíticas. Se o custo da aquisição, da manutenção, da produção, da análise e acondicionamento de fármacos e medicamentos for alto, conseqüentemente o preço do produto no mercado será elevado e não acessível ao paciente. Paralelamente a falha no tratamento não só afeta a qualidade de vida dos pacientes, mas também contribui significativamente para a carga econômica do sistema de saúde.

10.5. Conclusão

O método de CCD desenvolvido foi adequado por sugerir a identificação do darunavir no complexo darunavir:β-CD e seus produtos de degradação em meios ácido, básico e oxidativo, sendo apropriado para o uso de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

O desenvolvimento de novos métodos proporciona novas oportunidades para os analistas.

10.6. Artigo publicado

Kogawa, A.C.; Mendonça, J.N.; Lopes, N.P.; Salgado, H.R.N. Stability-indicating thin-layer chromatographic method for determination of darunavir in complex darunavir-β-cyclodextrin in the presence of its degradation products. **Analytical Methods**, v. 6, p.3689-3693, 2014.

11. ESTUDO DE ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

11.1. Introdução

Estabilidade é uma qualidade requerida a todos os fármacos e consiste no período a partir da data de fabricação e acondicionamento da formulação até que a sua atividade química e biológica não seja menor que o nível pré-determinado de teor rotulado e suas propriedades físicas não tenham mudado apreciavelmente e de forma deletéria (VADAS, 2000).

O estudo da estabilidade dos fármacos e medicamentos é mandatório pelas agências regulatórias através de todo o mundo. Os parâmetros utilizados no estudo de estabilidade acelerada e de longa duração são indicados pelo ICH (2003), pelo guia para realização de estudos de estabilidade da ANVISA (BRASIL, 2005) e pelo guia da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*) (WHO, 2009).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e adjuvantes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (BRASIL, 2005). Com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, são preconizados estudos de estabilidade (SILVA *et al.*, 2009).

A monitorização da estabilidade dos medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante a validade.

O estudo de estabilidade de longa duração verifica as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (BRASIL, 2005). Para a realização deste estudo, as zonas climáticas constituem um dos importantes fatores a serem considerados. Devido à grande variabilidade climática, o mundo foi subdividido em zonas

com diferentes especificações de temperatura e umidade, para possibilitar a comercialização dos produtos em outras zonas climáticas (SILVA *et al.*, 2009).

Para o procedimento dos ensaios de estabilidade realizados no Brasil, de zona climática IV, as indústrias farmacêuticas seguem a RE nº 1 de 2005 da ANVISA. Esses estudos são realizados em câmaras climáticas qualificadas que proporcionam o controle de temperatura e umidade em seu interior, projetadas para serem utilizadas continuamente.

O estudo foi realizado com dois objetivos. Primeiro, investigar o comportamento do fármaco complexado à β -ciclodextrina quanto à presença e identificação dos produtos de degradação e avaliação do teor de darunavir no CI através da técnica de CL desenvolvida e validada previamente. Análises de TG e DSC também foram realizadas com o CI e seus resultados comparados àqueles presentes no capítulo VII. O segundo objetivo foi investigar o comportamento do darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimidos através do método de espectrometria na região do infravermelho quanto ao aparecimento de produtos de degradação.

11.2. Parte Experimental

11.2.1. Material

Os materiais utilizados foram o CI darunavir: β -CD, obtido no capítulo VI, e os comprimidos de darunavir 300 mg, lote AEZOCOO, comercialmente conhecido como Prezista[®] da empresa Janssen-Cilag.

11.2.2. Método

Para o estudo de estabilidade de longa duração do complexo darunavir: β -CD foi utilizada câmara climática MA 835/UR (Marconi[®]) com temperatura controlada de 30 °C \pm 2 °C e 75 % UR \pm 5 % UR.

As amostras foram colocadas homogeneamente em placa de vidro sem tampa e dispostas no centro da câmara climática.

Nos tempos de 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses foram retiradas amostras para avaliação do comportamento do fármaco complexado à β -ciclodextrina quanto à presença e identificação dos produtos de degradação e avaliação do teor de darunavir por CL e CL-EM. Os cromatogramas foram comparados entre si e com uma análise de tempo zero, em que o

fármaco foi preparado e imediatamente analisado, com o objetivo de acompanhamento e avaliação da degradação.

Para o preparo da amostra foram pesados 29,12 mg do CI em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo[®]) e transferidos para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com álcool etílico, obtendo solução estoque de 1000 µg/mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 1 mL e transferidas para balão volumétrico de 25 mL para a preparação das soluções com concentração de 40 µg/mL, completando-se o volume com álcool etílico.

Na análise de CL foram utilizados bomba cromatográfica 1525 (Waters[®]), injetor manual 7725i (Rheodyne Breeze[®]), detector UV-Vis 2487 (Waters[®]) e coluna Phenomenex Luna CN 5 µm (250 x 4,6 mm). A fase móvel foi composta de água + 0,1 % de ácido acético glacial e ACN + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v) que foi filtrada através de membrana com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, sob vácuo e degaseificada em ultrassom durante 30 minutos. Após a estabilização do sistema, foram injetados 20,0 µL das soluções de CI, previamente filtrados em membranas com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min e a leitura dos resultados foi realizada em 268 nm.

As amostras foram aplicadas em placa preparativa de CCD, método descrito no capítulo VIII, para remoção da β-CD, para posterior injeção no CL-EM.

A análise de CL-EM foi realizada no sistema de CL Shimadzu[®] conectado a um espectrômetro de massas *ion trap* AmaZon SL Bruker[®] operando por ionização *electrospray* em modo positivo, nitrogênio como nebulizador (60 psi) e gás de secagem (10 L/min, 320 °C). A voltagem do capilar foi ajustada para 3500 V.

A amostra de CI após 24 meses em câmara climática com temperatura controlada de 30 °C ± 2 °C e 75 % UR ± 5 % UR foi analisada por TG e DSC.

As curvas de TG foram obtidas através do SDT Q600 V8.3 Build 101 e as curvas de DSC com fluxo de calor foram obtidas no DSC Q100 (TA Instruments[®]). Foram pesados de 1 a 3 mg de amostra e colocados em cadinho de alumina. A faixa de temperatura utilizada na TG foi de 30 a 600 °C e na DSC foi de 25 a 350 °C, ambas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (vazão de 100 mL/min) e razão de aquecimento de 2 °C/min.

Também foram retiradas amostras de darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimidos para a comparação do espectro na região do infravermelho do fármaco livre antes (tempo zero) e depois, nos mesmos tempos de 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses, quanto as suas diferenças, presença ou ausência de picos característicos.

Os espectros foram comparados com uma análise de tempo zero, em que o fármaco não foi exposto às condições da câmara climática de temperatura e umidade, com o intuito de estudar as mudanças nos espectros e avaliar a possibilidade da utilização de análises de infravermelho para detectar possíveis produtos de degradação ou fármacos degradados.

Para o preparo das amostras foi utilizado o peso médio de 20 comprimidos de darunavir etanolato, 647,81 mg. Imediatamente após a retirada da câmara, foram pesados 151,15 mg de amostra degradada, o equivalente a 70 mg de darunavir. Esta quantidade foi diluída em 478,85 mg de brometo de potássio e mantida em estufa a 105 °C por 30 minutos. Foram pesados 25 mg desta mistura e diluídos em 125 mg de KBr para obtenção de pastilhas de 150 mg contendo 2,5 mg de darunavir. Para o tempo zero, foi realizado o mesmo procedimento com o darunavir etanolato PA não degradado.

11.3. Resultados

Os cromatogramas do darunavir complexado obtido no tempo zero, ou seja, antes de ser colocado em câmara climática apresentou tempo de retenção em 7,2 minutos. A Figura 82 ilustra o cromatograma do fármaco complexado no tempo zero.

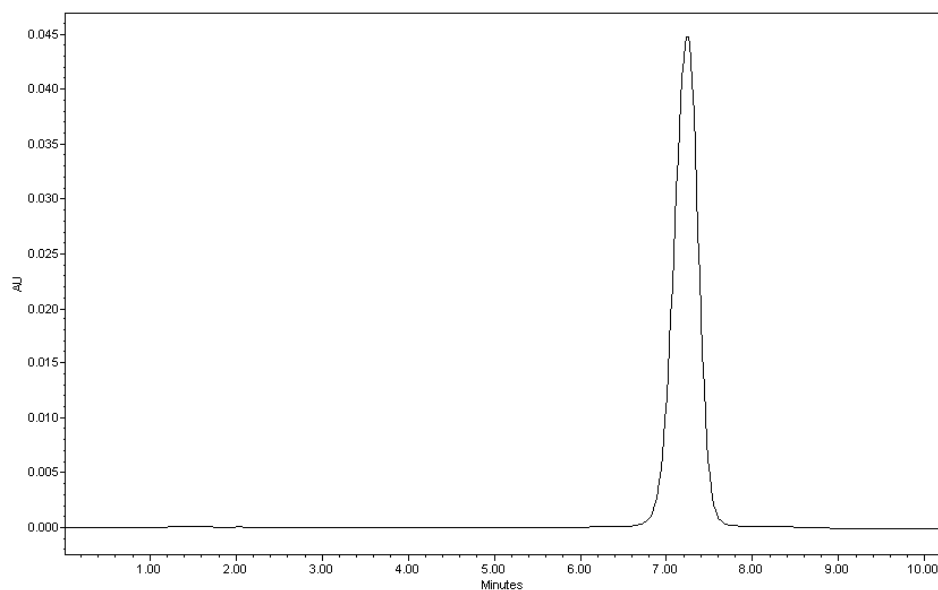


Figura 82. Cromatograma do CI na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 μm (250 mm x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial: acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e detecção a 268 nm, no tempo zero.

A Figura 83 mostra a sobreposição dos cromatogramas do CI nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses.

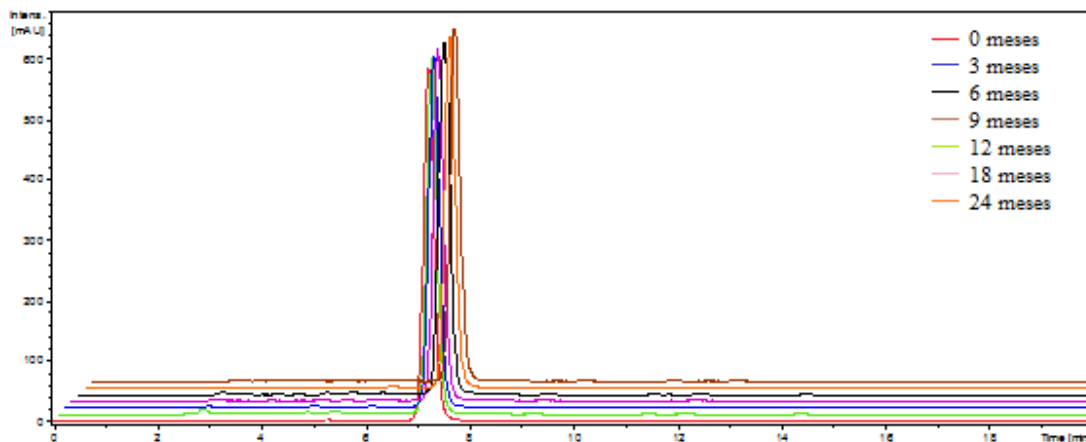


Figura 83. Sobreposição dos cromatogramas do CI na concentração de 40 µg/mL utilizando coluna Phenomenex Luna CN 5 µm (250 mm x 4,6 mm) e água purificada + 0,1 % de ácido acético glacial: acetonitrila + 0,1 % de ácido acético glacial (60:40, v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min e detecção a 268 nm, nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses.

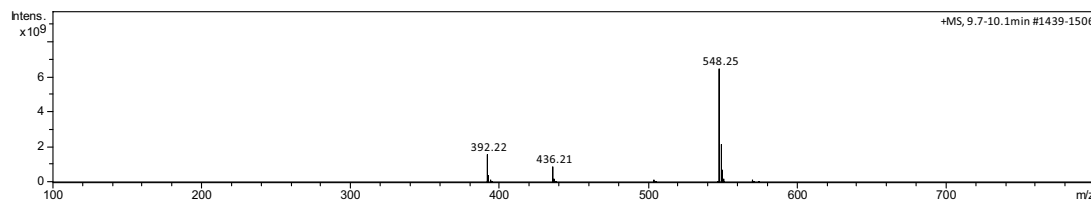


Figura 84. Espectro de massas do sinal obtido nos cromatogramas dos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses, no modo positivo.

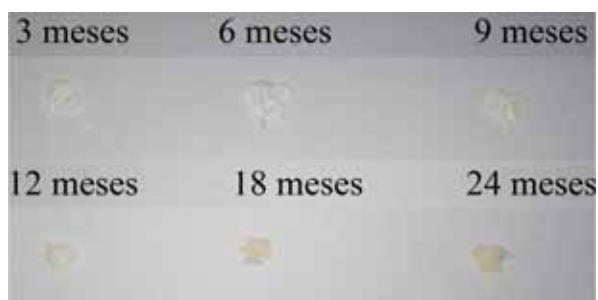


Figura 85. Avaliação da aparência do complexo darunavir:β-ciclodextrina em pó com o tempo, submetidos às condições de estudo de estabilidade de longa duração ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\text{ \% UR} \pm 5\text{ \% UR}$).

As Figuras 86 e 87 mostram os gráficos de TG e DSC, respectivamente, da amostra de darunavir:β-ciclodextrina no tempo zero e 24 meses.

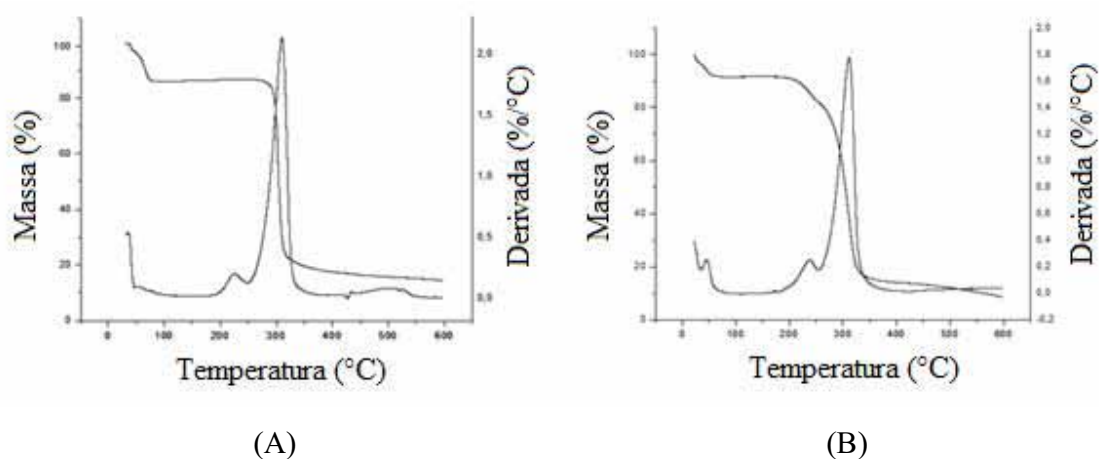


Figura 86. Curva TG do complexo darunavir:β-ciclodextrina (A) no tempo zero e (B) após 24 meses submetidos às condições de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\text{ \% UR} \pm 5\text{ \% UR}$.

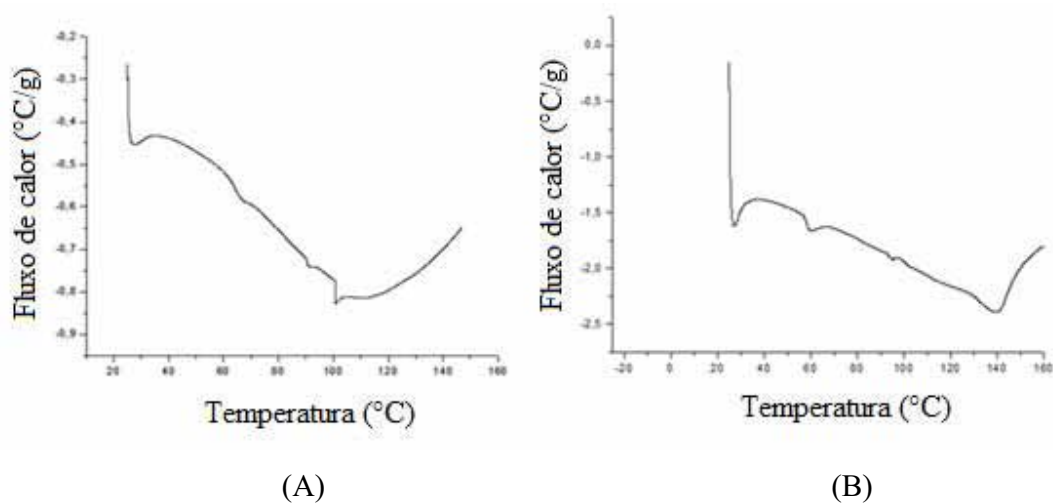


Figura 87. Curva DSC do complexo darunavir:β-ciclodextrina (A) no tempo zero e (B) após 24 meses submetidos às condições de $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.

O espectro de IV do darunavir etanolato PA não degradado obtido no tempo zero, ou seja, antes de ser colocado em câmara climática, apresentou 10 (dez) bandas características. A Figura 88 ilustra o espectro do fármaco no tempo zero.

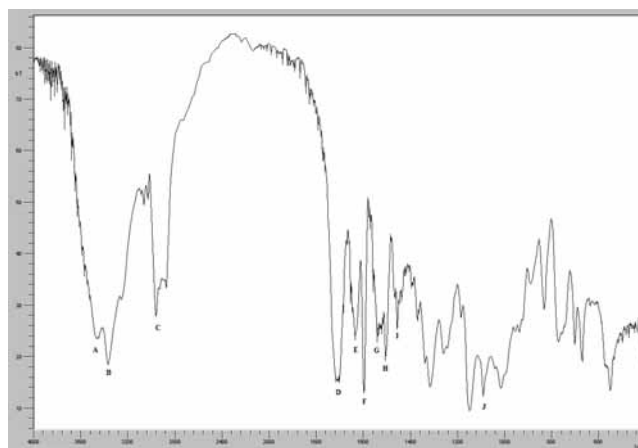


Figura 88. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg com as bandas características utilizando brometo de potássio como branco, no tempo zero.

As Figuras de 89 a 94 mostram os espectros do fármaco degradado nos tempos 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses.

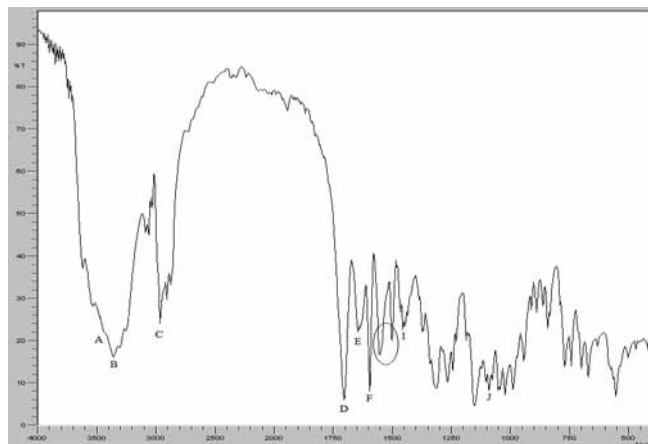


Figura 89. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 3 meses.

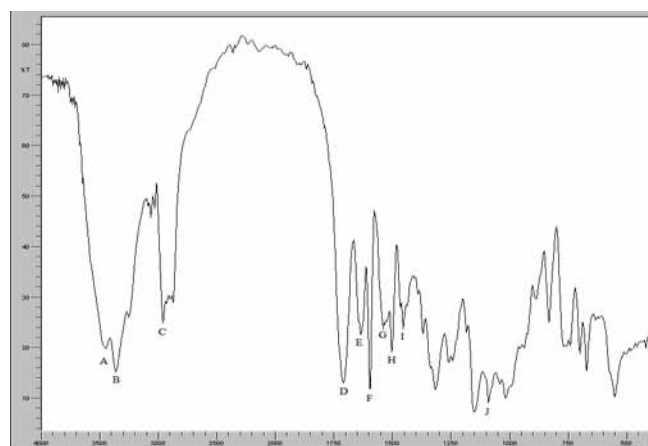


Figura 90. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 6 meses.

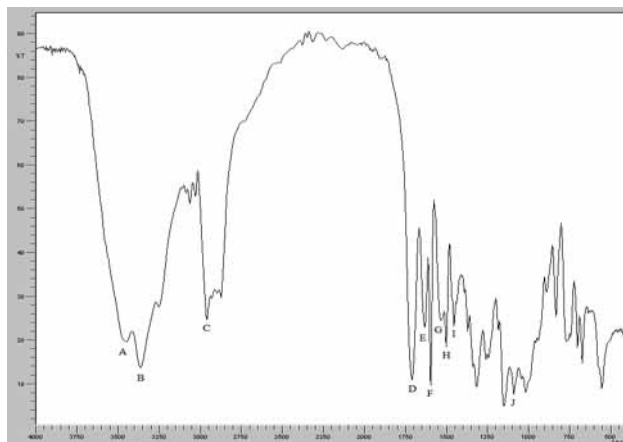


Figura 91. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 9 meses.

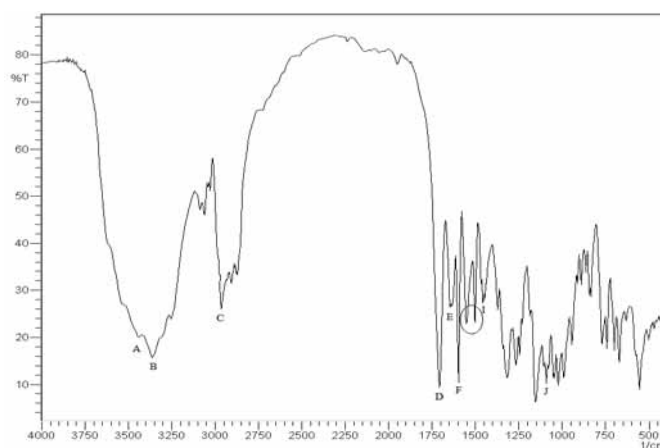


Figura 92. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 12 meses.

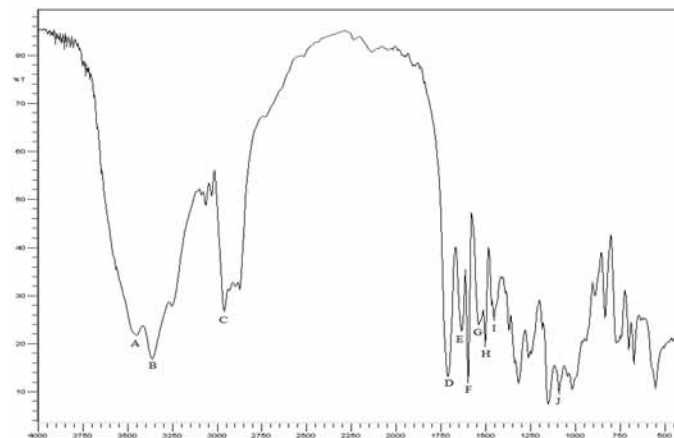


Figura 93. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 18 meses.

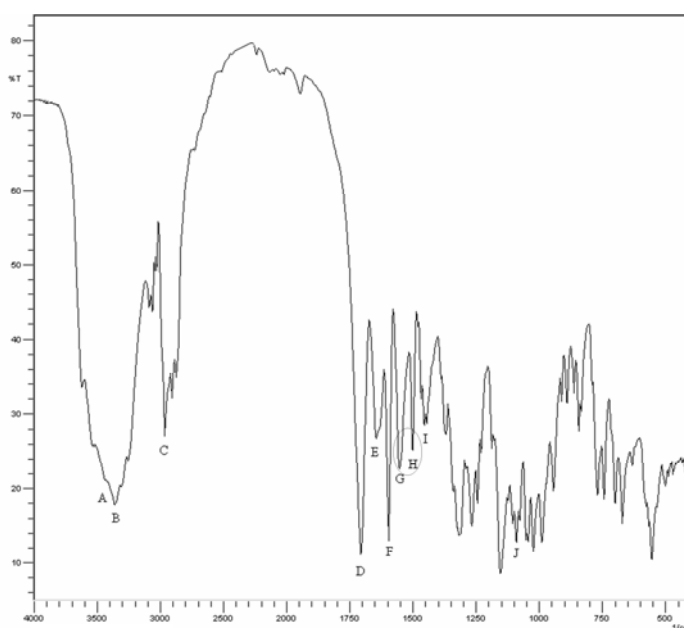


Figura 94. Espectro de absorção de infravermelho do darunavir PA na concentração de 2,5 mg utilizando brometo de potássio como branco, no tempo 24 meses.

A Tabela 50 resume as bandas características do darunavir PA no tempo zero até o tempo de 24 meses em exposição às condições da câmara climática.

Tabela 50. Características do darunavir PA observadas no estudo de estabilidade de longa duração desde o tempo zero até o tempo de 24 meses através da técnica de espectrometria de absorção na região do infravermelho

Tempo de degradação (meses)	Bandas características										Novas bandas	Absorvância
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
zero	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	-	0,830
3	P*	P	P	P	P	P	**	**	P	P	não	0,863
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	não	0,886
9	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	não	0,962
12	P*	P	P	P	P	P	**	**	P	P	não	1,033
18	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	não	0,741
24	P*	P	P	P	P	P	**	**	P	P	não	0,954

P = presente, *baixa intensidade, **diferentes intensidades

11.4. Discussão

A estabilidade é definida como a capacidade do fármaco ou produto farmacêutico de permanecer dentro das especificações estabelecidas para manter sua identidade, potência, qualidade e pureza durante todo o período de reteste ou data de validade (FDA, 1998; ICH, 2003; WHO, 2009).

A estabilidade é um fator essencial de qualidade, segurança e eficácia do produto farmacêutico. Um produto farmacêutico, que não é suficientemente estável, pode resultar em mudanças físicas, as quais podem afetar a aparência, ponto de fusão, limpidez e cor da solução, perda ou absorção de água, modificação do cristal (polimorfismo) ou tamanho de partícula etc, bem como em mudanças nas características químicas, as quais podem ser observadas como um aumento nos produtos de degradação ou formação de substâncias de alto risco devido à decomposição, potencialmente tóxicas aos pacientes, ou à diminuição do teor devido à hidrólise, oxidação, isomerização, descarboxilação (WHO, 2009; MARKENS, 2010).

O CI, quando submetido ao calor combinado à umidade da câmara climática (30 °C ± 2 °C e 75 % UR ± 5 % UR) após 9 meses, apresentou mudança física. A cor do pó anteriormente branco ou quase branco passou à coloração bege claro ou levemente amarelada.

Os teores de darunavir, calculados através da área do pico, não foram exatamente iguais em todos os tempos de degradação. Houve pequena variação entre eles. No entanto, não foi detectado o aparecimento de novos picos no cromatograma. Todavia, o não exato balanço de massas pode ser devido à eluição antecipada ou tardia das impurezas, ausência do cromóforo adequado, diferença à resposta do UV para o ativo e impurezas, presença de produtos de degradação voláteis ou vias de degradação complexas que fornecem grande número de impurezas de nível baixo.

Após 24 meses na câmara climática o único sinal ainda observado no cromatograma foi o darunavir com m/z 548, como demonstrado através do espectro de massas.

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquela que sua potência está reduzida a não mais do que 10 %, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (SILVA *et al.*, 2009).

Assim sendo, o CI sob condições de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ é estável após 24 meses na forma de pó. Para uma futura forma farmacêutica, novos testes de estabilidade para o produto acabado seriam necessários.

Para proteger o pó da mudança física apresentada, recursos da farmacotécnica seriam requisitados fazendo com que o produto acabado do darunavir complexado não apresente diferença de cor por 2 anos ou mais.

Outra comprovação da estabilidade do CI, após as condições da câmara climática, são os resultados de TG e DSC realizados com a amostra após 24 meses submetidos a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$. Os resultados são semelhantes aos obtidos na análise de tempo zero, sem qualquer tipo de degradação.

A curva TG exhibe dois eventos de perda de massa, o primeiro a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o segundo a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. No DSC, apesar da análise ter sido feita até $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, ainda nenhum evento térmico

pode ser observado, o que deve ser devido às mudanças na forma cristalina do sólido ou pela complexação à β -ciclodextrina.

Ao submeter o darunavir etanolato na forma farmacêutica comprimidos às condições da câmara climática e analisá-lo através do método de espectrometria na região do infravermelho é possível observar pequenas diferenças não significativas no espectro de tempos 3, 12 e 24 meses com relação ao espectro de tempo zero, como mostrado na Tabela 49.

Nos tempos 6, 9 e 18 meses que não mostraram diferenças em seus espectros com relação ao tempo zero podem ser justificadas pela própria definição do método de infravermelho. O espectro fornecido deve ser analisado como um todo, uma vez que mostra a presença de grupamentos funcionais da molécula analisada. Se os produtos de degradação ocorrerem e apresentarem as mesmas funções já mostradas como bandas características do espectro com o qual estamos comparando, isto pode esconder os produtos de degradação que não serão percebidos com esta técnica. No entanto, se uma nova função se formar como resultado da degradação, esta sim será detectada no espectro de infravermelho.

Todos os espectros de amostra degradada mostram bandas menos definidas, devido à presença de água no produto, fato justificado pela alta umidade utilizada no estudo (75 % UR).

11.5. Conclusão

O estudo de estabilidade de longa duração do CI foi possível através das técnicas de CL e CL-EM.

Análises de TG e DSC comprovaram a estabilidade do CI após 24 meses em câmara climática a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\text{ \% UR} \pm 5\text{ \% UR}$.

Através do método de espectrometria na região do infravermelho também foi possível o estudo de estabilidade de longa duração do darunavir na forma farmacêutica comprimidos.

CONCLUSÕES

- Segundo a revisão da literatura realizada, o darunavir é um antiretroviral inibidor de protease comercializado na forma de comprimidos e suspensão oral. Ele apresenta polimorfismo e sua forma mais estável é a etanolato. O darunavir apresenta baixa solubilidade em água, sendo necessária a administração de elevadas doses para o sucesso do efeito terapêutico. Este fármaco não apresenta monografia descrita nos compêndios oficiais e na literatura encontram-se poucos, deficientes e não ecologicamente corretos métodos analíticos referentes à análise farmacêutica do darunavir.

- As ferramentas da qualidade ajudam a resolver problemas e também detectar novas possibilidades para melhorar um processo ou torná-lo mais efetivo frente ao objetivo pretendido.

- A investigação de polimorfos do darunavir ao longo da pesquisa desenvolvida garantiu a utilização da mesma forma em todos os experimentos realizados, de acordo com os resultados de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, termogravimetria, calorimetria diferencial de varredura e difração de raios-X.

- O desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos para identificação do darunavir em matéria-prima e forma farmacêutica comprimidos foi realizado através das técnicas de determinação do intervalo de fusão, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta, espectroscopia na região do infravermelho e eletroforese capilar.

- O método de espectroscopia na região do infravermelho foi considerado adequado para a quantificação de darunavir etanolato em comprimidos através da banda da carbonila (C=O) entre 1757 e 1671 cm^{-1} . É uma técnica de fácil execução, que oferece a possibilidade de obtenção de espectros rápidos, não apresenta geração de resíduos tóxicos e o custo de um espectrômetro de infravermelho é relativamente acessível.

- O método de eletroforese capilar foi considerado adequado para quantificação de darunavir etanolato em comprimidos utilizando capilar de sílica fundida não revestido com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm, solução tamponante borato de sódio 25 mM pH 8,5 como eletrólito de corrida, voltagem de +20 kV

e leitura em 200 nm. Esta técnica utiliza capilares de sílica duradouros, amostras em pequenas quantidades, da ordem de nL, e permitiu a detecção do fármaco em menos de 1 minuto.

- A complexação do darunavir com a β -ciclodextrina foi alcançada. A verificação da formação do complexo e o estudo experimental e teórico através de técnicas térmicas e espectroscópicas também foram realizados.

- O teste de solubilidade realizado com o darunavir complexado utilizando o método de equilíbrio, saturação da solução, rotação de 60 rpm, temperatura controlada de $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ e quantificação do fármaco em espectrofotometria na região do UV mostrou que o complexo darunavir: β -ciclodextrina apresenta solubilidade 28 vezes maior que o darunavir livre quando utilizada a solução tamponante acetato 0,05 M pH 4,5, 23 vezes quando utilizada a água purificada, 22 vezes quando utilizada solução tamponante fosfato 0,2 M pH 6,8 e 5 vezes quando utilizada a solução tamponante fosfato 0,05 M com 0,5 % de Tween 20 pH 3,0.

- O desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos para identificação do darunavir no complexo de inclusão formado foi realizado através da técnica de cromatografia líquida.

- O método de cromatografia líquida de alta eficiência foi considerado adequado para quantificação de darunavir no complexo de inclusão obtido, utilizando álcool etílico para diluição das amostras, coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm) partícula de 5 μm e poro de 10 Å , fase móvel contendo água + 0,1 % de ácido acético e acetonitrila + 0,1 % de ácido acético (60:40, v/v) e detecção em UV a 268 nm. Este método apresenta a vantagem de permitir a separação e quantificação de produtos de degradação em tempo inferior a 8 minutos, não sendo necessário o uso de solução tamponante na fase móvel.

- Os produtos de degradação forçada em meios ácido, básico e oxidativo do complexo de inclusão darunavir: β -ciclodextrina foram elucidados através da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Foram obtidos dois produtos de degradação em HCl 0,01 M, 1 em NaOH 0,01 M e 3 em H_2O_2 3 %, utilizando CL acoplado a espectrômetro de massas *ion trap* operando por ionização *electrospray* em modo positivo, nitrogênio como nebulizador (60 psi), gás de secagem (10 L min^{-1} , $320\text{ }^\circ\text{C}$), voltagem do

CONCLUSÕES

capilar em 3500 V, coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água e acetonitrila (60:40, v/v) e detecção em UV a 268 nm.

- A identificação dos produtos de degradação do complexo de inclusão obtidos na CL foi alcançada na CCD utilizando água e álcool metílico (70:30, v/v) com pH ajustado para 2,45 com ácido acético como fase móvel, placa de sílica gel como fase estacionária e visualização em câmara UVA a 365 nm. Dessa forma, uma análise mais econômica, rápida e fácil de executar foi desenvolvida identificando os produtos de degradação em meios ácido, básico e oxidativo do complexo de inclusão, mostrando ser uma alternativa de maior valia para as análises de rotina do Controle de Qualidade.

- Segundo o estudo de estabilidade de longa duração, o complexo de inclusão darunavir:β-ciclodextrina após 24 meses sob condições de 30 °C ± 2 °C e 75 % UR ± 5 % UR manteve-se estável sem o aparecimento de produtos de degradação, os quais foram investigados através da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

- A validação de métodos analíticos contempla a inovação na área do Controle de Qualidade, uma vez que visa à diminuição dos custos da análise, a facilidade no procedimento e rapidez na liberação dos resultados. A complexação do darunavir à β-ciclodextrina agregou valor ao fármaco ao torná-lo mais solúvel em água e proporcionar assim um maior aproveitamento desse antirretroviral.

REFERÊNCIAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1.

ARAÚJO, G.L.B.; PITALUGA, A.JR.; ANTONIO, S.G.; SANTOS, C.O.P.; MATOS, J.R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.33, n.1, p.27-36, 2012.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BERGINC, K.; TRDAN, T.; TRONTELJ, J.; KRISTL, A. HIV protease inhibitors: garlic supplements and first-pass intestinal metabolism impact on the therapeutic efficacy. **Biopharm Drug Dispos**, v.31, n.8-9, p.495-505, 2010.

BOSCO, G.L. The development of LC-MS: the marriage of the bird and the fish. **TrAC**, v.29, n.8, p.781-794, 2010.

BP. BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationary Office, v.2, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 136, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 893, de 29 de maio de 2003. Guia para realização de alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 jul. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 16, de 02 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos, anexo I.

Acompanha esse regulamento o anexo II, intitulado “Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos”. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 mar. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 ago. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 57, de 17 de novembro de 2009. Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 nov. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 dez. 2013.

BREWSTER, ME; LOFTSSON, T Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv Drug Deliver Rev**, v.59, n.7, p.645-666, 2007.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**, v.13(dez/jan), p.129-146, 2003.

BROWN, M.E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. New York: Chapman & Hall, 1995.

CAMPOS, V.F. **Qualidade Total-Padronização de Empresas**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1992.

CANOTILHO, J.; DE SOUSA, A.T.B.; PINTO, J.A.M.C. Análise térmica. Interesse em tecnologia farmacêutica. **Rev Port Farm**, v.42, n.4, p.5-12, 1992.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **J Controlled Release**, v.123, p.78-99, 2007.

CORRÊA, J.C.R. **Estabilidade, polimorfismo, dissolução e correlação in vivo-in vitro de darunavir comprimidos**. Araraquara, 2014. (Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista).

CORRÊA, J.C.R.; SERRA, C.H.R.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of first derivate spectrophotometric method for quantification of darunavir in tablets. **Br J Pharm Res**, v.4, n.6, p.722-730, 2014.

CUFFINI, S.L.; PITALUGA, A.J.R.; TOMBARI, D.G. Polimorfismo em Fármacos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. Ed. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.21-30.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.28, p.1-9, 2007.

DAMODHARAN, L.; PATTABHI, V.; NAGARAJAN, K. Solvent interactions with β -cyclodextrin: as observed in crystal structures. **Mol Cryst Liq Cryst Sci Technol Sect A**, v.423, p.17-35, 2004.

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. **J Pharm Biomed Anal**, v.52, p.774-780, 2010.

DHANESHWAR, S.R.; BHUSARI, V.K.; MAHADIK, M.V. Application of a stability-indicating thin-layer chromatographic method to the determination of tenatoprazole in pharmaceutical dosage forms. **J AOAC Int**, v.92, n.2, p.387-393, 2009.

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. **J Chromatogr B**, v.878, p.1455-1465, 2010.

EP. FARMACOPEIA EUROPEIA. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: an integrated approach. **J Pharm Biomed Anal**, v.24, p.755-767, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FARMACOPEIA PORTUGUESA. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Draft guidance for industry, stability testing of drug substances and drug products, 1998. Disponível em <http://www.fda.gov>.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Analytical procedures and methods validation, 2000a. Disponível em <http://www.fda.gov>.

FDA. 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, 2000b. Disponível em <http://www.fda.gov>.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Validation of Chromatographic Methods. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2004. Disponível em <http://www.fda.gov>.

FAYET, A.; BÉGUIN, A.; ZANOLARI, B.; CRUCHON, S.; GUIGNARD, N.; TELENTI, A.; CAVASSINI, M.; GUNTARD, 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. **J Chromatogr B**, v.877, p.1057-1069, 2009.

GANDURI, R.B.; LANKA, R.A.; PAMIDI, S.; PEDDAREDDIGARI, J.R.; RAO, J.V.L.N.S. New RP-HPLC method for the determination of darunavir in tablet dosage form. **Asian J Pharm Res**, v.1, n.1, p.10-14, 2011.

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. **Rev Lab Clin**, v.4, n.3, p.127-133, 2011.

GIRON, D. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. **Acta Pharm Jugosl**, v.40, n.1-2, p.95-157, 1990.

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

GUPTA, A.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P.S.; SANYAL, M. Application of a validated ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of darunavir in human plasma for a bioequivalence study in Indian subjects. **J Chromatogr B**, v.879, p.2443-2453, 2011.

GYSEGHEM, E.V.; STOKBROEKX, S.; ARMAS, H.N.; DICKENS, J.; VANSTOCKEM, M.; BAERT, L.; ROSIER, J.; SCHUELLER, L.; MOOTER, G.V. Solid state characterization of the anti-HIV drug TMC114: Interconversion of amorphous TMC114, TMC114 ethanolate and hydrate. **Eur J Pharm Sci**, v.38, p.489-497, 2009.

HARRIS, D.C. **Quantitative Chemical Analysis**. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007.

HEINE, R.; ALDERDEN-LOS, C.G.; ROSING, H.; HILLEBRAND, M.J.X.; GORP, E.C.; 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 Commun Mass Spectrom**, v.21, p.2505-2514, 2007.

HEINE, R.; ROSING, H.; GORP, E.C.M.; MULDER, J.W.; 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. **J Chromatogr B**, v.867, p.205-212, 2008.

HIGUCHI, T; CONNORS, AK. Phase-solubility techniques. **Adv Anal Chem Instrum**, v.4, p.117-212, 1965.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W.J. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Assoc Offic Anal Chem**, v.63, p.1344-1355, 1980.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1996.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances Q6A, 1999.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Quality Risk Management Q9, 2006.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Pharmaceutical Quality System Q10, 2007.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Guidance for Pharmaceutical Development Q8(R2), 2009.

IFPMA. IFPA issue paper. Quality Assurance of Medicines. Geneva: International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations, 1997.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

JANNUZZI, A.H.L.; VASCONCELLOS, A.G.; DE SOUZA, C.G. Especificidades do patenteamento no setor farmacêutico: modalidades e aspectos da proteção intelectual. **Cad. Saúde Pública**, v.24, n.6, p.1205-1218, 2008.

JP. FARMACOPEIA JAPONESA. 16. ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011.

JURAN, J.M.; GODFREY, A.B. **Juran's Quality Handbook**. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC–UV method. **J Chromatogr Sci**, v.50, p.1-7, 2012.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos para a análise de darunavir comprimidos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.34, p.207-213, 2013a.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v.3, n.1, p.1-6, 2013b.

KOGAWA, A.C.; ZOPPI, A.; QUEVEDO, M.A.; LONGHI, M.R.; SALGADO, H.R.N. Complexation between darunavir ethanolate and β -cyclodextrin. Experimental and theoretical studies. **WJPPS**, v.3, n.6, p.298-309, 2014.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev Bras Farm**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 3. ed. São Carlos: RiMa, 2004.

LIAÑO, J.P.; TENORIO, C.H. Chemical characteristics, mechanism of action and antiviral activity of darunavir. **Enferm Infecc Microbiol Clín**, v.26, p.3-9, 2008.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. **J Pharm Pharmacol**, v.62, n.11, p.1607-1621, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. **J Pharm Sci**, v.101, n.9, p.3019-3032, 2012.

LOPES, N.P.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; STAUNTONA, J. Fragmentation studies on monesin A by sequential electrospray mass spectrometry. **Analyst**, v.127, p.503-506, 2002a.

LOPES, N.P.; STARK, C.B.W.; HONG, H.; GATES, P.J.; STAUNTONA J. Fragmentation studies on monensin A and B accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.16, p.414-420, 2002b.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIN NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.31, n.2, p.117-124, 2010.

MANE, M.B.; GAIKAWAD, P.J.; PATIL, A.V.; MOGALE, A.S. RP-HPLC method for determination of darunavir in bulk and pharmaceutical preparations. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v.21, n.2, p.20-23, 2013.

MARKENS, U. Conducting stability studies-Recent changes to climatic zone IV. **Pharma Times**, v.42, n.7, p.13-14, 2010.

MARTIN, A.; SINKO, P.J. **Martin: Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

MARTIN, J.; DESLANDES, G.; DAILLY, E.; RENAUD, C.; RELEQUET, V.; RAFFI, F.; JOLLIET, P. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV. **J Chromatogr B**, v.877, p.3072-3082, 2009.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A mechanism approach to understanding the factors affecting drug absorption: A review of fundamentals. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 620-643, 2002.

MCCOY, C. Darunavir: A nonpeptidic antiretroviral protease inhibitor. **Clin Ther**, v. 29, n.8, p.1559-1576, 2007.

MODHAVE, D.T.; HANDA, T.; SHAH, R.P.; SINGH, S. Stress degradation studies on lornoxicam using LC, LC–MS/TOF and LC–MSⁿ. **J Pharm Biomed Anal**, v.56, p.538-545, 2011.

MÖLLER, C. **O Lado Humano da Qualidade**. São Paulo: Pioneira, 1992.

NATA. TECHNICAL NOTE 17. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods, 2012.

NOGUEIRA, R.; WOLLINGER, W.; SILVA, T.E.; OLIVEIRA, L.M.; REGO, E.C.P.; MOREIRA, G.F.; BARIN, J.S.; LAPORTA, L.V.; MESKO, M.F.; BITTENCOURT, C.F.; RODRIGUES, J.M.; CUNHA, V.S. Validation of a liquid chromatographic method for determination of related substances in a candidate certified reference material of captopril. **Braz J Pharm Sci**, v.47, n.2, p.351-362, 2011.

O'NEIL, M.J.; HECKELMAN, P.E.; KOCH, C.B.; ROMAN, K.J.R. The Merck Index. 14th. ed. Whitehouse Station: Merck & Co, 2006.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quím Nova**, v.31, n.5, p.1190-1198, 2008.

PIGATTO, M.C.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; VESSECCHI, R.; ASSIS, M.D.; SANTOS, J.S.; COSTA, T.D.; LOPES, N.P. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **Eur. J. Med. Chem**, v.46, p.4245-4251, 2011.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2003.

REDDY, B.V.R.; JYOTHI, G.; REDDY, B.S.; RAMAN, N.V.V.S.S.; REDDY, K.S.C.; RAMBABU, C. Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate. **J Chromatogr Sci**, v.51, p.471-476, 2013.

REVISTA DO FARMACÊUTICO. v.novembro-dezembro, p.52-53, 2013.

REYNOLDS, J.E.F. **Martindale the extra pharmacopoeia**. 35th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.

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.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

SALGADO, H.R.N.; RIBEIRO, Y.A; RIBEIRO, C.A; SCHAPOVAL, E.E.S. Análise térmica de esparfloxacino. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.26, n.2, p.119-123, 2005.

SALEM, H.; MOUSTAFA, A.A.; HEGAZY, M.; ALI, O. Stability indicating validated chromatographic methods for determination of buflomedil in presence of its degradation products. **Pharm Anal Acta**, v.4, n.5, p.1-5, 2013.

SANDER, L.C.; WISE, S.A. Recent advances in bonded phases for liquid chromatography. **Crit Rev Anal Chem**, v.18, p.299-413, 1987.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y-H. P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D. L.; RANGARI, V. K.; FASINA, O.; BABU, R. J. Physicochemical Characterization of Efavirenz–Cyclodextrin Inclusion Complexes. **AAPS PharmSciTech**, v.10(1), p.81–87, 2009.

SATYANARAYANA, L.; NAIDU, S.V.; RAO, M.N.; KUMAR, A.; SURESH, K. The estimation of darunavir in tablet dosage form by RP-HPLC. **Asian J Res Pharm Sci**, v.1, n.3, p.74-76, 2011.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J Chromatogr A**, v.987, p.57-66, 2003.

SHARMA, P.; GARG, S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. **Adv Drug Delivery Rev**, v.6, n.2, p.491-502, 2010.

SILVA JÚNIOR, E.S. **Preparação de fases estacionárias para CLAE com uma mistura de poli(dimetilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano) sorvidos e imobilizados por tratamento térmico sobre sílica**. Campinas, 2007. (Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas).

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.30, n.2, p.129-135, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.K.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

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. **AAPS PharmSciTech**, v.11, n.2, 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. **J Controlled Release**, v.138, p.2-15, 2009.

SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Rev Bras Cienc Farm**, v.42, n.3, p.437-445, 2006.

STULZER, H.K.; TAGLIARI, M.P.; SILVA, M.A.S.; LARANJEIRA, M.C.M. Desenvolvimento, avaliação e caracterização físico-química de micropartículas constituídas de aciclovir/quitosana desenvolvidas pela técnica de spray-drying. **Lat Am J Pharm**, v.26, n.6, p.866-871, 2007.

SVERSUT, R.A.; DO AMARAL, M.S.; BARONI, A.C.M.; RODRIGUES, P.O.; ROSA, A.M.; GERLIN, M.C.G.; SINGH, A.K.; KASSAB, N.M. Stability-indicating HPLC-DAD method for the simultaneous determination of fluoroquinolones and corticosteroids in ophthalmic formulations. **Anal Methods**, v.6, p.2125-2133, 2014.

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. **Biol Pharm Bull**, v.30, n.10, p.1947-1949, 2007.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trend Anal Chem**, v.23, p.535-552, 2004.

THOMAS, S.; SHANDILYA, S.; BHARATI, A.; PAUL, S.K.; AGARWAL, A.; MATHELA, C.S. Identification, characterization and quantification of new impurities by LC-ESI/MS/MS and LC-UV methods in rivastigmine tartrate active pharmaceutical ingredient. **J Pharm Biomed Anal**, v.57, p.39-51, 2012.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution. **Anal Methods**, v.5, p.5923-5928, 2013.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35th. ed. Rockville: United States Convention, 2012.

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

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas na terapia farmacêutica**. Coimbra: Minerva, 2006.

VELLANKI, S.R.P.; SAHU, A.; PHADHURI, N.K.; KILARU, R. Crystalline darunavir. **WO 2013/114382 A1**. World Intellectual Property Organization: Mylan Laboratories Ltd., 2013.

VERMEERSCH, H.W.P.; THONÉ, D.J.C.; JANSSENS, L.D.M. Pseudopolymorphic forms of a HIV protease inhibitor. **US 7700645B2**. United States: Tibotec Pharmaceuticals Ltd. (Little Island, Co. Cork, IE), 2010.

VESSECCHI, R.; EMERY, F.S.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P. Fragmentation studies and electrospray ionization mass spectrometry of lapachol: protonated, deprotonated and cationized species. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.24, p.2101-2108, 2010.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2nd. ed. New York: Academic Press, 2000.

WENDLANDT, W.W. **Thermal analysis**. 3rd. ed. New York: Wiley Interscience, 1986. v.19, cap.2, p.18-25.

WESOLOWSKI, M. Analysis of drug formulations by thermal decomposition. **Thermochim Acta**, v.209, p.223-251, 1992.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report Series, Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. Annex 2, nº 953, 2009.

YOSHII, K. Application of differential scanning calorimetry to the estimation of drug purity: various problems and their solutions in purity analysis. **Chem Pharm Bull**, v.45, n.2, p.338-43, 1997.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. **The Association of Official Analytical Chemistry**. v.33, Washington, DC, 1975.

REFERÊNCIAS

ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propanolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. Santa Maria, 2005. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria).