

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Elionai Cassiana de Lima Gomes

**Avaliação da Interação dos Antirretrovirais Lamivudina, Efavirenz e
Tenofovir e seus excipientes**

Belo Horizonte

2015

**UFMG/ICEx/DQ. 1085^a
T. 493^a**

ELIONAI CASSIANA DE LIMA GOMES

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS ANTIRRETROVIRAIS
LAMIVUDINA, EFAVIRENZ E TENOFOVIR E SEUS EXCIPIENTES**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

**Belo Horizonte
2015**

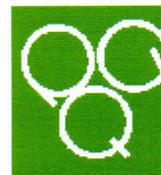
G633a Gomes, Elionai Cassiana de Lima
2015 Avaliação da interação dos antirretrovirais
T lamivudina, efavirenz e tenofovir e seus excipientes
[manuscrito] / Elionai Cassiana de Lima Gomes. 2015.
[xvii], 105 f. : il.

Orientadora: Maria Irene Yoshida.
Coorientador: Wagner da Nova Mussel.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Analítica - Teses 2. Farmacologia -
Teses 3. Análise térmica - Teses 4. Medicamentos -
Teses 5. Ressonância magnética nuclear - Teses I.
Yoshida, Maria Irene, Orientadora II. Mussel, Wagner
da Nova, Coorientador III. Título.

CDU 043



**"Avaliação da Interação dos Antirretrovirais Lamivudina, Efavirenz e
Tenofovir e seus excipientes"**

Elionai Cassiana de Lima Gomes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof.ª Maria Irene Yoshida - Orientadora
UFMG

Prof. Wagner da Nova Mussel - Coorientador
UFMG

Prof. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro
USP

Prof. Marcelo Antônio de Oliveira
UFES

Prof. Guilherme Dias Rodrigues
UFMG

Prof.ª Cynthia Lopes Martins Pereira
UFMG

Belo Horizonte, 18 de junho de 2015.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Essa tese foi realizada sob a orientação da professora Doutora Maria Irene Yoshida e co-orientação do professor Doutor Wagner da Nova Mussel, em parceria com a Fundação Ezequiel Dias (Funed).

“Andei. Por caminhos difíceis, eu sei. Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr. E, assim, cada passo que der, tentarei fazer o melhor que puder. Aprendi. Não tanto quanto quis, mas vi que, conhecendo o universo ao meu redor, aprendo a me conhecer melhor, e assim escutarei o tempo, que ensinará a tomar a decisão certa em cada momento. E partirei, em busca de muitos ideais. Mas sei que hoje se encontram meu passado, futuro e presente. Hoje sinto em mim a emoção da despedida. Hoje é um ponto de chegada e, ao mesmo tempo, ponto de partida... De tudo ficarão três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino (Texto adaptado).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu amparo em todos os momentos, por sempre me guiar pelo caminho certo, e por olhar por mim como um verdadeiro Pai.

À professora Maria Irene Yoshida, pela orientação e confiança em mim. Agradeço também pela amizade, que começou durante a minha Iniciação Científica e desde então cresce a cada dia. Costumamos brincar que ela é minha segunda mãe, pois sei que torce muito por mim e a agradeço imensamente por isto. É uma pessoa por quem tenho profunda admiração e carinho.

Ao professor Wagner da Nova Mussel, por todas as discussões, pelo apoio e pelo incentivo em todos os momentos. Todos esses anos de UFMG não teriam tido a mesma graça sem os nossos inúmeros cafés. Agradeço também pela amizade, desde a época da minha graduação e pelo suporte dado, principalmente nos primeiros meses do meu doutorado sanduíche.

Ao professor Jarbas Magalhães Resende, pela disponibilidade em nos ajudar nos experimentos de RMN. Sua ajuda foi imprescindível para que eu realizasse doutorado sanduíche em um grupo de RMN do estado sólido. Agradeço especialmente pelo seu apoio pessoal, que tem sido deveras importante, principalmente nesta reta final do doutorado.

Ao professor Marco Geppi, que me acolheu em seu grupo de pesquisa em Pisa com tamanha generosidade, me fazendo sentir logo nos primeiros dias como se eu estivesse em casa. Quando desembarquei em Pisa, não tinha a menor referência de que tipo de pessoa encontraria à minha espera no aeroporto, mas graças a Deus não poderia ter sido uma pessoa melhor. Sua competência profissional e as inúmeras discussões que tivemos me fizeram aprender muito cientificamente, e seu caráter, gentileza e humildade me proporcionaram verdadeiras lições de vida.

À Elisa Carignani, pela ajuda na interpretação de alguns resultados e pela convivência tão agradável durante todo o período em que estivemos juntas. Agradeço também aos amigos do grupo de RMN do estado sólido da Università di Pisa Silvia Borsacchi, Francesca Martini, Mario Cifelli, Marco Mais e Marco Carlotti, pela carinhosa recepção e por todos os cafés *del mattino e di pomeriggio*, sempre tão divertidos e acompanhados das mais variadas discussões, científicas ou não. Sou grata pelas aulas sobre a cultura e hábitos italianos, alguns dos quais não seriam tão fáceis de entender sem um pouco de ajuda. A experiência na Itália ao lado dessas pessoas me proporcionou um crescimento pessoal enorme, e guardarei sempre um imenso carinho e profunda gratidão por cada um deles.

À Fundação Ezequiel Dias, pela parceria e pelo fornecimento dos fármacos utilizados na realização do trabalho. Agradeço em especial à Silvia Ligório Fialho e à Jamile Barbosa, pela presteza e por todas as discussões que enriqueceram este trabalho.

Às colegas de laboratório Virgínia, Sumaia, Liliane e Olívia, pelas discussões, pela convivência e por todos os bons momentos que passamos juntas, dentro ou fora da universidade.

A todos os professores que tive desde a graduação até o doutorado, que de alguma forma contribuíram para a minha formação. Especialmente aos professores José Dias de Souza Filho, Ricardo José Alves, Armando da Silva Cunha-Júnior, Renata Barbosa de Oliveira, Luís Bernardes e Bibó, por me mostrarem o quanto é importante sermos apaixonados pelo que fazemos. Vejo neles um caso de amor com a Farmácia, com a ciência e com a vida. Procuro sempre me inspirar em pessoas como eles para fortalecer o meu engajamento de sempre trabalhar visando alguma melhoria social, ainda que mínima.

Ao professor Marcelo Antônio de Oliveira, por todos os ensinamentos durante a minha Iniciação Científica, que carregarei para sempre. Agradeço pela ótima convivência, pelo incentivo em todas as horas e por ser um exemplo sempre que penso no tipo de profissional que quero me tornar.

Aos amigos brasileiros que fiz em Pisa, Ingrid, Breno, Natália e Lucas, por terem sido minha família durante um ano. Tenho certeza de que a nossa amizade permanecerá forte, mesmo à distância.

À Júnia e à Marilda, pela amizade, por todos os passeios, cafés e conversas jogadas fora, que sempre foram um ponto de apoio para que o cansaço não tomasse conta após longas horas de trabalho.

A todas as funcionárias da Pós-Graduação, pela presteza.

Aos porteiros do Departamento de Química, especialmente ao Luiz e ao Carlos, por me receberem a cada manhã com um sorriso no rosto, me fazendo começar o dia sempre com bom humor.

Aos meus pais, Isabel e Arnaldo, por todo o suporte e apoio incondicional. Eles têm minha gratidão, meu respeito e meu amor.

Aos meus irmãos Eliezer e Jônatas, e à minha cunhada Adriana, por toda a convivência, apoio e incentivo a mim dados.

Aos meus sobrinhos, Matheus e Samuel, por serem uma fonte de inspiração e de força em todos os momentos. Agradeço por nunca deixarem morrer a criança que existe em mim.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
SIGLAS E ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos	11
4 PARTE EXPERIMENTAL	12
4.1 Material	12
4.2 Métodos	15
4.2.1 Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	15
4.2.2 Análise Termo-Óptica (TOA)	15
4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	16
4.2.4 Difração de raios X (DRX)	16
4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (ssNMR)	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Caracterização dos fármacos	19
5.1.1 Lamivudina	19
5.1.2 Efavirenz	28
5.1.3 Fumarato de tenofovir desoproxila	35
5.2 Estudo de compatibilidade entre os fármacos	56
5.2.1 Mistura efavirenz – lamivudina (EFZ – 3TC)	56
5.2.2 Mistura efavirenz – tenofovir (EFZ – TDF)	63
5.2.3 Mistura lamivudina – tenofovir (3TC – TDF)	70
5.2.4 Mistura efavirenz - lamivudina - tenofovir (EFZ - 3TC - TDF)	76

5.3 Estudo de compatibilidade entre fármacos e excipientes	80
5.3.1 Misturas lamivudina – excipientes	83
5.3.1 Misturas efavirenz – excipientes	85
5.3.3 Mistura tenofovir – excipientes.....	88
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS ANTIRRETROVIRAIS A) LAMIVUDINA; B) EFAVIRENZ; C) TENOFOVIR.....	12
FIGURA 2 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	13
FIGURA 3 – CURVAS DSC E TG/DTG DA LAMIVUDINA OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	20
FIGURA 4 – IMAGENS TOA DA LAMIVUDINA (AUMENTO DE 100 VEZES)	21
FIGURA 5 – ESPECTRO FTIR DA LAMIVUDINA	21
FIGURA 6 – CÉLULA UNITÁRIA DA LAMIVUDINA OBTIDA PELO AJUSTE DE RIETVELD (ÁTOMOS DE CARBONO EM CINZA, HIDROGÊNIO EM BRANCO, OXIGÊNIO EM VERMELHO, NITROGÊNIO EM AZUL E ENXOFRE EM AMARELO).....	23
FIGURA 7 – DIFRATOGRAMA AJUSTADO DA LAMIVUDINA	23
FIGURA 8 – NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS DAS MOLÉCULAS DA LAMIVUDINA.....	24
FIGURA 9 – ESPECTRO ¹³ C CP-MAS DA LAMIVUDINA OBTIDO COM UMA FREQUÊNCIA MAS DE 14 KHZ.....	24
FIGURA 10 – CURVA DE RETORNO EXPONENCIAL DA MAGNETIZAÇÃO LONGITUDINAL DA LAMIVUDINA.....	28
FIGURA 11 – CURVAS DSC E TG/DTG DO EFAVIRENZ OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	29
FIGURA 12 – IMAGENS TOA DO EFAVIRENZ (AUMENTO DE 100 VEZES)	30
FIGURA 13 – ESPECTRO FTIR DO EFAVIRENZ	31
FIGURA 14 – CÉLULA UNITÁRIA DO EFAVIRENZ OBTIDA PELO AJUSTE DE RIETVELD (ÁTOMOS DE CARBONO EM CINZA, HIDROGÊNIO EM BRANCO, OXIGÊNIO EM VERMELHO, NITROGÊNIO EM AZUL ESCURO, FLÚOR EM AZUL CLARO E CLORO EM VERDE)	32
FIGURA 15 – DIFRATOGRAMA AJUSTADO DO EFAVIRENZ	32
FIGURA 16 – NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS DAS MOLÉCULAS DO EFAVIRENZ.....	33
FIGURA 17 – ESPECTRO ¹³ C CP-MAS DO EFAVIRENZ OBTIDO COM UMA FREQUÊNCIA MAS DE 16 KHZ.....	33
FIGURA 18 – CURVA DE RETORNO EXPONENCIAL DA MAGNETIZAÇÃO LONGITUDINAL DO EFAVIRENZ	35
FIGURA 19 – CURVAS DSC E TG/DTG DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO. UMA EXPANSÃO DA REGIÃO DO PICO DE FUSÃO, MOSTRANDO O PICO ENDOTÉRMICO ANTERIOR AO PICO DE FUSÃO, PODE SER VISTA NA PARTE SUPERIOR À DIREITA...	37
FIGURA 20 – IMAGENS TOA DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA (AUMENTO DE 100 VEZES).....	38
FIGURA 21 – ESPECTRO FTIR DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	39
FIGURA 22 – CÉLULA UNITÁRIA DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDA PELO AJUSTE DE RIETVELD (ÁTOMOS DE CARBONO EM CINZA, HIDROGÊNIO EM BRANCO, OXIGÊNIO EM VERMELHO, NITROGÊNIO EM AZUL E FÓSFORO EM ROSA).	40

FIGURA 23 – DIFRATOGRAMA AJUSTADO DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	41
FIGURA 24 – NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS DA MOLÉCULA DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	41
FIGURA 25 – ESPECTROS (A) ^{13}C CP-MAS E (B) ^1H MAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDOS COM UMA FREQUÊNCIA MAS DE 17 KHZ	43
FIGURA 26 – CURVA DE RETORNO EXPONENCIAL DA MAGNETIZAÇÃO LONGITUDINAL DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA.....	45
FIGURA 27 – CURVAS DSC DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDAS A (A) 2, (B) 10 E (C) 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO.....	47
FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDOS ANTES (A) E APÓS AQUECIMENTO A (B) 109 E (C) 110 $^{\circ}\text{C}$. OS PICOS PRESENTES APENAS NO DIFRATOGRAMA OBTIDO A 109 $^{\circ}\text{C}$ ESTÃO MARCADOS COM ASTERISCOS	49
FIGURA 29 – ESPECTROS DE ^{13}C CP-MAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDOS SOB AQUECIMENTO	50
FIGURA 30 – ESPECTROS DE ^1H (ESQUERDA) E ^{31}P (DIREITA) MAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA OBTIDOS COM VELOCIDADE DE ROTAÇÃO DE 17 KHZ E TEMPERATURAS VARIÁVEIS.....	52
FIGURA 31 – DIFERENÇAS NA REDE CRISTALINA DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA (A) ANTES E (B) APÓS AQUECIMENTO A 110 $^{\circ}\text{C}$, OBTIDAS PELO AJUSTE DE RIETVELD (ÁTOMOS DE CARBONO EM CINZA, HIDROGÊNIO EM BRANCO, OXIGÊNIO EM VERMELHO, NITROGÊNIO EM AZUL E FÓSFORO EM ROSA).	53
FIGURA 32 – CURVAS DSC DE A) EFAVIRENZ; B) LAMIVUDINA; C) MISTURA FÍSICA 1:1 M/M EFAVIRENZ – LAMIVUDINA, OBTIDAS A 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO.....	57
FIGURA 33 – IMAGENS TOA DA MISTURA EFAVIRENZ – LAMIVUDINA. TODAS AS IMAGENS FORAM OBTIDAS COM AUMENTO DE 100 VEZES	58
FIGURA 34 – ESPECTROS INFRAVERMELHO DOS FÁRMACOS A) EFAVIRENZ; B) LAMIVUDINA; C) MISTURA FÍSICA 1:1 M/M EFAVIRENZ - LAMIVUDINA	59
FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DO ESTADO SÓLIDO DE A) EFAVIRENZ; B) LAMIVUDINA; C) MISTURA EFAVIRENZ - LAMIVUDINA.....	61
FIGURA 36 – CURVAS DSC DE A) EFAVIRENZ; B) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; C) MISTURA FÍSICA 1:1 M/M EFAVIRENZ - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA, OBTIDAS A 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	64
FIGURA 37 – IMAGENS TOA DA MISTURA EFAVIRENZ - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA. TODAS AS IMAGENS FORAM OBTIDAS COM AUMENTO DE 100 VEZES	65
FIGURA 38 – ESPECTROS INFRAVERMELHO DOS FÁRMACOS A) EFAVIRENZ; B) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; C) MISTURA FÍSICA 1:1 M/M EFAVIRENZ - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA.....	67

FIGURA 39 – ESPECTRO DE RMN DO ESTADO SÓLIDO DE A) EFAVIRENZ; B) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; C) MISTURA EFAVIRENZ - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	68
FIGURA 40 – CURVAS DSC DOS FÁRMACOS A) LAMIVUDINA; B) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; C) MISTURA FÍSICA 1:1 M/M LAMIVUDINA - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA, OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	71
FIGURA 41 – IMAGENS TOA DA MISTURA LAMIVUDINA – FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA. TODAS AS IMAGENS FORAM OBTIDAS COM AUMENTO DE 100 VEZES	72
FIGURA 42 – ESPECTROS INFRAVERMELHO DOS FÁRMACOS A) LAMIVUDINA; B) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; C) MISTURA FÍSICA 1:1 M/M LAMIVUDINA - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	73
FIGURA 43 – ESPECTRO DE RMN DO ESTADO SÓLIDO DE A) LAMIVUDINA; B) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; C) MISTURA LAMIVUDINA - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	74
FIGURA 44 – CURVAS DSC DOS FÁRMACOS A) EFAVIRENZ; B) LAMIVUDINA; C) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; D) MISTURA FÍSICA 1:1:1 M/M/M EFAVIRENZ - LAMIVUDINA - FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA, OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	77
FIGURA 45 – IMAGENS TOA DA MISTURA EFAVIRENZ – LAMIVUDINA – FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA. TODAS AS IMAGENS FORAM OBTIDAS COM AUMENTO DE 100 VEZES	78
FIGURA 46 – DIFRATOGRAMAS DE (A) MISTURA EFAVIRENZ – LAMIVUDINA – FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA; (B) LAMIVUDINA; (C) FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA E (D) EFAVIRENZ	79
FIGURA 47 – CURVAS DSC DOS EXCIPIENTES UTILIZADOS NAS PRÉ-FORMULAÇÕES, OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	81
FIGURA 48 – DIFRATOGRAMAS DOS EXCIPIENTES UTILIZADOS NAS PRÉ-FORMULAÇÕES	82
FIGURA 49 – DIFRATOGRAMA AJUSTADO DA LACTOSE <i>SPRAY DRIED</i>	83
FIGURA 50 - CURVAS DSC DAS MISTURAS BINÁRIAS DA LAMIVUDINA COM OS EXCIPIENTES UTILIZADOS NAS PRÉ-FORMULAÇÕES, OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	84
FIGURA 51 - CURVAS DSC DAS MISTURAS BINÁRIAS DO EFAVIRENZ COM OS EXCIPIENTES UTILIZADOS NAS PRÉ-FORMULAÇÕES, OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	87
FIGURA 52 - CURVAS DSC DAS MISTURAS BINÁRIAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA COM OS EXCIPIENTES UTILIZADOS NAS PRÉ-FORMULAÇÕES, OBTIDAS A 10 °C MIN ⁻¹ SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO	90

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – LOTES, FABRICANTES E FORNECEDORES DOS EXCIPIENTES UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	14
TABELA 2 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE ^{13}C CP-MAS DA LAMIVUDINA	25
TABELA 3 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE ^{13}C CP-MAS DO EFAVIRENZ	34
TABELA 4 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE ^{13}C CP-MAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	44
TABELA 5 – FAIXAS DE TEMPERATURA DE FUSÃO E VALORES DE CALOR DE FUSÃO DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM DIFERENTES RAZÕES DE AQUECIMENTO	47
TABELA 6 – PARÂMETROS DE LÁTICE DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM TEMPERATURA AMBIENTE E APÓS AQUECIMENTO A $110\text{ }^{\circ}\text{C}$	49
TABELA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE ^{13}C OBSERVADOS PARA EFAVIRENZ E LAMIVUDINA PUROS E EM MISTURA	62
TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE ^{13}C OBSERVADOS PARA EFAVIRENZ E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA PUROS E EM MISTURA	69
TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE ^{13}C OBSERVADOS PARA LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA PUROS E EM MISTURA	75
TABELA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE ENTALPIA DE FUSÃO (J g^{-1}) E AS TEMPERATURAS <i>ONSET</i> ($^{\circ}\text{C}$) DE FUSÃO DA LAMIVUDINA E SUAS MISTURAS BINÁRIAS	85
TABELA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE ENTALPIA DE FUSÃO (J g^{-1}) E AS TEMPERATURAS <i>ONSET</i> ($^{\circ}\text{C}$) DE FUSÃO DO EFAVIRENZ E SUAS MISTURAS BINÁRIAS	88
TABELA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE ENTALPIA DE FUSÃO (J g^{-1}) E AS TEMPERATURAS <i>ONSET</i> ($^{\circ}\text{C}$) DE FUSÃO DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA E SUAS MISTURAS BINÁRIAS	91

SIGLAS E ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
δ	Deslocamento Químico
Aids	Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CDF	Combinação em Dose Fixa
CP-MAS	Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DST	Doença sexualmente transmissível
DTG	Primeira Derivada da Curva TG
EFZ	Efavirenz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier (<i>Fourier-Transformed Infrared</i>)
Funed	Fundação Ezequiel Dias
HIV	Vírus da Imuno-Deficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HMQC	Coerência Heteronuclear de Múltiplo Quanta (<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>)
ITRN	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
ITRNN	Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo
MAS	Rotação no Ângulo Mágico (<i>Magic Angle Spinning</i>)

Min	Minuto
NQS	Supressão Não-Quaternária (<i>Non-Quaternary Suppression</i>)
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PF	Ponto de fusão
PPP	Parceria Público-Privada
PVP	Polivinilpirrolidona
ssNMR	Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (<i>solid state Nuclear Magnetic Resonance</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TDF	Fumarato de Tenofovir Desoproxila (<i>Tenofovir Disoproxil Fumarate</i>)
TEN	Tenofovir
TG	Termogravimetria
TOA	Análise Termo-Óptica (<i>Thermo-Optical Analysis</i>)

RESUMO

Efavirenz (EFZ), lamivudina (3TC) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) estão entre os fármacos mais utilizados para o tratamento da AIDS. Foram utilizadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (ssNMR), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), e Análise Termo-Óptica (TOA) para estudar possíveis interações entre os fármacos, visando o desenvolvimento de uma combinação em dose fixa (CDF, ou seja, dois ou mais fármacos na mesma formulação) dos mesmos. DSC e TOA evidenciaram deslocamentos significativos das temperaturas de fusão dos fármacos nas misturas EFZ-3TC e EFZ-TDF, o que sugere uma interação entre eles. Pequenas alterações foram observadas na mistura 3TC-TDF, que podem ser devidas à solubilização da 3TC após a fusão do TDF (que apresenta ponto de fusão menor que a primeira), o que sugere não haver incompatibilidade entre esses fármacos. Os espectros de FTIR não apresentaram modificações devido à sobreposição de bandas. As análises de ssNMR não apresentaram mudanças significativas nos valores de deslocamento químico (δ) das misturas, quando comparados aos dos fármacos puros, com exceção da mistura EFZ-TDF, que apresentou um deslocamento significativo dos sinais dos núcleos de carbono próximos a grupos capazes de participarem de ligações de hidrogênio. Esses resultados sugerem que ocorre interação apenas entre a mistura EFZ-TDF, já que as análises de ssNMR não confirmaram as interações sugeridas pelo DSC e TOA para a mistura EFZ-3TC. A 3TC apresentou indícios de incompatibilidade com a lactose *spray dried*, o EFZ, com os excipientes lactose *spray dried*, opadry e PVP-K30, e o TDF, com o estearato de magnésio e a lactose *spray dried*. Pode-se concluir que a produção de um medicamento contendo os três fármacos é possível, desde que sejam utilizadas estratégias para minimizar o contato entre o EFZ e o TDF, de modo a evitar a ocorrência de uma possível incompatibilidade entre eles.

Palavras-chave: Antirretrovirais, Excipientes, Interação, Análise Térmica, RMN do Estado Sólido.

ABSTRACT

Efavirenz (EFV), lamivudine (3TC) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) are among the most worldwide antiretrovirals for AIDS treatment. In this work, Solid-State Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR), Fourier-transform Infrared spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and thermo-optical analysis (TOA) were used to study possible interactions between these drugs, aiming the development of a fixed-dose combination (e.g., two or more active pharmacological products in the same formulation) of ARVs (antiretrovirals). DSC and TOA showed significant shifts of the melting temperatures of drugs in the mixtures EFZ-3TC and EFZ-TDF, suggesting an interaction between them. Slight changes were observed in the TDF-3TC mixture, which may be due to solubilization of 3TC after melting of TDF (which presents lower melting point than 3TC). The FTIR spectra showed no change due to overlapping bands. ssNMR analysis showed no significant changes in chemical shift values (δ) of the mixtures when compared to the pure drugs, except for the EFZ-TDF mixture, which showed a significant shift of the signals of the carbon nuclei near groups able to participate of hydrogen interactions. These results suggest that interaction occurs only between EFZ-TDF mixture, since the ssNMR did not confirm the interactions of EFZ-3TC mixture suggested by DSC and TOA results. Regarding the excipients, 3TC presented evidence of incompatibility with lactose spray dried. EFZ presented evidence of incompatibility with the excipients lactose spray dried, opadry and PVP- K30. TDF showed evidence of incompatibility with the magnesium stearate and lactose spray dried. It can be concluded that the production of a formulation containing the three drugs is possible, provided that strategies are employed to minimize contact between TDF and EFZ, to prevent a possible incompatibility between them.

Keywords: Antiretrovirals, Excipients, Interaction, Thermal Analysis, solid-state NMR

1 INTRODUÇÃO

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), a Aids (Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida) está entre as doenças prioritárias. De 1980, ano em que houve o primeiro caso de Aids no Brasil, até 2012, foram notificados 656.701 casos da doença no país. Há alguns anos, receber o diagnóstico de Aids era uma sentença de morte. Mas, hoje em dia, é possível ser soropositivo e viver com qualidade de vida. Isso é possível graças ao surgimento do denominado “coquetel anti-Aids”, uma associação entre múltiplos agentes antirretrovirais, que se mostrou muito mais eficiente do que a terapia com um único fármaco na manutenção da carga viral em níveis indetectáveis (Ministério da Saúde; Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais: www.aids.gov.br).

Por meio da Política Nacional de Desenvolvimento de Fármacos do Ministério da Saúde, desde 2009 vem sendo firmadas parcerias entre o governo brasileiro e indústrias farmacêuticas privadas, denominadas PPPs (Parcerias Público-Privadas) para nacionalizar a produção de medicamentos de alto valor agregado que antes eram importados pelo governo. Atualmente, 29 medicamentos figuram a lista do grupo das PPPs, entre os quais estão medicamentos utilizados no tratamento da Aids. A importação dos 29 medicamentos do grupo das PPPs custa ao Ministério da Saúde cerca de R\$ 1,5 bilhão por ano. Sem a necessidade de importar esses medicamentos, o país poderá economizar cerca de R\$ 1 bilhão por ano.

Além de interesses econômicos, que visam minimizar o déficit comercial do setor de saúde, os medicamentos escolhidos para figurar na produção via PPPs também estão de acordo com a política pública de atenção farmacêutica do SUS (Sistema Único de Saúde). As ações privilegiam o aumento da produção de fármacos para combater doenças que mais acometem a

população brasileira. As PPPs são uma iniciativa para que o Brasil diminua a dependência na aquisição de medicamentos no mercado internacional, dê mais um passo para o desenvolvimento da indústria nacional e reduza significativamente os custos do Estado na garantia de tratamento de diversas doenças, inclusive do Programa DST/AIDS do Ministério da Saúde. Os fármacos incluídos nas parcerias estão na lista de produtos estratégicos prioritários para o SUS, definidos na portaria nº 978, publicada em maio de 2008 (Brasil, 2008b) e atualizada pela portaria nº 1.284, publicada em maio de 2010 (Brasil, 2010a).

Um dos esquemas de tratamento mais utilizados entre os portadores do vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), principalmente pelos co-infectados pelo vírus da hepatite B é uma associação entre três fármacos antirretrovirais: lamivudina (3TC), tenofovir (TDF) e efavirenz (EFZ), sendo os três incluídos na lista das PPPs em 2008 pela portaria nº 978 e pertencentes à Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) de 2010 (Brasil, 2010b). Cada um desses fármacos constitui um medicamento isolado, o que, além de causar um desconforto ao paciente, que deve tomar muitos comprimidos, também gera um alto custo ao governo. Por esse motivo, o Ministério da Saúde tem um grande interesse na produção de uma combinação em doses fixas (CDF, vários fármacos misturados em uma única forma farmacêutica) para os fármacos mencionados. Entretanto, essa associação entre diversos fármacos em um único sistema pode gerar problemas de incompatibilidades, que devem ser extensamente avaliados.

Diante da importância de se avaliar as características físico-químicas dos fármacos, a possível existência de formas polimórficas dos mesmos e as possíveis incompatibilidades entre os fármacos e entre fármacos e excipientes para a produção de um medicamento com qualidade, e das prioridades e necessidades do governo brasileiro, foram escolhidos para estudo três fármacos dos 19 que constituem o coquetel para o tratamento dos portadores

do vírus HIV, tenofovir, lamivudina e efavirenz. Esses fármacos foram escolhidos porque a sua associação em um único medicamento é de grande interesse para o Ministério da Saúde, já tendo sua produção prevista por um laboratório público nacional (Fundação Ezequiel Dias, Funed), assim como a associação dupla dos fármacos tenofovir e lamivudina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Aids, hoje considerada uma pandemia, é uma doença do sistema imunológico humano causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), um retrovírus que reduz progressivamente a eficácia do sistema imunológico e torna os infectados suscetíveis a infecções oportunistas (Galo *et al.*, 1983; Sepkowitz, 2001). O HIV é transmitido pelo contato direto de uma membrana mucosa ou do sangue com um fluido corporal que contém o HIV, tais como sangue, sêmen, secreção vaginal e leite materno (Ministério da Saúde; Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais: www.aids.gov.br).

A Aids foi primeiramente relatada em 5 de junho de 1981, quando o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos, registrou o *Pneumocystis carinii* em cinco homossexuais em Los Angeles, Califórnia. No início, o CDC não tinha um nome oficial para a doença. O CDC, em busca de um nome e observando as comunidades infectadas, criou o termo "a doença dos 4Hs", referindo-se aos haitianos, homossexuais, hemofílicos e usuários de heroína. No entanto, depois de determinar que a Aids não era uma doença exclusiva da comunidade homossexual, o termo "Aids" foi criado em uma reunião em julho de 1982. O caso mais antigo de infecção pelo HIV conhecido vem do Congo em 1959. O vírus HIV descende do vírus da imunodeficiência símia (SIV), que infecta símios e macacos na África. Há evidências de que esse vírus infectava os humanos que caçavam chimpanzés para comer, e posteriormente, após contato desses humanos com o sangue infectado dos animais, o vírus sofria uma mutação e se transformava no HIV (*Centers for Disease Control and Prevention; Divisions of HIV/Aids Prevention: www.cdc.gov/hiv*).

Atualmente, existem cinco classes de medicamentos utilizados no tratamento contra a Aids: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (ITRNN), inibidores da protease, inibidores de fusão e inibidores da integrase. A primeira opção sugerida pelo Ministério da Saúde para a terapia inicial da doença é a combinação de três fármacos: 2 ITRN e 1 ITRNN. A associação entre a 3TC e a zidovudina (AZT) é a dupla de ITRN de primeira escolha para o tratamento inicial. Em casos de intolerância ao AZT, o TDF apresenta-se como uma alternativa. Em relação à classe dos ITRNN, existem dois fármacos disponíveis no Brasil: o EFZ e a nevirapina (NVP). Entre os dois, o EFZ é preferido, devido ao menor risco de efeitos adversos sérios e elevada potência de supressão viral (Brasil, 2008a).

A qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos são uma preocupação econômico-social constante dos órgãos sanitários de todos os países. O setor público é responsável pela definição dos parâmetros de qualidade dos medicamentos, bem como pela fiscalização do seu cumprimento. É obrigação da indústria farmacêutica o cuidado rigoroso com a qualidade e segurança dos seus processos e produtos. Um dos problemas enfrentados por ela é a ocorrência de polimorfismo (Oliveira, 2010).

Algumas substâncias existem sob diferentes formas cristalinas, polimórficas, que diferem em suas propriedades físicas. O polimorfismo também pode incluir produtos solvatados ou hidratados (pseudopolimorfos), a forma amorfa, e ainda os co-cristais (Giron, 2002). Este fenômeno pode levar a alterações nos produtos farmacêuticos no que se refere a parâmetros de pureza, estabilidade, qualidade e biodisponibilidade do produto farmacêutico, o que acarreta o comprometimento do efeito *in vivo* desejado (Center for Veterinary Medicine, 2005; Chieng *et al.*, 2011).

Além disso, algumas etapas do processo de fabricação do medicamento podem levar a alterações polimórficas, tais como: processo de micronização ou moagem, granulação via úmida e compressão. Desta forma, além da caracterização inicial da matéria-prima ao chegar na fábrica é importante avaliar se o processo produtivo também pode alterar a forma final gerando novas espécies polimorfas (Chieng *et al.*, 2011).

Segundo as instruções da agência americana FDA (*Food and Drug Administration*), para manter a qualidade do produto farmacêutico com a mesma segurança e eficácia terapêutica em relação ao medicamento referência (o qual tem todos os estudos clínicos evidenciados), o princípio ativo farmacêutico deve apresentar, além dos testes exigidos nas farmacopeias, especificações internas na indústria, quanto à existência/ausência de polimorfismo, tamanho de partícula e solubilidade (*Guidance for Industry*, 2000). Uma das técnicas mais utilizadas para a avaliação de polimorfismo é a Análise Térmica (Oliveira, 2010).

Vários estudos relacionados à aplicação da Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), na identificação, caracterização, estudos de compatibilidade, estabilidade e decomposição térmica de inúmeros fármacos, encontram-se descritos na literatura. Na indústria farmacêutica, a TG é utilizada na avaliação da estabilidade de fármacos ou medicamentos, na caracterização de substâncias, e na determinação de umidade. A DSC é empregada para fins de caracterização térmica dos constituintes, determinação da pureza de substâncias, identificação de polimorfismo, estudo de compatibilidade entre os constituintes da formulação e na avaliação da estabilidade dos fármacos ou medicamentos (Oliveira *et al.*, 2011).

Recentemente, diversos trabalhos em Análise Térmica têm sido publicados na área aplicada à indústria farmacêutica. Desta forma, cada vez mais, as

indústrias brasileiras demonstram o interesse nesse tipo de análise e adquirem equipamentos para sua realização (Oliveira, 2010).

Os artigos publicados na área farmacêutica demonstram que os dados obtidos por Análise Térmica, principalmente TG e DSC, estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto farmacêutico, seja quanto à eficácia terapêutica do medicamento ou estabilidade do mesmo ao longo do seu prazo de validade. Além disso, todos os órgãos regulamentadores de produtos farmacêuticos já descrevem a importância da Análise Térmica e dos parâmetros de qualidade dela provenientes (Oliveira, 2010).

As técnicas termoanalíticas são muito úteis nos estudos de compatibilidade de formulações farmacêuticas, pois possibilitam a avaliação de possíveis incompatibilidades entre fármacos e excipientes (adjuvantes da formulação) e a escolha de formulações mais estáveis com muita rapidez.

Um exemplo da utilidade da Análise Térmica no estudo de fármacos pode ser visto no trabalho de Yoshida e colaboradores (2010). Os autores observaram, por meio de DSC, a compatibilidade do verapamil com todos os excipientes comumente utilizados nas formulações dos medicamentos encontrados no mercado.

Felix e colaboradores (2009) observaram, utilizando DSC e TG/DTG, um aumento da estabilidade térmica do salbutamol devido à presença de excipientes na amostra comercial, quando comparada à amostra padrão (fármaco puro).

Rezende e colaboradores (2008) mostraram que o problema de estabilidade da formulação, observado durante o tempo de armazenamento de comprimidos de enalapril, era devido à incompatibilidade do fármaco com o excipiente dióxido de silício coloidal.

Pelos exemplos, pode-se observar que a Análise Térmica é aplicável a estudos de estabilidade de fármacos e na predição do tempo de prateleira em estudos de pré-formulação, confirmando ser uma poderosa ferramenta em tecnologia farmacêutica (Viana *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2011). Essa técnica é altamente sensível e de resposta rápida para identificar incompatibilidades em um período de tempo muito curto.

Além da Análise Térmica, a Difração de raios X de pó constitui uma técnica essencial no desenvolvimento do presente projeto, na identificação de possíveis formas polimórficas dos fármacos e suas interações, tais como ocorrência de amorfização quando misturados a algum excipiente.

Um exemplo da utilidade da Difração de raios X no estudo de fármacos pode ser visto no trabalho de Oliveira e colaboradores (2010). Os autores relataram o desaparecimento do pico de fusão da sinvastatina quando misturada ao excipiente butilhidroxianisol (BHA) na curva DSC da mistura binária, e por meio de Difração de raios X constataram que ocorria amorfização do fármaco quando em contato com o BHA.

Medina e colaboradores (2014) utilizaram a Análise Térmica e a Difração de raios X para estudar as diferentes formas polimórficas do sacarinato de sódio. Foi relatada uma transição de fase da forma monoclinica para a triclinica durante o aquecimento.

Modelos químicos simples podem ser utilizados para compreender a importância que a estrutura química exerce sobre a solubilidade de um fármaco. De forma concisa, há um balanço de forças de atração e repulsão entre soluto e moléculas do solvente. Para que ocorra a dissolução, forças de atração entre soluto-solvente devem superpor-se às forças atrativas que mantêm o sólido intacto e moléculas de solvente agregadas, além de considerações entrópicas.

De forma mais detalhada, a energia livre de solvatação liberada pela dissolução tem de ser maior do que a energia livre de rede do fármaco em questão, garantindo assim espontaneidade no processo.

Como é comum a ocorrência de energias de rede diferentes entre estruturas cristalinas distintas, a solubilidade de diferentes formas cristalinas (polimórficas) de um determinado fármaco deve diferir. Logo, uma flutuação nas taxas de dissolução de diferentes polimorfos de um mesmo princípio ativo poderá manifestar-se apresentando graus variados de biodisponibilidade (Li *et al.*, 2011).

A Análise Térmica e a Difração de raios X são técnicas muito úteis na avaliação de possíveis formas polimórficas de fármacos, bem como suas interações com os excipientes utilizados na formulação, que afetam significativamente a ação dos mesmos no organismo.

No entanto, o estudo de interações soluto-solvente é relativamente facilitado em solução. No estado sólido, os processos físico-químicos, são muito menos acessíveis, o que torna seu estudo muito mais complexo, principalmente pela cinética mais lenta. Nesse contexto, as análises de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (ssNMR) podem desempenhar um papel de extrema valia (Geppi *et al.*, 2008).

Por meio dessa técnica, as interações entre fármacos e entre fármaco-excipiente podem ser acessadas em um sistema intacto, no estado sólido, como são encontrados em comprimidos, evidenciando até mesmo as interações mais leves e as limitações no tempo de prateleira do medicamento. Além disso, a técnica de ssNMR é muito útil na identificação, caracterização e quantificação das diferentes formas polimórficas dos fármacos, bem como para o estudo das transições entre uma forma polimórfica e outra (Garro Linck *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2010; Virtanen & Maunu, 2010). Apesar de todas essas

vantagens, alguns trabalhos que utilizam a técnica para a caracterização das diferentes formas polimórficas de um fármaco podem ser encontrados na literatura (Lee *et al.*, 2010; Carignani *et al.*, 2013), mas poucos trabalhos utilizam ssNMR para a avaliação da estabilidade e compatibilidade de formulações farmacêuticas, provavelmente devido ao longo tempo de análise requerido (Chieng *et al.*, 2011; Geppi *et al.*, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as características térmicas, estabilidade e polimorfismo dos fármacos antirretrovirais lamivudina, efavirenz e tenofovir, e estudar a compatibilidade de misturas binárias e ternárias desses fármacos e seus excipientes.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Estabelecer parâmetros experimentais e sugerir especificações de controle de qualidade para fármacos utilizados como matérias-primas;
- 2) Realizar estudos de compatibilidade dos princípios ativos (fármacos) junto aos excipientes da formulação, estabelecendo possíveis incompatibilidades entre os fármacos e entre fármacos e excipientes;
- 3) Determinar a existência de formas polimorfas/pseudopolimorfas dos fármacos por meio de Análise Térmica, Difração de raios X de pó e RMN do estado sólido.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material

Lamivudina (3TC, $C_8H_{11}N_3O_3S$) foi obtida pela Hangzhou Coben Pharmaceutical (China), com pureza igual a 99,7%. Efavirenz (EFZ, $C_{14}H_9ClF_3NO_2$) foi obtido pela Nortec (Brasil), apresentando pureza igual a 98,3%. Tenofovir (TEN, $C_9H_{14}N_5O_4P$), ou fumarato de tenofovir desoproxila (TDF, $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P$), foi obtido pela Nortec Química (Brasil), com pureza igual a 99,4%. A estrutura química dos fármacos está apresentada na Figura 1. Cada fármaco foi individualmente pesado e as misturas físicas foram preparadas em uma razão 1:1 m/m.

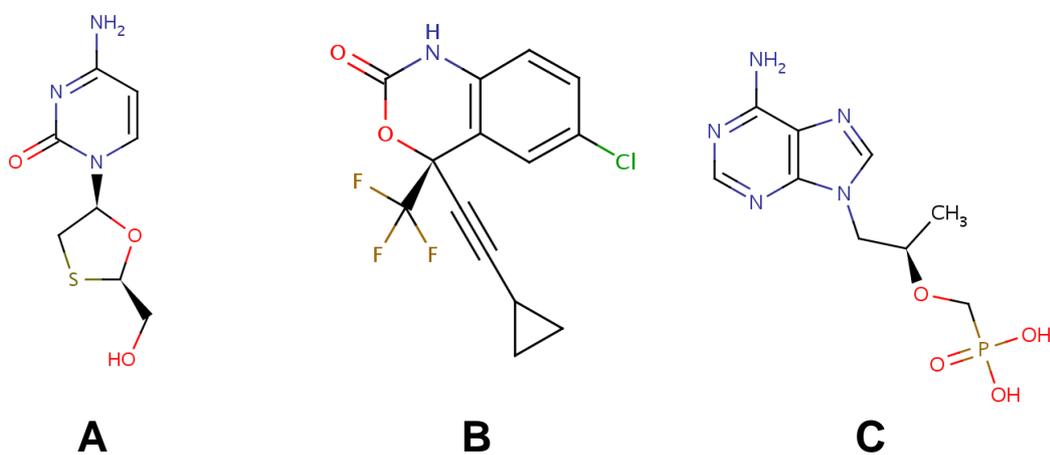


Figura 1 – Fórmulas estruturais dos antirretrovirais A) lamivudina; B) efavirenz; C) tenofovir.

O tenofovir é administrado *in vivo* como fumarato de tenofovir desoproxila (Figura 2), um pró-fármaco do tenofovir que no organismo se converte à forma

ativa (tenofovir). Neste trabalho, os dois termos (tenofovir e fumarato de tenofovir desoproxila) serão usados como sinônimos.

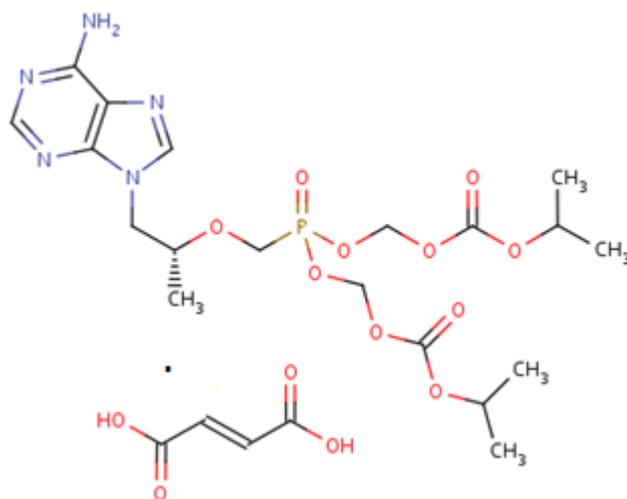


Figura 2 – Fórmula estrutural do fumarato de tenofovir desoproxila.

Na Tabela 1 estão apresentadas as informações dos excipientes utilizados nos estudos de pré-formulação. A pureza dos excipientes não foi informada.

Tabela 1 – Lotes, fabricantes e fornecedores dos excipientes utilizados nos estudos de pré-formulação.

Excipiente	Lote	Fabricante	Fornecedor
Amido de milho (diluyente, aglutinante)	2523	Cargil Agrícola S.A.	Valdequímica Produtos Químicos Ltda.
Amido parcialmente pré-gelatinizado (diluyente, aglutinante)	IN513582	Colorcon do Brasil Ltda.	Colorcon do Brasil Ltda.
Celulose microcristalina 102 (diluyente, aglutinante)	115011016	Blanver Farmoquímica Ltda.	Blanver Farmoquímica Ltda.
Croscarmelose sódica (desintegrante)	ACRMC/03/29310	Amishi Drugs & Chemicals Ltd.	Valdequímica Produtos Químicos Ltda.
Crospovidone (desintegrante)	87194156P0	BASF	Blanver Farmoquímica Ltda.
Dióxido de silício coloidal (deslizante)	1405069	Cabot Corporation	Genix Indústria Farmacêutica Ltda.
Estearato de magnésio (lubrificante)	007009	Inbra Indústrias Químicas	CAQ - Casa da Química Indústria e Comércio Ltda.
Fosfato de cálcio dibásico (diluyente)	B24065A	Budenheim	Genix Indústria Farmacêutica Ltda.
Glicolato de amido sódico (desintegrante)	19224/10	Blanver Farmoquímica Ltda.	Blanver Farmoquímica Ltda.
Lactose <i>spray dried</i> (diluyente)	8510042961	Foremost Farms Usa	FURP - Fundação para Remédio Popular
Opadry 7003 (revestimento)	004/06	Colorcon do Brasil Ltda.	Colorcon do Brasil Ltda.
PVP-K30 (aglutinante)	20091228	Nanhang Industrial Co., Ltd.	Valdequímica Produtos Químicos Ltda.

4.2 Métodos

4.2.1 Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas TG/DTG foram obtidas em uma termobalança modelo DTG 60 (Shimadzu, Japão), alocada no Departamento de Química da UFMG, numa faixa de temperatura entre 25 e 700 °C, utilizando cadinhos de alumina abertos, contendo aproximadamente 3 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento DSC-60 (Shimadzu, Japão) alocado no Departamento de Química da UFMG, utilizando cadinhos de alumínio parcialmente fechados, contendo cerca de 1 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ numa faixa de temperatura entre 25 e 450 °C. O equipamento foi calibrado com índio (PF 156,6 °C; $\Delta H_{fus} = 28,5 \text{ J g}^{-1}$) e chumbo (PF 327,5 °C).

As misturas entre os fármacos e entre os fármacos e excipientes foram obtidas por mistura mecânica.

4.2.2 Análise Termo-Óptica (TOA)

A análise Termo-Óptica é uma técnica na qual a amostra é observada utilizando-se um microscópio durante um programa de aquecimento controlado (com atmosfera não controlada). As imagens TOA foram obtidas em diferentes

intervalos de tempo durante o aquecimento, utilizando um equipamento hot stage FP82 (Mettler, Suíça), com uma razão de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e um microscópio modelo DM 4000B (Leica, Alemanha), acoplado a uma câmera digital Leica modelo DFC 280. As imagens foram capturadas com um aumento de 100 vezes. O equipamento utilizado encontra-se alocado na Fundação Ezequiel Dias (Funed).

4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier foram obtidos em um espectrofotômetro modelo Spectrum 1000 (Perkin Elmer, Estados Unidos), alocado no Departamento de Química da UFMG, em temperatura ambiente, utilizando-se um acessório de ATR (Reflexão Total Atenuada). As amostras foram pressionadas contra um cristal de seleneto de zinco, e os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$.

4.2.4 Difração de raios X (DRX)

As análises de raios X para os fármacos foram obtidas em um difratômetro modelo XRD-7000 (Shimadzu, Japão), alocado no Departamento de Química da UFMG, sob 40 kV , 30 mA , munido de um tubo de cobre e um monocromador de grafite, com $K_{\alpha 1\text{Cu}} = 1,54056\text{ \AA}$. O porta-amostras foi submetido a *spinning* de 30 rpm , para prevenir orientação preferencial e minimizar efeitos de rugosidade. As medidas foram realizadas sob a ótica paralela policapilar. Os dados foram obtidos na faixa de $4,00 - 70,00^{\circ} 2\theta$, com incremento de $0,01^{\circ} 2\theta$

e constante de tempo de 5 segundos por incremento. As amostras foram submetidas à análise segundo o algoritmo de Rietveld para a determinação precisa dos parâmetros de rede. A análise de Rietveld do experimento de Difração de raios X de pó refinou 1370 picos de reflexão para 3TC, 997 picos de reflexão para EFZ e 1709 picos de reflexão para TDF na faixa de $4 - 70^\circ 2\theta$.

As análises de raios X para os excipientes puros foram obtidas no mesmo equipamento. Os dados foram obtidos na faixa de $10 - 70^\circ 2\theta$, com incremento constante e velocidade de $2^\circ 2\theta \text{ min}^{-1}$.

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (ssNMR)

Os espectros de RMN do estado sólido de ^{13}C desacoplados de próton para as misturas entre os fármacos foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 NMR (Bruker, Alemanha) alocado no Departamento de Química da UFMG, utilizando uma sonda comercial dupla ressonância 4 mm MAS. Uma sequência de pulso de polarização cruzada (Pines *et al.*, 1973) foi utilizada com os seguintes parâmetros típicos de aquisição: Largura de pulso $90^\circ 4 \mu\text{s}$, tempo de bloqueio de giro $5000 \mu\text{s}$, atraso de reciclo 4,0 s, 3072 pontos de dados, 3072 aquisições, largura espectral 28,3 kHz e velocidade de spinning de 4 kHz. Adamantano foi usado como referência (sinal de campo alto em 29,5 ppm).

Os espectros de RMN do estado sólido para os fármacos puros foram adquiridos em um espectrômetro Varian Infinity Plus 400, alocado no Departamento de Química da Università di Pisa (Itália), operando em uma frequência de Larmor de 400,03 MHz, 100,59 MHz e 161,93 MHz para ^1H , ^{13}C e ^{31}P , respectivamente. Foi utilizada uma sonda comercial MAS de dupla

ressonância de 3,2 mm, com duração do pulso 90° de 2 μ s para ^1H e ^{31}P , e de 3 μ s para ^{13}C .

Os espectros ^1H MAS a 17 KHz (TDF), 16 KHz (EFZ) e 14 KHz (3TC) foram adquiridos por excitação direta, com um atraso de pulso de 5 s.

Os espectros de RMN do estado sólido de ^{13}C desacoplados de próton dos fármacos puros foram adquiridos com a sequência de pulso de polarização cruzada com o uso de uma rampa (Pines *et al.*, 1973) e o esquema SPINAL de desacoplamento (Fung *et al.*, 2000). O tempo de contato de 5 ms foi o que proporcionou a máxima intensidade de sinal e um atraso de pulso de 20 s foi utilizado em todos os experimentos de polarização cruzada. Espectros de ^{13}C livres de banda de rotação foram obtidos utilizando-se uma velocidade de rotação de 17 KHz para o TDF, 16 KHz para o EFZ e 14 KHz para a 3TC. Experimentos de supressão não-quaternária (NQS, *Non-Quaternary Suppression*) foram obtidos com tempos de defasagem de 50, 100 e 200 μ s. O espectro 2D MAS-J-HMQC (Lesage *et al.*, 1998) do TDF foi obtido com o tempo de contato de 1 ms e uma frequência MAS de 17,85 KHz (sequência sincronizada com o rotor). Nesse experimento foram adquiridas 400 varreduras para 84 linhas.

Espectros de ^{31}P do TDF foram obtidos por excitação direta com atraso de pulso de 120 s e uma frequência MAS de 17 KHz.

Todos os experimentos com temperatura variável foram adquiridos após 15 minutos de estabilização da temperatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos fármacos

5.1.1 Lamivudina

5.1.1.1 TG/DTG e DSC

Na curva TG da 3TC (Figura 3) observa-se que o fármaco é termicamente estável até cerca de 217 °C. A curva DTG indica que o processo de decomposição térmica da 3TC ocorre em uma única etapa, de 217,2 até 335,7 °C ($T_{onset} = 256,2$ °C), com perda de massa de 57,06%. Após isso, ocorre uma perda de massa de 13,81% devido ao processo de carbonização do fármaco.

Na curva DSC da 3TC (Figura 3) pode-se observar um pico endotérmico que corresponde à fusão do fármaco ($T_{onset} = 173,5$ °C, $\Delta H_{fus} = 355,3$ J g⁻¹). Após a fusão, é observado um evento exotérmico próximo a 260 °C, devido ao processo de decomposição do fármaco. Na literatura, a forma I e a forma II da 3TC apresentam temperaturas similares de fusão. A temperatura relatada para o pico de fusão da forma I da 3TC é 178,2 °C, e da forma II, 178,6 °C. Porém, a forma I apresenta um evento endotérmico próximo a 117 °C devido a um processo de recristalização do fármaco. A curva DSC obtida para a amostra não apresenta esse pico endotérmico anterior à fusão, o que é um indicativo de que se trata da forma II da 3TC (Chadha *et al.*, 2012).

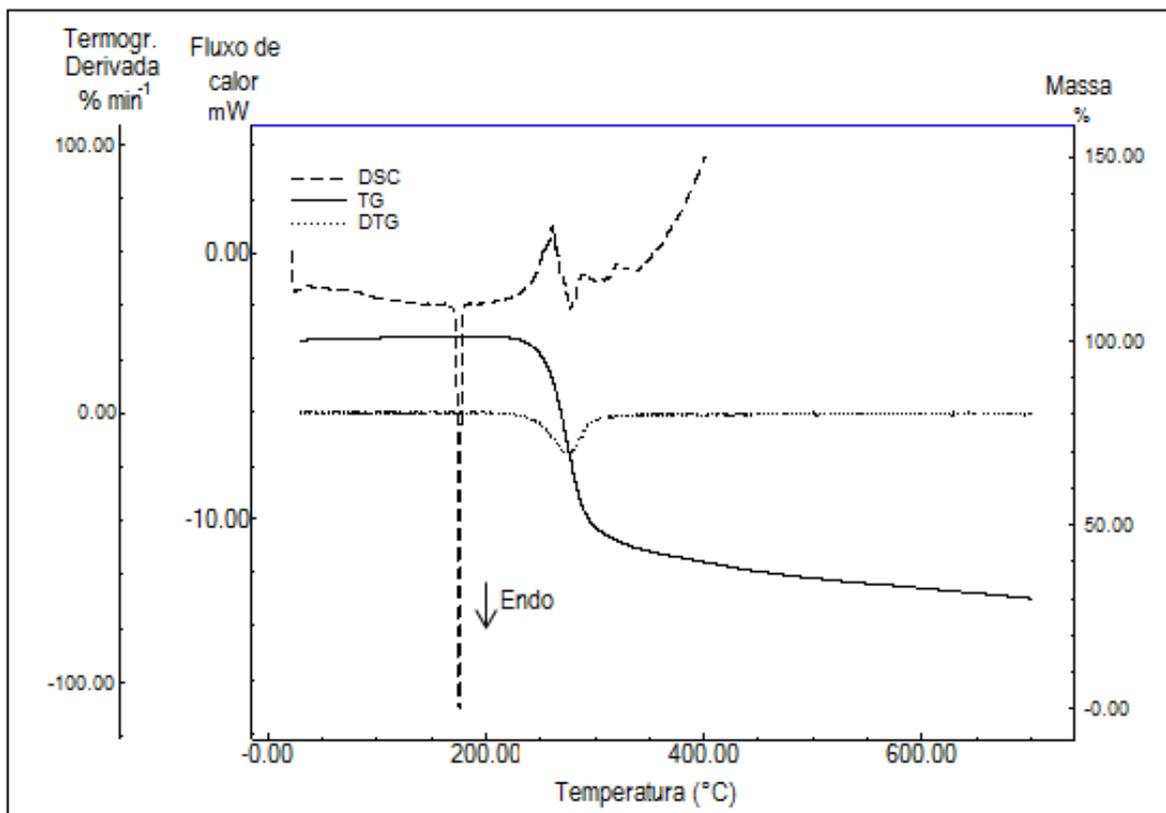


Figura 3 – Curvas DSC e TG/DTG da lamivudina obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.1.1.2 TOA

As análises TOA indicaram que a 3TC funde na faixa de temperatura entre $174,6$ e $176,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4). A forma de bipirâmide observada para os cristais de 3TC é característica da forma II do fármaco, confirmando os resultados obtidos por DSC (Chadha *et al.*, 2012).

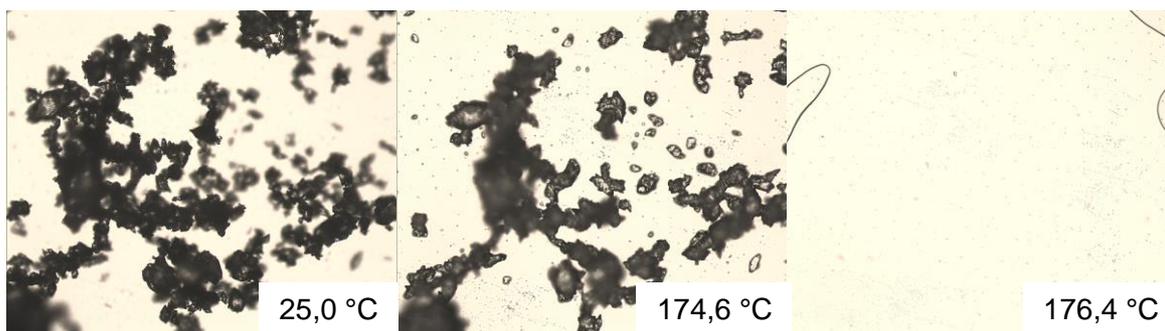


Figura 4 – Imagens TOA da lamivudina (aumento de 100 vezes).

5.1.1.3 FTIR

Foi feita a caracterização dos fármacos por espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier. Todas as bandas dos espectros foram assinaladas de acordo com a literatura (Silverstein *et al.*, 1991).

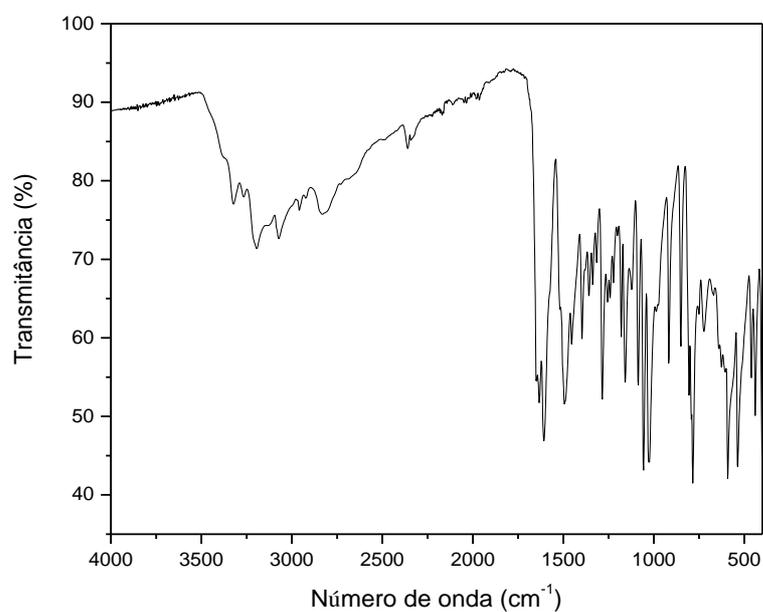


Figura 5 – Espectro FTIR da lamivudina.

O espectro FTIR da 3TC (Figura 5) exibe uma banda característica de estiramento do grupo carbonila (C=O) da função carbamida em 1633 cm^{-1} . Esta banda se sobrepõe com a banda de deformação do grupo N–H em 1608 cm^{-1} . A banda característica da vibração de estiramento do grupo imina ($R_2\text{C=NR}$) é observada em 1647 cm^{-1} . A banda de dobramento do grupo CH_2 aparece em 1495 cm^{-1} . Uma banda intensa característica do estiramento de ligações C–O é observada em 1057 cm^{-1} , próxima à banda de estiramento C–N em 1026 cm^{-1} . Uma banda muito intensa ocorre em 785 cm^{-1} , devido ao dobramento fora do plano do grupo $=\text{C–H}$. Bandas largas devido à vibração de estiramento dos grupos $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$ são observadas entre $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$. A atribuição feita para as bandas de absorção da 3TC encontra-se de acordo com dados obtidos na literatura (Porfírio *et al.*, 2015).

5.1.1.4 DRX

A 3TC cristaliza-se segundo o grupo espacial $P2_1$, a célula assimétrica compreende quatro moléculas de lamivudina e duas de água. Os parâmetros de rede ajustados segundo o algoritmo de Rietveld correspondem a $a = 11,59 \pm 0,01^\circ$, $b = 11,24 \pm 0,01^\circ$ e $c = 16,045 \pm 0,001^\circ$, sendo $\alpha = \gamma = 90,000$ e $\beta = 94,172 \pm 0,005^\circ$ (Figuras 6 e 7).

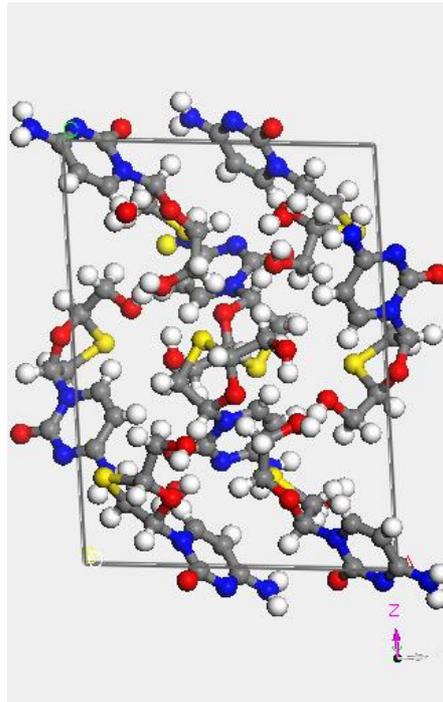


Figura 6 – Célula unitária da lamivudina obtida pelo ajuste de Rietveld (Átomos de carbono em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e enxofre em amarelo).

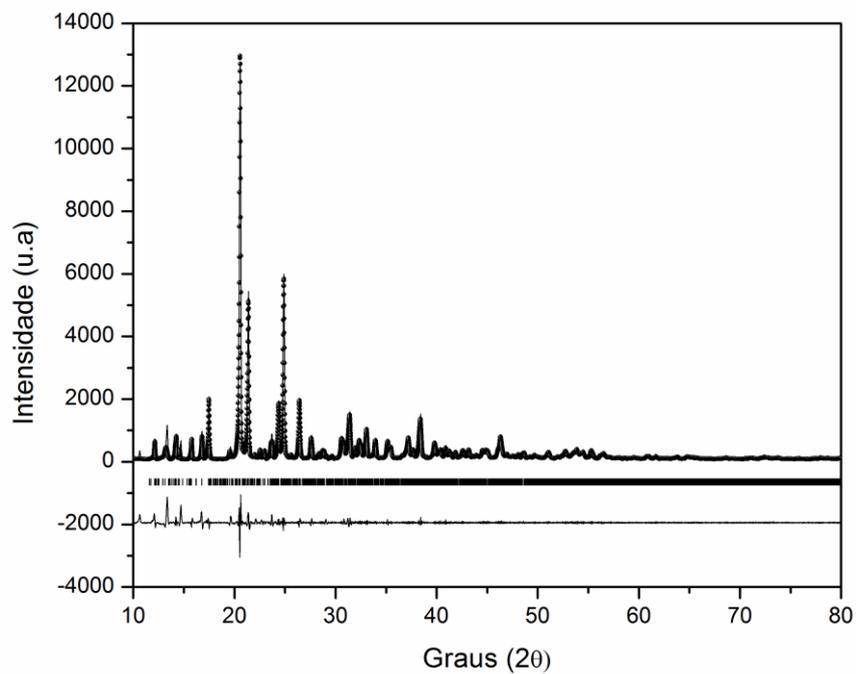


Figura 7 – Difratoograma ajustado da lamivudina.

5.1.1.5 ssNMR

A numeração adotada para os átomos da molécula da 3TC é mostrada na Figura 8. O espectro de ^{13}C CP-MAS (Polarização Cruzada com Rotação no Ângulo Mágico) do fármaco é apresentado na Figura 9.

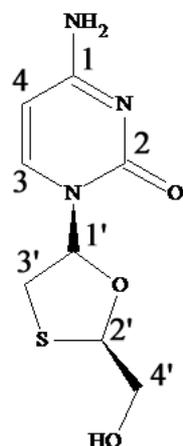


Figura 8 – Numeração dos átomos das moléculas da lamivudina.

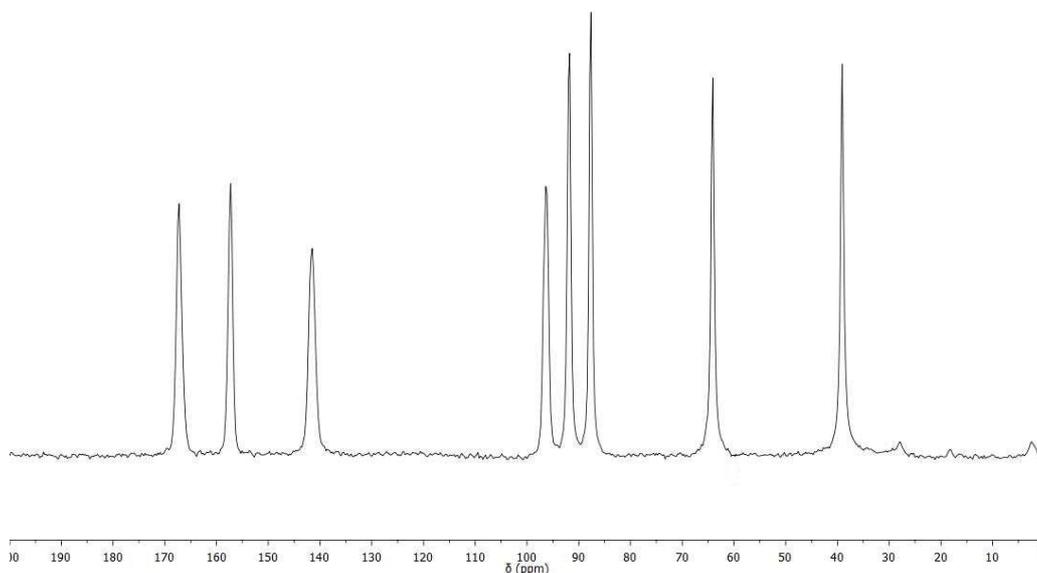


Figura 9 – Espectro ^{13}C CP-MAS da lamivudina obtido com uma frequência MAS de 14 KHz.

Oito sinais são observados no espectro de ^{13}C da 3TC. O átomo de carbono carbamida C2 ressona em 157,3 ppm, enquanto o átomo de carbono C1 ressona em 167,2 ppm. Os dois outros átomos de carbono sp^2 (C3 e C4) ressonam em 141,5 e 96,3 ppm. Os outros sinais são atribuídos aos átomos de carbono sp^3 ligados a um ou dois átomos eletronegativos e são observados entre 39 e 92 ppm (Figura 9).

Tabela 2 – Atribuição dos sinais do espectro de ^{13}C CP-MAS da lamivudina.

Carbono	δ (ppm)
1	167,2
2	157,3
3	141,5
4	96,3
1'	91,9
2'	87,7
3'	39,1
4'	64,1

Medidas do tempo de relaxação spin-rede (T_1)

Após uma perturbação no sistema de spins, geralmente causada pela aplicação de pulsos de radiofrequência, esse sistema tende a voltar para seu estado de equilíbrio por meio de processos de relaxação. O processo de relaxação relacionado à volta da população de spins para a sua distribuição de Boltzmann é denominado relaxação spin-rede ou longitudinal (T_1). A medida do tempo de relaxação spin-rede é uma das ferramentas mais valiosas para o estudo de processos dinâmicos em um sólido. A relaxação spin-rede envolve a troca de energia do sistema com a rede (vizinhança) e é um processo

exponencial de primeira ordem caracterizado por um tempo de relaxação T_1 , que depende da razão giromagnética do núcleo, assim como da mobilidade da rede. Assim, espera-se que em sólidos cristalinos e líquidos viscosos o valor de T_1 seja grande, e na medida em que a mobilidade da rede aumenta, o valor de T_1 diminua (Geppi *et al.*, 2008).

Em amostras sólidas, a interação dipolar entre os núcleos é a que apresenta maior intensidade (com exceção da interação quadrupolar, quando essa está presente). Um efeito direto do forte acoplamento dipolar homonuclear entre núcleos abundantes (principalmente de ^1H e ^{19}F) é a chamada *difusão de spins*, um fenômeno que consiste na transferência espacial da magnetização longitudinal entre diferentes regiões da amostra. Esses efeitos de difusão de spins impedem que os tempos de relaxação spin-rede de núcleos abundantes sejam interpretados em termos de propriedades dinâmicas de uma região específica da molécula, mas eles ainda podem fornecer informações preciosas a respeito da dinâmica global da amostra. Em particular, essa informação é muito útil no estudo de interações entre os componentes de uma mistura, já que a difusão de spins tende a mediar os diferentes valores de T_1 presentes na amostra a um único valor, e o grau em que é obtida essa média fornece informações sobre a heterogeneidade da amostra. Quando se misturam dois componentes, cada um deles vai apresentar a média do seu próprio valor de T_1 . Se para a mistura forem obtidos dois valores característicos de T_1 (cada um correspondendo a um componente da mistura), isso indica que a amostra é heterogênea e não houve um grau significativo de “mistura” entre os componentes. Porém, se for obtido um único valor de T_1 para a mistura, significa que ela é homogênea o bastante para apresentar um único valor de T_1 , ou seja, houve uma “mistura” entre os componentes. Em outros termos, pode-se dizer que houve uma interação significativa entre eles (Geppi *et al.*, 2008).

Os valores de $^1\text{H } T_1$ podem ser obtidos por meio de diferentes experimentos. Eles podem ser obtidos diretamente no espectro de ^1H , ou no espectro de ^{13}C por meio da técnica de polarização cruzada, em que os tempos de relaxação dos núcleos de ^1H são obtidos por meio do espectro de ^{13}C , devido aos núcleos de carbono que estão acoplados com os prótons. Durante a realização desse estudo, os valores de T_1 dos núcleos de ^1H foram obtidos a partir dos espectros de ^{13}C utilizando-se a técnica de inversão-recuperação. Nessa técnica, um pulso de 180° é aplicado à amostra, o qual inverte as populações do sistema de spins, que evolui num tempo variável t durante o processo de relaxação spin-rede, que tende a restaurar as condições de equilíbrio. Por meio da aquisição do FID em diversos tempos t , é obtida a curva de recuperação da magnetização (I) como uma função de t . O valor de T_1 é determinado por meio da seguinte equação:

$$I = M_0(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}})$$

Na qual M_0 é o valor de equilíbrio da magnetização longitudinal (Geppi *et al.*, 2008).

A curva de retorno exponencial da magnetização longitudinal da 3TC após a aplicação do pulso é mostrada na Figura 10. Por meio da técnica de inversão-recuperação, o valor de T_1 encontrado para os núcleos de ^1H na amostra da 3TC foi de 40,53 s, que será depois comparado aos valores obtidos para as misturas entre os fármacos.

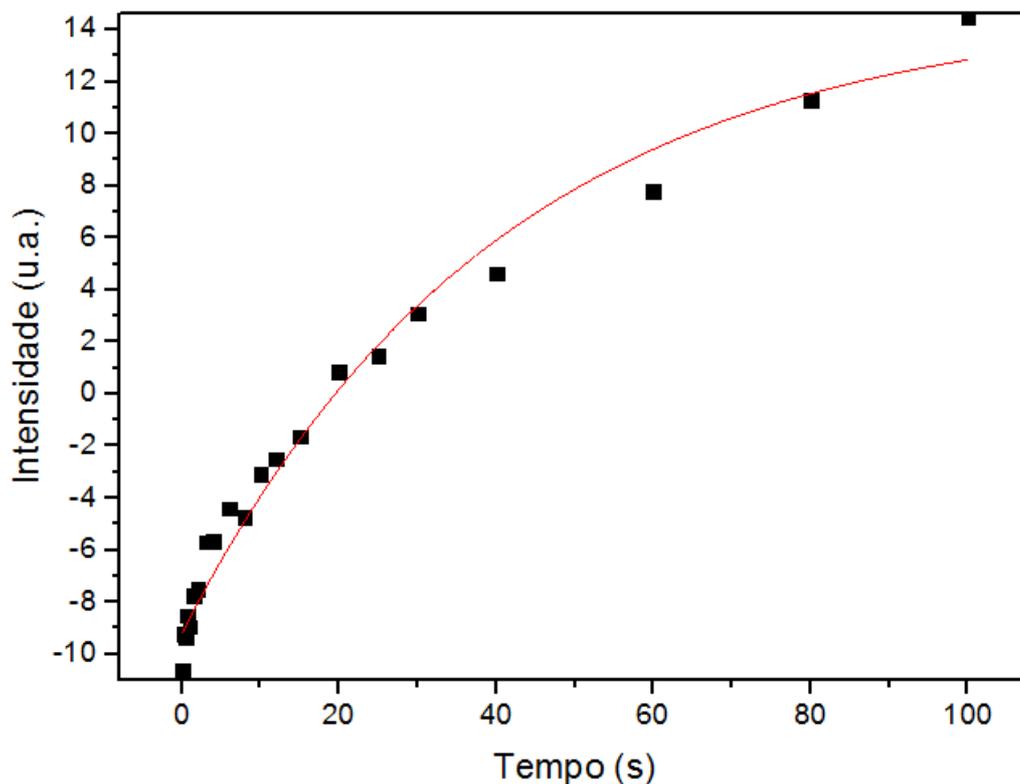


Figura 10 – Curva de retorno exponencial da magnetização longitudinal da lamivudina.

5.1.2 Efavirenz

5.1.2.1 TG/DTG e DSC

Pode-se observar pela curva TG do EFZ (Figura 11) que o fármaco apresenta estabilidade térmica até cerca de 158 °C. A curva DTG indica que o processo de decomposição térmica do EFZ ocorre em uma etapa, de 157,6 até 268,1 °C ($T_{onset} = 220,4$ °C), com perda de massa de 92,5%. Após isso, há uma perda de massa de 4,83% devido ao processo de carbonização do fármaco.

A curva DSC do EFZ (Figura 11) apresenta um pico endotérmico, correspondente à fusão do fármaco ($T_{onset} = 135,7 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\Delta H_{fus} = 124,3 \text{ J g}^{-1}$). Após a fusão, é observado um evento exotérmico próximo a $260 \text{ } ^\circ\text{C}$ característico do processo de decomposição da amostra.

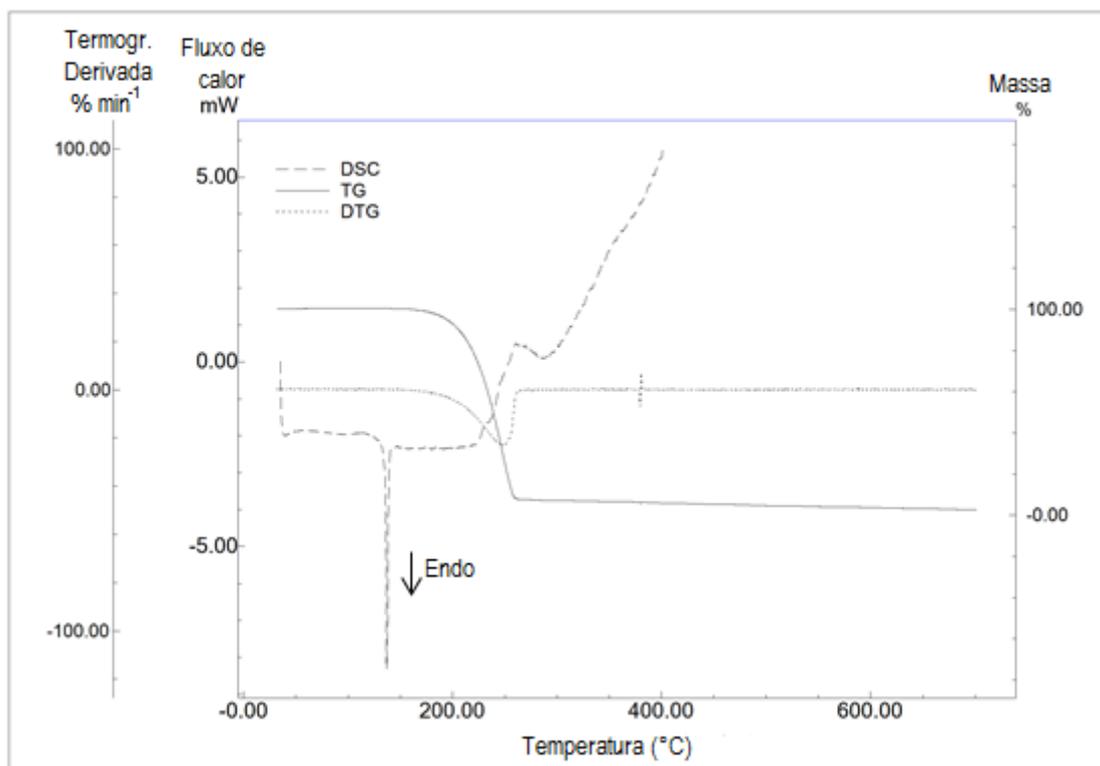


Figura 11 – Curvas DSC e TG/DTG do efavirenz obtidas a $10 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.1.2.2 TOA

As imagens TOA indicaram que o EFZ funde na faixa de temperatura entre $133,6$ e $137,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Figura 12).

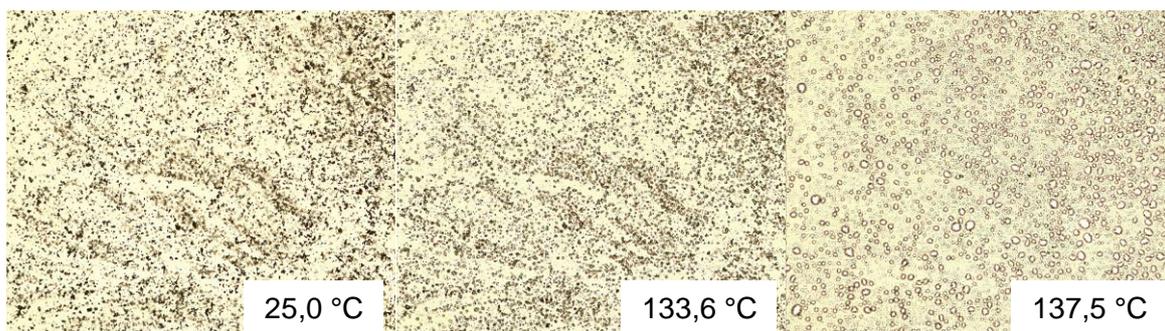


Figura 12 – Imagens TOA do efavirenz (aumento de 100 vezes).

5.1.2.3 FTIR

O espectro FTIR do EFZ é mostrado na Figura 13.

O espectro exibe uma banda característica da vibração de estiramento do grupo C=O em 1743 cm^{-1} e uma banda de estiramento do grupo –NH– em 3310 cm^{-1} , característica de carbamatos. Uma banda intensa devido à vibração de estiramento de ligações –C–F é observada em 1183 cm^{-1} . A banda de estiramento da ligação tripla é observada em 2242 cm^{-1} . Vibrações de estiramento de ligações C=C no anel aromático ocorrem em 1600 e 1494 cm^{-1} .

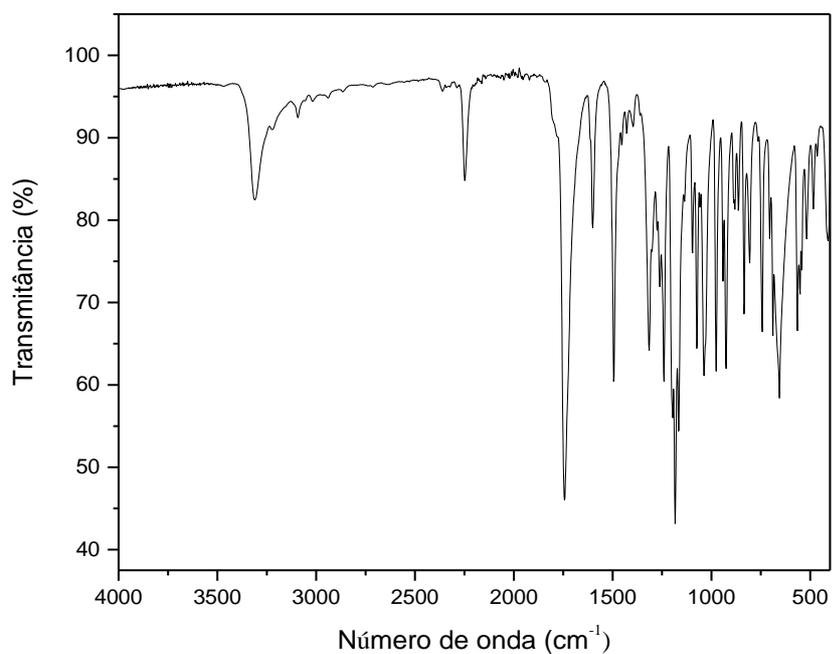


Figura 13 – Espectro FTIR do efavirenz.

5.1.2.4 DRX

O EFZ cristaliza-se segundo o grupo espacial $P2_12_12_1$. Os parâmetros de rede ajustados segundo o algoritmo de Rietveld correspondem a $a = 8,018 \pm 0,004^\circ$, $b = 13,417 \pm 0,007^\circ$ e $c = 24,75 \pm 0,01^\circ$, sendo $\alpha = \beta = \gamma = 90,000$ (Figuras 14 e 15).

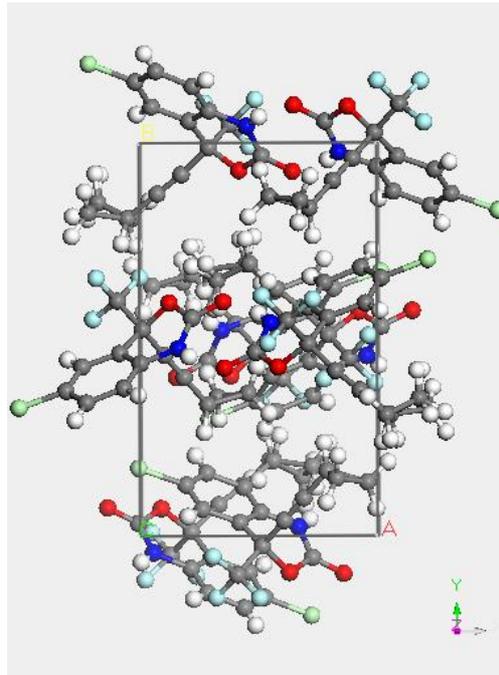


Figura 14 – Célula unitária do efavirenz obtida pelo ajuste de Rietveld (átomos de carbono em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul escuro, flúor em azul claro e cloro em verde).

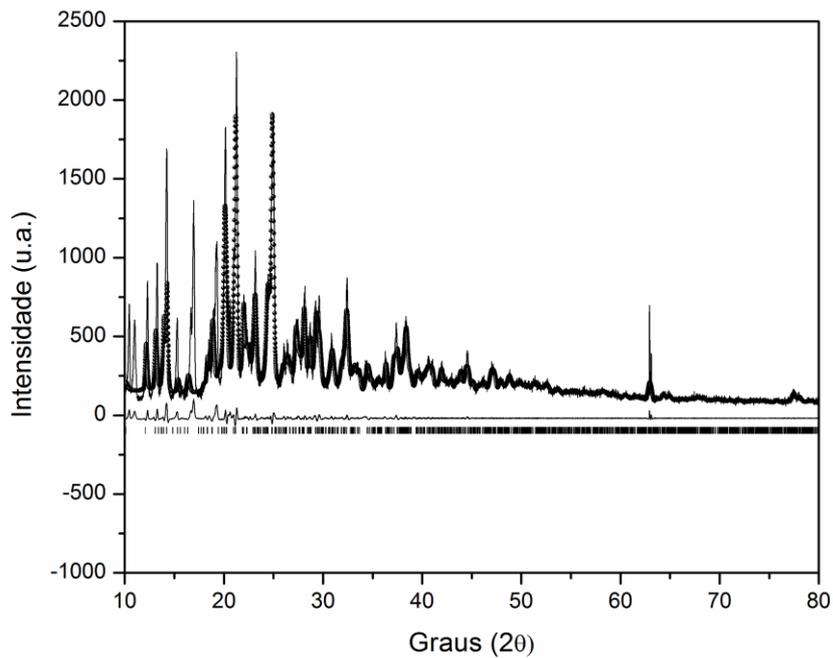


Figura 15 – Difratoograma ajustado do efavirenz.

5.1.2.5 ssNMR

A numeração adotada para os átomos da molécula do EFZ é mostrada na figura 16. O espectro de ^{13}C CP-MAS do fármaco é apresentado na Figura 17.

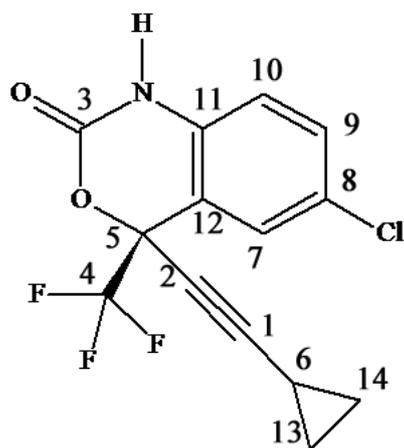


Figura 16 – Numeração dos átomos das moléculas do efavirenz.

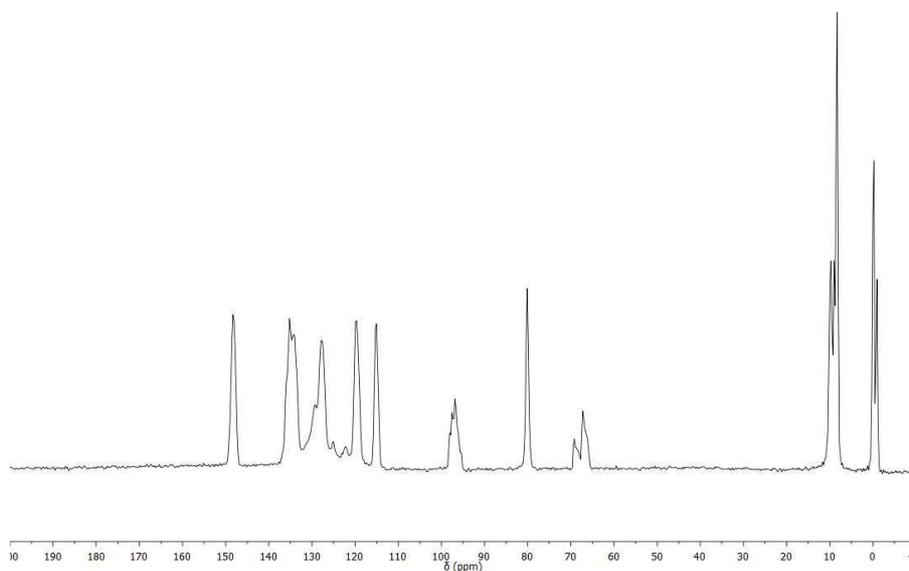


Figura 17 – Espectro ^{13}C CP-MAS do efavirenz obtido com uma frequência MAS de 16 KHz.

A atribuição dos sinais para o EFZ pôde ser feita principalmente com base no espectro ^{13}C CP-MAS do fármaco, e os espectros NQS (Supressão Não-Quaternária) e ^{19}F MAS (Rotação no Ângulo Mágico) foram utilizados para suportar atribuições que eram dúbias pelo espectro ^{13}C CP-MAS (Anexo I, página 101).

Seis sinais são observados entre 115 e 135 ppm no espectro de ^{13}C do EFZ (Figura 17), os quais correspondem às ressonâncias dos átomos de carbono aromáticos. O átomo de carbono carbonílico ressona em 148,1 ppm, o que está de acordo com a conjugação cruzada do grupo funcional carbamato. As ressonâncias blindadas observadas entre -0,9 e 8,3 ppm estão de acordo com o anel de 3 átomos de carbono altamente tensionado. Ressonâncias de átomos de carbono sp substituídos são observadas em 66,4 e 96,8 ppm, enquanto o sinal C–O é observado em 80,1 ppm. Finalmente, o átomo de carbono desblindado do grupo trifluorometila ressona em 115,1 ppm (Tabela 3).

Tabela 3 – Atribuição dos sinais do espectro de ^{13}C CP-MAS do efavirenz.

Carbono	δ (ppm)
1	96,8
2	66,4
3	148,1
4	115,1
5	80,1
6	-0,9/-0,1
7	135,2
8	115,1
9	127,7
10	119,6
11	134,1
12	122,3
13	8,3
14	8,3

A curva de retorno exponencial da magnetização longitudinal do EFZ é mostrada na Figura 18. O valor de T_1 encontrado para os núcleos de ^1H na amostra do EFZ foi de 1,25 s, que será depois comparado aos valores obtidos para as misturas entre os fármacos.

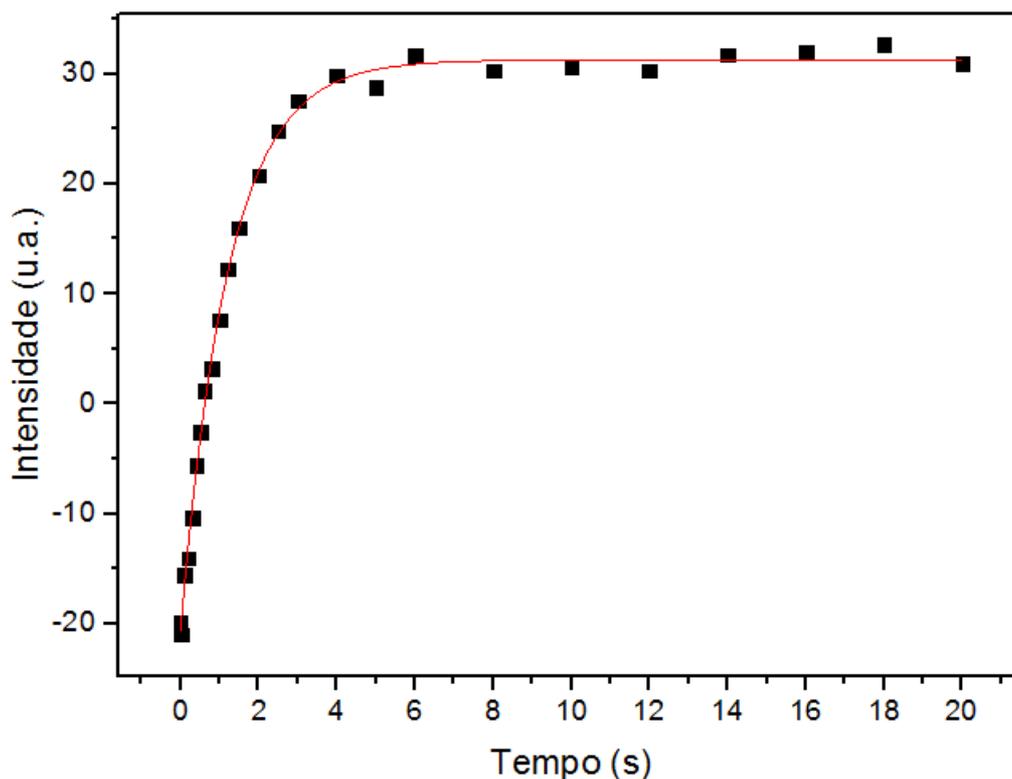


Figura 18 – Curva de retorno exponencial da magnetização longitudinal do efavirenz.

5.1.3 Fumarato de tenofovir desoproxila

5.1.3.1 TG/DTG e DSC

De acordo com a curva TG do TDF (Figura 19), o fármaco apresenta estabilidade térmica até cerca de 138 °C. As curvas TG/DTG indicam que o

processo de decomposição térmica do TDF ocorre em três etapas. De acordo com a curva DTG, a primeira etapa ocorre de 138,1 até 208,1 °C ($T_{onset} = 171,1$ °C), com perda de massa de 33,95%. A segunda ocorre de 208,1 até 273,9 °C ($T_{onset} = 218,2$ °C), com perda de massa de 12,12%. A última etapa de decomposição ocorre de 273,9 até 377,6 °C ($T_{onset} = 357,4$ °C), com perda de massa de 9,97%. Após isso, ocorre uma perda de massa de 9,07% devido ao processo de carbonização do fármaco.

A curva DSC do TDF (Figura 19) mostra um pico endotérmico que corresponde à fusão do fármaco ($T_{onset} = 113,5$ °C, $\Delta H_{fus} = 226,3$ J g⁻¹). Após a fusão, é observado um evento endotérmico próximo a 163 °C, característico do processo de decomposição do fármaco. De acordo com a literatura, o TDF apresenta no mínimo três formas polimórficas conhecidas: formas A, B e I. A temperatura de fusão apresentada pelo TDF está de acordo com a forma polimórfica I do fármaco (Lee *et al.*, 2010), porém o pico apresentado para o TDF no trabalho de Lee *et al.* (2010) é mais largo do que o apresentado na Figura 19.

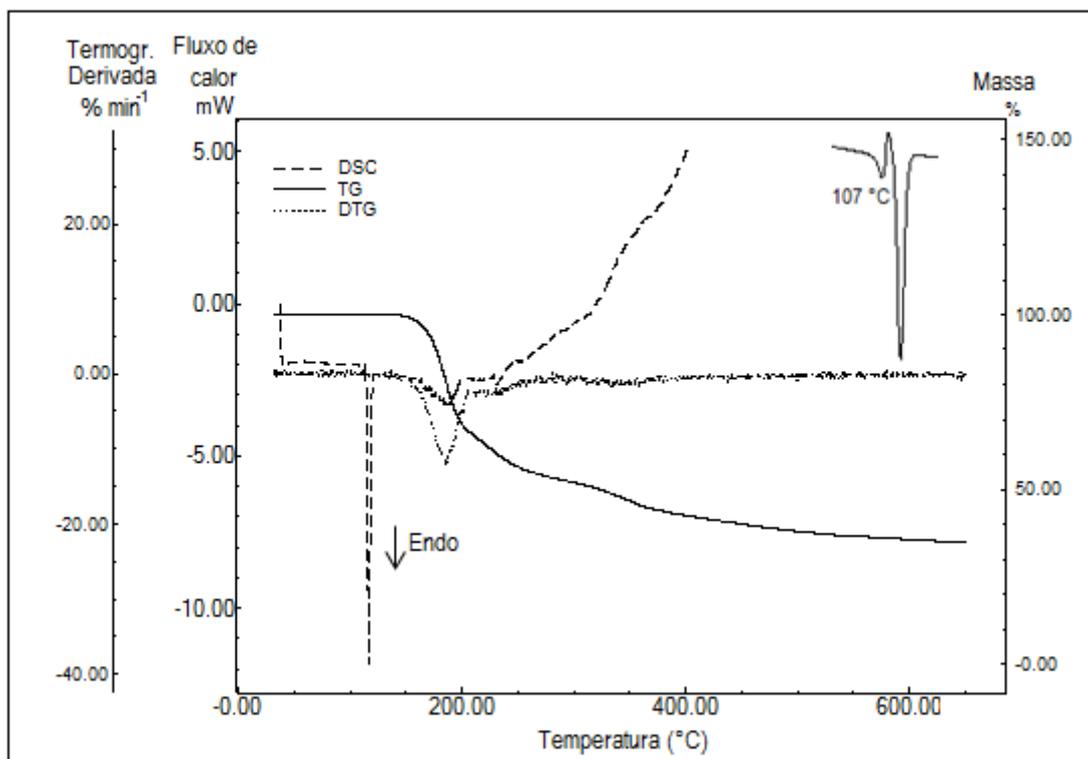


Figura 19 – Curvas DSC e TG/DTG do fumarato de tenofovir desoproxila obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio. Uma expansão da região do pico de fusão, mostrando o pico endotérmico anterior ao pico de fusão, pode ser vista na parte superior à direita.

A curva DSC do TDF apresenta um pico endotérmico largo próximo a $107\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes da fusão ($\Delta H_{\text{fus}} = 9,3\text{ J g}^{-1}$), cuja atribuição não é trivial: esse pico pode ser atribuído a (i) fusão de pequenas partículas que são cristaltos imperfeitos na amostra (fenômeno comum dependendo da rota de síntese), ou a (ii) uma transição de fase sólido-sólido envolvendo toda a amostra. Esse fenômeno será melhor discutido adiante, por técnicas de DRX e RMN do estado sólido com temperatura variável. Esse pico endotérmico largo a $107\text{ }^{\circ}\text{C}$ não foi observado no trabalho de Lee *et al.* (2010), mas devido à largura do pico de fusão reportado na literatura, é possível que ele tenha se sobreposto ao pico de fusão. O segundo pico endotérmico a $113,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pode ser devido a: no caso

(i) fusão dos cristais de maiores dimensões ou no caso (ii) fusão da fase sólida obtida após a transição prévia.

Lee *et al.* (2010) observaram um pico endotérmico pequeno antes da fusão da forma B do TDF (mas não para a forma I), e atribuíram esse pico à conversão da forma B para a forma I durante o aquecimento, mas em um segundo artigo (Lee *et al.*, 2013) os autores propuseram que a transição não ocorre e que esse pequeno pico endotérmico antes da fusão de formas solvatadas do TDF pode ser devido a transições de fase intermediárias ou à presença de impurezas.

5.1.3.2 TOA

As análises TOA indicaram que o TDF funde na faixa de temperatura entre 115,2 e 116,7 °C (Figura 20). A morfologia irregular apresentada pelo TDF está de acordo com a forma polimórfica I (Lee *et al.*, 2010), assim como os resultados de DSC.

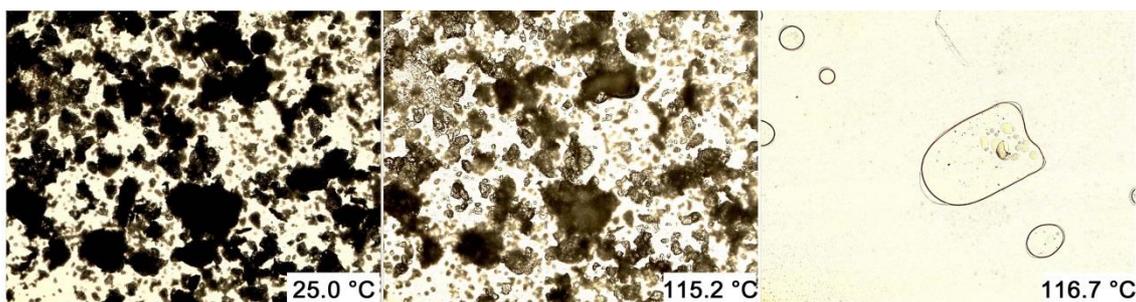


Figura 20 – Imagens TOA do fumarato de tenofovir desoproxila (aumento de 100 vezes).

5.1.3.3 FTIR

O espectro FTIR do TDF (Figura 21) exibe uma banda característica da deformação do grupo N–H em 1622 cm^{-1} . A banda característica da vibração de estiramento do grupo imina ($R_2\text{-C=NR}$) é observada em 1674 cm^{-1} . Uma banda intensa característica da vibração de estiramento C–N de amina aromática primária ocorre em 1255 cm^{-1} . A banda de estiramento do grupo P=O é observada em 1184 cm^{-1} e o estiramento dos grupos C=O ocorre em 1751 cm^{-1} . Bandas largas devido à vibração de estiramento dos grupos -NH_2 e -OH são observadas entre $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$.

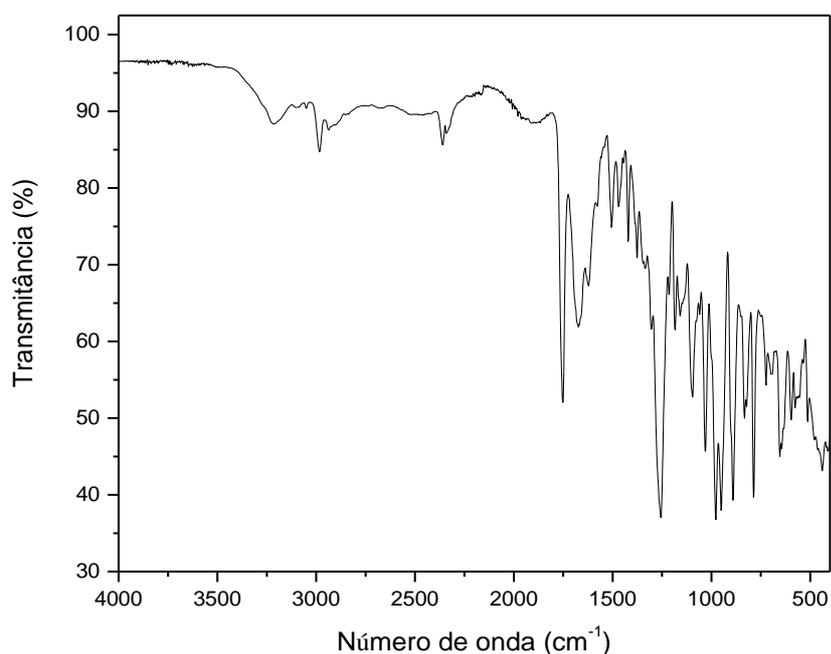


Figura 21 – Espectro FTIR do fumarato de tenofovir desoproxila.

5.1.3.4 DRX

A célula unitária do TDF é mostrada na Figura 22. O fármaco cristaliza-se segundo o grupo espacial monoclinico $P2_1$. Os parâmetros de rede ajustados segundo o algoritmo de Rietveld correspondem a $a = 9,835 \pm 0,002^\circ$, $b = 22,315 \pm 0,005^\circ$ e $c = 12,545 \pm 0,003^\circ$, sendo $\alpha = \gamma = 90,000$ e $\beta = 95,042 \pm 0,003^\circ$ (Figuras 22 e 23). O difratograma obtido para o TDF (Figura 23) indica que se trata da forma polimórfica I do fármaco (Lee *et al.*, 2010), o que confirma os resultados de DSC e TOA.

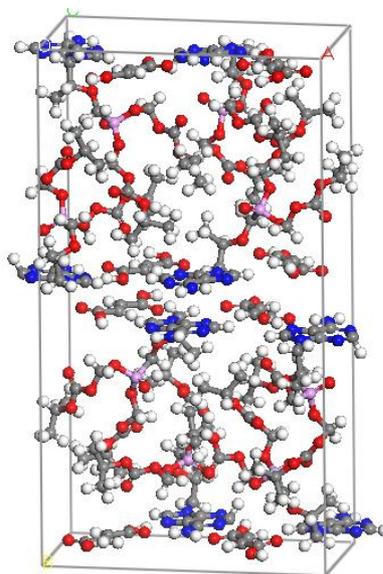


Figura 22 – Célula unitária do fumarato de tenofovir desoproxila obtida pelo ajuste de Rietveld (átomos de carbono em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e fósforo em rosa).

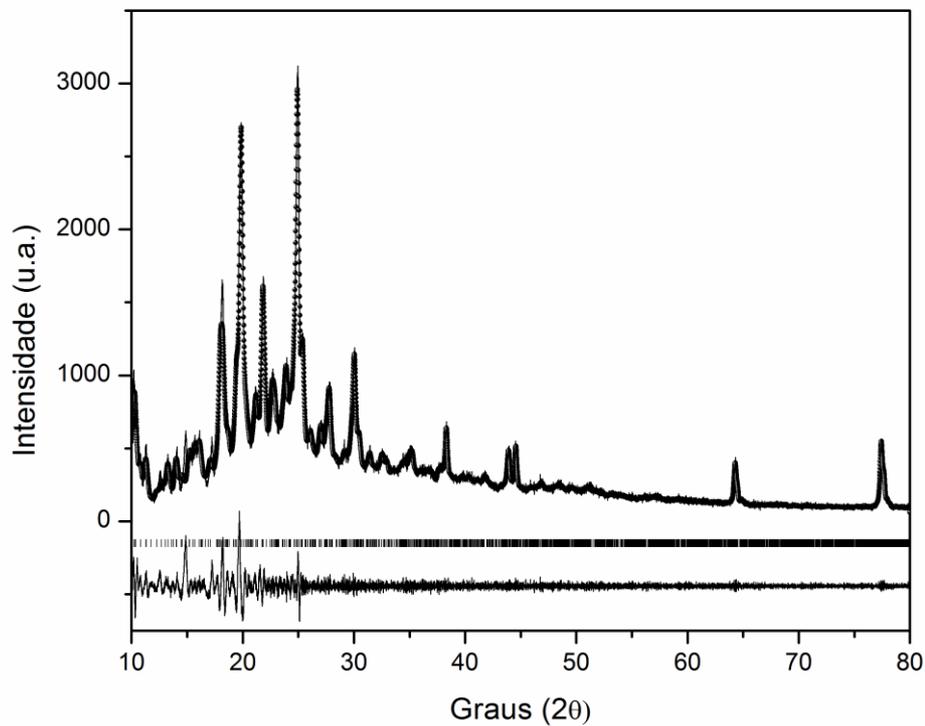


Figura 23 – Difratoograma ajustado do fumarato de tenofovir desoproxila.

5.1.3.5 ssNMR

A numeração adotada para os átomos da molécula do TDF é mostrada na Figura 24.

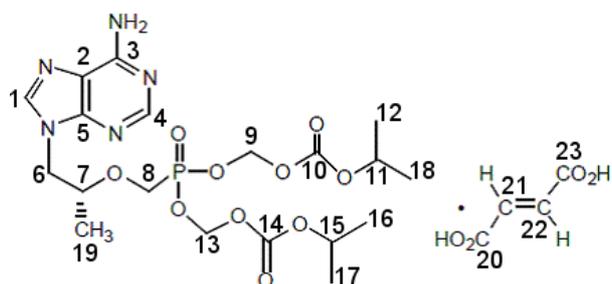


Figura 24 – Numeração dos átomos da molécula do fumarato de tenofovir desoproxila.

Os espectros ^{13}C CP-MAS e ^1H MAS do TDF estão mostrados na Figura 25. Pode-se observar que o espectro de ^{13}C (Figura 25A) obtido para a amostra corresponde ao espectro da forma I apresentado anteriormente por Lee *et al.* (2010). Entretanto, os autores desse trabalho não reportaram nenhuma interpretação estrutural detalhada. Uma análise qualitativa da presença de várias ressonâncias no espectro ^{13}C CP-MAS, mais do que o número de núcleos de carbono não equivalentes na molécula, sugere que não há uma única molécula independente na célula unitária do TDF. Isto está de acordo com os dados estruturais obtidos pela DRX, que mostrou a existência de duas moléculas independentes na unidade assimétrica do fármaco.

A atribuição dos sinais do espectro de ^{13}C do TDF aos diferentes núcleos, apresentada na tabela 4, foi feita com base nos experimentos CP-MAS (Figura 25A), MAS-*J*-HMQC e NQS (mostrados no anexo II, páginas 102 e 103) em conjunto com cálculos semi-empíricos e comparação com os dados da literatura para o fragmento fumarato (Apperley *et al.*, 2012). A atribuição dos sinais na região de 110 a 160 ppm foi particularmente delicada: do experimento MAS-*J*-HMQC (anexo II, página 102) pode-se observar que os sinais em 133,2, 141,6, 144,8, 146,6 e 151,1 ppm dão origem a correlações com prótons e que portanto eles são atribuídos a átomos de carbono protonados. Por outro lado, o experimento NQS (anexo II, página 103) indica que o sinal em 133,2 e o grupo de sinais em 141,6-146,6 ppm são originários de carbonos não-quaternários e o sinal em 154,2 ppm é originário de átomos de carbono quaternários (de acordo com o experimento MAS-*J*-HMQC), enquanto o sinal em 151,1 ppm pode ser devido à superposição de duas ressonâncias provenientes de um átomo de carbono quaternário e um não-quaternário. Apesar de o experimento CP-MAS não ser estritamente quantitativo, a atribuição acima descrita está de acordo com a avaliação superficial das integrais dos picos.

É interessante observar que todos os átomos de carbono da porção alifática da molécula do TDF (exceto C6 e os átomos carbonílicos C10 e C14) apresentam

um duplete no espectro de ^{13}C , indicando que as principais diferenças entre as duas moléculas independentes na unidade assimétrica da rede cristalina envolve porções alifáticas e originam-se provavelmente devido à presença de duas conformações distintas.

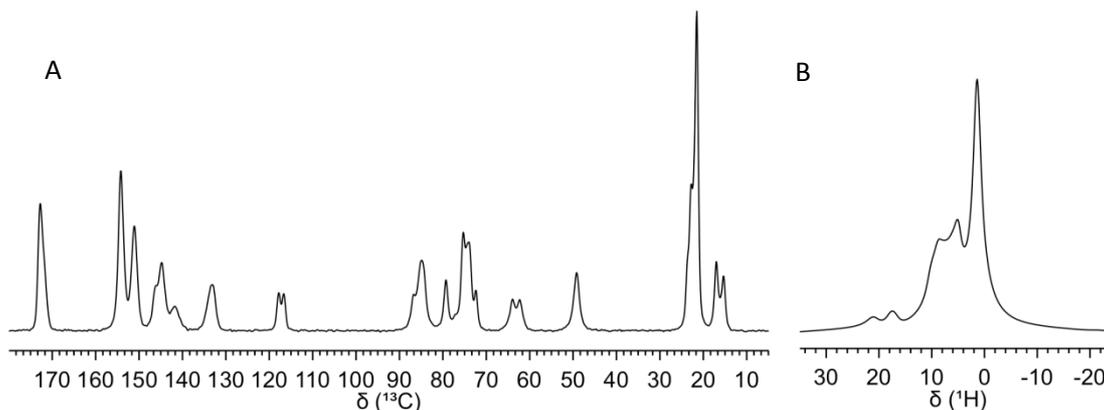


Figura 25 – Espectros (A) ^{13}C CP-MAS e (B) ^1H MAS do fumarato de tenofovir desproxila obtidos com uma frequência MAS de 17 KHz.

O espectro ^1H MAS do TDF (Figura 25B) foi obtido com uma velocidade de rotação de 17 KHz. A essa velocidade as fortes interações dipolares homonucleares ^1H - ^1H não são completamente removidas e cinco sinais principais podem ser observados. O sinal mais intenso em 1,4 ppm pode ser atribuído aos prótons metílicos, enquanto os sinais em 5,4 e 8,6 ppm podem ser atribuídos aos prótons alifáticos dos grupos CH e CH_2 , e aos prótons aromáticos e olefínicos, respectivamente. Os sinais presentes em 17,5 e 21,3 ppm indicam a presença de prótons envolvidos em ligações de hidrogênio muito fortes. Deslocamentos químicos similares foram observados para algumas bases de Schiff, suportando a hipótese de que os prótons carboxílicos formam ligações de hidrogênio com os átomos de nitrogênio imínicos dos anéis (Sharif *et al.*, 2007).

Tabela 4 – Atribuição dos sinais do espectro de ^{13}C CP-MAS do fumarato de tenofovir desopoxila.

Carbono	δ (ppm)
1	133,2
2	116,7-117,9
3	154,2
4	151,1
5	151,1
6	49,2
7	77,1-79,3
8	62,2-64,0
9	84,9-86,8
10	154,2
11	72,3-74,2-75,4
12	21,6-22,8-23,7
13	84,9-86,8
14	154,2
15	72,3-74,2-75,4
16	21,6-22,8-23,7
17	21,6-22,8-23,7
18	21,6-22,8-23,7
19	15,3-17,0
20	171,8-172,8
21	141,6-144,8-146,6
22	141,6-144,8-146,6
23	171,8-172,8

A curva de retorno exponencial da magnetização longitudinal do TDF é mostrada na Figura 26. O valor de T_1 encontrado para os núcleos de ^1H na amostra do TDF foi de 1,54 s, que será depois comparado aos valores obtidos para as misturas entre os fármacos.

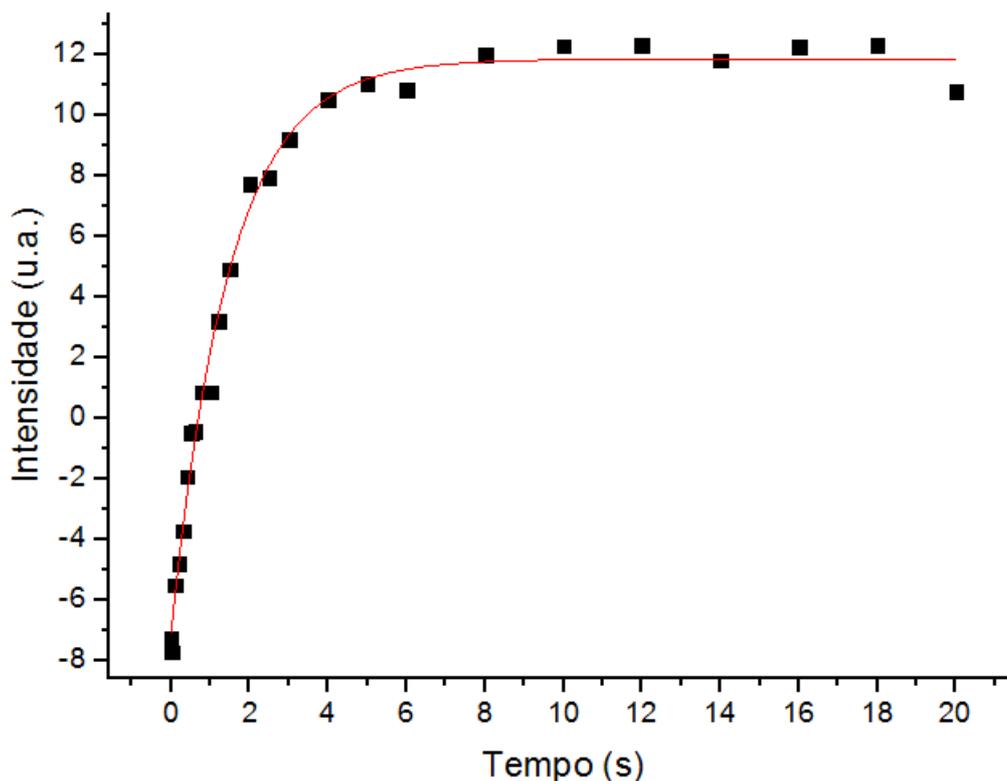


Figura 26 – Curva de retorno exponencial da magnetização longitudinal do fumarato de tenofovir desoproxila.

5.1.3.6 Estudos do TDF com temperatura variável

Para a avaliação de uma possível transição polimórfica do TDF, fez-se necessária a realização de um estudo com temperatura variável. Curvas DSC do TDF foram obtidas com diferentes razões de aquecimento (Figura 27). Conforme a razão de aquecimento aumenta, é observado um aumento na

temperatura de fusão e um alargamento da faixa de fusão porque a amostra tem menos tempo para absorver calor e fundir homogênea em uma temperatura constante. Em vez disso, o dispositivo de calor pode aquecer bem acima da faixa real de fusão antes que o interior funda, assim a faixa de fusão observada pode ser em temperaturas mais elevadas. Esse superaquecimento do TDF cristalino é observado como um deslocamento do pico de fusão para temperaturas maiores quanto maior a razão de aquecimento. Um fenômeno similar foi observado para a temperatura de fusão da α -D-glicose (Magón e Pyda, 2011), mas contrariamente à glicose, o calor de fusão do TDF diminui com o aumento da razão de aquecimento (Tabela 5). As curvas DSC obtidas a 10 e 20 °C min⁻¹ mostram um pico endotérmico largo antes da fusão. Como mencionado anteriormente, esse pico pode ser atribuído a (i) fusão de cristais menores presentes na amostra, ou a (ii) uma transição de fase sólido-sólido envolvendo toda a amostra. O deslocamento para maiores temperaturas conforme a razão de aquecimento aumenta é observado para ambos os picos presentes em cada curva e a diferença de temperatura entre os dois picos também aumenta. A curva DSC obtida com a razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹ não mostra esse pequeno pico endotérmico antes da fusão, o que pode ser devido ao fato de que ele é muito largo e/ou parcialmente sobreposto ao segundo pico endotérmico. Na curva DSC obtida a 10 °C min⁻¹, o primeiro pico endotérmico aparece próximo a 107 °C, e na curva obtida a 20 °C min⁻¹, próximo a 115 °C.

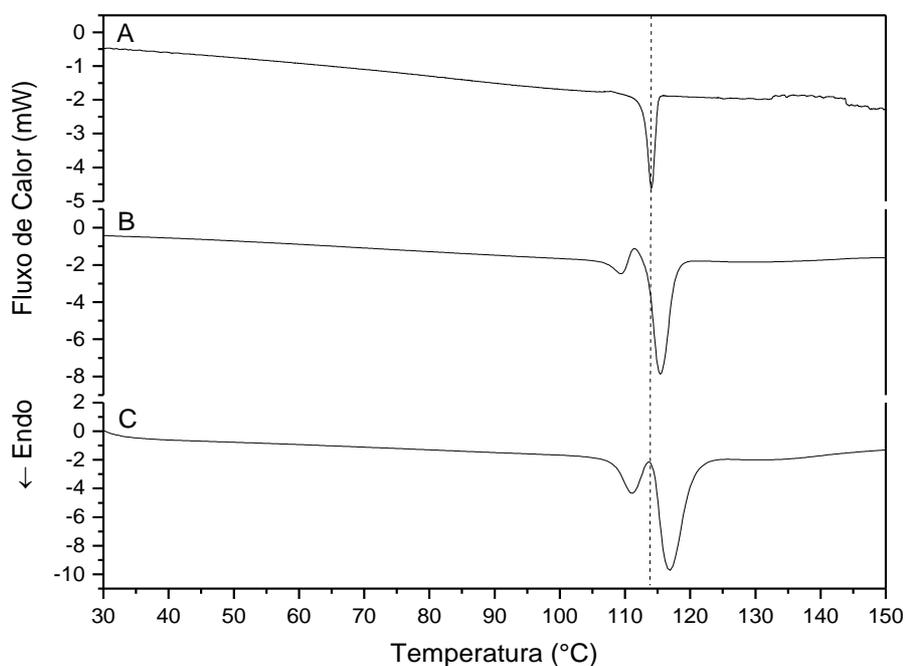


Figura 27 – Curvas DSC do fumarato de tenofovir desoproxila obtidas a (A) 2, (B) 10 e (C) 20 °C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

Tabela 5 – Faixas de temperatura de fusão e valores de calor de fusão do fumarato de tenofovir desoproxila em diferentes razões de aquecimento.

Razão de aquecimento (°C min ⁻¹)	Temperatura Onset (°C)	Temperatura do pico (°C)	Temperatura Endset (°C)	Faixa de fusão (°C)	Calor de fusão (J g ⁻¹)
2	112,8	114,0	115,0	2,2	134,93
10	113,5	115,4	117,8	4,3	129,11
20	114,4	116,9	120,6	6,2	107,22

A amostra foi submetida a um aquecimento até 109 °C a 10 °C min⁻¹ e em seguida resfriada à temperatura ambiente e aquecida novamente até 150 °C a 10 °C min⁻¹. A curva DSC do primeiro aquecimento mostra o pico endotérmico largo ($T_{onset} = 107$ °C) antes da fusão do TDF, mas a curva DSC do segundo aquecimento não apresenta esse pico. Essa observação suporta a hipótese (ii),

se a forma obtida após a transição de fase é estável mesmo quando a amostra retorna à temperatura ambiente. O difratograma obtido para a amostra após o aquecimento a 109 °C (Figura 28B) exibe novos picos de reflexão a 6, 8,5 e 12° (2θ). Esse resultado pode ser explicado como segue: a temperatura não é alta o suficiente para que a transição de fase ocorra completamente, mas é suficiente para iniciar o processo. Assim, existem planos extras de reflexão devido a um estado intermediário entre as duas fases. Quando a amostra é submetida a um aquecimento até 110 °C, o difratograma não exibe esses picos extras de reflexão (Figura 28C), provavelmente porque a transição de fase já ocorreu e não existe mais uma condição intermediária que permita a observação desses picos extras de reflexão de Bragg presentes no difratograma da amostra aquecida a 109°C. Os picos presentes no difratograma da amostra aquecida a 110 °C estão basicamente nas mesmas posições dos picos no difratograma da amostra obtido em temperatura ambiente (Figura 28A), o que indica que não há uma mudança significativa nos parâmetros de rede (Tabela 6). Isso significa que não ocorre uma transição de fase *estrutural* do TDF sob aquecimento, ou seja, a simetria e a estequiometria dentro da rede são preservadas. Na Tabela 6, pode-se observar que a célula unitária diminui nos 3 eixos, mas a mudança é muito pequena para ser considerada significativa.

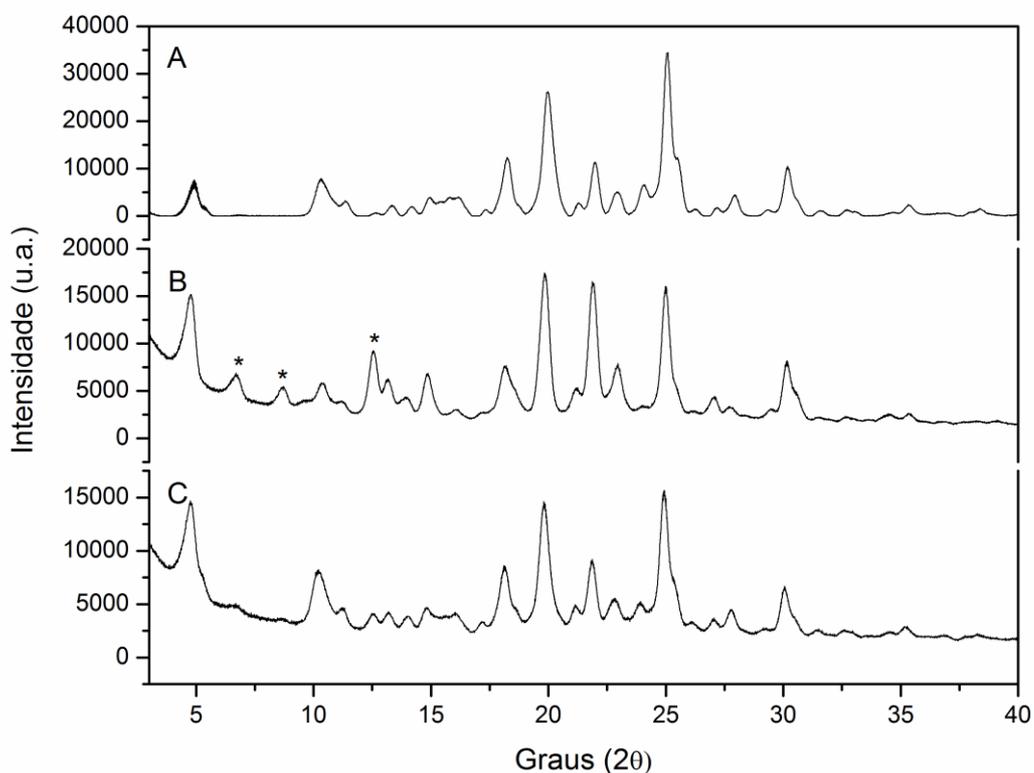


Figura 28 – Difratogramas do fumarato de tenofovir desoproxila obtidos antes (A) e após aquecimento a (B) 109 e (C) 110 °C. Os picos presentes apenas no difratograma obtido a 109 °C estão marcados com asteriscos.

Tabela 6 – Parâmetros de rede do fumarato de tenofovir desoproxila em temperatura ambiente e após aquecimento a 110 °C.

Parâmetro	Temperatura ambiente	110 °C	Mudança no parâmetro (%)
a (Å)	$18,61 \pm 0,02$	$18,43 \pm 0,01$	-0,96
b (Å)	$34,464 \pm 0,003$	$33,937 \pm 0,002$	-1,53
c (Å)	$10,02 \pm 0,01$	$9,86 \pm 0,01$	-1,57

O espectro de ^{13}C CP-MAS do TDF obtido a temperatura variável (de 21 a 80 °C, temperatura nominal) está mostrado na Figura 29. Os sinais relacionados com o átomo de carbono do grupo fosfonato (C8) apresenta

mudanças significativas. Antes do aquecimento, é observado um duplete devido ao acoplamento escalar C-P ($^1J \approx 170$ Hz). Após o aquecimento, esse duplete se transforma em um duplo duplete, provavelmente devido à perda da equivalência dessa região nas duas moléculas da unidade assimétrica. Isto está de acordo com a alteração observada nos sinais de C9 e C13, na vizinhança do grupo fosfonato.

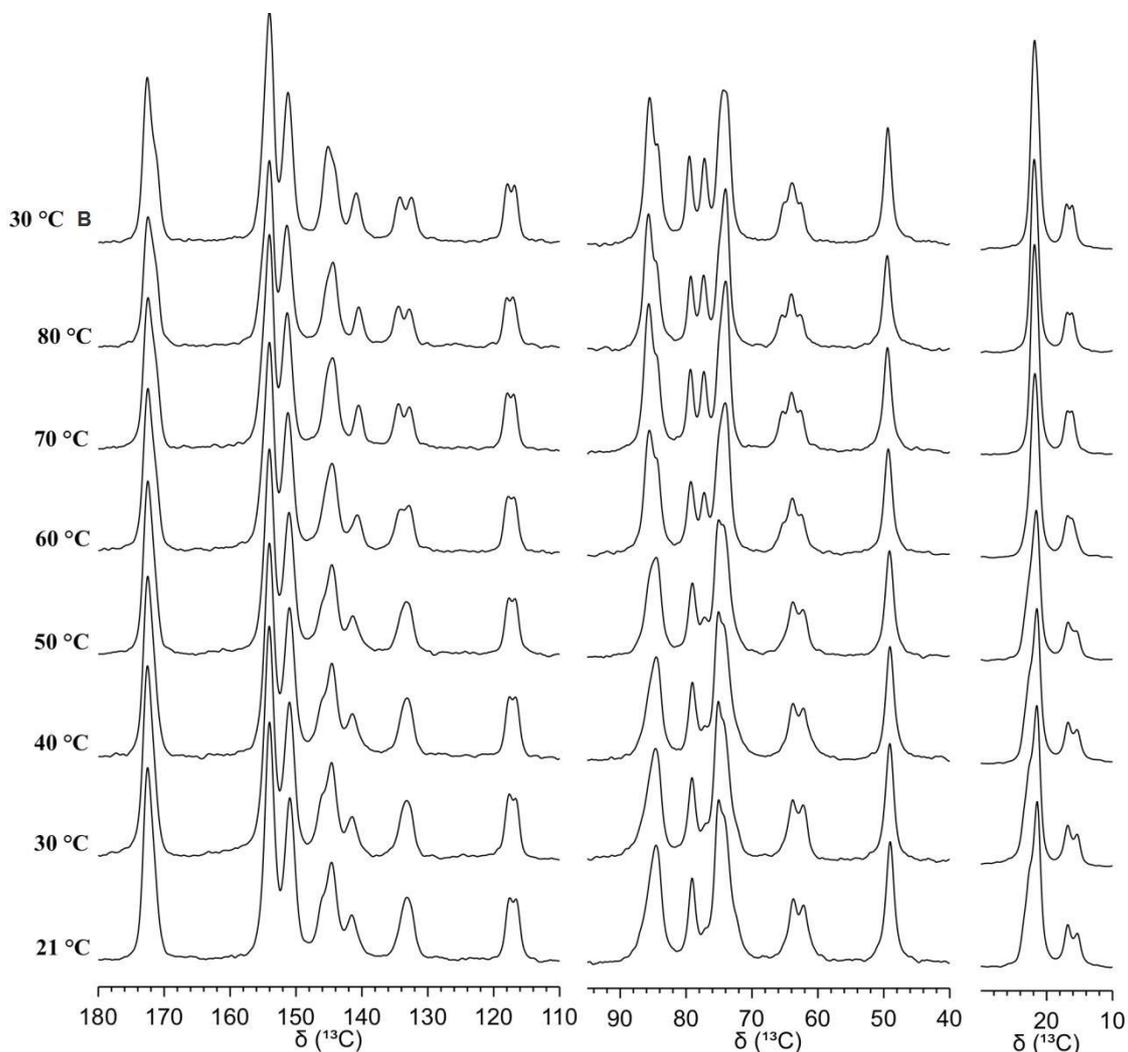


Figura 29 – Espectros de ^{13}C CP-MAS do fumarato de tenofovir desoproxila obtidos sob aquecimento.

O espectro de RMN do estado sólido ^{31}P MAS do TDF (Figura 30) confirma a perda de equivalência dos átomos de fósforo na célula unitária após o aquecimento. O sinal observado no espectro obtido em temperatura ambiente se transforma em um duplete após o aquecimento até 80 °C. O espectro apresentado na Figura 30 mostra que a transição de fase segue uma cinética lenta: um segundo espectro obtido a 80 °C (denominado “80 °C B” na Figura) duas horas após o primeiro apresenta ainda diferenças significativas. Em particular, o sinal a 0,8 ppm, característico da forma I do fármaco, é ainda muito intenso no primeiro espectro, porém praticamente desaparece no segundo, o que indica que a transição de fase continua ocorrendo após duas horas. Por outro lado, os espectros ^1H MAS a temperatura variável não mostram nenhuma mudança associada a uma transição de fase, provavelmente devido à pequena dispersão nos valores de deslocamento químico dos núcleos ^1H e à baixa resolução espectral. Todas as mudanças observadas nos espectros de ^{13}C e ^{31}P com o aumento da temperatura indicam que a forma I do fármaco passa por uma transição de fase sólido-sólido sob aquecimento, o que pode implicar diferenças no empacotamento cristalino e/ou na conformação do TDF levando a um polimorfismo de empacotamento ou conformacional, respectivamente. Pode-se observar a partir do espectro que a transição envolve toda a amostra, mesmo se com uma cinética lenta.

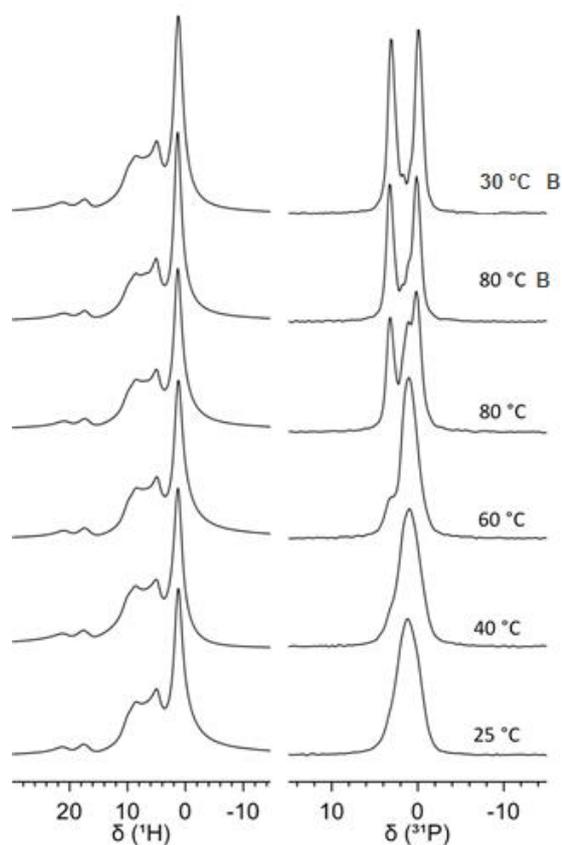


Figura 30 – Espectros de ^1H (esquerda) e ^{31}P (direita) MAS do fumarato de tenofovir desoproxila obtidos com velocidade de rotação de 17 KHz e temperaturas variáveis.

A Figura 31 mostra as diferenças na rede cristalina (obtida a partir dos dados de DRX) da amostra aquecida a 110 °C (Figura 31B), em comparação com a amostra em temperatura ambiente (Figura 31A).

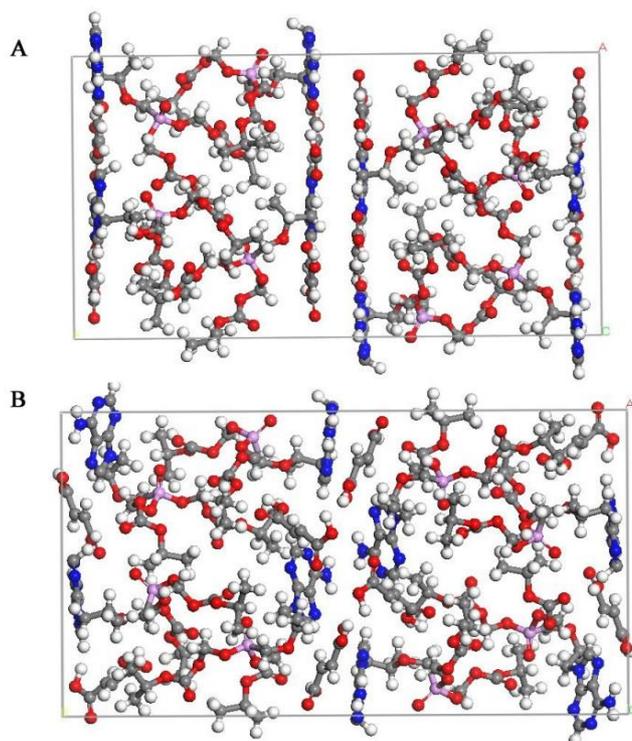


Figura 31 – Diferenças na rede cristalina do fumarato de tenofovir desopoxila (A) antes e (B) após aquecimento a 110 °C, obtidas pelo ajuste de Rietveld (átomos de carbono em cinza, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e fósforo em rosa).

Antes do aquecimento (Figura 31A), existe uma estrutura do tipo “sanduíche” formada por duas camadas paralelas, cada uma delas formada por duas moléculas (uma acima e uma abaixo) de cada lado da célula unitária. As oito moléculas na célula unitária formam duas estruturas “sanduíche”, com um canal entre elas, cada uma sendo composta por duas camadas de duas moléculas, dando um total de quatro moléculas por “sanduíche”. Após o aquecimento (Figura 31B), observa-se uma estrutura muito mais desorganizada. Além disso, pode-se observar que a conformação da porção fumarato das moléculas na célula unitária muda significativamente. Esse resultado está de acordo com as mudanças nos sinais relacionados aos átomos de carbono da porção fumarato no espectro de RMN. Os átomos de

carbono carbonílicos dos grupos ácido carboxílico na estrutura fumarato (C20 e C23) ressonam em 172,7 ppm e após o aquecimento esse sinal apresenta claramente um ombro (Figura 29). Isso sugere a perda de simetria das duas moléculas fumarato na unidade assimétrica da rede cristalina após o aquecimento. Mudanças adicionais são observadas nos espectros obtidos durante o aquecimento, principalmente nos sinais atribuídos aos carbonos metílicos C12, C16, C17 e C18, os quais ressonam entre 21,5 e 23,7 ppm, e os sinais atribuídos aos átomos de carbono terciários ligados a eles (C11 e C15), os quais ressonam entre 72,3 e 75,3 ppm. Os dois grupos de sinais relacionados aos átomos de carbono metílicos C12, C16, C17 e C18, e também os átomos de carbono metínicos C11 e C15 mostram uma dispersão menor nos valores de deslocamento químico após o aquecimento, o que sugere uma similaridade maior dos ambientes químicos nessa região terminal das duas moléculas inequivalentes e/ou das duas cadeias alifáticas da mesma molécula. As mudanças observadas no espectro de RMN após aquecimento do TDF são mantidas mesmo quando a amostra é resfriada novamente (espectro designado “30 °C B” nas Figuras 29 e 30).

Por meio da comparação dos resultados de DRX e RMN do estado sólido pode-se inferir que existe uma transição de fase sólido-sólido, e, portanto, a hipótese (ii) é suportada. Essa nova forma obtida por aquecimento, que é estável após subsequente resfriamento, foi denominada forma I-1, já que ela mantém características em comum com a forma I. Conseqüentemente, pode-se seguramente atribuir o pico endotérmico observado nas curvas DSC próximo a 107 °C à transição I->I-1. Como indicado pelo RMN, essa transição envolve toda a amostra, e portanto a hipótese de que o pico na curva DSC seria devido a mudanças no tamanho dos cristais não pode ser suportada. Além disso, a ausência do pico endotérmico a 107 °C na curva DSC do segundo aquecimento indica que a forma I-1 permanece estável após o resfriamento da amostra até a temperatura ambiente, o que também é observado nos experimentos de RMN.

Dois exemplos recentes de polimorfismo similar de diferentes cristais orgânicos são reportados em Tamboli *et al.* (2014) e Wang *et al.* (2012). Pode-se inferir, no caso do TDF, que a transição observada é do tipo *conformacional* (Cruz-Cabeza e Bernstein, 2014), já que uma transição de fase estrutural pode ser descartada pela análise dos dados de DRX e também de TOA, visto que não foi observada uma mudança na forma dos cristais durante a obtenção das imagens TOA, mesmo quando a análise foi feita a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, a mesma razão de aquecimento em que se observou o pico endotérmico anterior ao pico de fusão na curva DSC. As análises TOA foram repetidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com e sem luz polarizada, e em nenhuma delas foi possível observar uma transição de fase do tipo *estrutural* (Anexo III, páginas 104 e 105).

Deve-se observar que os experimentos de DRX foram obtidos após aquecimento até 110°C porque essa é a temperatura na qual o pequeno pico endotérmico é observado na curva DSC. Os experimentos de RMN do estado sólido foram conduzidos até uma temperatura nominal de 80°C e ainda assim a transição é observada. Porém, deve-se considerar que no caso do RMN a temperatura real da amostra é maior do que a temperatura nominal, devido ao calor friccional gerado por uma velocidade de rotação muito alta (17 KHz). Nessa velocidade de rotação, é esperada uma diferença de cerca de 15°C entre as temperaturas nominal e real com base em procedimentos de calibração de temperatura obtidos para o nitrato de chumbo (Bielecki e Burum, 1995). Além disso, os experimentos de RMN mostraram que o fenômeno observado segue uma cinética lenta, e, portanto, a razão de aquecimento pode influenciar muito a temperatura na qual ele ocorre. Os espectros de RMN do estado sólido foram conduzidos com intervalos regulares de 10°C , e cada experimento durou cerca de duas horas, enquanto os dados de DRX foram obtidos após aquecimento direto a 110°C . Essas diferenças na forma de obtenção dos dados podem explicar a diferença de temperatura observada para a transição conformacional nos experimentos de DSC, DRX e RMN do estado sólido.

5.2 Estudo de compatibilidade entre os fármacos

5.2.1 Mistura efavirenz – lamivudina (EFZ – 3TC)

5.2.1.1 DSC

A curva DSC da mistura física EFZ - 3TC (Figura 32) evidenciou deslocamentos significativos nas temperaturas de fusão de ambos os fármacos, se comparadas às temperaturas de fusão dos fármacos no estado puro. O ponto de fusão da 3TC deslocou de 173,5 para 161,8 °C, e o ponto de fusão do EFZ deslocou de 135,7 para 121,9 °C. Esses deslocamentos sugerem a presença de interação fármaco-fármaco. O abaixamento das temperaturas de fusão de ambos os fármacos na mistura, se comparados aos fármacos puros, indicam que as interações EFZ – 3TC existentes na mistura são mais fracas do que as interações EFZ - EFZ e 3TC - 3TC, existentes nos fármacos puros. Essa interação também é evidenciada por mudanças nos valores de entalpia de fusão dos fármacos. Em uma mistura com razão 1:1 m/m, os valores de ΔH dos picos de fusão devem ser metade do valor em relação ao fármaco puro. O valor de ΔH de fusão da 3TC na mistura foi 96,9 J g⁻¹, menos de um terço do valor em relação ao fármaco puro (355,3 J g⁻¹), apesar de o valor do ΔH de fusão do EFZ na mistura (56,9 J g⁻¹) ter sido aproximadamente metade do valor em relação ao fármaco puro (124,3 J g⁻¹).

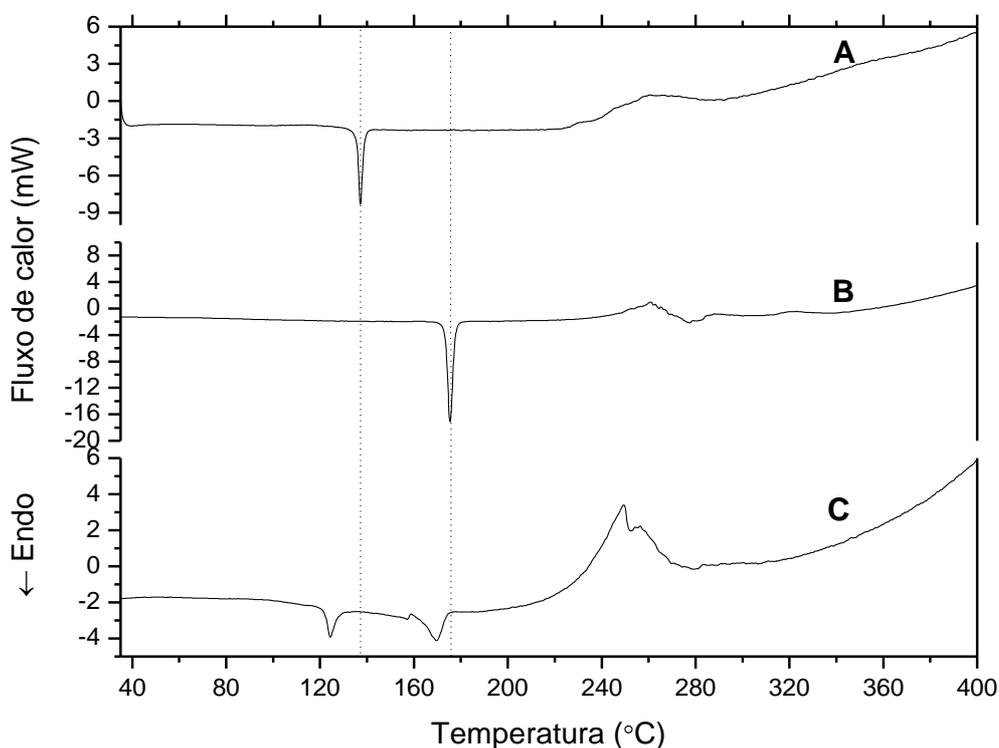


Figura 32 – Curvas DSC de A) efavirenz; B) lamivudina; C) mistura física 1:1 m/m efavirenz – lamivudina, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.2.1.2 TOA

A análise TOA da mistura EFZ - 3TC (Figura 33) mostra que a fusão do EFZ começa em $120,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresentando um deslocamento de $15,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação ao EFZ puro ($133,6\text{ }^{\circ}\text{C}$). A fusão da 3TC começa em aproximadamente $122\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse grande deslocamento da temperatura de início da fusão da 3TC comparada à do fármaco puro ($174,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) pode indicar uma interação com o EFZ, ou pode indicar que a 3TC começa a se dissolver no EFZ fundido, o que também explicaria o fato de o valor de ΔH de fusão da 3TC ser menor do que o

esperado na curva da mistura. A análise TOA também mostrou que a fusão completa da 3TC na mistura ocorre em 173,8 °C, antes da fusão da 3TC pura, a qual ocorre em 176,4 °C. A fim de se avaliar se esta interação ocorre apenas após a fusão do EFZ, com a dissolução parcial da 3TC no EFZ fundido, ou se é devida a uma incompatibilidade no estado sólido, foram feitas as análises FTIR e ssNMR.

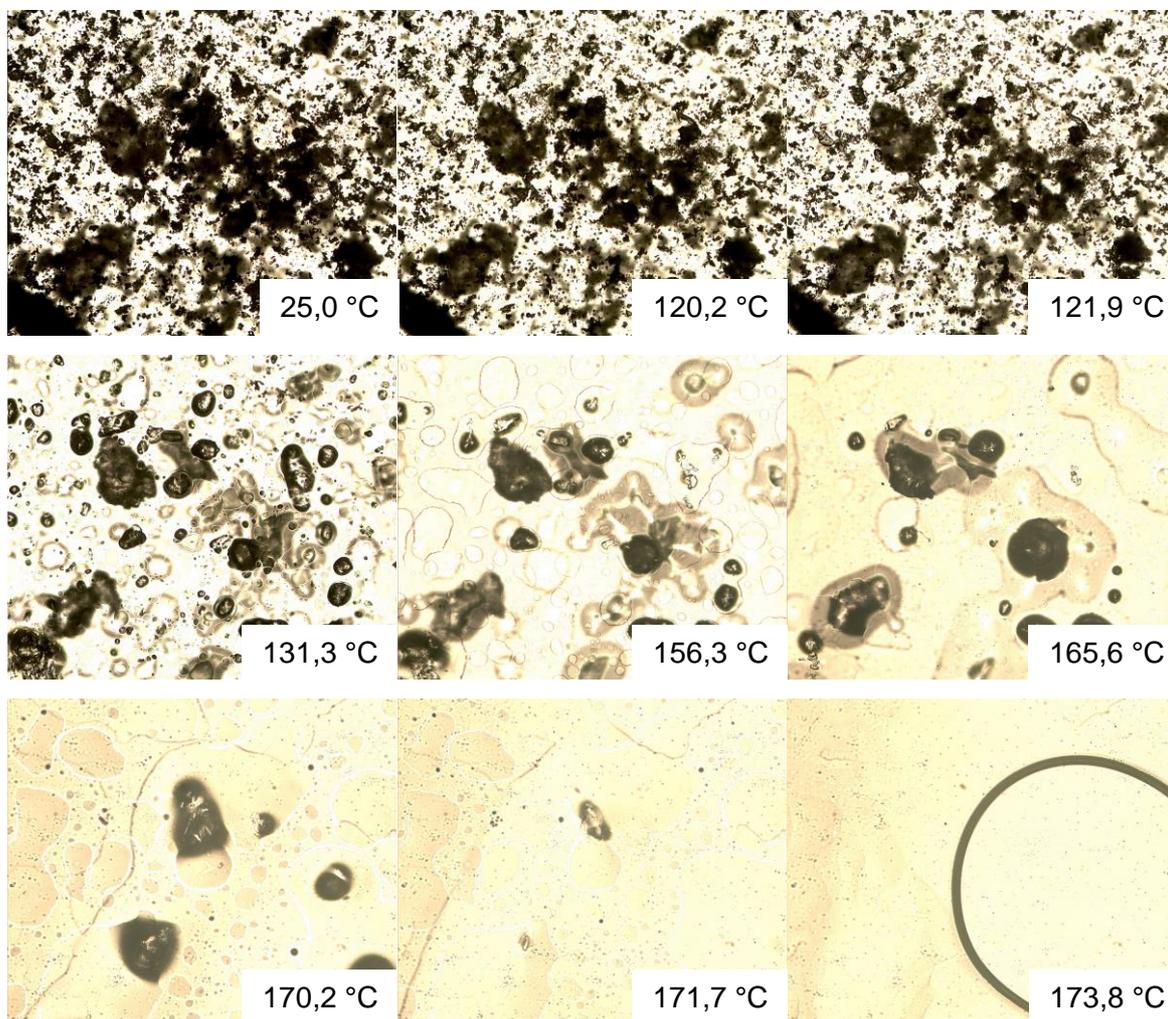


Figura 33 – Imagens TOA da mistura efavirenz – lamivudina. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100 vezes.

5.2.1.3 FTIR

Na análise de FTIR, não houve diferença entre os espectros da mistura EFZ – 3TC e dos fármacos puros (Figura 34). De acordo com os resultados dessa análise, nenhuma interação entre os fármacos pôde ser detectada, já que não houve um deslocamento pronunciado das bandas, provavelmente devido à baixa resolução da técnica e sobreposição de bandas. Monajjemzadeh *et al.* (2009) reportaram um fenômeno similar nos espectros na região do infravermelho do aciclovir, lactose e a mistura de ambos.

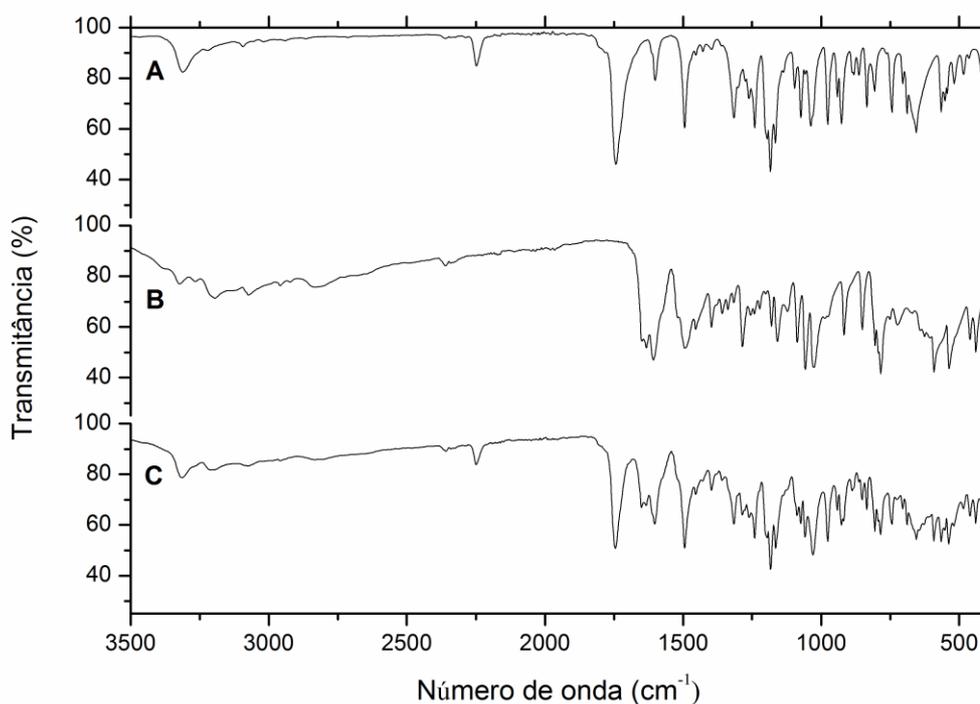


Figura 34 – Espectros infravermelho dos fármacos A) efavirenz; B) lamivudina; C) mistura física 1:1 m/m efavirenz – lamivudina.

5.2.1.1 ssNMR

Os espectros de RMN do estado sólido das misturas entre os fármacos foram obtidos no Departamento de Química da UFMG. Devido a limitações do espectrômetro utilizado, não foi possível empregar velocidades de rotação maiores que 4 KHz, e por este motivo os espectros apresentam picos que não são sinais, e sim bandas de rotação em frequências múltiplas da velocidade de rotação.

O espectro de RMN da mistura EFZ - 3TC (Figura 35) não apresentou mudanças significativas nos valores de deslocamento químico, quando comparado aos espectros dos fármacos puros (Tabela 7). Por meio da técnica de RMN do estado sólido, para que haja indício de interação entre dois componentes de uma mistura a mudança no valor de deslocamento químico dos núcleos deve ser maior do que 1 ppm, que é a largura de linha observada para um espectro de RMN de uma amostra sólida (Geppi *et al.*, 2008). Apesar de haver pequenas mudanças nos valores de deslocamento químico dos dois fármacos na mistura EFZ-3TC, elas não são maiores do que 1 ppm para nenhum dos núcleos. Dessa forma, o espectro de ^{13}C obtido para a mistura não confirma a interação sugerida pelas análises DSC e TOA. Portanto, o deslocamento nos pontos de fusão dos fármacos observados por essas técnicas provavelmente ocorre devido à mistura entre os dois componentes, e não a uma incompatibilidade entre eles.

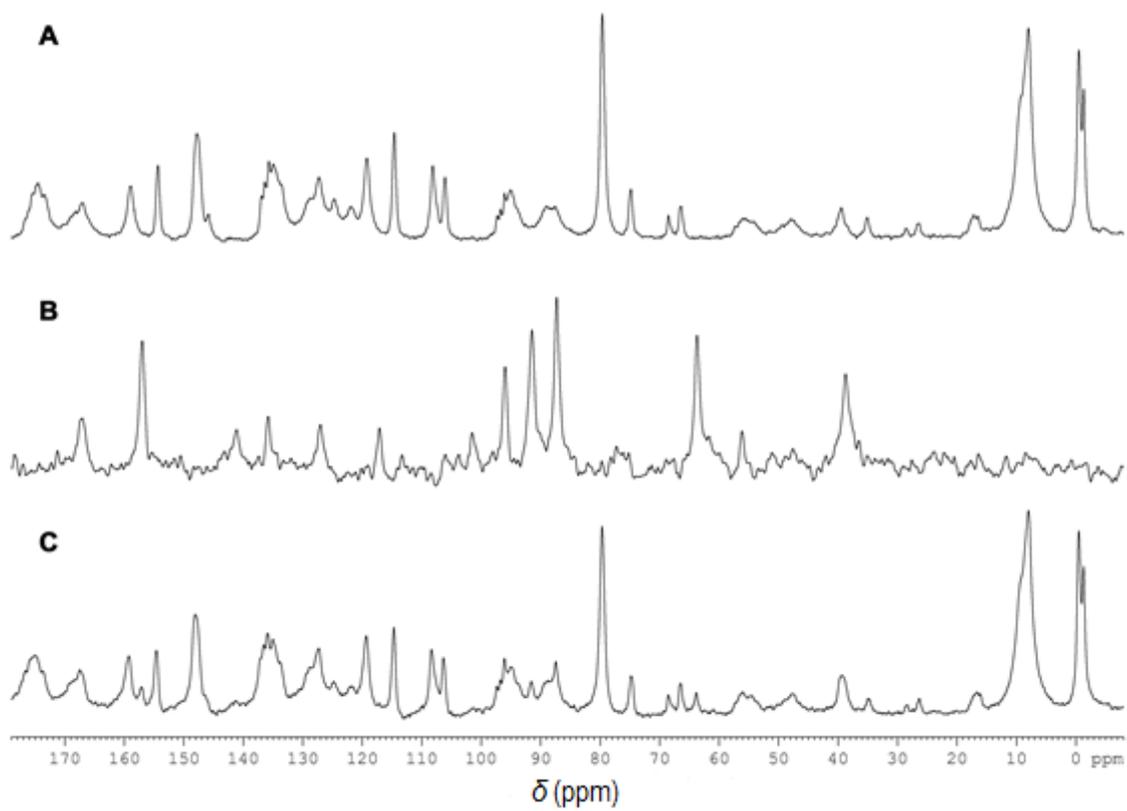


Figura 35 – Espectro de RMN do estado sólido de A) efavirenz; B) lamivudina; C) mistura efavirenz – lamivudina.

Tabela 7 – Comparação entre os valores de deslocamento químico de ^{13}C observados para efavirenz e lamivudina puros e em mistura.

Número do carbono	EFZ δ (ppm)	EFZ mistura δ (ppm)	3TC δ (ppm)	3TC mistura δ (ppm)
1	96,8	97,2	167,2	167,0
2	66,4	66,4	157,3	157,1
3	148,1	147,8	141,5	141,3
4	115,1	114,7	96,3	96,1
5	80,1	79,7	-	-
6	-0,9/-0,1	-1,2/-0,4	-	-
7	135,2	134,8	-	-
8	124,9	124,6	-	-
9	127,7	127,3	-	-
10	119,6	119,3	-	-
11	134,1	133,6	-	-
12	122,3	121,8	-	-
13	8,3	8,0	-	-
14	8,3	8,0	-	-
1'	-	-	91,9	91,6
2'	-	-	87,7	87,4
3'	-	-	39,1	38,8
4'	-	-	64,1	63,9

Os tempos de relaxação spin-rede (T_1) obtidos a partir do espectro da mistura entre o EFZ e a 3TC foram de 46,92 s a partir das integrais dos sinais correspondentes à 3TC e de 1,05 s a partir das integrais dos sinais correspondentes ao EFZ. Os valores de T_1 permanecem próximos aos valores originais de cada fármaco (40,53 s para a 3TC e 1,25 s para o EFZ), não sendo obtido um valor médio, que seria previsto caso ocorresse uma interação acentuada entre eles. Portanto, a medida dos valores de T_1 para a mistura indica que não ocorre uma interação muito forte entre os fármacos, de acordo

com o resultado da análise dos valores de deslocamento químico no espectro de ^{13}C para essa mistura.

5.2.2 Mistura efavirenz – tenofovir (EFZ – TDF)

5.2.2.1 DSC

Assim como na mistura EFZ - 3TC, a curva DSC da mistura física EFZ - TDF (Figura 36) também apresentou mudanças significativas em relação às curvas dos fármacos puros, sugerindo possíveis incompatibilidades entre eles. O ponto de fusão do TDF deslocou de 113,5 para 98,3 °C, e houve o desaparecimento do pico de fusão do EFZ. O ΔH do pico de fusão do TDF apresentou o valor de 72,0 J g⁻¹, menos de um terço do valor relativo ao TDF puro (226,3 J g⁻¹).

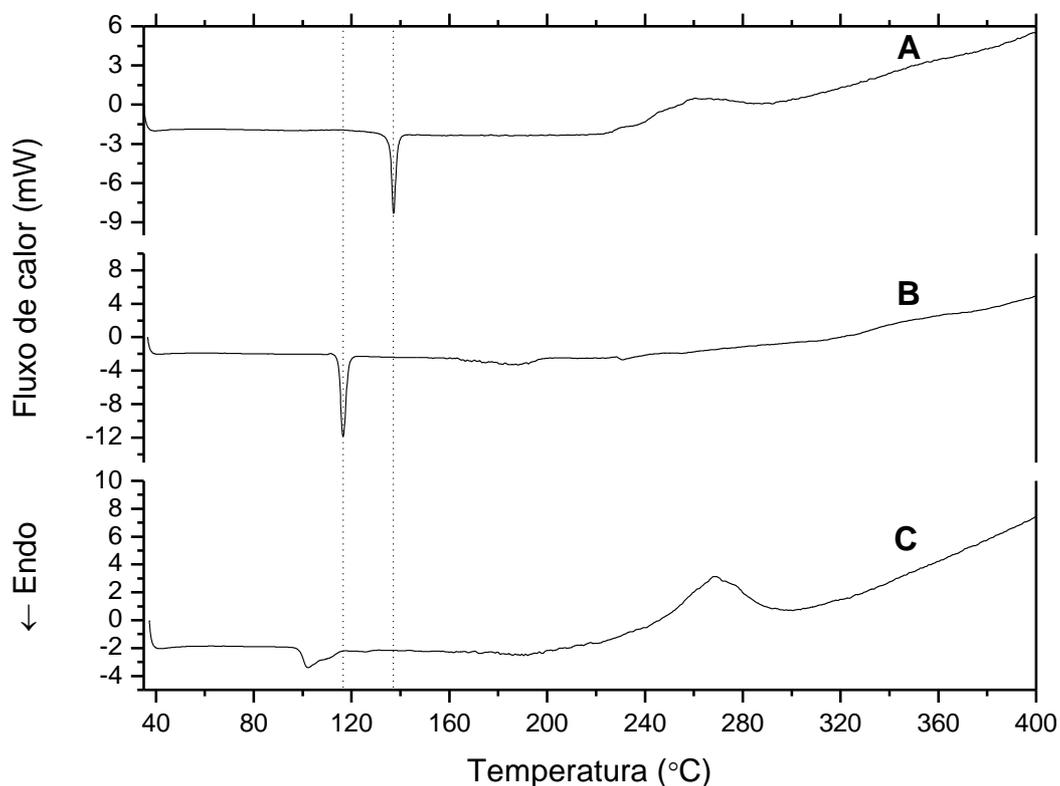


Figura 36 – Curvas DSC de A) efavirenz; B) fumarato de tenofovir desoproxila; C) mistura física 1:1 m/m efavirenz - fumarato de tenofovir desoproxila, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.2.2.2 TOA

As imagens TOA da mistura EFZ - TDF (Figura 37) mostram que a fusão do TDF começa em $97,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresentando um deslocamento de $17,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação ao TDF puro ($115,2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pode-se observar que nessa temperatura a fusão do EFZ também começa a ocorrer, o que pode explicar o desaparecimento do seu pico de fusão na curva DSC.

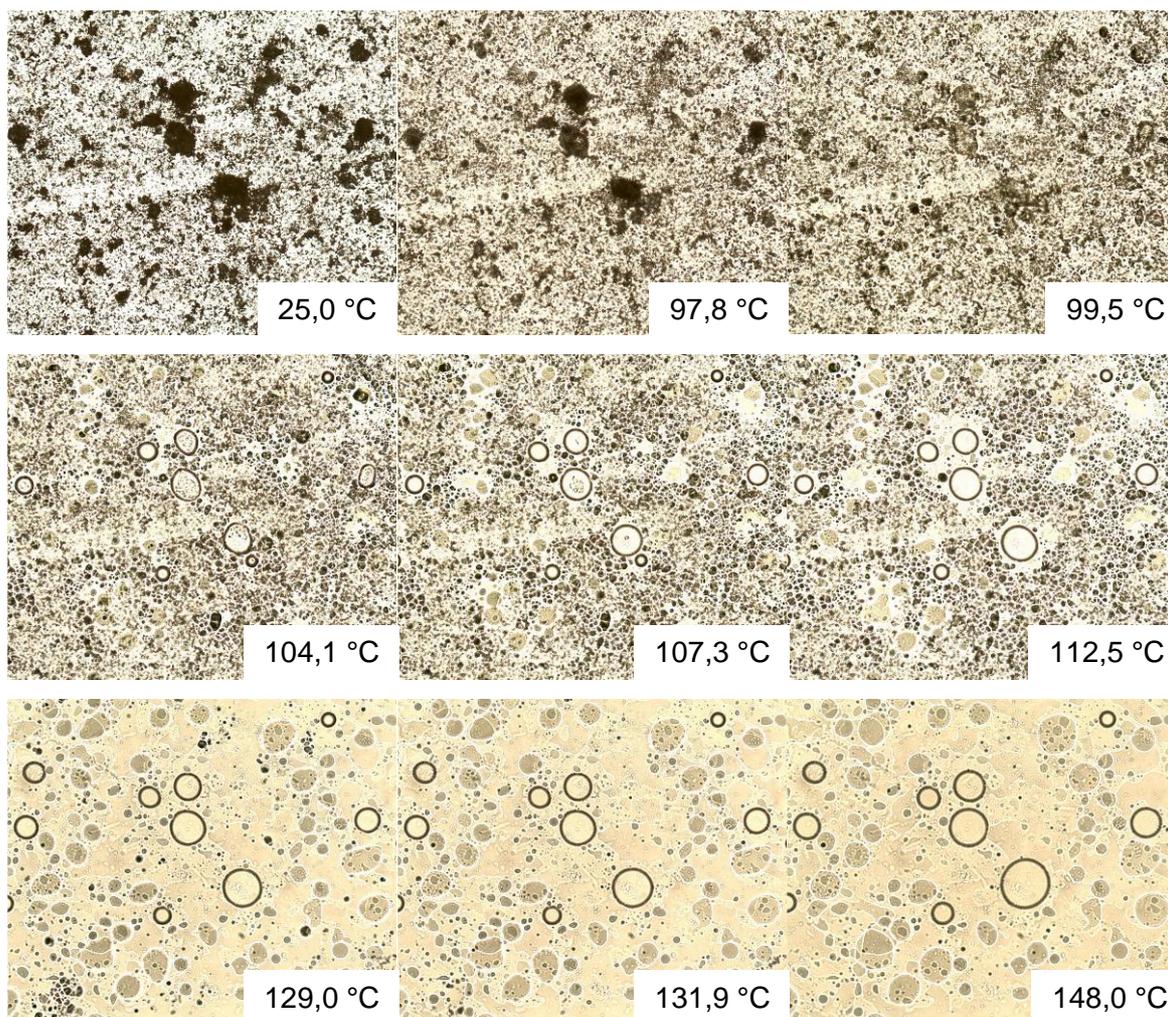


Figura 37 – Imagens TOA da mistura efavirenz - fumarato de tenofovir desoproxila.
Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100 vezes.

A fusão completa do EFZ ocorre em 148,0 °C, aproximadamente 10 °C depois da fusão completa do EFZ puro. O fato de a fusão completa do fármaco ocorrer em uma temperatura maior em relação à amostra pura pode indicar a existência de interações que estabilizam a fase sólida. Deve-se observar que mesmo quando ocorre a estabilização da fase sólida, a interação pode significar uma incompatibilidade, pois isso pode acarretar em problemas na formulação farmacêutica após a sua administração, como exemplo uma dissolução mais lenta, comprometendo a eficácia terapêutica do medicamento.

Porém, deve-se levar em consideração que a simples ocorrência de uma interação sólido-sólido não indica necessariamente uma incompatibilidade entre os componentes. Uma incompatibilidade farmacêutica é determinada por uma interação entre dois ou mais componentes que altere as propriedades físicas, químicas, microbiológicas ou terapêuticas que comprometam a eficácia da formulação final. Além disso, por meio da identificação de possíveis interações podem ser utilizadas estratégias para evitá-las ou, pelo menos, minimizá-las. Desse modo, uma alternativa para evitar a incompatibilidade entre o EFZ e o TDF é a produção de um comprimido em duas camadas, uma delas contendo o EFZ, e a outra, contendo os fármacos 3TC e TDF, ou ainda a produção de dois granulados diferentes (um deles contendo um dos fármacos separadamente), que são posteriormente comprimidos para produzir o medicamento. Essa estratégia é especialmente útil no caso do TDF, uma vez que possibilitaria a produção de dois granulados obtidos por processos diferentes, um por via úmida e outro por via seca. A granulação por via seca é recomendada nos casos em que os fármacos apresentem instabilidade frente à umidade ou a temperaturas elevadas, utilizadas durante o processo de secagem do granulado. Dessa forma, o processo mais indicado para o TDF, que sofre uma transição de fase em temperaturas mais altas, é a granulação por via seca.

5.2.2.3 FTIR

Assim como para a mistura EFZ - 3TC, o espectro de FTIR da mistura EFZ - TDF não apresentou diferenças em relação aos fármacos puros (Figura 38), e nenhuma interação pôde ser detectada.

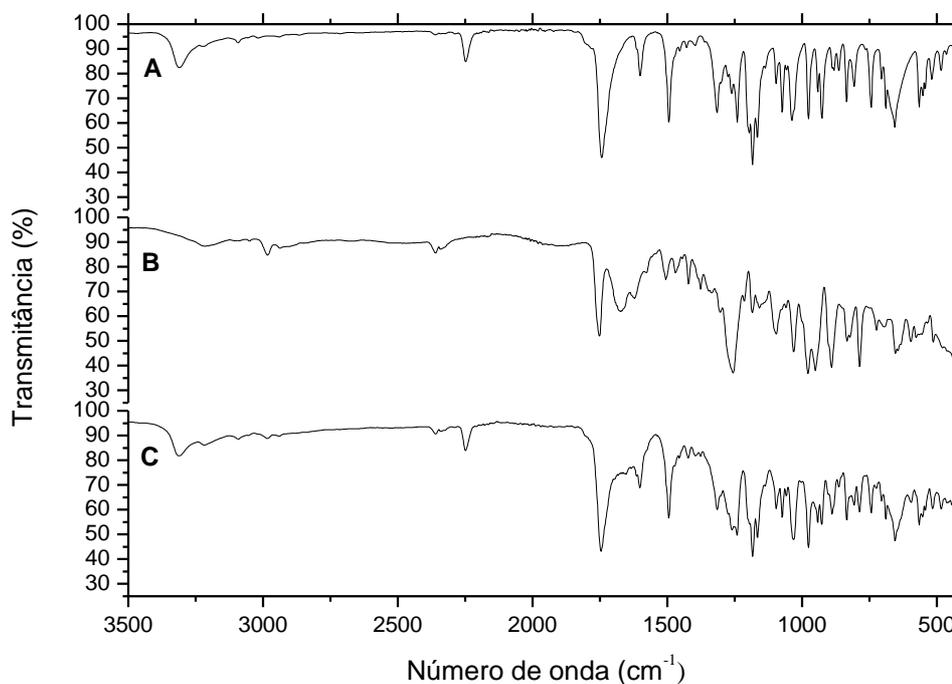


Figura 38 – Espectros infravermelho dos fármacos A) efavirenz; B) fumarato de tenofovir desoproxila; C) mistura física 1:1 m/m efavirenz - fumarato de tenofovir desoproxila.

5.2.2.4 *ssNMR*

A mistura EFZ - TDF apresentou algumas mudanças significativas nos valores de deslocamento químico dos fármacos em relação ao estado puro (Figura 39 e Tabela 8), o que confirma que a interação entre eles sugerida pela análise TOA ocorre no estado sólido. As mudanças observadas ocorrem nos valores de deslocamento químico do C3 do TDF, ligado ao grupo amino, e os átomos C3 e C11 do EFZ, próximos ao N-H, e C4, ligado aos 3 átomos de flúor. Isso sugere que ocorre uma interação entre esses grupos, provavelmente uma ligação de hidrogênio entre o grupo amino do TDF e o N-H do EFZ, assim

como entre os átomos de hidrogênio do grupo amino do TDF e os átomos de flúor ligados a C4 e oxigênio do carbono carbonílico C3 do EFZ. Essa possível interação de hidrogênio explica o fato de a temperatura de fusão do EFZ se deslocar para valores mais altos na análise TOA.

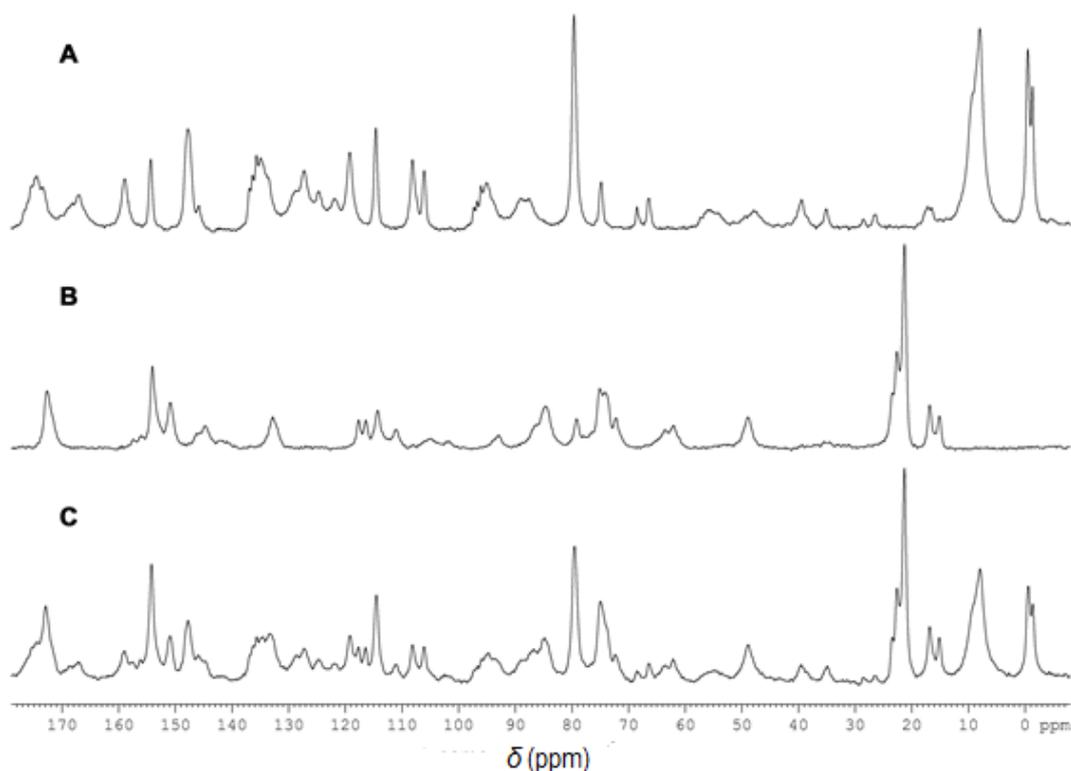


Figura 39 – Espectro de RMN do estado sólido de A) efavirenz; B) fumarato de tenofovir desopoxila; C) mistura efavirenz - fumarato de tenofovir desopoxila.

No caso da mistura entre EFZ e TDF, não foi possível a obtenção dos tempos de relaxação spin-rede (T_1) a partir do espectro da mistura para avaliação de possíveis interações, uma vez que ambos os fármacos possuem valores similares de T_1 , o que impede a avaliação se os dois valores foram transformados em uma média ou não. Mesmo quando foi utilizado um espectrômetro de baixo campo (20 MHz), os dois fármacos apresentaram valores de T_1 semelhantes (nesse caso, próximos a 0,3 s), o que não

possibilitou o estudo da interação por meio da obtenção dos tempos de relaxação spin-rede para essa mistura.

Tabela 8 – Comparação entre os valores de deslocamento químico de ^{13}C observados para efavirenz e fumarato de tenofovir desoproxila puros e em mistura.

Número do carbono	EFZ δ (ppm)	EFZ mistura δ (ppm)	TDF δ (ppm)	TDF mistura δ (ppm)
1	96,8	96,8	133,2	133,8
2	66,4	67,0	116,7/117,9	117,7
3	148,1	149,2*	154,2	156,2*
4	115,1	116,1*	151,1	151,0
5	80,1	79,5	151,1	151,0
6	-0,9/-0,1	-1,2/-0,4	49,2	48,9
7	135,2	135,7	77,1/79,3	72,3*
8	124,9	124,7	62,2/64,0	62,1/63,6
9	127,7	128,6	84,9/86,8	86,8
10	119,6	106,1	154,2	154,2
11	134,1	135,2*	72,3/75,4	75,0
12	122,3	121,8	21,6/23,7	23,4
13	8,3	8,3	84,9/86,8	86,8
14	8,3	8,3	154,2	154,2
15	-	-	72,3/75,4	75,0
16	-	-	21,6/23,7	23,4
17	-	-	21,6/23,7	23,4
18	-	-	21,6/23,7	23,4
19	-	-	15,3/17,0	16,8
20	-	-	171,8/172,8	172,8
21	-	-	141,6/146,6	143,4
22	-	-	141,6/146,6	143,4
23	-	-	171,8/172,8	172,8

* Mudança no valor de δ do fármaco na mistura quando comparado ao fármaco puro

5.2.3 Mistura lamivudina – tenofovir (3TC – TDF)

5.2.3.1 DSC

A curva DSC da mistura física 3TC - TDF (Figura 40) apresentou mudanças em relação às curvas dos fármacos puros, sugerindo possíveis incompatibilidades entre eles. O ponto de fusão do TDF deslocou de 113,5 para 110,3 °C, e houve o desaparecimento do pico de fusão da 3TC, assim como acontece com o pico de fusão do EFZ na mistura com o TDF. Porém, ao contrário do que ocorre na mistura EFZ - TDF, em que o ΔH do pico de fusão do TDF apresentou valor inferior a um terço em relação ao fármaco puro, na mistura 3TC - TDF o ΔH do pico de fusão do TDF apresentou o valor de 99,5 J g⁻¹, aproximadamente metade do valor relativo ao fármaco puro (226,3 J g⁻¹), o que é esperado numa mistura 1:1 m/m. Esse resultado diminui a possibilidade de uma interação entre o TDF e a 3TC. Uma hipótese é que após a fusão do TDF, ocorre a solubilização total da 3TC, o que justificaria o desaparecimento do seu pico de fusão.

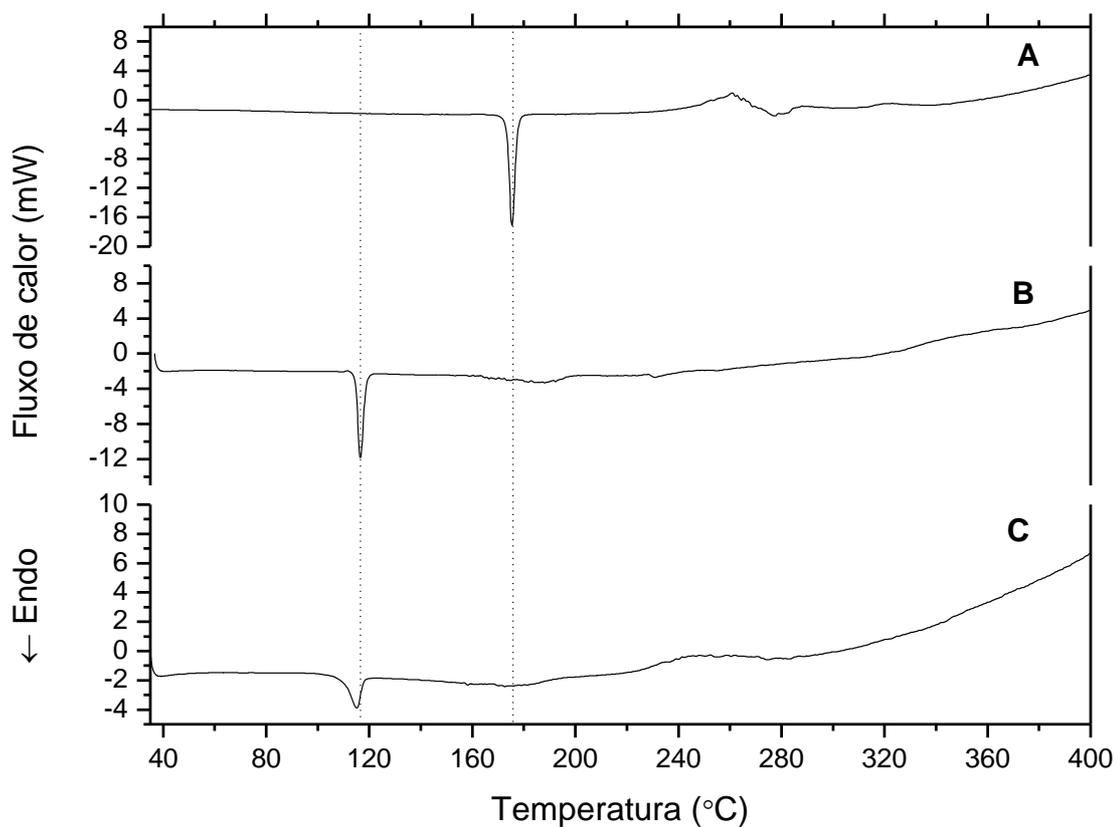


Figura 40 – Curvas DSC dos fármacos A) lamivudina; B) fumarato de tenofovir desoproxila; C) mistura física 1:1 m/m lamivudina - fumarato de tenofovir desoproxila, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.2.3.2 TOA

As imagens TOA da mistura 3TC - TDF (Figura 41) mostraram que a fusão do TDF começa em $105,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura cerca de $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ abaixo da temperatura de início da fusão do TDF puro. Pode-se observar que nessa temperatura a 3TC começa a se dissolver no TDF fundido, o que explica o desaparecimento

do seu pico de fusão na curva DSC dessa mistura e confirma a hipótese anterior.

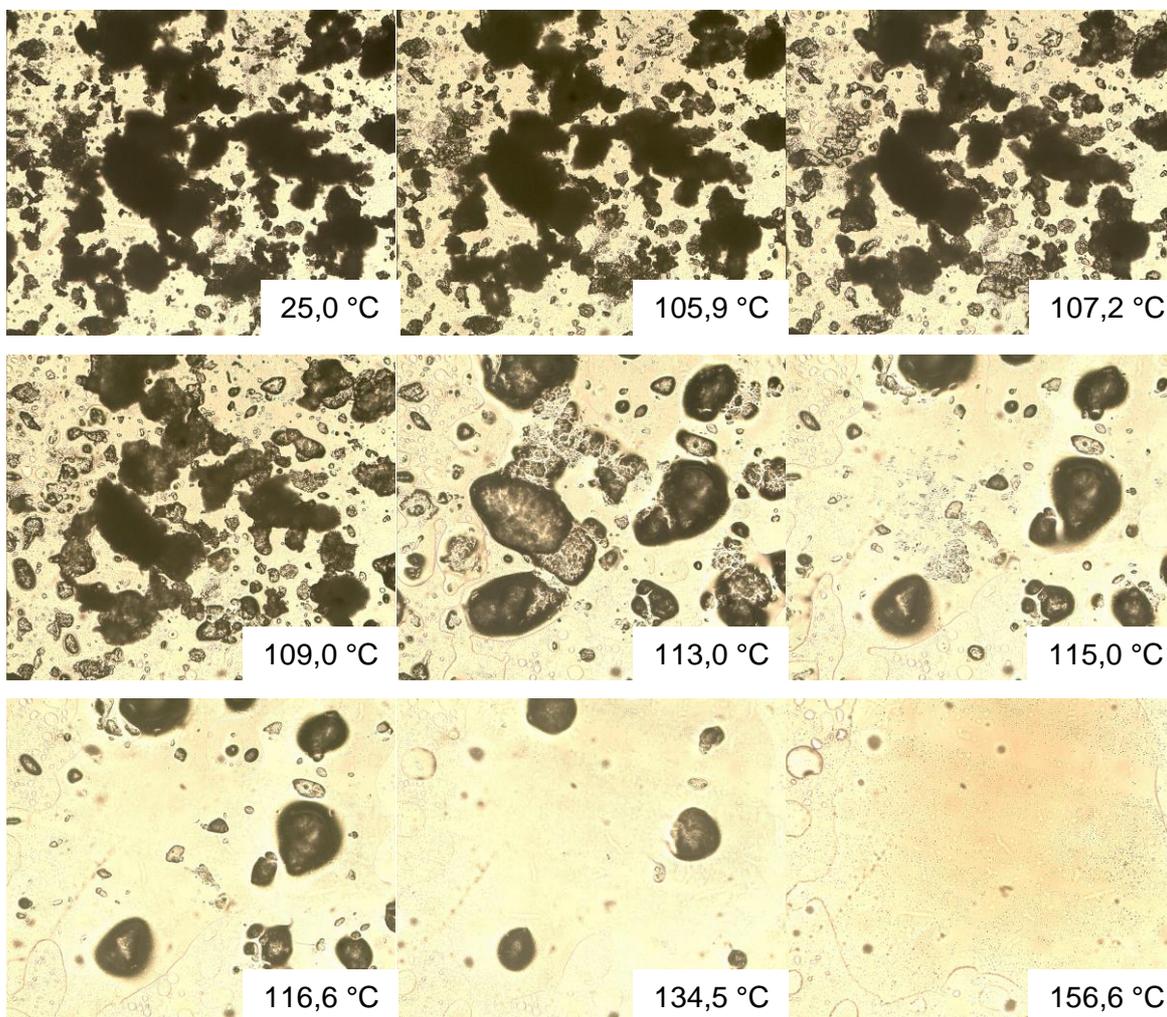


Figura 41 – Imagens TOA da mistura lamivudina – fumarato de tenofovir desoproxila. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100 vezes.

5.2.3.3 FTIR

Assim como para as outras misturas, não foi possível detectar nenhum tipo de interação entre os fármacos 3TC e TDF por FTIR (Figura 42).

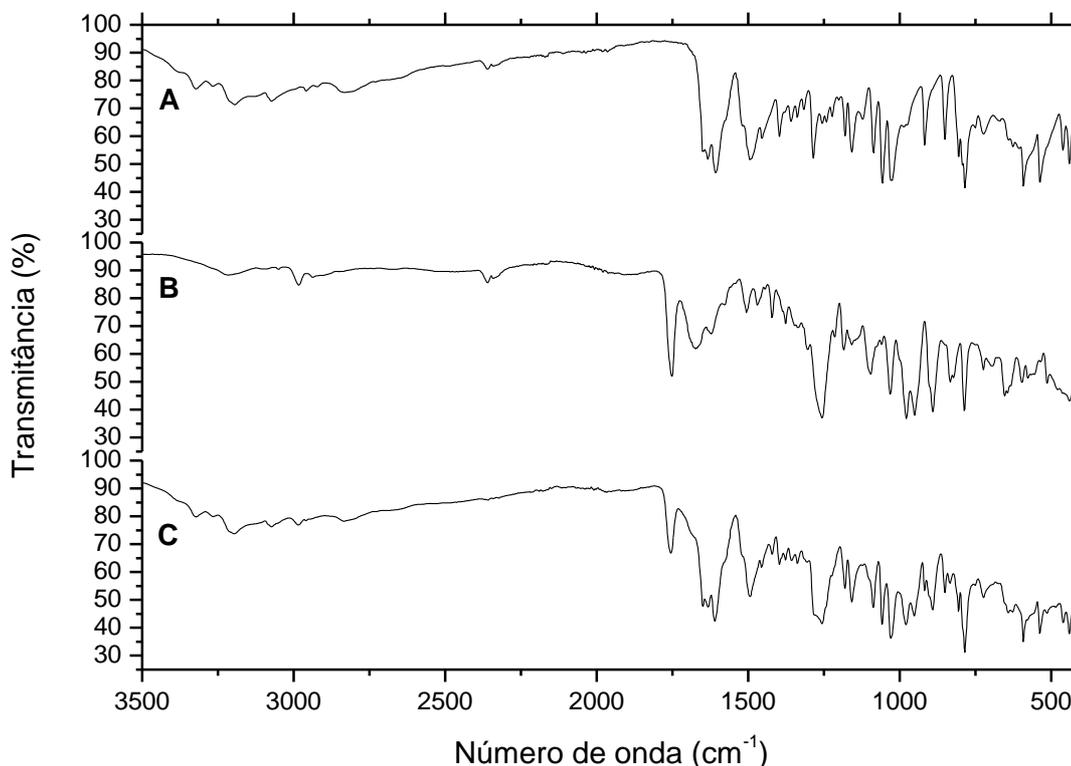


Figura 42 – Espectros infravermelho dos fármacos A) lamivudina; B) fumarato de tenofovir desoproxila; C) mistura física 1:1 m/m lamivudina - fumarato de tenofovir desoproxila.

5.2.3.4 ssNMR

A análise de RMN da mistura 3TC - TDF (Figura 43) não mostrou mudanças maiores que 1 ppm nos valores de deslocamento químico dos fármacos se comparados aos valores no estado puro (Tabela 9), o que caracteriza a inexistência de interação entre eles. O abaixamento no ponto de fusão do TDF na curva DSC da mistura provavelmente ocorre devido ao fato de o composto não se apresentar mais no estado puro.

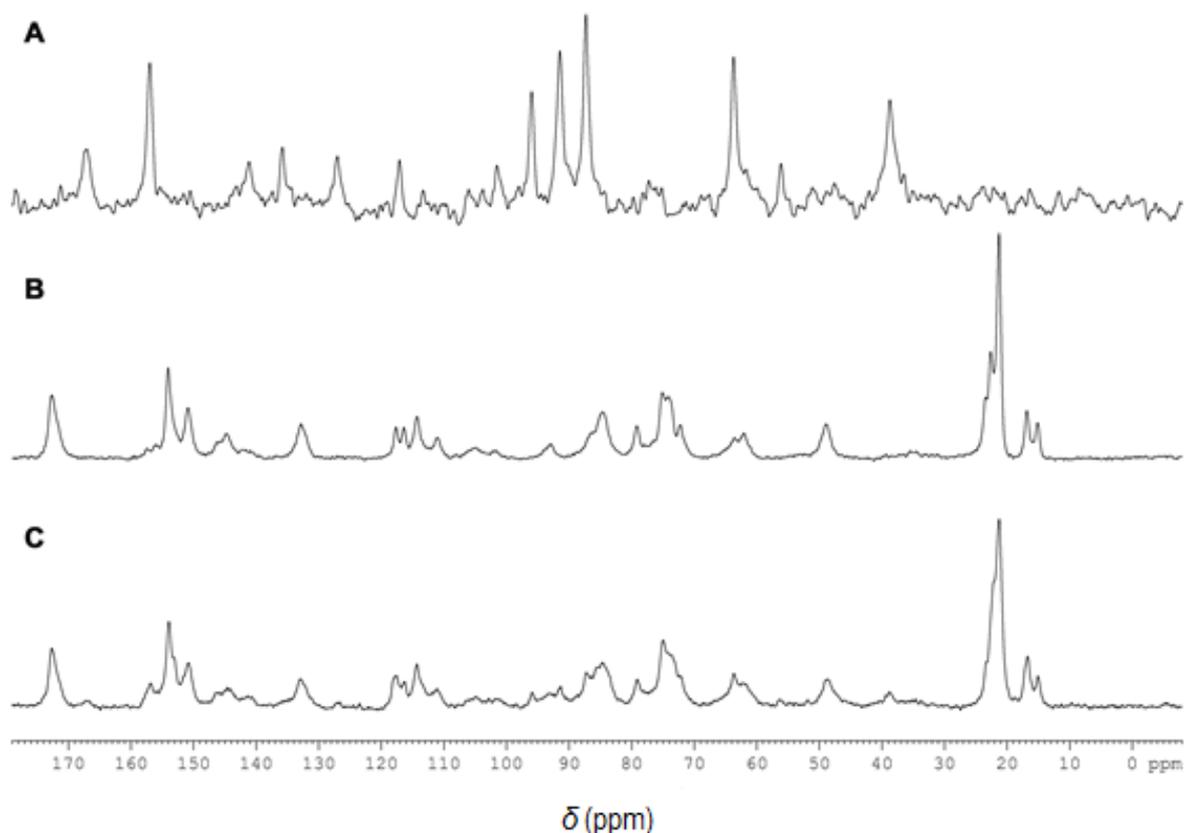


Figura 43 – Espectro de RMN do estado sólido de A) lamivudina; B) fumarato de tenofovir desoproxila; C) mistura lamivudina - fumarato de tenofovir desoproxila.

Os tempos de relaxação spin-rede (T_1) obtidos a partir do espectro da mistura entre os fármacos, foram de 35,55 s a partir das integrais dos sinais correspondentes à 3TC e de 1,27 s a partir das integrais dos sinais correspondentes ao TDF. Os valores de T_1 não apresentaram uma mudança significativa se comparados aos valores de T_1 obtidos a partir dos espectros dos fármacos puros (40,53 s para a 3TC e 1,54 s para o TDF). Foram obtidos dois valores, cada um referente a um fármaco, em vez de ser obtido um único valor médio para o T_1 dos fármacos, o que indica que não ocorre uma interação entre eles, confirmando o que foi observado na análise dos valores de deslocamento químico no espectro de ^{13}C para essa mistura.

Tabela 9 – Comparação entre os valores de deslocamento químico de ¹³C observados para lamivudina e fumarato de tenofovir desopoxila puros e em mistura.

Número do carbono	3TC δ (ppm)	3TC mistura δ (ppm)	TDF δ (ppm)	TDF mistura δ (ppm)
1	167,2	166,8	133,2	132,9
2	157,3	156,9	116,7/117,9	116,3/117,7
3	141,5	141,1	154,2	153,9
4	96,3	95,9	151,1	150,8
5	-	-	151,1	150,8
6	-	-	49,2	48,8
7	-	-	77,1/79,3	77,1/78,9
8	-	-	62,2/64,0	63,7
9	-	-	84,9/86,8	84,2/84,8
10	-	-	154,2	153,9
11	-	-	72,3/75,4	72,1/74,9
12	-	-	21,6/23,7	21,1/22,4
13	-	-	84,9/86,8	84,2/84,8
14	-	-	154,2	153,9
15	-	-	72,3/75,4	72,1/74,9
16	-	-	21,6/23,7	21,1/22,4
17	-	-	21,6/23,7	21,1/22,4
18	-	-	21,6/23,7	21,1/22,4
19	-	-	15,3/17,0	15,0/16,7
20	-	-	171,8/172,8	172,4
21	-	-	141,6/146,6	141,1/145,9
22	-	-	141,6/146,6	141,1/145,9
23	-	-	171,8/172,8	172,4
1'	91,9	91,4	-	-
2'	87,7	87,2	-	-
3'	39,1	38,5	-	-
4'	64,1	63,7	-	-

5.2.4 Mistura efavirenz - lamivudina - tenofovir (EFZ - 3TC - TDF)

5.2.4.1 DSC

Na curva DSC da mistura ternária EFZ - 3TC - TDF (Figura 44), observa-se a ausência dos picos de fusão da 3TC e do EFZ. O pico de fusão do TDF deslocou-se de 113,5 para 99,2 °C, e o valor do ΔH de seu pico de fusão foi de 57,8 J g⁻¹, aproximadamente um quarto do valor referente ao fármaco puro (226,3 J g⁻¹), quando o que seria esperado numa mistura 1:1:1 m/m/m seria cerca de um terço. O deslocamento da temperatura de fusão do TDF é significativo e similar ao observado na mistura EFZ – TDF (em que o ponto de fusão do TDF foi de 98,3 °C). O desaparecimento dos picos de fusão dos outros fármacos pode ser explicado pela solubilização parcial após a fusão do TDF.

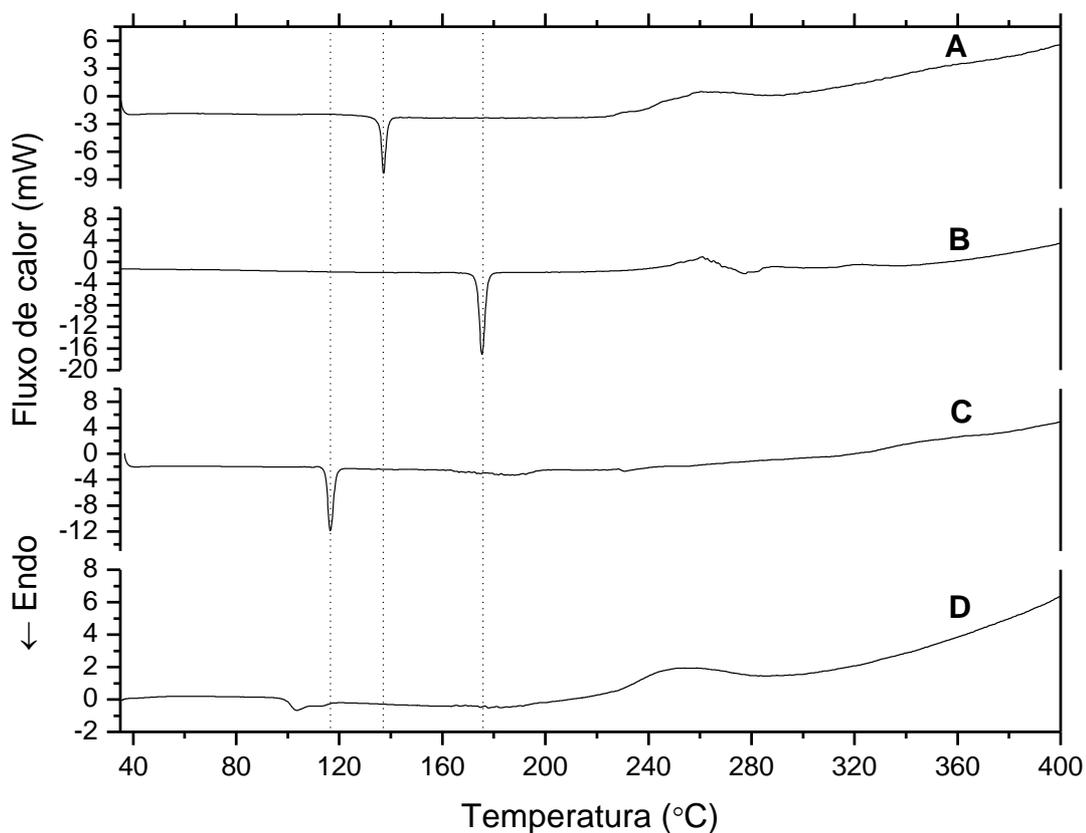


Figura 44 – Curvas DSC dos fármacos A) efavirenz; B) lamivudina; C) fumarato de tenofovir desoproxila; D) mistura física 1:1:1 m/m/m efavirenz - lamivudina - fumarato de tenofovir desoproxila, obtidas a 10 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.2.4.2 TOA

A análise TOA da mistura EFZ - 3TC - TDF (Figura 45) mostra que a fusão do TDF começa em $98,1\text{ °C}$, temperatura similar à observada para a mistura EFZ - TDF, que foi de $97,8\text{ °C}$. A fusão completa da mistura ocorre em $155,6\text{ °C}$.

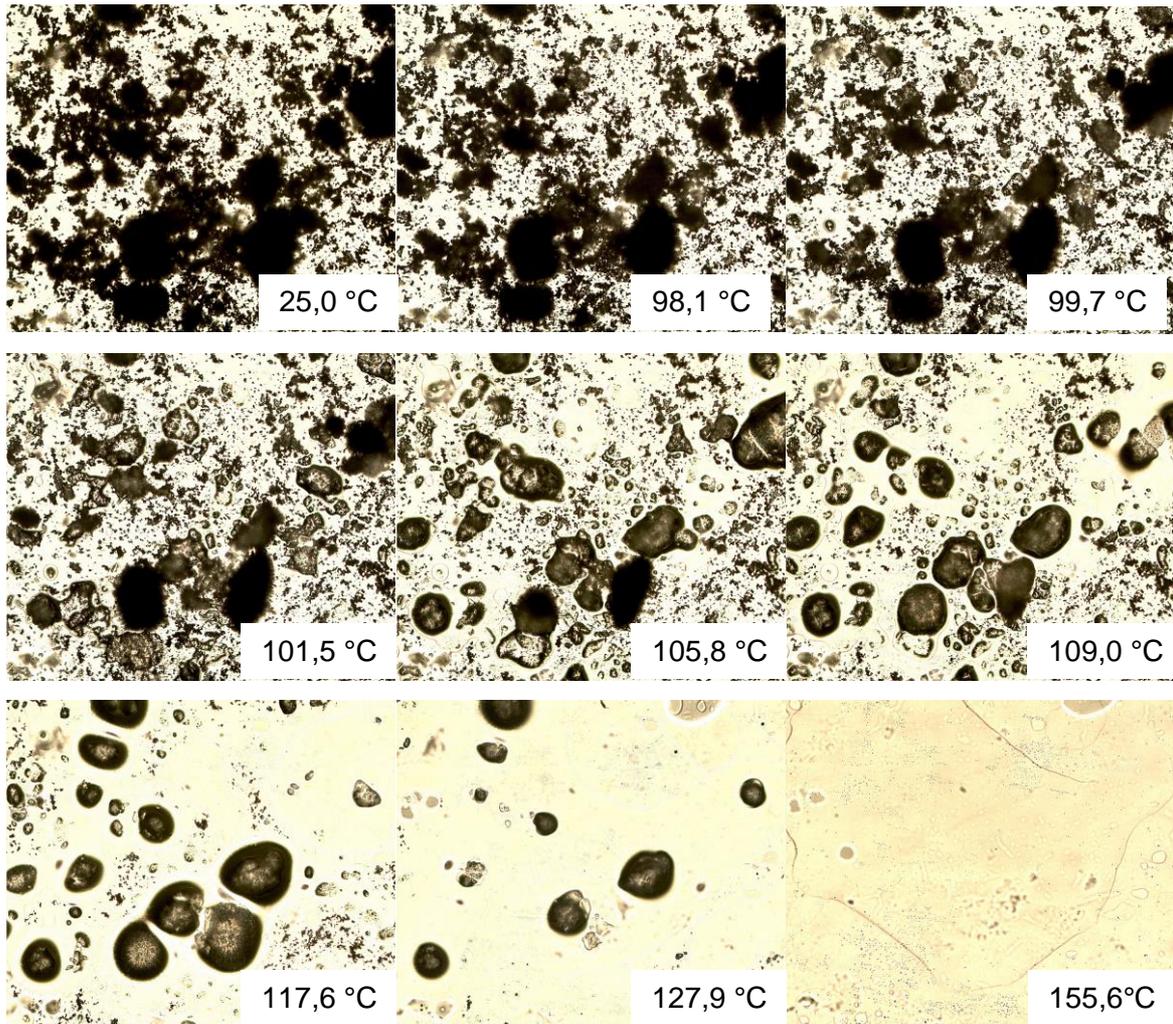


Figura 45 – Imagens TOA da mistura efavirenz – lamivudina – fumarato de tenofovir desoproxila. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100 vezes.

5.2.4.3 DRX

A fim de avaliar se ocorre alguma mudança no perfil de cristalinidade dos fármacos após a mistura dos três componentes, foi feita a difração de raios X para a amostra (Figura 46). O difratograma da mistura EFZ – 3TC – TDF apresenta-se como um somatório dos difratogramas dos fármacos puros, e não foi observada a ocorrência de amorfização de nenhum deles na mistura. Assim,

não foram evidenciadas interações entre os fármacos, o que era esperado, a partir das análises obtidas para as misturas binárias. Deve-se levar em consideração que a presença de ligações de hidrogênio (como evidenciada para a mistura EFZ – TDF) não seria observada em um difratograma de pó, sendo requerida, para esse caso, uma análise de monocristal.

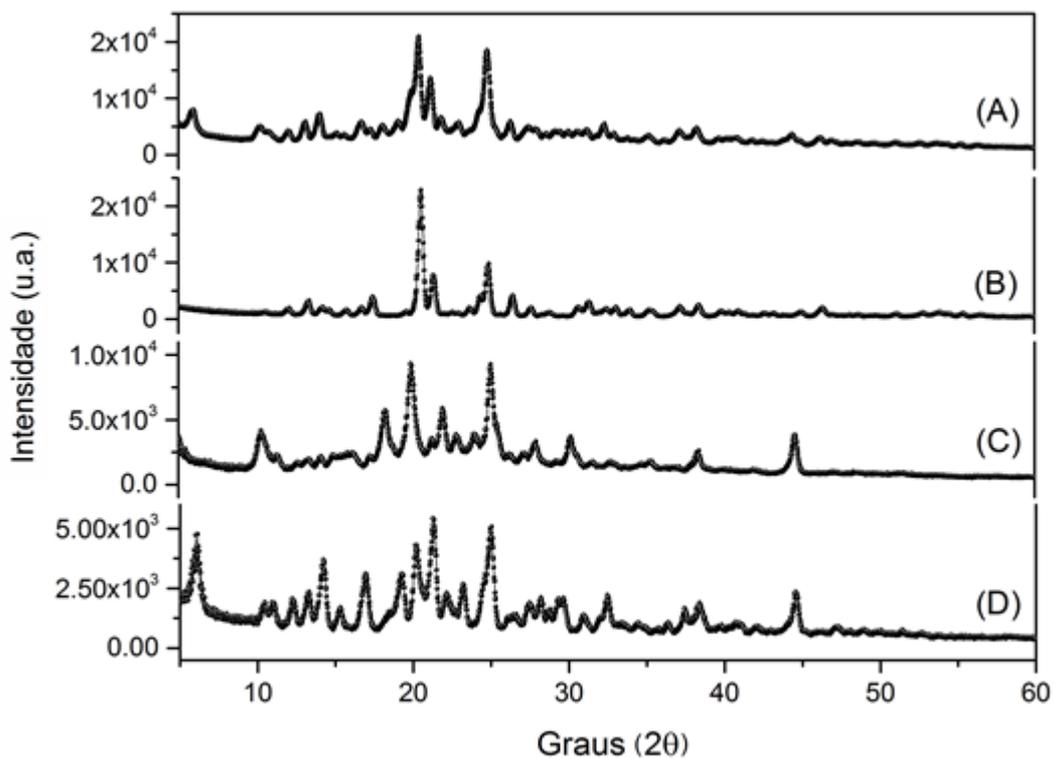


Figura 46 – Difratogramas de (A) mistura efavirenz – lamivudina – fumarato de tenofovir desoproxila; (B) lamivudina; (C) fumarato de tenofovir desoproxila e (D) efavirenz.

5.3 Estudo de compatibilidade entre fármacos e excipientes

A Figura 47 mostra as curvas DSC dos doze excipientes obtidos pela Funed: amido, amido de milho pré-gelatinizado, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, crospovidone, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, fosfato de cálcio dibásico, glicolato de amido sódico, lactose *spray dried*, opadry e PVP-K30. A maioria deles não apresentou nenhum evento térmico na curva DSC, com exceção dos excipientes estearato de magnésio, fosfato de cálcio dibásico (que apresenta um pico de fusão próximo a 200 °C) e lactose *spray dried*, que apresenta dois eventos endotérmicos.

A Figura 48 apresenta os difratogramas dos excipientes utilizados. A maioria deles apresentou padrão característico de material amorfo. A celulose microcristalina 102, como característica natural, apresenta-se com baixo tamanho de partícula, o que gera um difratograma com picos alargados. Os excipientes estearato de magnésio, fosfato de cálcio dibásico, lactose *spray dried* e opadry são policristalinos, porém apresentam significativa contribuição de material amorfo (15% para lactose *spray dried* e mais de 50% para os demais). O difratograma da lactose *spray dried*, evidenciando a contribuição de material amorfo e cristalino, está apresentado na Figura 49.

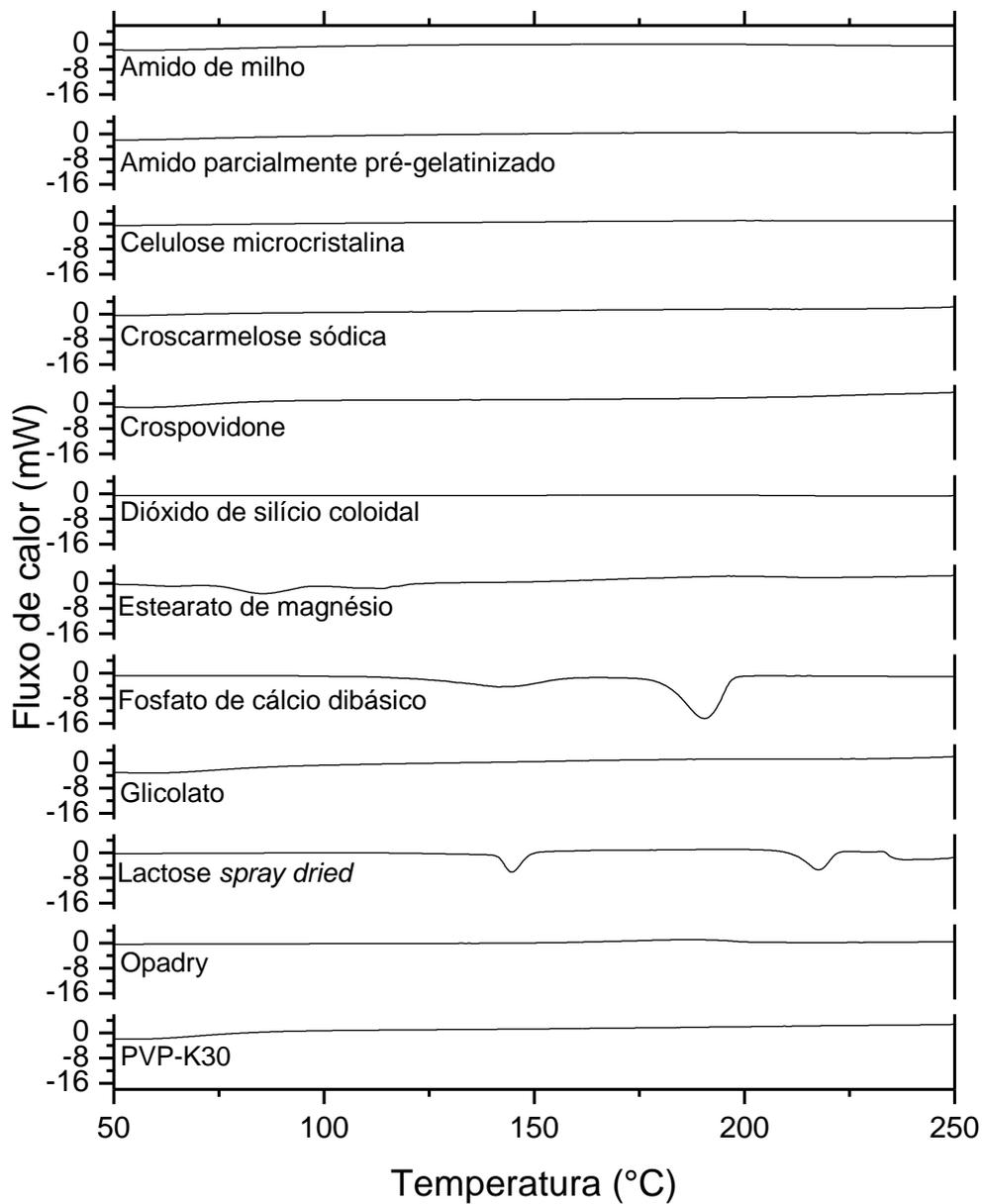


Figura 47 – Curvas DSC dos excipientes utilizados nas pré-formulações, obtidas a 10 °C min⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

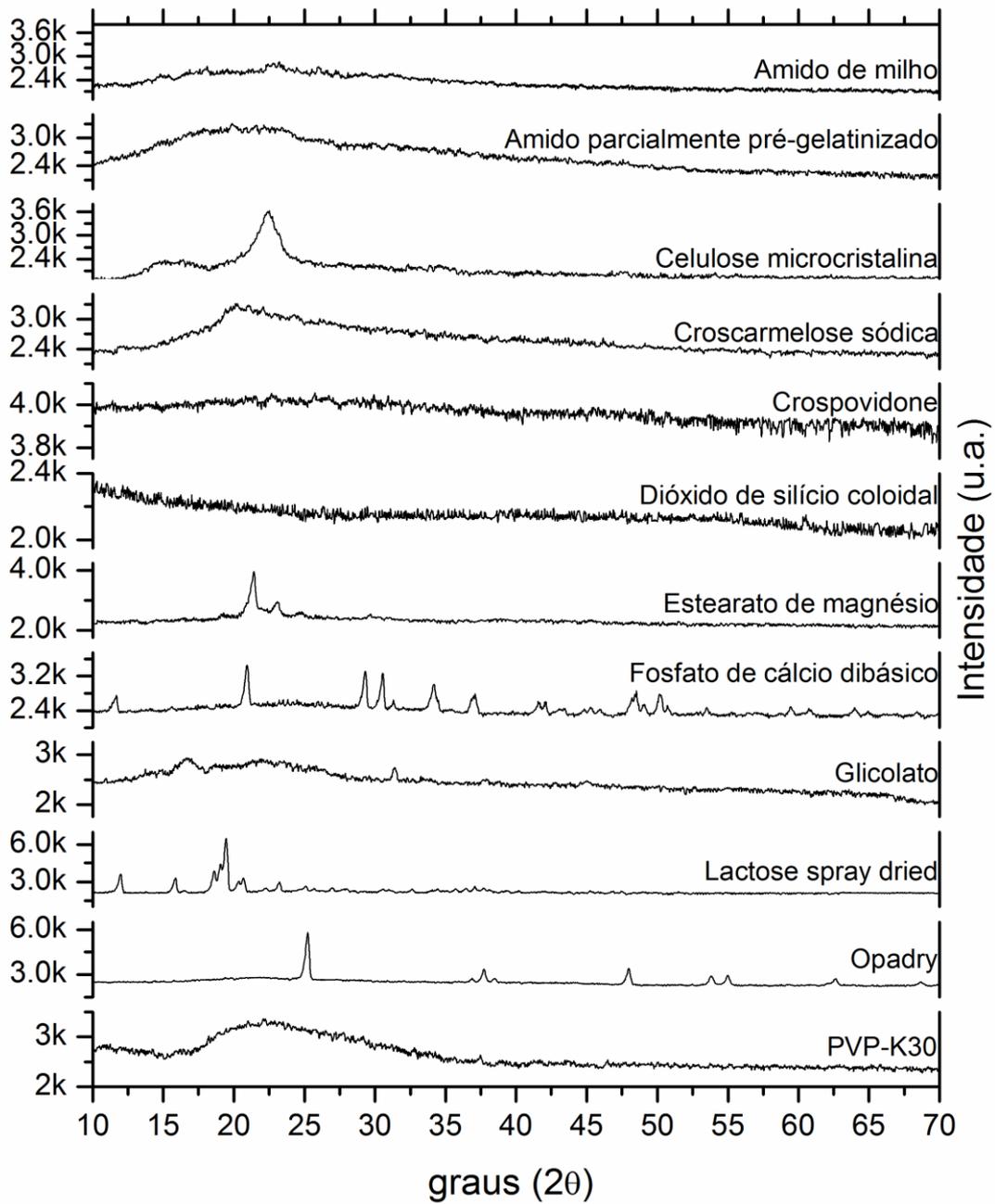


Figura 48 – Difractogramas dos excipientes utilizados nas pré-formulações.

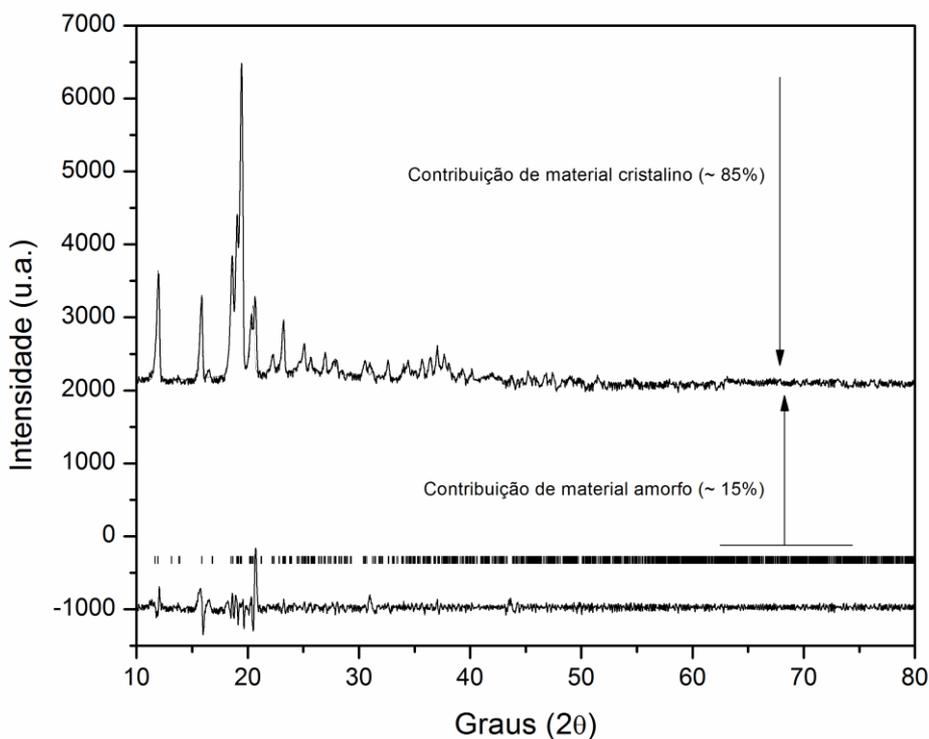


Figura 49 – Difratoograma ajustado da lactose *spray dried*.

5.3.1 Misturas lamivudina – excipientes

A Figura 50 mostra as curvas DSC das misturas binárias da 3TC com os excipientes utilizados no estudo de pré-formulação. As curvas não mostraram nenhuma evidência de incompatibilidade entre o fármaco e os excipientes, com exceção da curva da mistura entre a 3TC e a lactose *spray dried*, em que a temperatura onset do pico de fusão da 3TC deslocou de 173,5 para 169,3 °C, um abaixamento significativo (Tabela 10). Além disso, ocorre o desaparecimento do pico de fusão da lactose *spray dried*. Uma hipótese é que após a fusão da 3TC, que ocorre antes da fusão da lactose *spray dried*, ocorre solubilização da última, o que justificaria a ausência do seu pico de fusão.

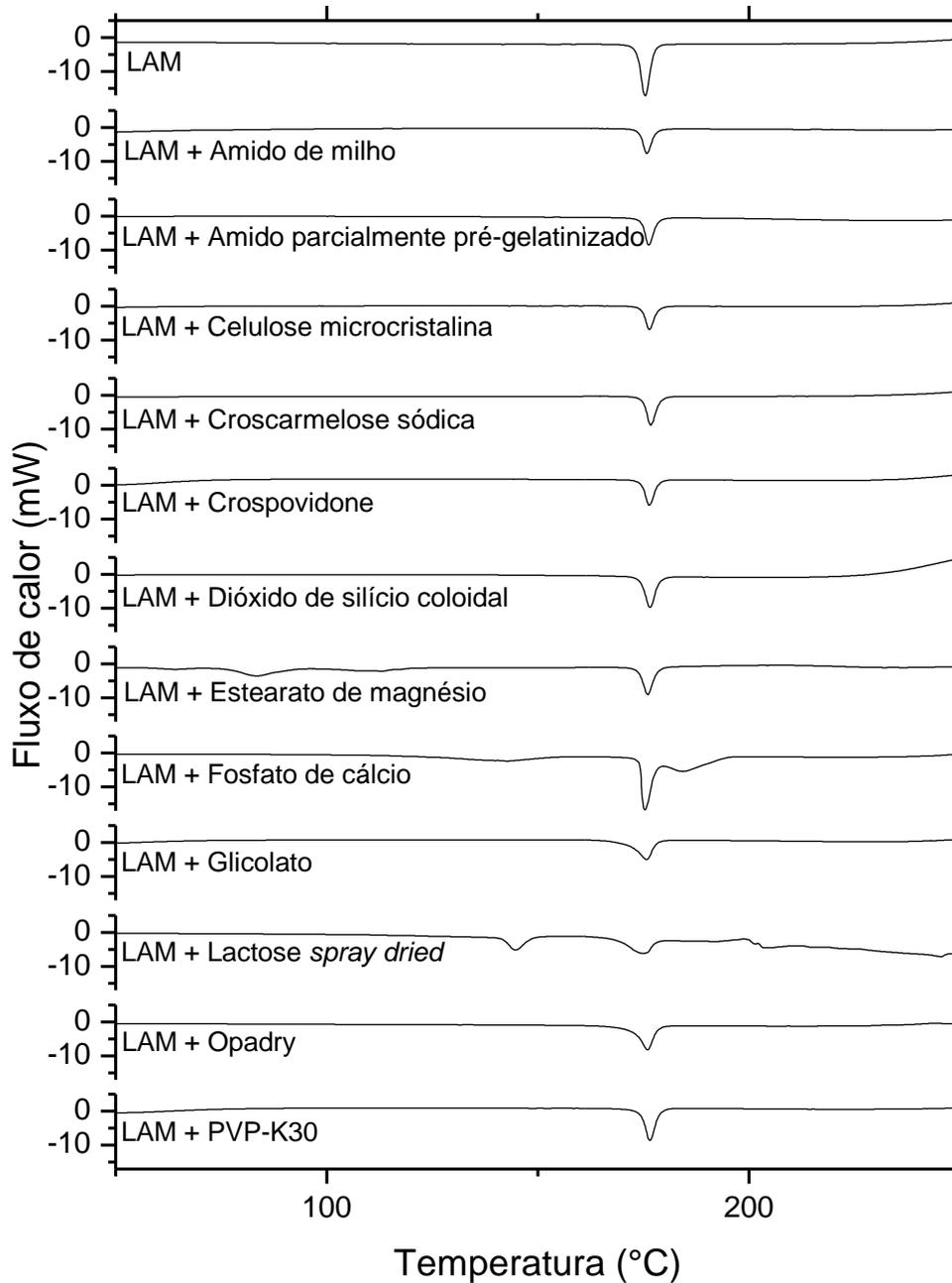


Figura 50 - Curvas DSC das misturas binárias da lamivudina com os excipientes utilizados nas pré-formulações, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

Tabela 10 – Comparação entre os valores de entalpia de fusão (J g^{-1}) e as temperaturas *onset* ($^{\circ}\text{C}$) de fusão da lamivudina e suas misturas binárias.

Fármaco e misturas binárias 1:1	ΔH (J g^{-1})	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)
Lamivudina	355,30	173,5
Lamivudina + amido	121,58	173,9
Lamivudina + amido parcialmente pré-gelatinizado	107,78	174,4
Lamivudina + celulose microcristalina	101,75	174,6
Lamivudina + croscarmelose sódica	119,22	175,0
Lamivudina + crospovidone	103,93	174,6
Lamivudina + dióxido de silício coloidal	168,76	174,5
Lamivudina + estearato de magnésio	117,10	173,6
Lamivudina + fosfato de cálcio dibásico	150,46	174,1
Lamivudina + glicolato	111,61	172,3
Lamivudina + lactose <i>spray dried</i>	124,88	169,3
Lamivudina + opadry	141,19	172,8
Lamivudina + PVP	117,89	174,4

5.3.1 Misturas efavirenz – excipientes

A Figura 51 mostra as curvas DSC das misturas binárias entre os excipientes e o EFZ na proporção 1:1. Pode-se observar que os eventos térmicos mais significativos ocorrem na mesma faixa de temperatura para a maioria das misturas, o que, em princípio, evidencia ausência de incompatibilidades entre o fármaco e os excipientes (Tabela 11). As pequenas alterações ocorridas são devido à presença do excipiente e não caracterizam interação (Mura *et al.*, 1998; Macedo & Nascimento, 2001).

Um fato a ser notado é o valor de ΔH do pico de fusão do EFZ na mistura com o fosfato de cálcio dibásico ($420,64 \text{ J g}^{-1}$), mais de três vezes superior ao valor de ΔH do EFZ puro ($125,43 \text{ J g}^{-1}$). Entretanto, essa mudança no valor de ΔH

não indica incompatibilidade entre os componentes. O que ocorre é a sobreposição dos picos de perda de água de hidratação do fosfato de cálcio dibásico ($T_{onset} = 124,3$ e $\Delta H = 373,51 \text{ J g}^{-1}$) e de fusão do EFZ. Por outro lado, as misturas binárias entre o EFZ e os excipientes lactose *spray dried*, opadry e PVP-K30 apresentaram valores de ΔH anormalmente baixos. Além disso, o pico de fusão do fármaco nas misturas com o opadry e o PVP-K30 praticamente desaparece, enquanto na curva da mistura com a lactose *spray dried*, ocorre o aparecimento de um outro pico próximo a $230 \text{ }^\circ\text{C}$, ausente tanto na curva do fármaco quanto na curva desse excipiente separadamente. Esses fatos indicam a possibilidade de interação entre o EFZ e os três excipientes.

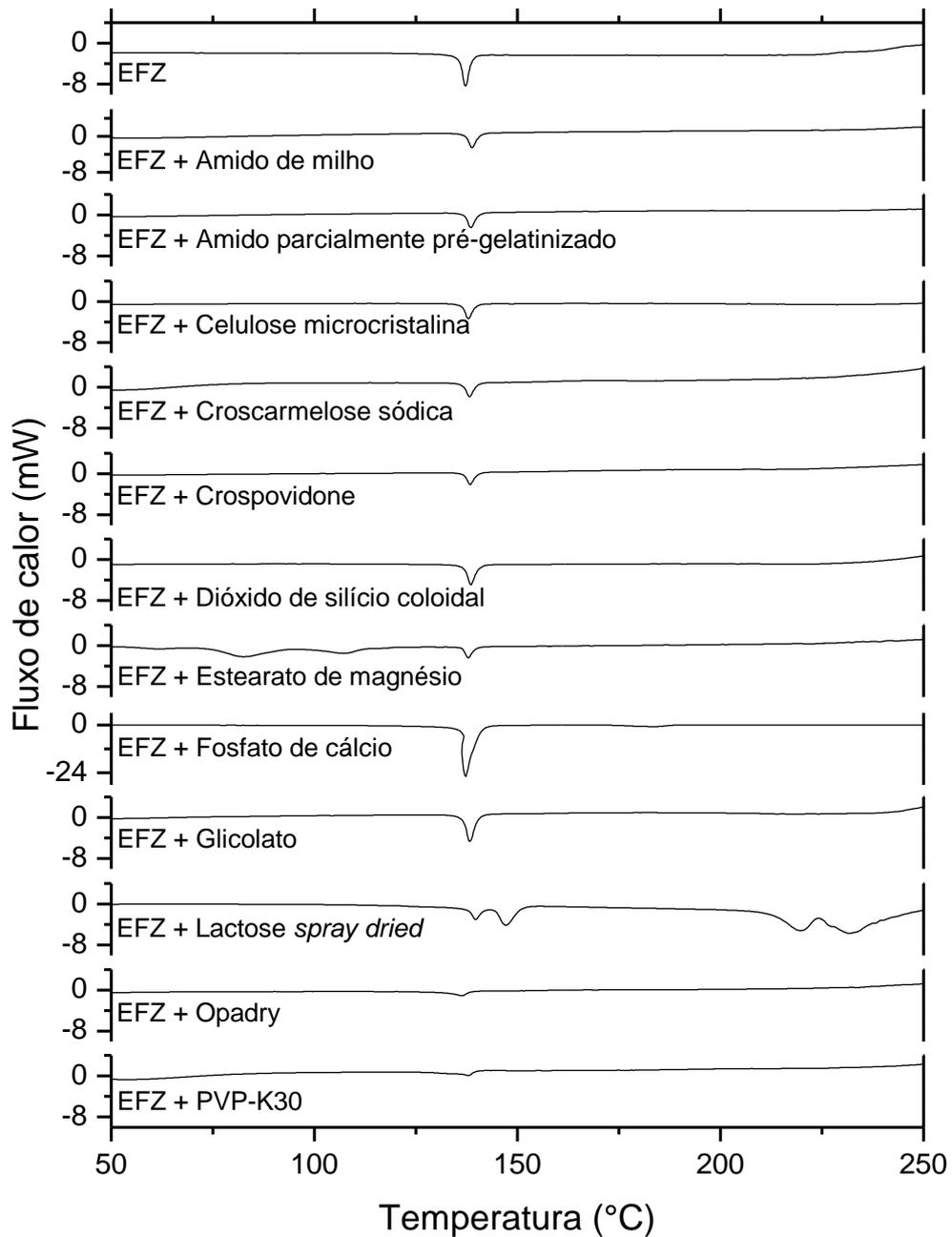


Figura 51 - Curvas DSC das misturas binárias do efavirenz com os excipientes utilizados nas pré-formulações, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

Tabela 11 – Comparação entre os valores de entalpia de fusão ($J g^{-1}$) e as temperaturas *onset* ($^{\circ}C$) de fusão do efavirenz e suas misturas binárias.

Fármaco e misturas binárias 1:1	$\Delta H (J g^{-1})$	$T_{onset} (^{\circ}C)$
Efavirenz	125,43	135,7
Efavirenz + amido	50,98	137,2
Efavirenz + amido parcialmente pré-gelatinizado	41,70	137,0
Efavirenz + celulose microcristalina	41,05	136,4
Efavirenz + croscarmelose sódica	39,70	137,0
Efavirenz + crospovidone	39,16	136,5
Efavirenz + dióxido de silício coloidal	84,47	136,9
Efavirenz + estearato de magnésio	31,18	136,5
Efavirenz + fosfato de cálcio dibásico	420,64	135,0
Efavirenz + glicolato	81,16	136,9
Efavirenz + lactose <i>spray dried</i>	28,41	137,8
Efavirenz + opadry	26,97	132,9
Efavirenz + PVP	25,49	134,3

5.3.3 Mistura tenofovir – excipientes

A Figura 52 mostra as curvas DSC do TDF com os excipientes utilizados no estudo de pré-formulação. Os principais eventos térmicos do fármaco e dos excipientes ocorrem na mesma faixa de temperatura para a maioria das misturas, o que sugere ausência de incompatibilidade (Tabela 12). Assim como observado na mistura do EFZ com o fosfato de cálcio dibásico, a curva do TDF com esse excipiente apresenta valor de ΔH do pico de fusão do TDF maior do que o valor encontrado na curva do fármaco puro, devido à sobreposição do pico de perda de água de hidratação do fosfato de cálcio dibásico e o pico de fusão do TDF, ou seja, o valor de ΔH elevado não indica incompatibilidade entre esses componentes. Entretanto, nas curvas relativas às misturas com os excipientes estearato de magnésio e lactose *spray dried* ocorrem alterações

significativas, o que sugere ocorrência de interação entre o TDF e esses excipientes. Na curva da mistura com o estearato de magnésio, a temperatura *onset* do pico de fusão do fármaco é deslocada de 113,5 para 92,1 °C, mais de 20 °C, o que indica forte interação entre os componentes. Já na curva da mistura entre o TDF e a lactose *spray dried*, há o desaparecimento do pico de fusão do excipiente, assim como ocorre na mistura do mesmo com a 3TC. Esse resultado pode ser devido tanto a uma interação entre os componentes quanto pela solubilização da lactose *spray dried* após a fusão do TDF.

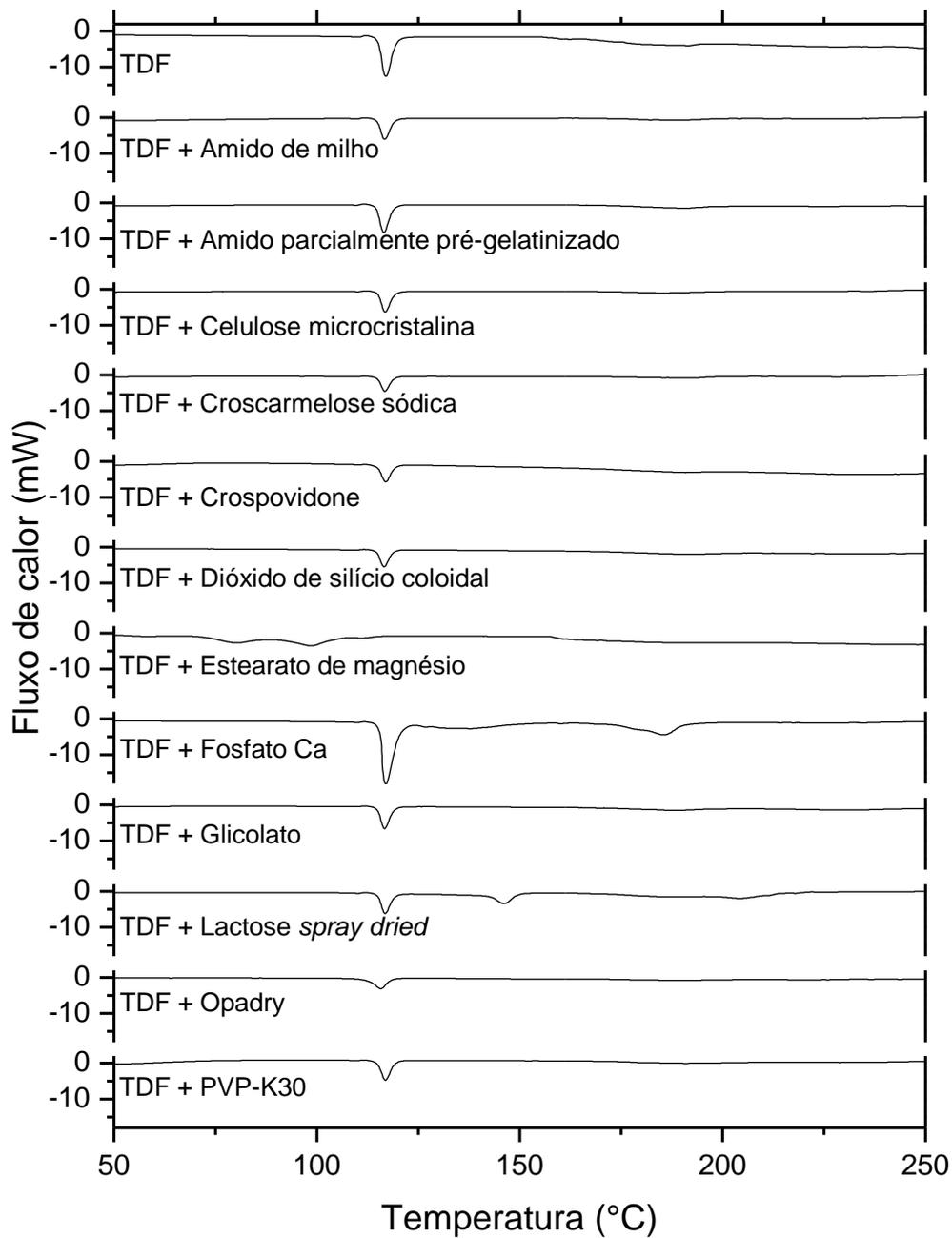


Figura 52 - Curvas DSC das misturas binárias do fumarato de tenofovir desoproxila com os excipientes utilizados nas pré-formulações, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

Tabela 12 – Comparação entre os valores de entalpia de fusão (J g^{-1}) e as temperaturas *onset* ($^{\circ}\text{C}$) de fusão do fumarato de tenofovir desoproxila e suas misturas binárias.

Fármaco e misturas binárias 1:1	ΔH (J g^{-1})	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)
Tenofovir	188,40	113,5
Tenofovir + amido	94,99	114,7
Tenofovir + amido pré-gelatinizado	116,29	114,6
Tenofovir + celulose microcristalina	84,29	115,0
Tenofovir + croscarmelose sódica	64,42	114,8
Tenofovir + crospovidone	79,72	114,9
Tenofovir + dióxido de silício coloidal	73,20	114,7
Tenofovir + estearato de magnésio	87,59	92,1
Tenofovir + fosfato de cálcio dibásico	252,63	115,6
Tenofovir + glicolato	97,60	115,0
Tenofovir + lactose spray dried	100,05	115,0
Tenofovir + opadry	76,23	112,2
Tenofovir + PVP	92,76	114,7

6 CONCLUSÃO

Não houve uma interação pronunciada entre os fármacos EFZ, 3TC e TDF. Os deslocamentos dos pontos de fusão dos fármacos observados pelas análises DSC e TOA para as misturas poderiam ser indício de uma interação entre os constituintes, mas essa interação não foi confirmada pelas outras técnicas utilizadas (IV e RMN do estado sólido). O espectro de ^{13}C da mistura entre o EFZ e o TDF apresentou mudanças nos valores de deslocamento químico dos sinais C3, C4 e C11 do EFZ e o C3 do TDF, o que indica possivelmente uma ligação de hidrogênio entre os átomos próximos a esses núcleos.

O estudo prévio de compatibilidade entre fármacos e excipientes mostrou que existe a possibilidade de incompatibilidade entre:

1. A 3TC e a lactose *spray dried*;
2. O EFZ e os excipientes lactose *spray dried*, opadry e PVP-K30;
3. O TDF e os excipientes estearato de magnésio e lactose *spray dried*.

A lactose mostra indícios de incompatibilidade com os três fármacos, e, portanto, deve ser evitada na formulação final. Uma alternativa para seu uso é a utilização de outros excipientes utilizados como diluentes nas formulações, como o amido de milho e a celulose microcristalina.

A parceria com a Fundação Ezequiel Dias (Funed) mostrou-se extremamente positiva. Os resultados obtidos foram discutidos com representantes da indústria ao longo de todo o período de realização do estudo, e, felizmente, o medicamento 3 em 1 contendo TDF (300 mg), EFZ (600 mg) e 3TC (300 mg) já

está sendo desenvolvido, em parceria com a Farmanguinhos e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). O medicamento foi primeiramente disponibilizado nos estados do Amazonas e do Rio Grande do Sul, devido ao maior número de casos nessas regiões, e existe a previsão de que em pouco tempo será distribuído para todo o país. A produção deste medicamento representa um avanço prático muito importante para o tratamento da Aids. O maior ganho obtido com o novo antirretroviral estará na redução do número de pacientes que deixam de dar continuidade ao tratamento. Antes, os pacientes portadores do vírus HIV necessitavam ingerir quatro comprimidos de uma só vez (um de EFZ, um de TDF e dois de 3TC) diariamente. Agora, com o medicamento 3 em 1, é possível a ingestão de apenas um comprimido, o que aumenta a adesão dos pacientes ao tratamento. Outro ponto positivo é a otimização da distribuição dos medicamentos nos postos de saúde, uma vez que é muito mais fácil e rápido entregar um medicamento do que três, além de reduzir o espaço necessário para o seu armazenamento. Além disso, a redução de gastos por parte do governo para a produção do medicamento permitirá que novos pacientes sejam tratados com o mesmo custo dos que eram atendidos antes pelo programa DST/ Aids do Ministério da Saúde, o que, aliado à maior adesão ao tratamento por parte dos pacientes, reflete em uma possibilidade menor de transmissão da doença.

REFERÊNCIAS

APPERLEY, D. C.; MARKWELL, A. F.; HARRIS, R. K.; HODGKINSON, P. NMR characterisation of structure in solvates and polymorphs of formoterol fumarato. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 680–690, 2012.

BIELECKI, A.; BURUM, D. P. Temperature Dependence of ^{207}Pb MAS Spectra of Solid Lead Nitrate. An Accurate, Sensitive Thermometer for Variable-Temperature MAS. *Journal of Magnetic Resonance Series A*, v. 116, n. 2, p. 215-220, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008, 7ª Ed.; Brasília, 2008a.

BRASIL. Portaria nº 978, de 16 de maio de 2008 - Dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde, com a finalidade de colaborar com o desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde. Diário Oficial da União, 28 de maio de 2008b. Seção 1, p.46.

BRASIL. Portaria nº 1.284, de 26 de maio de 2010 - Altera o anexo da portaria nº 978, de 16 de maio de 2008. Diário Oficial da União, 27 de maio de 2010a. Seção 1, p.36.

BRASIL. Portaria N° 1.044, de 05 de maio de 2010 – Aprova 7ª edição da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Diário Oficial da União, 06 de maio de 2010b. Seção 1, p.58.

CARIGNANI, E.; BORSACCHI, S.; BRADLEY, J. P.; BROWN, S. P.; GEPPI, M. Strong Intermolecular Ring Current Influence on ^1H Chemical Shifts in Two Crystalline Forms of Naproxen: a Combined Solid-State NMR and DFT Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 117, n. 34, p. 17731-17740, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Divisions of HIV/Aids Prevention. <http://www.cdc.gov/hiv/resources/qa/definitions.htm>. Acesso em 30/06/2015.

CENTER FOR VETERINARY MEDICINE: Guidance for Industry Specifications: Test Procedures And Acceptance Criteria For New Veterinary Drug Substances And New Medicinal Products: Chemical Substances - DRAFT GUIDANCE. FDA, Department of Health and Human Services, May, 2005.

CHADHA, R.; ARORA, P.; BHANDARI, S. Polymorphic Forms of Lamivudine: Characterization, Estimation of Transition Temperature, and Stability Studies by Thermodynamic and Spectroscopic Studies. *ISRN Thermodynamics*, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2008.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, n. 4, p. 618-644, 2011.

CRUZ-CABEZA, A. J.; BERNSTEIN, J. Conformational Polymorphism. *Chemical Reviews*, v. 114, n. 4, p. 2170-2191, 2014.

FELIX, F. S.; SILVA, L. C. C.; ANGNES, L.; MATOS, J. R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 95, n. 3, p. 877-880, 2009.

FUNG, B. M.; KHITRIN, A. K.; ERMOLAEV, K. An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 142, n. 1, p. 97-101, 2000.

GALLO, R. C.; SARIN, P. S.; GELMANN, E. P.; ROBERT-GUROFF, M.; RICHARDSON, E.; KALYANARAMAMV, S.; MAN, D.; SIDHU, G. D.; STAHLR, E.; ZOLLA-PAZZNE, S.; LEIBOWITCH, J.; POPOVIC, M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 865-867, 1983.

GARRO LINCK, Y.; CHATTAH, A. K.; GRAF, R.; ROMAÑUK, C. B.; OLIVERA, M. E.; MANZO, R. H.; MONTI, G. A.; SPIESS, H. W. Multinuclear solid state NMR investigation of two polymorphic forms of Ciprofloxacin-saccharinate. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13, n. 14, p. 6590-6596, 2011.

GEPPI, M.; MOLLICA, G.; BORSACCHI, S.; VERACINI, C. A. Solid state NMR studies of pharmaceutical systems. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, n. 3, p. 202-302, 2008.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 68, n. 2, p. 335-357, 2002.

GUIDANCE FOR INDUSTRY. "Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, FDA, Department of Health and Human Services, 2000.

ITO, A.; WATANABE, T.; YADA, S.; HAMAURA, T.; NAKAGAMI, H.; HIGASHI, K.; MORIBE, K.; YAMAMOTO, K. Prediction of recrystallization behavior of troglitazone/polyvinylpyrrolidone solid dispersion by solid-state NMR. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 383, n. 1-2, p. 18-23, 2010.

LEE, E. H.; SMITH, D. T.; FANWICK, P. E.; BYRN, S. R. Characterization and Anisotropic Lattice Expansion/Contraction of Polymorphs of Tenofovir Disoproxil Fumarate. *Crystal Growth & Design*, v. 10, n. 5, p. 2314-2322, 2010.

LESAGE, A.; SAKELLARIOU, D.; STEUERNAGEL, S.; EMSLEY, L. Carbon-Proton Chemical Shift Correlation in Solid-State NMR by Through-Bond Multiple-Quantum Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, n. 50, p. 13194-13201, 1998.

LI, Y.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Quantification of polymorphic impurity in an enantiotropic polymorph system using differential scanning calorimetry, X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 415, n. 1-2, p. 110-118, 2011.

MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. Thermal characterization of lapachol by means of TG and DSC coupled to a photovisual system. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 64, n. 2, p. 751-756, 2001.

MAGÓN, A.; PYDA, M. Melting, glass transition, and apparent heat capacity of α -D-glucose by thermal analysis. *Carbohydrate Research*, v. 346, n. 16, p. 2558-2566, 2011.

MEDINA, D. A. V.; FERREIRA, A. P. G.; CAVALHEIRO, E. T. G. Thermal investigation on polymorphism in sodium saccharine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 117, n. 1, p. 361-367, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. www.aids.gov.br. Acesso em 30/06/2015.

MONAJJEMZADEH, F.; HASSANZADEH, D.; VALIZADEH, H.; SIAHI-SHADBAD, M. R.; MOJARRAD, J. S.; ROBERTSON, T. A.; ROBERTS, M. S. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 73, n. 3, p. 404-413, 2009.

MURA, P.; FAUCCI, M. T.; MANDERIOLI, A.; BRAMANTI, G.; CECCARELLI, L. Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, n. 1-2, p. 151-163, 1998.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Formulações Farmacêuticas na Indústria Farmacêutica. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; VIANNA-SOARES, C. D.; CUNHA, A. F.; PIANETTI, G. A. Análise Térmica Aplicada à Caracterização da Sinvastatina em Formulações Farmacêuticas. *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1653-1657, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; Caracterização de Fármacos e Formulações Farmacêuticas de Antihipertensivos e Antilipêmicos por Análise Térmica. 2010. 125 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

PINES, A.; GIBBY, M. G.; WAUGH, J. S. Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids. *Journal of Chemical Physics*, v. 59, n. 2, p. 569-590, 1973.

PORFÍRIO, L. O.; COSTA, A. A.; CONCEIÇÃO, R. R.; MATOS, T. O.; ALMEIDA, E. D. P.; SARMENTO, V. H. V.; ARAÚJO, A. A. S.; NUNES, R. S.; LIRA, A. A. M. Compatibility study of hydroxypropylmethylcellulose films containing zidovudine and lamivudine using thermal analysis and infrared spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 120, n. 1, p. 817-828, 2015.

REZENDE, R. L. O.; SANTORO, M. I. R. M.; MATOS, J. R. Stability and compatibility study on enalapril maleate using thermoanalytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 93, n. 3, p. 881-886, 2008.

SEPKOWITZ, K. A. AIDS — THE FIRST 20 YEARS. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 23, p. 1764-1772, 2001.

SHARIF, S.; SCHAGEN, D.; TONEY, M. D.; LIMBACH, H. H. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 14, p. 4440-4455, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5^a ed.; John Wiley: New York, 1991.

TAMBOLI, M. I.; KRISHNASWAMY, S.; GONNADE, R. G.; SHASHIDHAR, M. S. Crystal-to-Crystal Thermal Phase Transformation of Polymorphs of Isomeric 2,3-Naphthalene Diol Ditoluates: Mechanism and Implications for Molecular Crystal Formation and Melting. *Crystal Growth & Design*, v. 14, n. 10, p. 4985-4996, 2014.

VIANA, O. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SIMÕES, R. A.; SOARES, J. L.; MATOS, C. R. S.; GRANGEIRO-JÚNIOR, S.; LIMA, C. M.; ROLIM-NETO, P. J. Kinetic Analysis of the Thermal Decomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 27, n. 2, p. 211-216, 2008.

VIRTANEN, T.; MAUNU, S. L. Quantitation of a polymorphic mixture of an active pharmaceutical ingredient with solid state ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 394, n. 1, p. 18-25, 2010.

WANG, W. D.; GAO, X.; STROHMEIER, M.; WANG, W.; BAI, S.; DYBOWSKI, C. Solid-State NMR Studies of Form I of Atorvastatin Calcium. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 116, n. 11, p. 3641-3649, 2012.

YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; VIANNA-SOARES, C. D.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M. A. Thermal Analysis Applied to Verapamil Hydrochloride Characterization in Pharmaceutical Formulations. *Molecules*, v. 15, n. 4, p. 2439-2452, 2010.

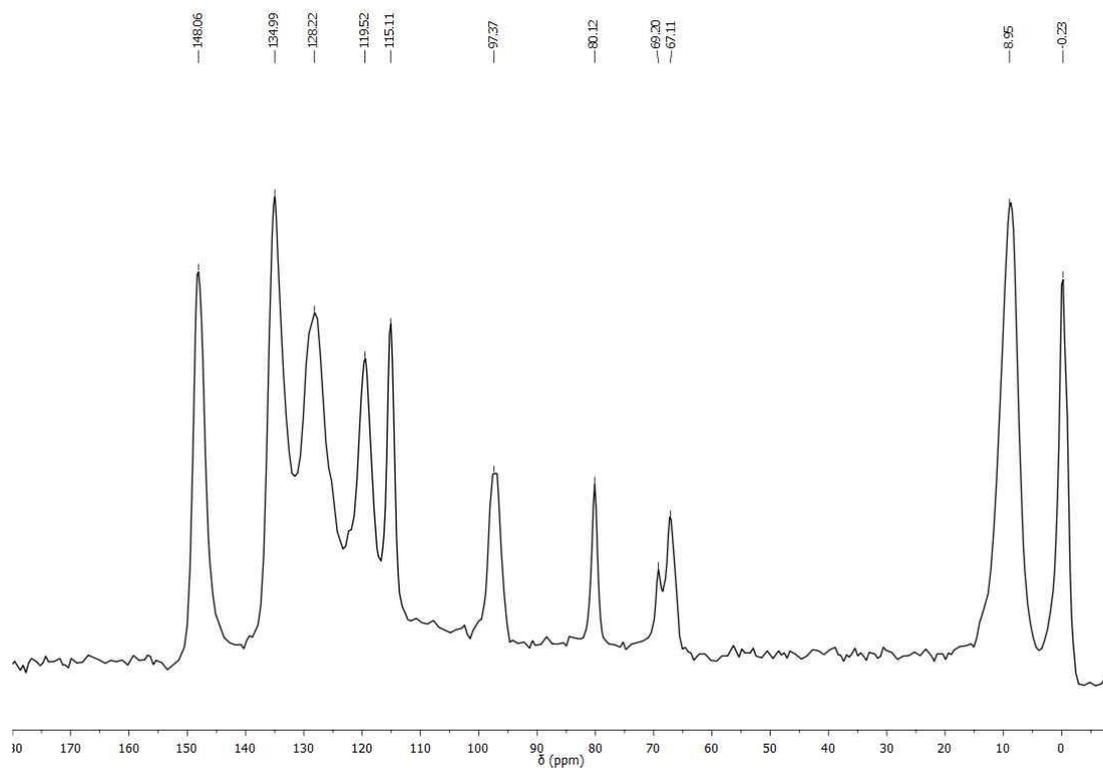
YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; VIANNA-SOARES, C. D.; OLIVEIRA, M. A. Thermal Behavior Study and Decomposition Kinetics of Amiodarone Hydrochloride Under Isothermal Conditions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 37, n. 6, p. 638-647, 2011.

ANEXOS

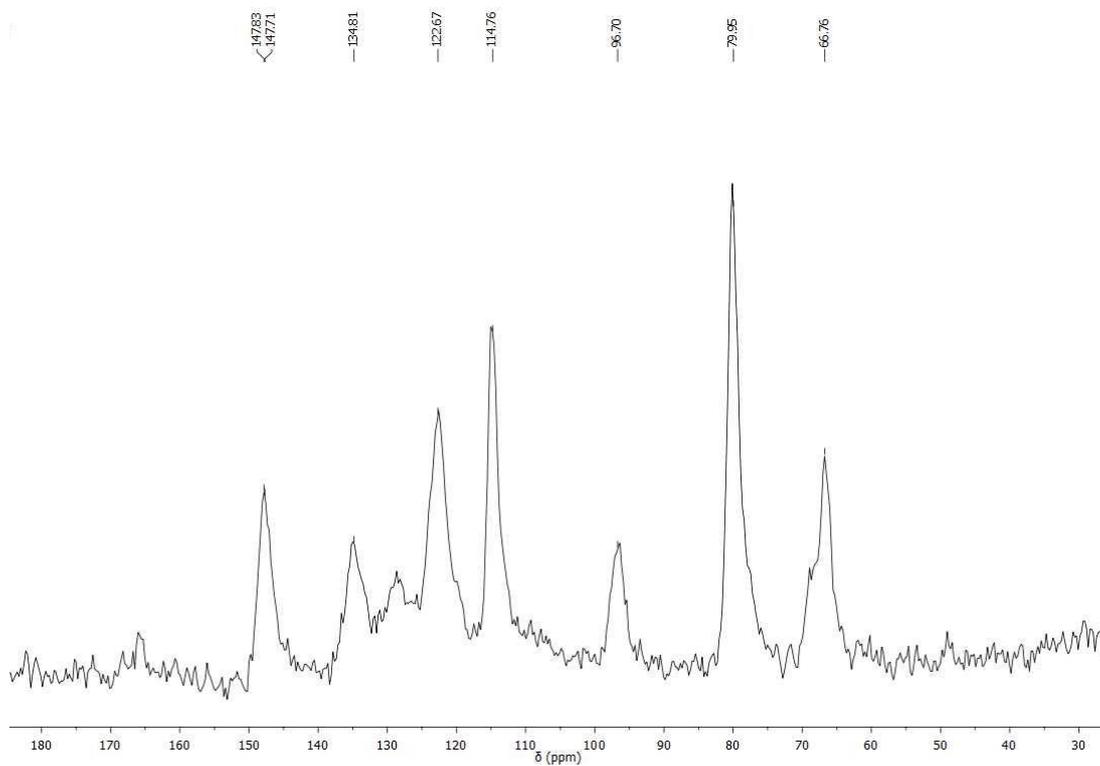
Anexo I – Espectros NQS e ^{19}F MAS do efavirenz.

Anexo II – Espectros 2D ^1H - ^{13}C MAS-*J*-HMQC e NQS do fumarato de tenofovir desoproxila.

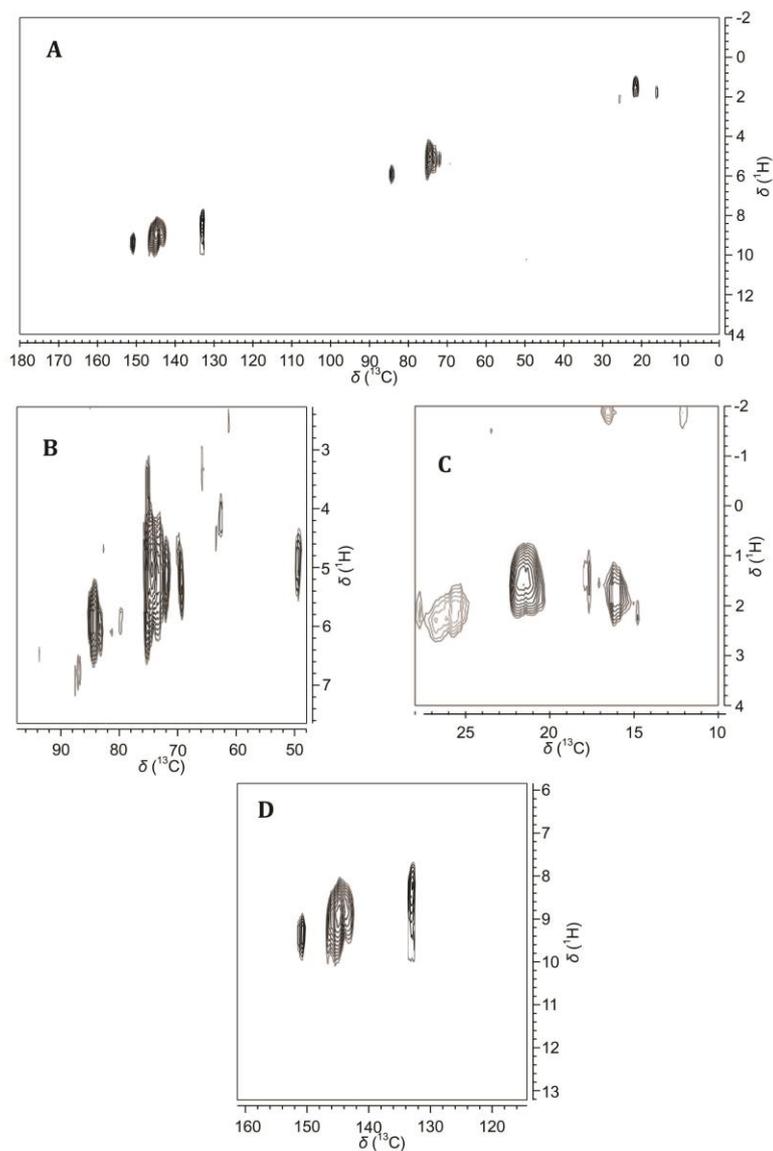
Anexo III – Imagens TOA do fumarato de tenofovir desoproxila, obtidas a $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, com e sem luz polarizada.



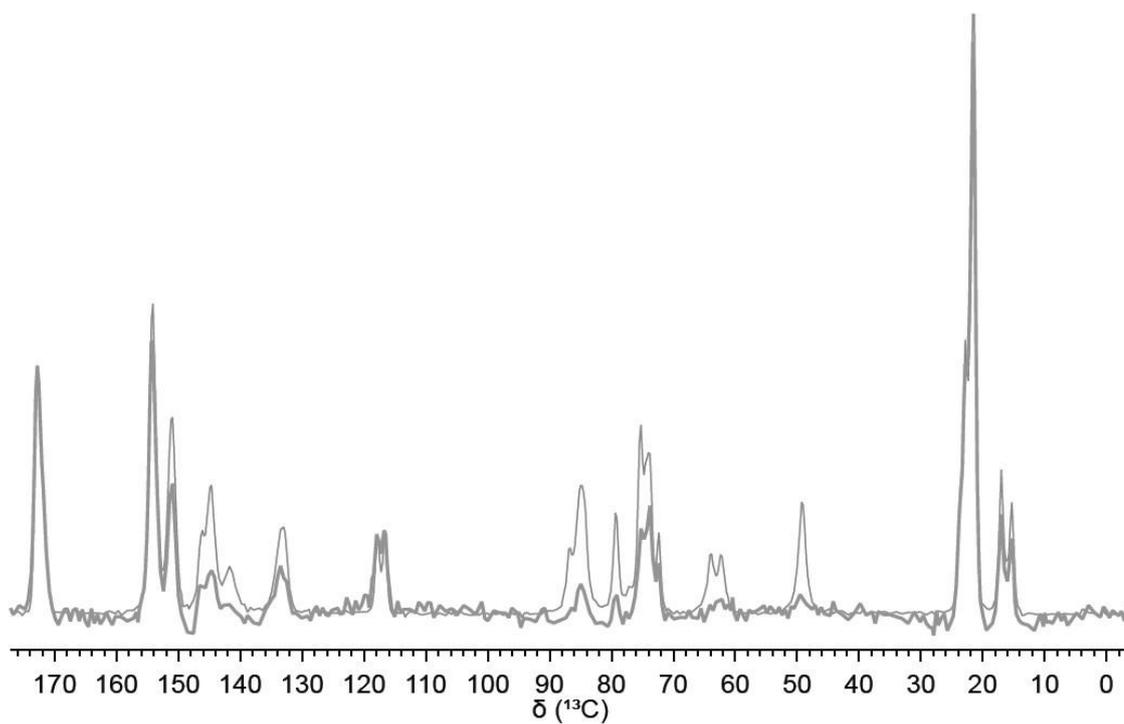
Espectro NQS do efavirenz.



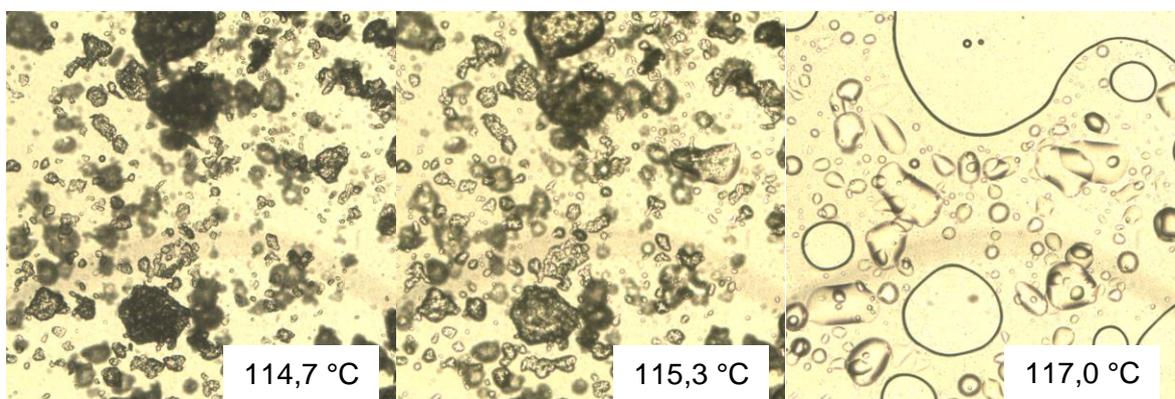
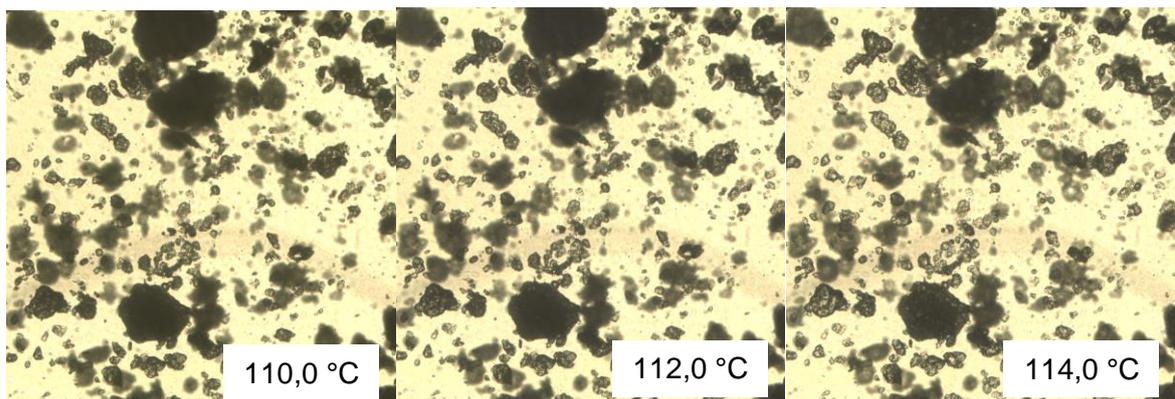
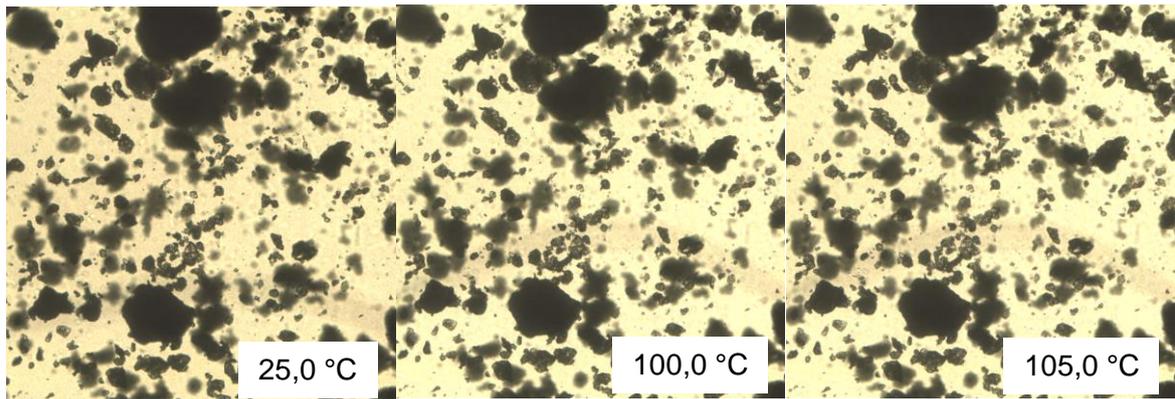
Espectro ^{19}F MAS do efavirenz.



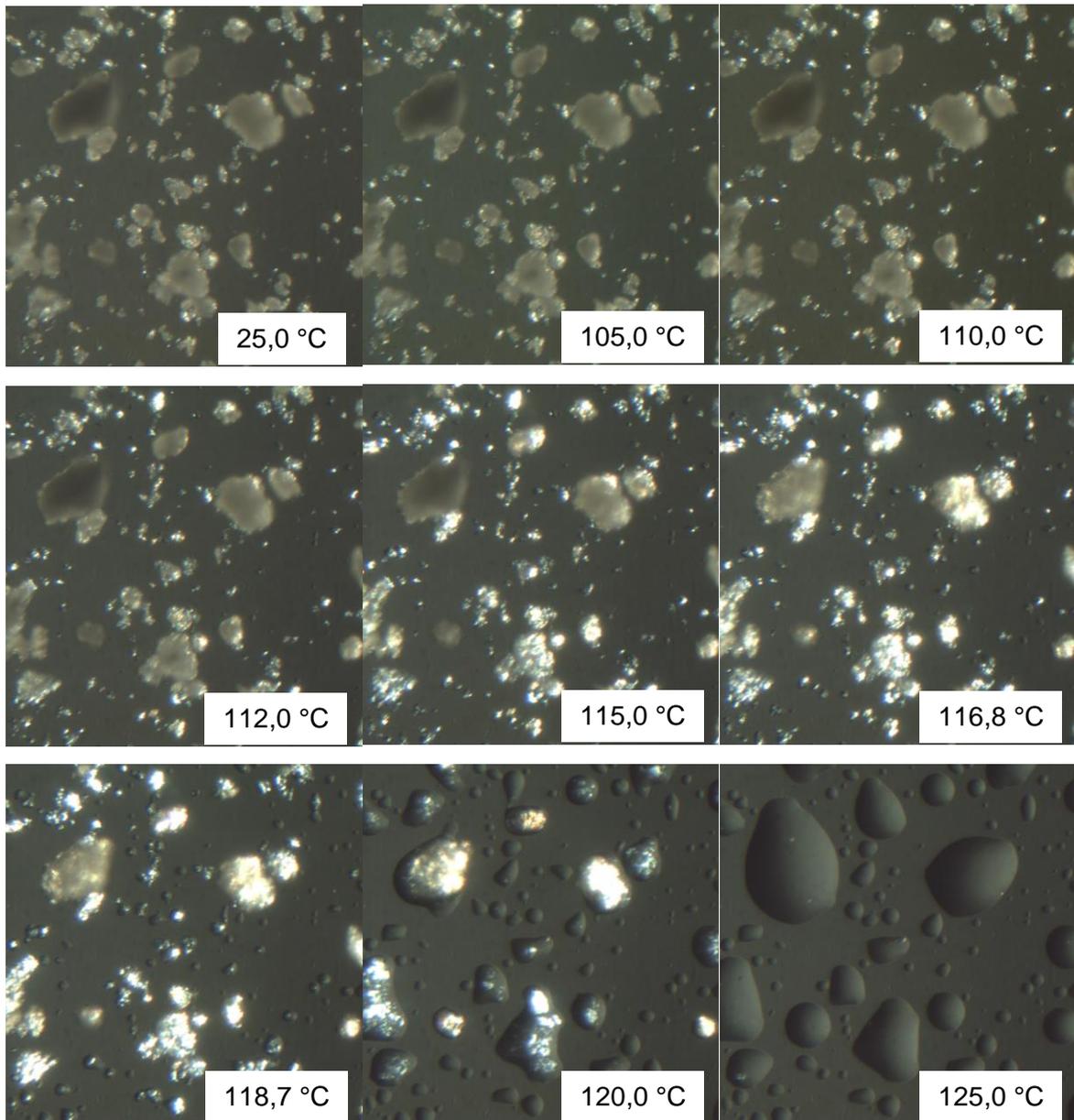
Espectro ^1H - ^{13}C MAS-J-HMQC 2D do fumarato de tenofovir desopoxila (A) obtido em uma frequência de rotação de 17,85 kHz. O período de evolução spin-echo foi de 1,49 ms a fim de selecionar correlações devido a acoplamentos J de curta distância (uma ligação). São mostradas também expansões do espectro de ^{13}C em (A) nos intervalos de (B) 48-98 ppm, (C) 10-30 ppm e (D) 114-162 ppm.



Espectro ^{13}C NQS do fumarato de tenofovir desoproxila (linha mais grossa). O espectro está sobreposto ao espectro ^{13}C CP-MAS (linha mais fina) para comparação.



Imagens TOA do fumarato de tenofovir desoproxila obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sem luz polarizada. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100 vezes.



Imagens TOA do fumarato de tenofovir desoproxila obtidas a 10 °C min^{-1} com luz polarizada. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100 vezes.