

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE PARA
NEVIRAPINA INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E COMPRIMIDOS. PROPOSTAS
DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DE CITOTOXICIDADE PARA
OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Belo Horizonte - MG
2015

NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE PARA
NEVIRAPINA INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E COMPRIMIDOS. PROPOSTAS
DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DE CITOTOXICIDADE PARA
OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti – UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes – UFMG

Belo Horizonte

2015

R375d Reis, Naialy Fernandes Araújo
Desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade para nevirapina insumo farmacêutico ativo e comprimidos. Propostas de caracterização estrutural e estudo de citotoxicidade para os produtos de degradação / Naialy Fernandes Araújo Reis – 2015.
180 f.: il.

Orientador: Gerson Antônio Pianetti.
Coorientador: Christian Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nevirapina – Teses. 2. Medicamentos – Análise – Teses. 3. Medicamentos – Degradação – Teses. 4. Medicamentos – Estabilidade – Teses. 5. Cromatografia a líquido de ultra eficiência – Teses. 6. Coluna de núcleo fundido – Teses. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. Fenandes, Christian. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

“Desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade para nevirapina insumo farmacêutico ativo e comprimidos. Propostas de caracterização estrutural e estudo de citotoxicidade para os produtos de degradação.”

NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS

DISSERTAÇÃO submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de MESTRA em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

DISSERTAÇÃO apresentada em sessão pública e aprovada em 24 de abril de 2015, pela comissão constituída pelos seguintes membros:

GERSON ANTÔNIO PIANETTI (Orientador)
Professor Doutor - UFMG

CHRISTIAN FERNANDES (Coorientador)
Professor Doutor - UFMG

ANA GABRIELA REIS SOLANO
Professora Doutora - UFIS

MARTA MARQUES GONTIJO DE AGUIAR
Professora Doutora - UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais Marcelo e Ronise,
pelo amor incondicional, por serem a minha inspiração de
determinação, por não medirem esforços para a realização
dos meus sonhos.

Ao meu grande amor Pedro,
pela paciência, pelos conselhos,
pelo companheirismo e cumplicidade em todos os momentos,
sempre dividindo comigo os sonhos, as conquistas e dificuldades.

Aos meus irmãos
pelas brincadeiras, pelas caronas e pelo apoio.

Aos meus avós
pelo incentivo de sempre,
por serem exemplos de sabedoria e superação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e proteção, por me amparar nos momentos difíceis e me dar força, coragem e sabedoria para superar os desafios.

Desde o começo dessa caminhada, encontrei muitas pessoas especiais com as quais aprendi muito, que compartilharam comigo seus conhecimentos, que me apoiaram, sempre muito prestativas e que foram essenciais na concretização desse trabalho. Sou muito grata a todos vocês!

Ao Professor Gerson Antônio Pianetti, querido orientador, por ser, além de um grande exemplo de profissional farmacêutico, um exemplo de ser humano a ser seguido por todos nós. Pela confiança e valorização dos seus alunos, pela grande amizade e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Professor Christian Fernandes, meu coorientador, pelos ensinamentos, pelos valiosos conselhos que enriqueceram esse trabalho e contribuíram para a minha formação profissional, pela amizade e confiança.

Ao Professor Antônio Basílio Pereira pelas experiências de vida compartilhadas. À Professora Cristina Duarte Vianna Soares pela disponibilidade e ensinamentos. À Professora Isabela da Costa César, pela contribuição e auxílio nesse projeto. Ao professor Ricardo José Alves pelos conselhos, auxílios e por compartilhar seus conhecimentos químico-farmacêuticos.

Aos grandes amigos do LCQ-FAFAR Ana Carolina, Ana Silva, Carlos, Danielle, Écio Giovane, Fernanda, Fernando, Graziela, Juliana Brêtas, Juliana Veloso, Mateus, Paula Chellini, Paula Enéas, Pedro Reis, Rachel, Taízia e Tiago eu agradeço pela união, prestatividade, pelo aprendizado que compartilhamos e pela grande amizade que construímos! Contem sempre comigo, assim como contei sempre com vocês!

Agradeço especialmente à Fernanda Gontijo e à Juliana Brêtas pela prestatividade e pelo grande auxílio na realização dos testes de citotoxicidade. Ao Mateus pelos auxílios analíticos e estatísticos e por cobrir a minha ausência no CEDAFAR sempre

que necessário. À Paula Chellini pelos conselhos e por compartilhar suas experiências práticas e profissionais.

Aos queridos amigos e estagiários Jéssica, Diego e Pedro Franco, que demonstraram sempre pró-atividade e prestatividade em ajudar no que fosse preciso. À Jéssica eu agradeço por ser minha companheira de análises, pela confiança, por dividir comigo as angústias e preocupações e também os momentos de felicidades e descobertas durante esse projeto. Ao Diego agradeço toda colaboração, boa vontade e eficiência em realizar as minhas solicitações. Ao Pedro Franco agradeço a agilidade, a prestatividade e as ótimas ideias.

Aos companheiros do CEDAFAR, Leonardo, Luciano, Lúcia, Míriam e Tânia pela prestatividade, pelos ensinamentos e pelo ótimo convívio cotidiano. Às minhas grandes amigas da graduação Luiza e Tatiane pela amizade, apoio e por todo auxílio científico neste projeto. À toda Faculdade de Farmácia da UFMG, seus professores e funcionários, pela recepção sempre calorosa, pelo conhecimento compartilhado, por sempre me tratarem com educação e permitirem assim, um ambiente de convívio muito agradável.

À Sílvia Ligório Fialho e toda a equipe da FUNED, principalmente a Carolina Guerra, Wagner Marotta e Aline Martins pela parceria, por dividirem os conhecimentos e pela gentil doação dos materiais necessários à realização desse projeto.

À CAPES pelo auxílio financeiro e à Farmacopeia Brasileira pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos nos estudos de controle de qualidade e permitir que eu desenvolvesse atividades profissionais durante a realização do mestrado.

À minha família, pelo amor, pelas alegrias e por sempre acreditarem em mim. Aos meus pais pelo incentivo e apoio na minha qualificação, pelo exemplo a ser seguido de seres humanos, por abrirem mão dos seus sonhos para que eu realizasse os meus. Ao Pedro pela compreensão, pelo incentivo, por compartilhar comigo todos os bons e nem tão bons momentos, por me apoiar e me transmitir segurança sempre. Aos meus irmãos Guilherme e Augusto pela paciência, pelas incontáveis caronas e pelo apoio de sempre.

“Se nada mudar, invente... E quando mudar, entenda!
Se ficar difícil, enfrente... E quando ficar fácil, agradeça!
Se a tristeza rondar, alegre-se... E quando ficar alegre, contagie!
Se o caminho for longo, persista... E quando chegar, comemore!
Se achar que acabou, recomece... E quando recomeçar, acredite!
Se você acreditar, você tudo pode!”

Nicholas Montessori

“Acredite e aja como se fosse impossível fracassar.”

Charles Franklin Kettering

RESUMO

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de medicamentos. A ausência de estabilidade pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do paciente a possíveis efeitos tóxicos dos produtos de degradação. A nevirapina, fármaco pertencente à classe dos inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa, é um importante componente da farmacoterapia aplicada ao tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Trata-se de um medicamento constituinte do programa de tratamento da AIDS do Ministério da Saúde do Brasil, sendo este programa reconhecido mundialmente. Assim, justifica-se a importância de avaliar sua estabilidade por meio da realização de estudos de degradação forçada, do desenvolvimento de métodos para análise do insumo farmacêutico ativo (IFA) na presença de produtos de degradação e da determinação do perfil de degradação deste fármaco. Nesse sentido, o IFA, os comprimidos de nevirapina e o placebo foram submetidos a estudo detalhado de degradação forçada, empregando diversos agentes degradantes, o qual foi utilizado para o desenvolvimento de dois métodos indicativos de estabilidade seletivos, rápidos, eficazes e com reduzido gasto de solventes empregando cromatografia a líquido de ultra eficiência com colunas de partículas sub 2 µm e de núcleo fundido. O método indicativo de estabilidade utilizando coluna com partículas de núcleo fundido foi validado e mostrou-se seletivo para a nevirapina e seus produtos de degradação, apresentando resolução superior a 2,0 entre os picos e pureza de pico adequada para a nevirapina em todas as condições de estresse testadas. Apresentou-se linear na faixa de 8 a 48 µg/mL, preciso, exato e robusto tanto para a nevirapina presente no IFA quanto nos comprimidos, com limite de detecção inferior a 0,092 µg/mL e limite de quantificação inferior a 0,174 µg/mL. A nevirapina mostrou-se susceptível à degradação em meio ácido e oxidativo e o perfil de degradação para o IFA e comprimidos foi semelhante. Estruturas e mecanismos químicos para formação de três produtos de degradação foram propostas utilizando os resultados obtidos com CLAE/EM-EM. As amostras submetidas à degradação forçada em meio ácido e oxidativo apresentaram ausência de citotoxicidade *in vitro* frente a células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis.

Palavras-chave – Nevirapina. Degradação forçada. Métodos indicativos de estabilidade. Cromatografia a líquido de ultra eficiência. Coluna de núcleo fundido.

ABSTRACT

Stability is an important parameter for assessing the quality, safety and efficacy of active pharmaceutical ingredients (API) and drug products. The lack of stability can be related to loss of therapeutical effect and patient exposure to potential toxic effects from the degradation products. Nevirapine, which belongs to the class of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, is an important component applied to Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) treatment. It is part of a worldwide recognized program of the Brazilian Ministry of Health, which justifies the importance of studying its stability by means of the forced degradation studies, the development of methods to evaluate the presence of degradation products in the API and the determination of the degradation profile of the drug. The API and nevirapine tablets were subjected to a detailed study of forced degradation, employing several degrading agents, which were used for the development of two selective stability-indicating assay method by using ultra-high performance liquid chromatography with sub-2 μm and fused core columns , resulting in fast, efficient and with less expense of solvents methods. The stability-indicating assay method using fused core column was validated and proved to be selective for nevirapine and its degradation products, with resolution higher than 2.0 between the peaks and suitable peak purity for nevirapine. Calibration curves were linear in the range 8 to 48 $\mu\text{g/mL}$, precise, accurate and robust for both nevirapine API as well as for the tablets, with a detection limit of less than 0.092 $\mu\text{g/mL}$ and a limit of quantification of less than 0.174 $\mu\text{g/mL}$. Nevirapine was degraded in acidic and oxidative conditions and the degradation profile for tablets and API were similar. Chemical structures and mechanisms for the formation of three degradation products were proposed using the results obtained on a HPLC/MS-MS. The samples subjected to forced degradation in acidic and oxidative conditions presented no in vitro cytotoxicity against mononuclear cells from human peripheral blood of healthy individuals.

Key words – Nevirapine. Forced degradation. Stability-indicating assay methods. Ultra-high performance liquid chromatography. Fused core column.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma proposto para realização da hidrólise ácida e alcalina em estudos de degradação forçada.....	36
Figura 2 – Fluxograma proposto para realização de hidrólise neutra em estudos de degradação forçada.....	37
Figura 3 – Mecanismo envolvido nas três fases da auto-oxidação: iniciação, propagação e terminação.....	38
Figura 4 – Mecanismo envolvido na formação do radical a partir do AIBN (azobisisobutironitrila).....	39
Figura 5 – Fluxograma proposto para realização de estudos de degradação oxidativa.....	40
Figura 6 – Representação esquemática de uma partícula de sílica superficialmente porosa.....	47
Figura 7 – Ciclo de vida do vírus HIV.....	49
Figura 8 – Estrutura química do IFA nevirapina.....	54
Figura 9 – Cromatogramas obtidos com as amostras submetidas à degradação forçada no estudo de Navaneethan e colaboradores (2012).....	61
Figura 10 – Sistema de refluxo com condensador de bolas utilizado para os testes preliminares de degradação forçada da nevirapina IFA, comprimidos e placebo.....	69
Figura 11 – Espectros de absorção na região do infravermelho da nevirapina SQR (em preto) e nevirapina IFA (em vermelho) a 20 µg/mL.....	76
Figura 12 – Espectros de absorção na região do ultravioleta da nevirapina SQR (em preto) e nevirapina IFA (em vermelho).....	77
Figura 13 – Reação entre acetonitrila e peróxido de hidrogênio em elevados valores de pH, formando o ácido peroxicarboximídico.....	79
Figura 14 – Cromatogramas do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 8, página 73) obtido na degradação forçada da nevirapina IFA a 1000 µg/mL em meio ácido (HCl 1 M), durante 24 horas sob refluxo a 80 °C (254 nm). Cromatograma da corrida exploratória completa (A) e cromatograma referente aos primeiros 20 minutos da corrida exploratória (B).....	81
Figura 15 – Cromatograma referente aos 20 primeiros minutos do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 8, página 73) obtido na degradação forçada da nevirapina IFA a 40 µg/mL em meio ácido (HCl 1 M), durante 24 horas sob refluxo a 80 °C (254 nm).....	81
Figura 16 – Cromatogramas do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 8, página 73) obtido na degradação forçada da nevirapina comprimidos a 40 µg/mL em meio oxidativo (H ₂ O ₂ 3% v/v), durante 24 horas a 50 °C (254 nm). Cromatograma da corrida exploratória completa (A) e cromatograma referente aos primeiros 20 minutos da corrida exploratória (B).....	84
Figura 17 – Cromatogramas obtidos a partir do gradiente T5 (Tabela 13), utilizando-se amostras de IFA a 1000 µg/mL provenientes da degradação em meio ácido (HCl 1 M, durante 48 horas a 50°C – em azul) e em peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante 48 horas a 50 °C (em vermelho), em 254 nm.....	88
Figura 18 – Cromatogramas obtidos pela degradação da nevirapina IFA a 1000 µg/mL (A) e a 40 µg/mL (B) submetida a peróxido de hidrogênio 30% (v/v) durante 24 horas a 50 °C, utilizando-se metanol (em azul) e acetonitrila (em vermelho) como cossolventes e gradiente T5 (254 nm).....	89
Figura 19 – Amostras provenientes da degradação oxidativa da nevirapina IFA a 1000 µg/mL submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em vermelho e a 30% (v/v) em verde, durante 24 horas a 50 °C e gradiente T5 (254 nm).....	90
Figura 20 – Cromatogramas provenientes da degradação da nevirapina IFA (A) e comprimidos (B) a 1000 µg/mL e placebo (C) submetidos a ácido clorídrico 1 M, durante 24 h a 50 °C e agente degradante HCl 1 M (D) em 254 nm, utilizando gradiente T20.....	91

/continua

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 21 – Cromatogramas provenientes da degradação da nevirapina IFA (A) e comprimidos (B) a 40 µg/mL e placebo (C) submetidos a peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante 24 h a 50 °C e agente degradante H ₂ O ₂ (D) em 254 nm, utilizando gradiente T20.....	92
Figura 22 – Cromatograma obtido com o gradiente T20, em comprimento de onda de 254 nm, por meio da mistura de amostras de nevirapina IFA a 40 µg/mL submetidas a hidrólise ácida (HCl 1 M) e oxidação por peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante sete dias a 50 °C.....	93
Figura 23 – Cromatogramas do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 19, página 97) obtidos para amostras de nevirapina IFA controle (em preto), exposta à degradação ácida, durante três dias a 50 °C (em azul) e à degradação oxidativa, durante três dias a 50 °C (vermelho) a 1000 µg/mL. Cromatograma da corrida exploratória completa (A) e cromatograma referente aos primeiros 20 minutos da corrida exploratória (B).....	109
Figura 24 – Cromatogramas obtidos com eluição isocrática utilizando-se 16% (v/v) de acetonitrila e 84% (v/v) de água e demais condições descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação oxidativa (A) e ácida (B) a 1000 µg/mL.....	110
Figura 25 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 1 descrito na Tabela 25 e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação em meio ácido (A) e oxidativo (B) a 1000 µg/mL.....	111
Figura 26 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 14, descrito na Tabela 26 (página 113) e demais condições descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação ácida (A) e oxidativa (B) a 1000 µg/mL.....	112
Figura 27 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 1 descrito na Tabela 25 (página 111), porém, utilizando metanol como modificador orgânico e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação ácida (A) e oxidativa (B) a 1000 µg/mL.....	113
Figura 28 – Cromatograma obtido com o gradiente 17 (Tabela 27) utilizando-se metanol como modificador orgânico, para amostras de IFA provenientes da degradação ácida a 1000 µg/mL.....	114
Figura 29 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 23 descrito na Tabela 28, para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida (A) e oxidativa (B) a 1000 µg/mL.....	115
Figura 30 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 34a descrito na Tabela 29 e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida (em azul) e oxidativa (em vermelho) a 1000 µg/mL.....	116
Figura 31 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 34b descrito na Tabela 21 e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 20 (página 99), para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida (HCl 1 M, 10 dias a 50°C) (A) e oxidativa (H ₂ O ₂ 3% v/v, 10 dias a 50°C) (B) a 40 µg/mL.....	117
Figura 32 – Cromatograma obtido com o método definitivo indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido (gradiente 34b), em comprimento de onda de 254 nm, obtido para a mistura de amostras de nevirapina IFA a 40 µg/mL submetidas a hidrólise ácida (HCl 1 M) e oxidação por peróxido de hidrogênio 3% v/v, durante sete dias a 50 °C.....	119
Figura 33 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos, com o gradiente 34b, em comprimento de onda de 254 nm, dos agentes estressantes H ₂ O ₂ 3%v/v (vermelho), AIBN (verde); HCl 1 M (azul); NaOH 1 M (rosa); CuSO ₄ 0,05 M (roxo) e H ₂ O (cinza).....	121
Figura 34 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos, com o gradiente 34b (254 nm), com a preparação contendo os excipientes do comprimido Nevirax [®] (roxo), o diluente das amostras (acetonitrila e água, em verde), amostras de comprimidos de nevirapina (azul) e nevirapina IFA (laranja).....	121

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 35 – Curva analítica para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade para a nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido na faixa de 8 a 48 µg/mL.....	123
Figura 36 – Gráfico de distribuição de resíduos.....	124
Figura 37 – Cromatograma para solução de nevirapina IFA a 0,092 µg/mL obtido para a confirmação do limite de detecção do método indicativo de estabilidade para a nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido.....	128
Figura 38 – Cromatograma para solução de nevirapina IFA a 0,174 µg/mL obtido para a confirmação do limite de quantificação do método indicativo de estabilidade para a nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido.....	128
Figura 39 – Teor de nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de nevirapina IFA submetidas a H ₂ O ₂ 3% (v/v) à temperatura ambiente, durante 14 dias.....	138
Figura 40 – Teor de nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de comprimidos de nevirapina submetidas a H ₂ O ₂ 3% (v/v) à temperatura ambiente, durante 14 dias.....	138
Figura 41 – Cromatograma obtido na 7 ^a coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de nevirapina IFA a 40 µg/mL, submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) a 50 °C (A) e teor da nevirapina e dos produtos de degradação oxidativos formados (B).....	139
Figura 42 – Cromatograma obtido na 7 ^a coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de comprimidos de nevirapina a 40 µg/mL, submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) a 50 °C (A) e teor da nevirapina e dos produtos de degradação oxidativos formados (B).....	140
Figura 43 – Curvas de degradação obtidas quanto ao melhor ajuste à cinética de degradação em meio oxidativo. IFA a 50°C (A); comprimidos a 50°C (B).....	142
Figura 44 – Teor da nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de nevirapina IFA submetidas a HCl 1 M à temperatura ambiente, durante 14 dias.....	143
Figura 45 – Teor da nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de comprimidos de nevirapina submetidas a HCl 1 M à temperatura ambiente, durante 14 dias.....	143
Figura 46 – Cromatograma obtido na 7 ^a coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de nevirapina IFA a 40 µg/mL, submetida a ácido clorídrico 1 M a 50 °C (A) e teor da nevirapina e do produto de degradação formado (B).....	144
Figura 47 – Cromatograma obtido na 7 ^a coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de comprimidos de nevirapina a 40 µg/mL, submetida a ácido clorídrico 1 M a 50 °C (A) e teor da nevirapina e dos produtos de degradação formado (B).....	144
Figura 48 – Curvas de degradação obtidas quanto ao melhor ajuste à cinética de degradação hidrolítica em meio ácido. IFA a 50°C (A); comprimidos a 50°C (B).....	146
Figura 49 – Espectros IES(+) da nevirapina. Espectros de varredura com íon precursor <i>m/z</i> 267,25 (A) e espectro de varredura após fragmentação com íon filho <i>m/z</i> 226,29 (B).....	148
Figura 50 – Espectros obtidos no detector ultravioleta (A) e no detector de massas (B) para amostras provenientes da degradação em meio ácido com ácido clorídrico 1 M da nevirapina IFA a 1000 µg/mL.....	150
Figura 51 – Espectros obtidos no detector ultravioleta (A) e no detector de massas (B) para amostras provenientes da degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) da nevirapina IFA a 1000 µg/mL.....	150
Figura 52 – Propostas de estruturas químicas para os produtos de degradação PD ₄ e PD ₆ provenientes da oxidação da nevirapina, formados por mecanismo de hidroxilação de anel aromático. 2-hidroxicinevirapina (A); 8-hidroxicinevirapina (B).....	152
Figura 53 – Mecanismos propostos para a formação da 2-hidroxicinevirapina por meio de reação molecular.....	153

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

Figura 54 – Mecanismos propostos para a formação da 8-hidroxicinevirapina por meio de reação molecular.....	154
Figura 55 – Mecanismos radicalar propostos para a formação da 2-hidroxicinevirapina.....	155
Figura 56 – Mecanismos radicalar propostos para a formação da 8-hidroxicinevirapina.....	155
Figura 57 – Mecanismo de N-oxidação de anéis piridínicos.....	156
Figura 58 – Propostas de estruturas químicas para os produtos de degradação PD₄ (C) e PD₆ (D) provenientes da oxidação da nevirapina, formados por mecanismos de N-oxidação de anel piridínico.....	156
Figura 59 – Espectro de massas obtido a partir da fragmentação do íon precursor referente ao PD₄ e prováveis fragmentações das moléculas propostas para ser o PD₄ (A e C).....	157
Figura 60 – Espectro de massas obtido a partir da fragmentação do íon precursor referente ao PD₆ e prováveis fragmentações das moléculas propostas para ser o PD₆ (B e D).....	157
Figura 61 – Mecanismo químico proposto (hidrólise em meio ácido de amida) para formação de um produto de degradação proveniente do estudo de estresse em meio ácido.....	159
Figura 62 – Espectros de absorção na região do ultravioleta para os picos PD₁ (A) e PD₂ (B) provenientes da degradação da nevirapina em meio ácido.....	159
Figura 63 – Cromatogramas obtidos a partir da extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como agente extrator e DMSO para reconstituição das amostras de nevirapina IFA controle a 200 µg/mL (A), nevirapina IFA exposta a meio oxidativo a 200 µg/mL (B) e nevirapina IFA exposta a meio ácido a 1000 µg/mL (C).....	160
Figura 64 – Gráfico de viabilidade celular obtido no ensaio de citotoxicidade dos produtos de degradação forçada da nevirapina a 40 µg/mL.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de estresse às quais os IFAs e medicamentos devem ser expostos de acordo com o Informe Técnico nº 1/2008 (ANVISA).....	28
Tabela 2 – Limites para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação presentes em medicamentos de acordo com a RDC nº58/2013 (ANVISA).....	30
Tabela 3 – Classes e mecanismos de ação dos medicamentos antirretrovirais.....	51
Tabela 4 – Métodos farmacopeicos para determinação do teor de nevirapina em insumo farmacêutico ativo e produto acabado (comprimidos e suspensão oral).....	56
Tabela 5 – Substâncias relacionadas da nevirapina descritas nas farmacopeias internacionais.....	58
Tabela 6 – Resultado dos estudos de degradação forçada obtido por Sahoo e colaboradores (2013).....	62
Tabela 7 – Excipientes utilizados na fabricação do comprimido Nevirax®	63
Tabela 8 – Condições cromatográficas dos gradientes exploratórios para eluição da nevirapina e dos produtos de degradação formados.....	73
Tabela 9 – Termos descritivos de solubilidade e seus significados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).....	74
Tabela 10 – Volumes de cada solvente necessário para a solubilização de 10 mg da nevirapina e respectiva classificação da solubilidade.....	75
Tabela 11 – Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho da nevirapina IFA e SQR.....	76
Tabela 12 – Valores de pH encontrados nas soluções de nevirapina IFA a 1000 µg/mL submetidas aos testes de degradação forçada e das soluções diluídas a 40 µg/mL.....	80
Tabela 13 – Gradiente T5 proposto para a separação dos picos referentes à hidrólise em meio ácido e oxidação com peróxido de hidrogênio.....	88
Tabela 14 – Gradiente utilizado no método indicativo de estabilidade desenvolvido e otimizado para nevirapina utilizando CLUE (gradiente T20).....	90
Tabela 15 – Resumo das condições cromatográficas do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando CLUE.....	91
Tabela 16 – Parâmetros do sistema cromatográficos utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando CLUE.....	93
Tabela 17 – Resolução entre os picos nas amostras de nevirapina IFA e comprimidos de nevirapina contendo produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido e oxidação da nevirapina.....	94
Tabela 18 – Estimativa da porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) para corrida isocrática baseada no tempo de retenção do último pico do gradiente exploratório de acordo com Snyder e colaboradores (1997).....	97
Tabela 19– Condições cromatográficas para os gradientes exploratórios para eluição da nevirapina e seus produtos de degradação.....	97
Tabela 20 – Resumo das condições cromatográficas definitivas do método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.....	99
Tabela 21 – Gradiente 34b, utilizado no método definitivo indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.....	99
Tabela 22 – Preparo das soluções de nevirapina IFA padronizado para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.....	102
Tabela 23 – Preparo das amostras para avaliação da exatidão do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.....	104
Tabela 24 – Descrição das variáveis para avaliação da robustez do método indicativo de estabilidade para nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido.....	106
Tabela 25 – Gradiente 1 (gradiente inicial) utilizado no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.....	111

/continua

LISTA DE TABELAS (conclusão)

Tabela 26 – Gradiente 14 utilizado no desenvolvimento do indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.....	113
Tabela 27 – Gradiente 17, utilizado no desenvolvimento do indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.....	114
Tabela 28 – Gradiente 23, utilizado no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.....	115
Tabela 29 – Gradiente 34a, utilizado no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.....	116
Tabela 30 – Parâmetros do sistema cromatográficos utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna com partículas de núcleo fundido.....	118
Tabela 31 – Resolução entre os picos nas amostras de nevirapina IFA e comprimidos de nevirapina contendo produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido e oxidação e nevirapina.....	119
Tabela 32 – Ângulos de pureza e ângulos limites obtidos para o pico da nevirapina nas amostras de IFA e comprimidos submetidos às diversas condições de degradação forçada.....	120
Tabela 33 – Valores médios e DPR dos parâmetros de adequabilidade do sistema.....	122
Tabela 34– Concentrações de nevirapina e valores de área para a construção da curva analítica do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.....	122
Tabela 35 – Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO.....	123
Tabela 36 – Valores de teor médio e desvios padrão relativos (DPR) estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas para nevirapina insumo farmacêutico ativo.....	125
Tabela 37 – Valores de teor médio e desvios padrão relativos (DPR) estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas para comprimidos de nevirapina.....	125
Tabela 38 – Porcentagem de recuperação de nevirapina adicionada ao placebo para avaliação da exatidão do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando coluna com partículas de núcleo fundido.....	126
Tabela 39 – Avaliação do efeito das variáveis na determinação de nevirapina utilizando método indicativo de estabilidade com coluna de núcleo fundido.....	127
Tabela 40 – Parâmetros espectrométricos utilizados nas análises por CLAE-EM/EM.....	133
Tabela 41 – Equações da reta e coeficientes de determinação e correlação obtidos para os modelos matemáticos propostos em relação à degradação da nevirapina sob condição oxidativa (H₂O₂ 3% v/v a 50 °C).....	141
Tabela 42 – Equações da reta e coeficientes de determinação e correlação obtidos para os modelos matemáticos propostos em relação à degradação da nevirapina sob condição hidrolítica em meio ácido (HCl 1 M a 50°C).....	146
Tabela 43 – Condições cromatográficas do gradiente exploratório para eluição da nevirapina e dos produtos de degradação, utilizando CLAE-EM/EM.....	149
Tabela 44 – Razão massa/carga do íon precursor dos produtos de degradação e principais íons produto.....	151
Tabela 45 – Razão massa/carga dos íons precursores e dos respectivos íons produto obtidos a partir dos metabólitos oxidativos da nevirapina determinados por Rowland e colaboradores (2007).....	152
Tabela 46 – Concentração de nevirapina após extração líquido-líquido (LL) utilizando acetato de etila como agente extrator e reconstituição com 1 mL DMSO.....	161
Tabela 47–Viabilidade celular em células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis antes e após os testes de degradação forçada.....	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
α	Nível de significância
μL	Microlitro(s)
μm	Micrômetro(s)
AIBN	Azobisisobutironitrila
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C ₁₈	Sílica ligada a grupos octadecilsilanos
°C	Grau Celsius
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial
CLUE	Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Espectrometria de Massas
EUA	Estados Unidos da América
eV	Eletrovolt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
h	Hora(s)
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High Density Lipoproteins</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
h	Hora(s)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INN	Inibidores da integrase
INNTR	Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa

/continua

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (conclusão)

INTR	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa
INtTR	Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa
IP	Inibidores da protease
ITD	Ingestão total diária
IV	Infravermelho
k	Fator de retenção
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low Density Lipoproteins</i>
Log P	Coefficiente de partição
Lux	Unidade da intensidade de iluminação
M	Molar
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
m ²	Metros quadrados
min	Minuto (s)
mm	Milímetros
m/z	Razão massa-carga
NaOH	Hidróxido de sódio
NF	Núcleo fundido
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
p/v	Peso por volume
PVDF	Membrana fluoreto polivinidileno
R ²	Coefficiente de determinação
R	Coefficiente de correlação
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
T _R	Tempo de Retenção
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
USP	Farmacopeia Americana, do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
watt	Unidade de potência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Impurezas e produtos de degradação.....	24
3.2 Estabilidade de fármacos e produtos farmacêuticos.....	25
3.3 Delineamento dos testes de degradação forçada.....	32
3.3.1 <u>Degradação hidrolítica (hidrólise)</u>.....	34
3.3.2 <u>Degradação oxidativa (oxidação)</u>.....	37
3.3.3 <u>Degradação termolítica (termólise)</u>.....	41
3.3.4 <u>Degradação fotolítica (fotólise)</u>.....	42
3.4 Métodos indicativos de estabilidade.....	43
3.4.1 <u>Técnicas empregadas no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade</u>.....	45
3.5 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	48
3.6 Nevirapina.....	52
3.6.1 <u>Farmacocinética</u>.....	53
3.6.2 <u>Propriedades físico-químicas</u>.....	54
3.7 Métodos analíticos para determinação de nevirapina.....	54
4 CAPÍTULO I: TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRA EFICIÊNCIA.....	63
4.1 Materiais.....	63
4.1.1 <u>Substância química de referência, IFA e comprimidos</u>.....	63
4.1.2 <u>Reagentes</u>.....	64
4.1.3 <u>Materiais e vidrarias</u>.....	64
4.1.4 <u>Equipamentos</u>.....	64
4.2 Métodos.....	65
4.2.1 <u>Determinação da solubilidade da nevirapina</u>.....	65
4.2.2 <u>Identificação por espectrofotometria no infravermelho e no ultravioleta</u>.....	65
4.2.3 <u>Testes de degradação forçada</u>.....	66
4.2.4 <u>Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando cromatografia a líquido de ultra eficiência</u>.....	73
4.3 Resultados e discussão.....	74
4.3.1 <u>Solubilidade da nevirapina</u>.....	74
4.3.2 <u>Identificação da nevirapina por espectrofotometria no infravermelho..</u>	75
4.3.3 <u>Identificação da nevirapina por espectrofotometria no ultravioleta.....</u>	76
4.3.4 <u>Estudos de degradação forçada</u>.....	77
4.3.5 <u>Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando cromatografia a líquido de ultra eficiência</u>.....	86
5 CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE UTILIZANDO COLUNA COM PARTÍCULAS DE NÚCLEO FUNDIDO.....	95
5.1 Materiais.....	95

5.1.1 <u>Substância química de referência, IFA e comprimidos</u>	95
5.1.2 <u>Reagentes</u>	95
5.1.3 <u>Materiais e vidrarias</u>	95
5.1.4 <u>Equipamentos e coluna cromatográfica</u>	96
5.2 <u>Métodos</u>	96
5.2.1 <u>Gradiente exploratório</u>	96
5.2.2 <u>Eluições isocráticas</u>	98
5.2.3 <u>Eluições em gradiente e otimização das condições cromatográficas</u> ...	98
5.2.4 <u>Validação</u>	99
5.3 <u>Resultados</u>	107
5.3.1 <u>Desenvolvimento e otimização do método indicativo de estabilidade para nevirapina utilizando coluna com partículas de núcleo fundido</u>	107
5.3.2 <u>Validação</u>	118
6 CAPÍTULO III: ESTUDO DA CINÉTICA, DAS ROTAS DE DEGRADAÇÃO DA NEVIRAPINA E DA CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DEGRADADAS.	129
6.1 <u>Materiais</u>	129
6.1.1 <u>Substância química de referência, IFA e comprimidos</u>	129
6.1.2 <u>Reagentes</u>	129
6.1.3 <u>Materiais e vidrarias</u>	129
6.1.4 <u>Equipamentos e coluna cromatográfica</u>	130
6.2 <u>Métodos</u>	130
6.2.1 <u>Estudo da cinética de degradação forçada da nevirapina IFA e comprimidos</u>	130
6.2.2 <u>Identificação dos produtos de degradação</u>	133
6.2.3 <u>Estudo de citotoxicidade</u>	134
6.3 <u>Resultados</u>	137
6.3.1 <u>Estudo de cinética de degradação da nevirapina</u>	137
6.3.2 <u>Propostas de elucidação estrutural dos produtos de degradação formados no estudo de degradação forçada em meio ácido e oxidativo</u>	147
6.3.3 <u>Resultados do ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i></u>	160
7 CONCLUSÕES	164
REFERÊNCIAS	166

APÊNDICE A – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do - Simpósio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR - 2014), realizado na cidade de Belo Horizonte - MG, em agosto de 2014..... 175

APÊNDICE B – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO - 2014), na cidade de Campos do Jordão - SP, em setembro de 2014. 177

APÊNDICE C – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do - Simpósio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR - 2014), realizado na cidade de Belo Horizonte - MG, em agosto de 2014..... 179

1 INTRODUÇÃO

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de produtos farmacêuticos. A determinação dos parâmetros relacionados à estabilidade fundamenta-se não apenas no cumprimento de exigências legais, mas, também na preocupação com a saúde do paciente, uma vez que a ausência de estabilidade pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do paciente aos possíveis efeitos tóxicos dos produtos de degradação.

O desenvolvimento de estudos sobre a degradação de fármacos é de extrema relevância para a área farmacêutica, visto que permitem determinar as transformações estruturais do insumo farmacêutico ativo (IFA), detectar potenciais produtos de degradação e determinar as condições acidentais de exposição que podem ser deletérias para os fármacos e medicamentos.

Os produtos de degradação são impurezas resultantes da degradação do fármaco ou excipientes de uma formulação e podem surgir durante o armazenamento do medicamento, diante de situações de estresse, resultantes dos efeitos da luz, temperatura, pH, umidade e transporte. Podem também ser originados das características inerentes ao fármaco, da reação com os excipientes ou devido ao contato com a embalagem primária (MELO, 2012).

Na Resolução RE nº1/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é descrito o Guia para realização dos estudos de estabilidade, cujo principal objetivo é a determinação do prazo de validade do produto farmacêutico. Nessa resolução é preconizado, ainda, o desenvolvimento de método analítico seletivo para quantificação do fármaco e dos produtos de degradação, também conhecidos como métodos indicativos de estabilidade (BRASIL, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

Em dezembro de 2013, foi publicada a resolução RDC nº 58/2013 (ANVISA), na qual são estabelecidos os parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos durante o estudo de estabilidade e as condições a serem seguidas no estudo de degradação forçada (BRASIL, 2013[b]).

De acordo com este documento, estudos de degradação forçada, também conhecidos como estudos de estresse, são aqueles que permitem a geração de produtos de degradação por meio da exposição do IFA e do produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/alcalina/neutra, oxidação, entre outras. Com este estudo objetiva-se uma redução na área sob o pico do IFA de, pelo menos, 10% em cada condição, sem ocorrer uma degradação muito grande (uma redução de até 30% é tida como ideal). Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com seletividade adequada, bem como fornecem informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2013[b]).

Nesse campo de estudo, no qual se faz necessária a separação de um número relativamente grande de analitos, existe uma demanda crescente por análises rápidas. Assim, as técnicas modernas de separação, tais como a cromatografia a líquido de ultra eficiência utilizando colunas com partículas sub 2 µm e colunas com partículas de núcleo fundido, além de reduzirem o tempo de análise, possuem maior eficiência de separação, rapidez e permitem a diminuição do gasto de solventes.

Um outro aspecto importante nos estudos de estabilidade é a identificação dos produtos de degradação formados e, para isso, deve-se empregar técnicas sensíveis e que permitam a caracterização estrutural dos compostos formados. Enfoque também deve ser dado para a necessidade de qualificação de um produto de degradação quando este encontra-se em um nível acima dos limites de qualificação ou possui estrutura química característica que conduza à classificação de um produto potencialmente tóxico. Nesse caso, é recomendado na Consulta Pública nº 68/2014, que sejam realizados a avaliação do potencial genotóxico do produto de degradação e estudos de toxicidade em geral (BRASIL, 2014[a]).

A prevalência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) no Brasil e no mundo é muito alta. Em 2014 existiam no Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, 734.000 pessoas infectadas pelo vírus HIV e, a cada ano, é registrada uma média de 39.700 novos casos. Foram identificados 278.306 óbitos tendo a AIDS como causa básica de morte desde 1980 até dezembro de 2013 no Brasil (BRASIL, 2014[c]).

Apesar dos intensos esforços científicos, até o momento não se conhece a cura para essa doença. O principal objetivo, portanto, da terapia antirretroviral é retardar a progressão da imunodeficiência possibilitando maior qualidade de vida aos portadores do vírus HIV pela administração de uma combinação de fármacos antirretrovirais.

A nevirapina, fármaco pertencente à classe dos inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa, é um importante componente da farmacoterapia aplicada ao tratamento da AIDS. Possui ampla utilização e trata-se um medicamento integrante do programa de tratamento da AIDS que é assegurado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a qualquer cidadão infectado pelo vírus HIV no Brasil, sendo esse um programa reconhecido mundialmente. Assim, é de fundamental importância que seja realizado o estudo do perfil de degradação causado pela ação dos agentes estressantes e o desenvolvimento de método analítico confiável, sensível e rápido que consiga ser seletivo tanto para a nevirapina quanto para seus produtos de degradação.

Diante do exposto e sabendo-se que ainda não encontra-se descrito na literatura um estudo detalhado e completo abrangendo estudos de degradação forçada em todas as condições exigidas nas legislações, propõem-se com este trabalho a avaliação da estabilidade da nevirapina IFA e do produto acabado (comprimidos), por meio da realização de estudo de degradação forçada do fármaco e de seu comprimido, bem como o desenvolvimento, otimização e validação de métodos indicativos de estabilidade seletivos para a nevirapina e seus produtos de degradação. Além disso, serão propostas estruturas químicas e mecanismo de formação para os principais produtos de degradação encontrados empregando a espectrometria de massas sequencial e propõem-se também, a realização de testes de citotoxicidade para as amostras provenientes do estudo de degradação forçada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo do perfil de degradação da nevirapina e desenvolver, otimizar e validar métodos indicativos de estabilidade seletivos para o fármaco nevirapina e seus produtos de degradação.

2.2 Objetivos específicos

- Submeter o IFA nevirapina, o produto acabado (comprimidos) e o placebo aos testes de degradação forçada e realizar análise crítica do perfil de degradação, avaliando fatores que podem interferir na estabilidade do medicamento e propondo a possível origem de cada produto de degradação.
- Desenvolver método indicativo de estabilidade seletivo para nevirapina e seus produtos de degradação, utilizando cromatografia a líquido de ultra eficiência com coluna sub 2 μm .
- Desenvolver método indicativo de estabilidade seletivo para nevirapina e seus produtos de degradação, utilizando coluna com partículas de núcleo fundido.
- Validar o método desenvolvido utilizando coluna com partículas de núcleo fundido de acordo com a legislação e guias vigentes.
- Realizar estudos da cinética de degradação em diferentes condições de estresse para o insumo farmacêutico ativo nevirapina e para o produto acabado (comprimidos).
- Propor mecanismos de formação e estruturas químicas para os principais produtos de degradação formados empregando cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).
- Avaliar a segurança biológica dos produtos de degradação formados realizando teste de citotoxicidade *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Impurezas e produtos de degradação

A segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos são requisitos essenciais para o sucesso de um tratamento. A segurança de um medicamento é determinada pelo perfil farmacológico bem como pelos efeitos adversos causados pelas impurezas existentes nos lotes dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e nas formas farmacêuticas. As impurezas presentes no IFA e medicamento geralmente possuem efeitos farmacológicos ou toxicológicos indesejados que devem ser considerados em relação aos benefícios obtidos com a administração da medicação. Portanto, o monitoramento e controle das impurezas são importantes para a garantia da qualidade e segurança de um medicamento (RAO; NAGARAJU, 2003). Em termos de eficácia, o efeito mais óbvio da falta de estabilidade farmacêutica é a diminuição da potência do medicamento, entretanto, se os produtos de degradação formados são tóxicos, seu acúmulo é tão ou mais importante que a diminuição da potência (KOMMANABOYINA; RHODES; 1999).

Conforme definido no *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), as impurezas que habitualmente podem acompanhar um fármaco ou medicamento dividem-se em três tipos: impurezas inorgânicas, solventes residuais e impurezas orgânicas. As impurezas inorgânicas resultam exclusivamente do processo de síntese do fármaco e estão normalmente identificadas. Entre elas é possível encontrar reagentes, catalisadores, metais pesados, sais inorgânicos e outros materiais empregados na síntese do IFA. Os solventes residuais são os líquidos orgânicos e inorgânicos utilizados na síntese do fármaco e cuja presença no produto final dificilmente pode ser evitada. As impurezas orgânicas no produto final podem ser resultantes do processo de síntese ou podem ser formadas durante o período de armazenamento. Estas impurezas podem ou não estar identificadas e incluem reagentes de partida, intermediários, subprodutos e produtos de degradação (ICH-Q3A(R2), 2006).

A presença de traços de impurezas em medicamentos ou nos fármacos é inevitável. No entanto, esses níveis devem ser monitorados, pois, como dito anteriormente, impurezas podem, em alguns casos, reduzir a eficácia dos ativos farmacêuticos, bem como aumentar a possibilidade da ocorrência de efeitos adversos interferindo na segurança do medicamento. As impurezas podem ainda ser teratogênicas, mutagênicas ou carcinogênicas, colocando em risco a saúde do paciente. Sendo assim, é necessária a determinação do perfil das impurezas e dos produtos de degradação presentes no IFA e no produto acabado (RAO; KIRAM; PRASANTHI, 2010).

Os produtos de degradação são impurezas resultantes da degradação do fármaco ou excipientes de uma formulação. Podem surgir durante o armazenamento do medicamento, diante de situações de estresse, tais como luz, temperatura, pH, umidade e transporte. Podem também ser originados das características inerentes ao fármaco, da reação com os excipientes ou devido ao contato com a embalagem primária (MELO, 2012).

3.2 Estabilidade de fármacos e produtos farmacêuticos

Uma determinada especialidade farmacêutica e/ou IFA deve manter, durante o período de estocagem e uso, as mesmas características e padrões de qualidade que apresentava no momento de sua fabricação (SILVA *et al.*, 2009).

Dessa forma, a estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo o fármaco considerado isoladamente, mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado e aquele no qual sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (SILVA *et al.*, 2009).

Para a realização dos estudos a fim de conhecer o comportamento do fármaco ou medicamento durante seu tempo de utilização, determinar o prazo de validade dos mesmos e as condições ideais de armazenamento dos medicamentos submetidos ao registro sanitário pelas indústrias farmacêuticas, vários países elaboraram diretrizes para a avaliação da estabilidade farmacêutica, por meio de suas autoridades regulatórias.

Como a estabilidade depende de fatores ambientais, para a realização de estudos de estabilidade, o planeta foi subdividido em quatro zonas com diferentes especificações de temperatura e umidade (zona I: temperada; zona II: subtropical, mediterrânea; zona III: quente e seca e zona IV: quente e úmida), para possibilitar a comercialização dos produtos em outras zonas climáticas (GRIMM, 1998; BOTT; OLIVEIRA, 2007; CARVALHO *et al.*, 2005). O Brasil encontra-se situado na zona climática IV, que é caracterizada por alta temperatura e umidade, padrões dominantes ao longo do país, mesmo que com algumas diferenças inter-regionais.

No Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), os esforços para harmonizar os procedimentos para registro de medicamentos entre os países membros – Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai – resultaram na elaboração, em 1996, do regulamento técnico “*Estabilidad de Productos Farmacéuticos*”. Neste regulamento, MERCOSUL/GMC/RES nº 53/96 são estabelecidas diretrizes para determinar o prazo de validade de produtos farmacêuticos destinados à comercialização nesta região (MERCOSUL, 1996; LEITE, 2005).

No Brasil, para o procedimento dos estudos de estabilidade, as indústrias farmacêuticas devem seguir as normas descritas na Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA. O estudo de estabilidade descrito nesta resolução possui como principal aplicabilidade a previsão, determinação e acompanhamento do prazo de validade de produtos farmacêuticos. Dessa forma, as indústrias farmacêuticas, para seguirem as exigências presentes nesse guia, devem realizar três tipos de estudos: acelerado, longa duração e de acompanhamento (BRASIL, 2005). Essa resolução foi desenvolvida com base no guia Q1A(R2) do ICH (ICH-Q1A(R2), 2003).

O estudo de estabilidade acelerado (em temperatura e/ou umidade elevadas) é realizado para acelerar a degradação química e/ou, mudanças físicas no produto, com o objetivo de simular condições drásticas de armazenamento. O estudo de estabilidade de longa duração é projetado em condições de temperatura e umidade menos elevadas que os estudos de estabilidade acelerada, sendo utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento do produto (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; SILVA *et al.*, 2009). Por sua vez, os estudos de estabilidade de acompanhamento são realizados com o objetivo de garantir que o medicamento mantenha o padrão de qualidade (características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas) verificado no estudo de estabilidade de longa duração (SILVA *et al.*, 2009; Q1A(R2), 2003).

É apresentada na Resolução RE nº 1/2005 da ANVISA uma tabela com as condições de temperatura e umidade a serem utilizadas nos estudos de estabilidade acelerado e de longa duração, levando-se em conta a forma farmacêutica, a temperatura de armazenamento e o tipo de embalagem a ser utilizada. Para a maioria dos casos, é recomendada temperatura de 40 ± 2 °C e uma umidade relativa de $75 \pm 5\%$ para o estudo de estabilidade acelerado e temperatura de 30 ± 2 °C e uma umidade relativa de $75 \pm 5\%$ para estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

Para a avaliação desses estudos, as amostras são retiradas nos tempos determinados no guia, sendo realizados os seguintes testes: doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável) (BRASIL, 2005).

Para analisar as amostras provenientes dos estudos de estabilidade, ou seja, para determinar o teor do princípio ativo e quantificar os produtos de degradação formados nesses estudos, a ANVISA exige o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam indicativos de estabilidade, isto é, métodos que sejam seletivos aos princípios ativos e seus produtos de degradação (BRASIL, 2003, 2005).

O Informe Técnico nº 1 da ANVISA, de 15 de julho de 2008, foi publicado com o objetivo de esclarecer procedimentos nos casos em que a impureza ou o padrão do

produto de degradação não estão disponíveis. Estes procedimentos envolvem a realização de testes de degradação forçada sob condições variadas, que estão descritas na **Tabela 1**. Para as documentações de registro, pós-registro e renovação, a indústria farmacêutica deve apresentar estudos submetendo o medicamento a condições de estresse e análise crítica dos mesmos (BRASIL, 2008).

Tabela 1 – Condições de estresse às quais os IFAs e medicamentos devem ser expostos de acordo com o Informe Técnico nº 1/2008 (ANVISA).

Condição	Valor
Aquecimento	60 °C
Umidade	75% UR ou mais
Solução ácida	HCl 0,1 M
Solução básica	NaOH 0,1 M
Solução oxidativa	H ₂ O ₂ 3% (v/v)
Fotólise	UV-B fluorescente
Íons metálicos (opcional)	Fe ²⁺ ou Cu ²⁺ 0,05 M

Fonte: adaptado de BRASIL, 2008.

Atualmente, estes testes tornaram-se uma tendência no desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece informações úteis para o desenvolvimento da formulação e indica os tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente aperfeiçoarão a integridade do IFA e do produto acabado (REYNOLDS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009).

Em dezembro de 2013, foi publicada a resolução RDC nº 58/2013 (ANVISA), na qual são estabelecidos os parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos durante o estudo de estabilidade e estabelece as condições a serem seguidas no estudo de degradação forçada (BRASIL, 2013[b]).

De acordo com este documento, estudos de degradação forçada, também conhecidos como estudos de estresse, são estudos que permitem a geração de produtos de degradação por meio da exposição do IFA e do produto acabado a

condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/alcalina/neutra, oxidação, entre outras. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequadas, bem como fornecem informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2013[b]).

Em relação às condições a serem seguidas no estudo de degradação forçada, é estabelecido na RDC nº 58/2013 que o estudo deve ser realizado em um lote, em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento. Os estudos devem ser realizados com a formulação, o placebo e com o(s) IFA(s) isolado(s) e associado(s) no caso de associação em dose fixa. Além disso, define que os testes realizados na indústria farmacêutica devem submeter as amostras às condições forçadas de aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, condição fotolítica e a íons metálicos, mas não especifica as soluções de estresse a serem utilizadas e nem o tempo de exposição. Ademais, exige que os testes de degradação forçada promovam uma degradação superior a 10% e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra (BRASIL, 2013[b]).

A degradação da amostra deve gerar produtos em quantidades suficientes que propiciem o desenvolvimento e validação de uma metodologia para quantificação do fármaco e dos produtos de degradação e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento. Assim, a análise crítica do perfil de degradação deve contemplar a verificação da pureza cromatográfica do pico do IFA no medicamento e a avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2013[b]).

Na RDC nº 58/2013 são definidos os limites de notificação, identificação e qualificação, de forma que o limite de notificação é o valor acima do qual um determinado produto de degradação deve ser reportado no estudo de estabilidade e estar incluído(s) no limite de impurezas totais. Já o limite de identificação é o valor acima do qual um produto de degradação deve ter a sua estrutura química elucidada e ser quantificado individualmente. O produto de degradação com porcentual ou valor correspondente acima dos limites de qualificação deve ter seu perfil de

segurança estabelecido por meio da avaliação da segurança biológica, empregando testes de genotoxicidade e estudos gerais de toxicidade (BRASIL, 2013[b]).

A avaliação da necessidade de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação deve considerar a maior concentração da impureza de degradação encontrada durante o estudo de estabilidade. Na **Tabela 2** estão descritos os limites adotados para notificação, identificação e qualificação de impurezas em medicamentos (BRASIL, 2013[b]).

Tabela 2 – Limites para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação presentes em medicamentos de acordo com a RDC nº58/2013 (ANVISA).

	Dose máxima diária ¹	Limites ²
Limites de notificação	≤ 1 g	0,1%
	> 1 g	0,05%
Limites de identificação	< 1 mg	1,0% ou 5 µg ITD, o que for menor
	1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 µg ITD, o que for menor
	> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg ITD, o que for menor
	> 2 g	0,10%
Limites de qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50 µg ITD, o que for menor
	10 mg – 100 mg	0,5% ou 200 µg ITD, o que for menor
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg ITD, o que for menor
	> 2 g	0,15%

¹Quantidade máxima do fármaco administrada por dia.

²Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do fármaco ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

Fonte: adaptado de BRASIL, 2013[b].

Mais recentemente, em agosto de 2014, a ANVISA publicou a Consulta Pública nº68, na qual é proposto um guia regulatório para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação. Com este novo guia, tem-se dois objetivos principais: divulgar a opinião da ANVISA quanto à realização do perfil de degradação e quanto aos procedimentos de identificação e qualificação dos produtos de degradação, além de indicar a melhor forma de cumprir as exigências da RDC nº58/2013 (BRASIL, 2013[b], 2014[a]).

De acordo com a Consulta Pública nº 68/2014, o perfil de degradação é composto por duas etapas, uma experimental e uma crítica. A parte experimental é obtida por meio do estudo de degradação forçada, sendo sempre necessário realizá-la quando se deseja estudar o impacto de alterações no perfil de degradação do produto e/ou provar que um método é indicativo de estabilidade. A parte crítica deve demonstrar a aplicabilidade do estudo experimental realizado à situação do produto (BRASIL, 2014[a]).

Em relação à parte experimental do perfil de degradação, encontram-se descritas detalhadamente na Consulta Pública nº 68/2014 as condições de estresse às quais o placebo, produto acabado e IFAs isolados devem ser submetidos, sendo elas:

- ácida, utilizando-se uma solução tampão em pH abaixo de 7,0 ou um ácido mineral, como ácido clorídrico (HCl);
- alcalina, utilizando-se uma solução tampão em pH acima de 7,0 ou um hidróxido de metal alcalino, como hidróxido de sódio (NaOH);
- oxidante, usando-se preferencialmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- aquecimento (térmica seca), devendo ser feito na umidade mais baixa possível, sem dissolver o produto;
- umidade (térmica úmida), devendo ser feita no produto sem dissolver, mas com umidade relativa alta no ambiente;
- fotolítica, devendo se expor o produto sem dissolver, preferencialmente a luz visível;
- sob influência de íons de metais de transição, geralmente soluções de ferro II ou cobre (BRASIL, 2014[a]).

Os parâmetros dos estudos, tais como tempo de exposição, concentração dos agentes degradantes e temperatura devem ser variados, objetivando-se uma redução na área sob o pico do IFA de, pelo menos, 10% em cada condição, sem ocorrer uma degradação muito grande. Uma redução de até 30% é tida como ideal. Recomenda-se variar os seguintes parâmetros em ordem de preferência decrescente: tempo de exposição, temperatura e concentração ou magnitude do agente degradante (BRASIL, 2014[a]).

Após a realização do estudo do perfil de degradação, deve-se discutir os seguintes pontos: se o método proposto é indicativo de estabilidade, se existem condições a que o produto é particularmente sensível considerando entre outros fatores o processo de fabricação proposto e a influência dos excipientes na rota de degradação e as principais impurezas a serem monitoradas durante o estudo de estabilidade (BRASIL, 2014[a]).

Diante da necessidade de identificação dos produtos de degradação formados, uma técnica que se mostra de grande importância e utilização é a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (NARAYANAM *et al*, 2014). O princípio da espectrometria de massas é a produção de íons a partir dos analitos, os quais são filtrados e detectados em função de sua razão massa/carga (m/z). Além da razão massa/carga, o espectro também apresenta a abundância relativa de cada íon. Na espectrometria de massas sequencial (EM/EM) dois analisadores de massa são acoplados. Dessa forma, é possível selecionar determinado(s) íon(s) no primeiro analisador, fragmentá-lo(s) e avaliá-lo(s) no segundo analisador (SINGH *et al.*, 2012).

Em relação à necessidade de qualificação de um produto de degradação, ou seja, quando o mesmo encontrou-se em nível acima dos limites de qualificação ou possui estrutura química característica que conduza à classificação de um produto potencialmente tóxico, é recomendado na Consulta Pública nº 68/2014, que sejam realizados a avaliação do potencial genotóxico do produto de degradação e estudos de toxicidade em geral (BRASIL, 2014[a]).

3.3 Delineamento dos testes de degradação forçada

Os estudos de degradação forçada são realizados com a finalidade de acelerar a degradação do fármaco em um medicamento, para que se possa avaliar tanto a susceptibilidade deste produto a situações de estresse, elucidar os mecanismos envolvidos, as reações cinéticas, as estrutura dos produtos de degradação, determinar as condições acidentais de exposição que podem ser deletérias para os medicamentos, bem como verificar a adequabilidade do método analítico para aplicação em um estudo de estabilidade. Os estudos de degradação forçada

também podem auxiliar na seleção adequada do material de embalagem primária e excipientes mais compatíveis com o fármaco (BRASIL, 2014[a]).

Os estudos de estresse, ou estudos de degradação forçada, são testes realizados com o IFA e com a forma farmacêutica em condições extremas com o intuito de avaliar seu comportamento químico e prever as possíveis vias de degradação (SILVA *et al.*, 2009).

Antes da realização do estudo de degradação forçada propriamente dito, é recomendado que seja feita uma pesquisa bibliográfica detalhada sobre o princípio ativo a ser estudado, com a finalidade de obter as seguintes informações: os principais grupos funcionais da molécula e se os mesmos são susceptíveis à degradação ou interação com excipientes; excipientes que devem ser evitados por potencial interação química; produtos de degradação teoricamente possíveis; probabilidade de que o grupo cromóforo ou outro grupo funcional responsável pela detecção do fármaco seja degradado e verificar a previsibilidade de produtos de degradação com estruturas químicas alertas para toxicidade/genotoxicidade (BRASIL, 2014[a]).

O objetivo do teste de estresse não é degradar totalmente o composto, mas sim promover uma degradação de pequena extensão, de cerca de 10%, sendo considerado adequada uma degradação de 10% a 30% do princípio ativo. Se a degradação for menor que 10% devem-se empregar condições de estresse mais extremas (BRASIL, 2014[a]).

Ainda não é claramente definido na literatura qual é a melhor forma de realizar o estudo de degradação forçada e alcançar a porcentagem de degradação adequada; dessa forma, existe muita divergência entre os laboratórios analíticos, particularmente com relação às concentrações de agentes degradantes a serem utilizadas e ao tempo de exposição (BRASIL, 2014[a]).

Como consequência, vários estudos vêm sendo realizados para a obtenção de produtos de degradação utilizando diferentes condições, diferentes métodos de análise e de identificação (BHARDWAJ; SINGH, 2008; BEDSE; KUMAR; SINGH,

2009; FREITAS, 2014) e cada laboratório tem seus procedimentos e diretrizes internos a serem seguidos no teste de degradação forçada. Este fato foi confirmado em uma pesquisa na qual foram comparadas informações sobre o protocolo, condições e procedimentos utilizados no teste de degradação forçada em 20 indústrias farmacêuticas (ALSANTE *et al.*, 2003). Os autores concluíram que as indústrias farmacêuticas estavam aplicando abordagens significativamente diferentes para a realização dos estudos de degradação forçada.

Um guia prático e bem detalhado foi proposto por Singh e Bakshi (2000), que criaram um esquema de classificação dos fármacos de acordo com sua estabilidade química e desenvolveram fluxogramas do tipo árvore de decisões que auxiliam a escolha dos parâmetros (concentração do agente estressante, temperatura e tempo de exposição) a serem empregados em cada condição de estresse para produzir a degradação exigida pela legislação, em um número mínimo de tentativas (BAKSHI; SINGH, 2002; SINGH; BAKSHI, 2000).

Nem sempre todos os produtos de degradação formados nos ensaios de estresse são verificados nos estudos de estabilidade conduzidos com o IFA e medicamento, uma vez que as condições de degradação forçada não têm a finalidade de simular condições de exposição usual durante a vida útil do produto, mas sim de gerar deliberadamente produtos de degradação que só apareceriam após longos períodos de tempo nas condições usuais de armazenamento. Assim, a submissão do fármaco e do produto acabado a cada uma das condições de estresse tem por finalidade gerar o maior desafio possível para o método proposto, para que então ele possa ser usado com razoável grau de segurança no estudo de estabilidade (BRASIL, 2014[a]).

3.3.1 Degradação hidrolítica (hidrólise)

A degradação do IFA que envolve a reação com a água é conhecida como hidrólise (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005; STEWART; TUCKER, 1985). Para a maioria dos comprimidos, o IFA entra em contato com a água ao ser administrado, além disso, as formas farmacêuticas sólidas entram em contato com a umidade do ar, durante o seu prazo de validade. Dessa forma, a hidrólise é uma das reações mais

comuns observadas com produtos farmacêuticos (YOSHIOKA; STELLA, 2002). IFAs que possuem grupos ésteres ou amidas são mais propensos à hidrólise (VADAS; GENNARO, 2004).

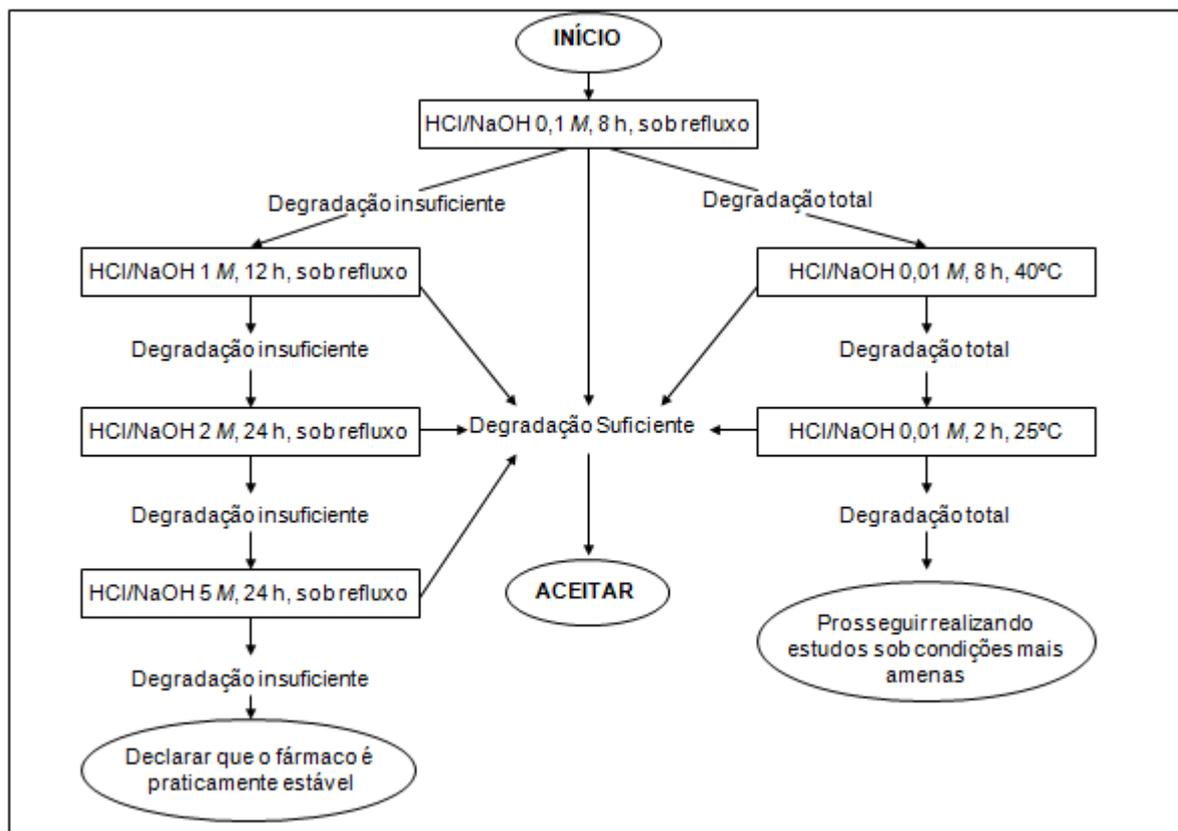
Reações de hidrólise são tipicamente catalisadas tanto pelo íon hidrônio quanto pela hidroxila. Portanto, condições ácidas e alcalinas devem ser utilizadas para induzir todas as potenciais reações hidrolíticas. Isto é especialmente importante quando a estrutura molecular do IFA a ser testado possui grupos funcionais que podem existir em diferentes estados de ionização em meio aquoso. Em casos como estes, uma abordagem prática é expor a amostra a uma vasta gama de pH em incrementos definidos. Uma faixa de pH de 1 (por exemplo, HCl 0,1 M) a 13 (por exemplo, NaOH a 0,1 M) tem sido usado por um grande número de indústrias farmacêuticas nos seus testes de degradação hidrolítica ácida e alcalina em meio aquoso. A escolha do pH adequado para a degradação hidrolítica em uma extensão aceitável, dependerá da reatividade química de cada molécula avaliada (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Baertschi e colaboradores (2005) recomendam que os testes de degradação hidrolítica promovam a exposição do IFA e produto acabado a condições ácidas, neutras e alcalinas, ou seja, abranjam uma faixa de pH que varie de 1 a 13. O teste deve ser realizado, de preferência, em meio completamente aquoso, exceto quando é necessário utilizar um solvente (conhecido como cossolvente) para favorecer a solubilidade do fármaco, tendo-se o conhecimento de que a presença de um cossolvente pode acelerar ou reduzir a hidrólise. O uso de temperaturas elevadas, até 70° C é recomendado para acelerar as reações de hidrólise, sendo que o período máximo de exposição a esses agentes estressantes recomendado é de uma semana (7 dias), embora tempos mais longos possam ser utilizados, se desejado. A neutralização das amostras antes da sua análise não é recomendada devido à possibilidade de provocar precipitação ou reações secundárias (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

De acordo com o esquema apresentado na **Figura 1**, proposto por Singh e Bakshi (2000), para estudar a degradação hidrolítica de um IFA cuja estabilidade é desconhecida em condições ácidas e alcalinas, recomenda-se iniciar o estudo de

degradação forçada utilizando refluxo do fármaco em ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M durante 8 horas. Caso seja obtida uma degradação satisfatória (10% a 30%), não há necessidade de executar nenhum estudo adicional. No entanto, se a porcentagem de degradação for insuficiente, deve-se submeter o IFA a refluxo com HCl ou NaOH mais concentrado e/ou durante maior período de tempo de maneira sucessiva, até a condição máxima de refluxo com HCl ou NaOH 5 M durante 24 horas. Caso o fármaco não apresente degradação nessas condições extremas, o mesmo pode ser considerado como praticamente estável. Seguindo pelo outro ramo da árvore de decisão, caso haja degradação total do fármaco após submetê-lo às condições iniciais, deve-se reduzir a concentração, temperatura e/ou tempo de exposição aos degradantes ácidos e alcalinos (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 1 – Fluxograma proposto para realização da hidrólise ácida e alcalina em estudos de degradação forçada.

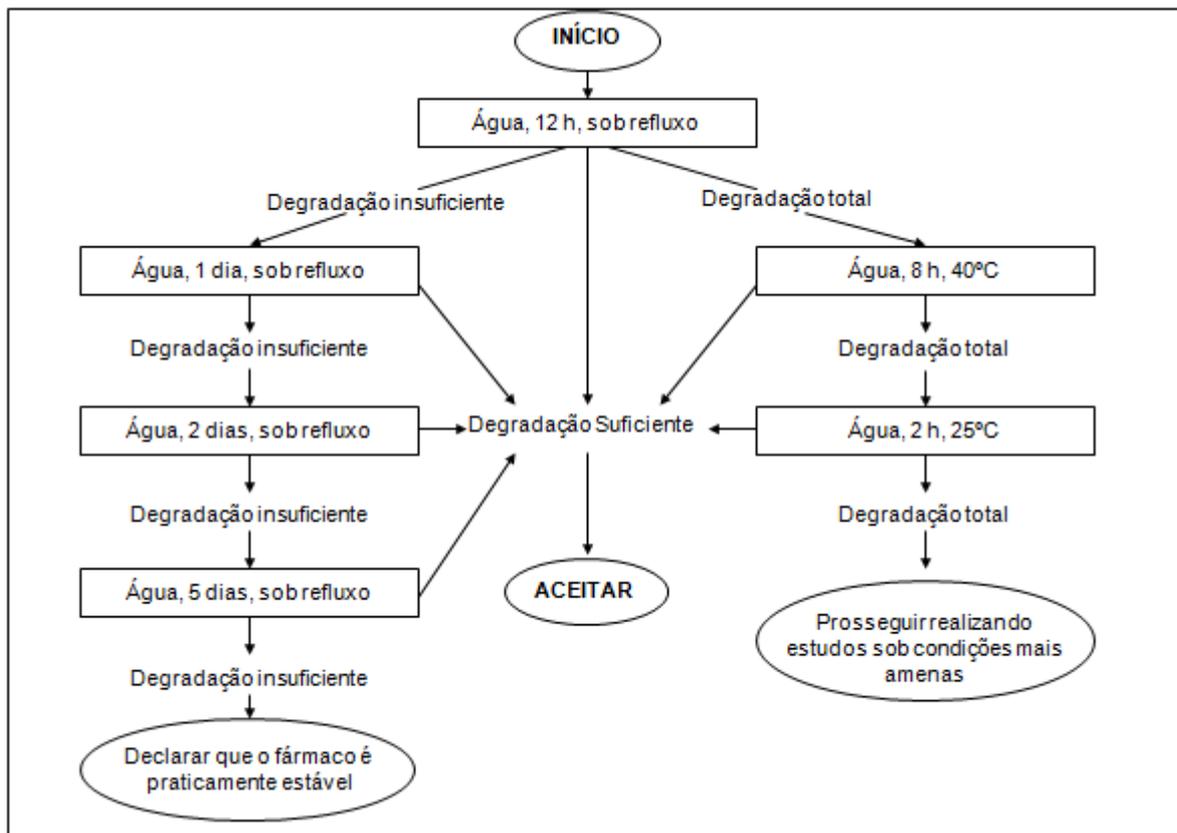


Fonte: adaptado e traduzido de SINGH, BAKSHI, 2000.

De um modo semelhante (**Figura 2**), o estudo de degradação hidrolítica sob condições neutras, pode ser iniciado por refluxo do IFA em água durante 12 horas. O tempo de refluxo deve ser aumentado para um dia (24 horas), caso não haja

degradação suficiente (10% a 30%). Se ainda não for observada degradação suficiente, o tempo de refluxo deve ser ampliado para 2 ou 5 dias, conforme a necessidade. Se a degradação ainda for insuficiente, pode-se considerar o fármaco praticamente estável à hidrólise neutra. Por outro lado, caso haja uma completa degradação do fármaco nas condições iniciais de refluxo em água durante 12 horas, tanto a temperatura quanto o tempo de exposição devem ser reduzidos (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 2 – Fluxograma proposto para realização de hidrólise neutra em estudos de degradação forçada.



Fonte: adaptado e traduzido de SINGH, BAKSHI, 2000.

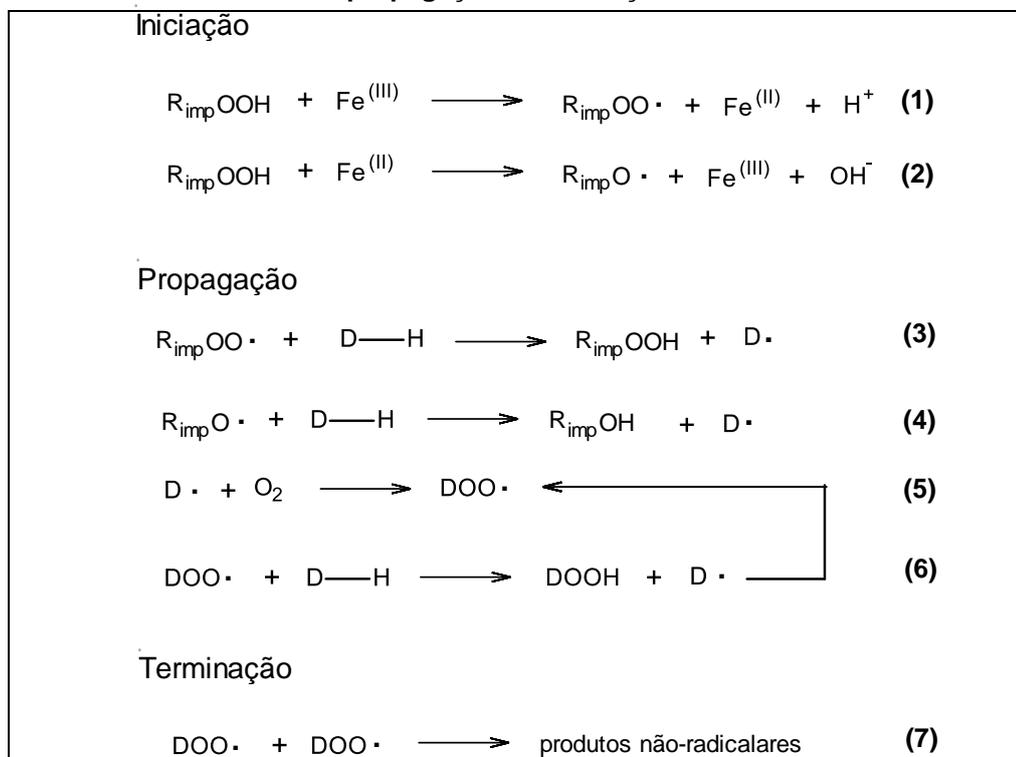
3.3.2 Degradação oxidativa (oxidação)

Reações oxidativas também são muito comuns. São três as principais vias oxidativas envolvidas na degradação de fármacos: oxidação iniciada por radicais (também conhecido como auto-oxidação); oxidação mediada por peróxido e oxidação mediada por transferência de elétrons (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

3.3.2.1 Auto-oxidação

A auto-oxidação é normalmente considerada como um processo iniciado pela via radicalar, ou seja, essas reações começam com uma fase de iniciação que envolve a formação de radicais (passo limitante da velocidade da reação), seguida por uma fase de propagação e, por fim, uma fase de terminação. Na **Figura 3** são apresentadas as fases da auto-oxidação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Figura 3 – Mecanismo envolvido nas três fases da auto-oxidação: iniciação, propagação e terminação.



Fonte: adaptado e traduzido de BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005.

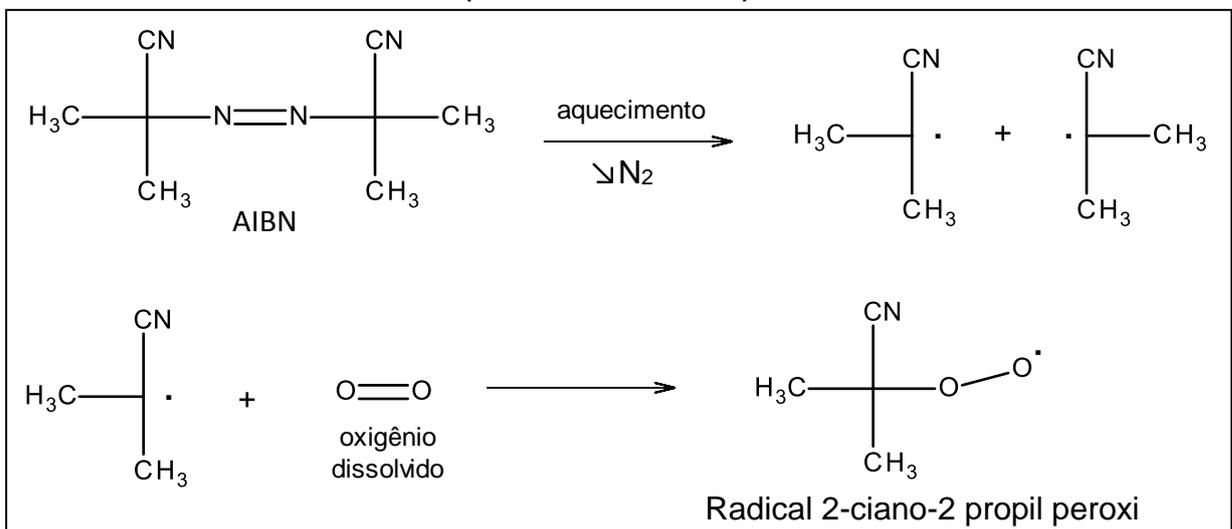
Legenda: R_{imp} = impurezas encontradas em níveis residuais nos excipientes; D = molécula do fármaco.

Nem sempre a fonte da iniciação é conhecida, podendo ser induzida por luz, metais catalisadores e reagentes. Na **Figura 3**, a etapa de iniciação (1 e 2) é representada pela reação entre impurezas encontradas em níveis residuais nos excipientes, conhecidas como hidroperóxidos orgânicos ($ROOH_{imp}$), que podem ser cataliticamente degradados por íons de metais de transição (principalmente Fe^{2+}) também presentes em níveis vestigiais e assim há a formação de quantidades equimolares de radicais peroxi ($R_{imp}OO\cdot$) e alcoxi ($R_{imp}O\cdot$). Esses radicais formados reagem com a molécula do fármaco (3 e 4), abstraindo um átomo de hidrogênio,

dando origem a radicais do fármaco ($D\cdot$), que por sua vez reagem com o oxigênio presente no meio (5), formando radicais peróxidos derivados do fármaco ($DOO\cdot$). Este radical reage com outra molécula do fármaco originando assim hidroperóxidos do fármaco ($DOOH$). A fase de terminação é caracterizada pela reação entre dois radicais peróxidos derivados do fármaco ($DOO\cdot$) (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

A susceptibilidade de um composto frente à degradação auto-oxidativa e os produtos de degradação formados, podem ser estudados em solução utilizando-se um iniciador (formador de radicais), dentre esses, azonitrilas, como o azobisisobutironitrila (AIBN), solubilizado em uma mistura de acetonitrila (50% ou mais), água (até 25%) e metanol (10%), a uma temperatura entre 40° e 60 °C, durante um período de até sete dias. A reação de formação do radical peroxila a partir do AIBN é apresentada na **Figura 4** (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005; BOCARDI, 1994).

Figura 4 – Mecanismo envolvido na formação do radical a partir do AIBN (azobisisobutironitrila).



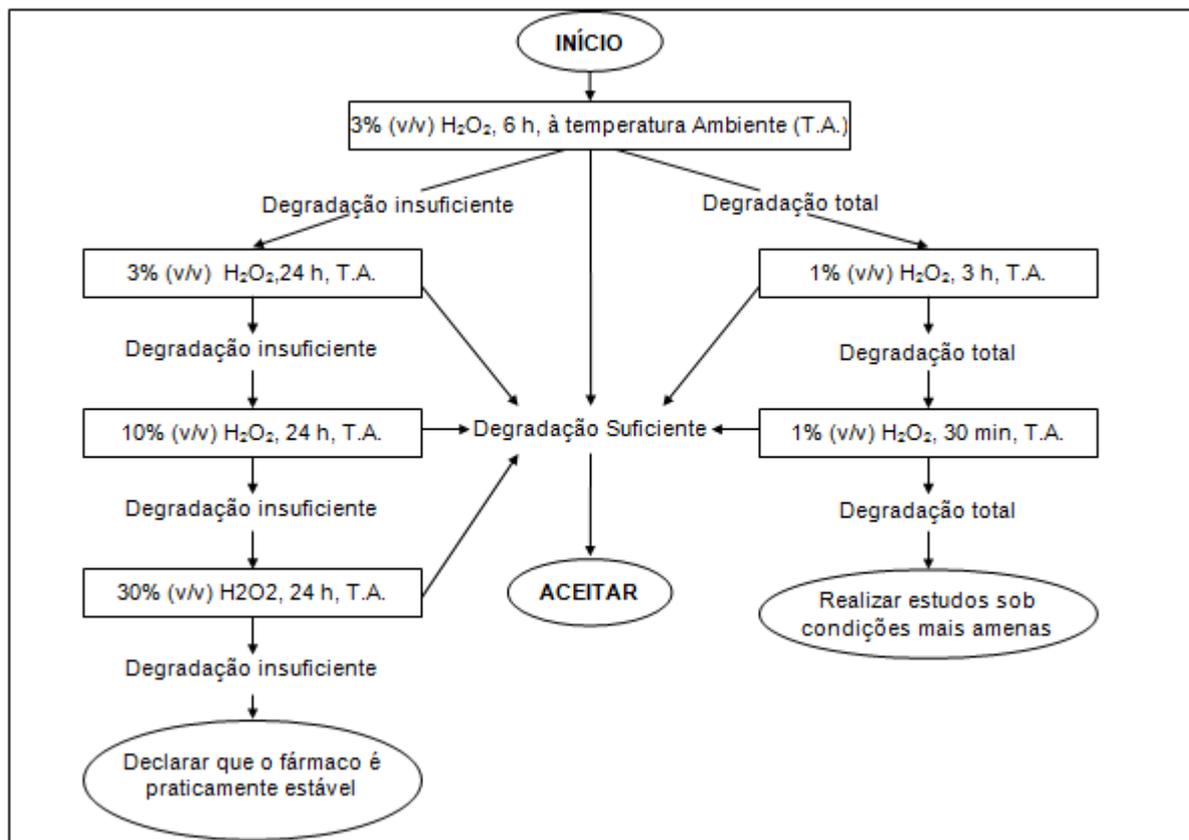
Fonte: adaptado e traduzido de BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005.

Como mostrado na **Figura 4**, após aquecimento, o azo-composto perde uma molécula de nitrogênio, formando radicais que reagem com oxigênio presente no meio, dando origem assim, a um radical peroxila terciário (radical 2-ciano-2propil peroxi), que substitui os radicais provenientes de impureza ($R_{imp}OO\cdot$ e $R_{imp}O\cdot$), na fase de iniciação da auto-oxidação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

3.3.2.2 Oxidação mediada por peróxido

A oxidação de produtos farmacêuticos também pode ser causada pela exposição aos peróxidos. Os peróxidos podem ser encontrados em níveis variáveis em certos excipientes, como por exemplo, nos polissorbatos, polietilenoglicol, povidona e hidroxipropilcelulose. Além disso, os níveis podem aumentar ao longo do tempo devido à processos auto-oxidativos (WASYLASCHUK; HARMON; WAGNER, 2007). Dessa forma, os IFAs podem estar expostos a peróxidos após a fabricação do medicamento e durante a distribuição e armazenamento do mesmo. O teste de estresse oxidativo é clássico e consiste em expor o IFA e os produtos acabados a uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de concentração entre 0,3% e 30,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio em água, por até sete dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005). A escolha das condições adequadas para avaliação da degradação oxidativa utilizando peróxido de hidrogênio como agente estressante pode ser feita utilizando-se a árvore de decisão apresentada na **Figura 5** (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 5 – Fluxograma proposto para realização de estudos de degradação oxidativa.



Fonte: adaptado e traduzido de SINGH, BAKSHI, 2000.

Singh e Bakshi (2000) sugerem que o teste de degradação oxidativa seja iniciado mantendo o IFA em uma solução de H₂O₂ a 3% (v/v), durante 6 horas à temperatura ambiente. Caso não haja degradação suficiente (10% a 30%), o período de exposição deve ser aumentado para 24 horas. Caso ainda não se observe degradação suficiente, a reação deve ser conduzida com uma solução de H₂O₂ a 10% (v/v), durante 24 horas. Para fármacos que ainda assim não oxidam, deve-se utilizar solução de H₂O₂ a 30% (v/v), durante 24 horas, à temperatura ambiente ou utilizando refluxo em temperaturas maiores. Caso não haja degradação adequada nessas condições, o fármaco pode ser considerado praticamente estável. Por outro lado, caso o fármaco seja totalmente degradado nas condições iniciais, a concentração da solução de peróxido de hidrogênio deve ser reduzida de 3% (v/v) a 1% (v/v) e o tempo de reação deve ser reduzido até que se alcance a porcentagem de degradação desejada (SINGH; BAKSHI, 2000).

3.3.2.3 Oxidação mediada por transferência de elétrons

Os metais de transição podem catalisar reações de oxidação, uma vez que podem ocorrer mecanismos de transferência de elétrons, como por exemplo, as que envolvem a remoção de um elétron de um grupo funcional da molécula do IFA devido à ligação ou reação com metais como cobre (II) e ferro (III). Após ganhar um elétron proveniente da molécula do IFA, o estado de oxidação do metal é reduzido e a molécula de fármaco é oxidada para um cátion radical instável, que reage prontamente com o oxigênio molecular para formar produtos de degradação oxidativa. Dessa forma, o uso de metais de transição como o cobre (II) e ferro (III) também é recomendado para a avaliação da susceptibilidade do IFA e do produto acabado à degradação oxidativa (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

3.3.3 Degradação termolítica (termólise)

A degradação termolítica pode ser definida como a degradação causada pela exposição a temperaturas suficientemente altas para induzir a quebra de uma ligação covalente, isto é, a pirólise. No contexto de degradação do fármaco, pode-se usar o termo termólise para descrever as reações que são movidas pelo calor ou temperatura, principalmente no estado sólido. Desta forma, qualquer mecanismo de

degradação que possa ser acelerado em função do aumento da temperatura pode ser considerado uma via termolítica. Como exemplo dessas vias termolíticas, temos: hidrólise/desidratação, isomerização/epimerização, descarboxilação, rearranjos e alguns tipos de reações de polimerização (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

No guia de estabilidade do ICH é sugerido que o estudo de degradação forçada inclua o efeito da temperatura em incrementos de 10 °C acima das condições de temperatura preconizadas para o estudo de estabilidade acelerada, ou seja, deve-se empregar temperaturas tais como 60 °C, 70°C e assim por diante, até que se obtenha uma degradação satisfatória (10% a 30%) (ICH-Q1A(R2), 2003).

Baertschi e colaboradores (2005) sugerem, com base na avaliação da literatura e das considerações sobre cinética de reação, que a utilização de temperaturas de 70 °C (sob baixas e altas umidades relativas), podem proporcionar uma avaliação rápida e razoavelmente previsível das vias de degradação e estabilidades relativas da maioria dos fármacos no estado sólido (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

3.3.4 Degradação fotolítica (fotólise)

A degradação fotolítica é resultante da exposição do IFA à luz ultravioleta ou visível na faixa de comprimento de onda compreendida entre 300 e 800 nm. A exposição à radiação em comprimentos de onda inferiores a 300 nm não é necessária porque um produto farmacêutico não seria submetido a essa exposição durante o seu ciclo de vida (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

A primeira lei da fotoquímica, que foi estabelecida por Grotthus e Draper em 1818 e por isso também conhecida como “Lei Grotthus-Draper” traz a seguinte afirmação: “apenas a radiação que é absorvida por uma molécula pode efetivamente produzir mudanças químicas na molécula” (NAVARATHAM, 2004). Dessa forma, conclui-se que as taxas de fotodegradação são diretamente dependentes da quantidade de radiação incidente e da quantidade de radiação que é absorvida pelo IFA ou demais constituintes da formulação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

De acordo com o guia de fotoestabilidade do ICH (Q1B) existem dois tipos de estudos: testes confirmatórios e estudos de degradação forçada. Os testes confirmatórios são aqueles realizados sob condições padronizadas com o objetivo de fornecer as informações necessárias para a manipulação, embalagem e rotulagem. Nesses testes, o mínimo de exposição recomendada pelo guia é de 1,2 milhões de lux.h (visível) e 200 watt.h/m² (ultravioleta). Já os estudos de degradação forçada são realizados para avaliar a fotossensibilidade do composto com o objetivo de desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade e para elucidar as vias de degradação do fármaco (ICH-Q1B, 1996). Este guia não traz recomendações relacionadas à intensidade de exposição quando se trata de estudos de degradação forçada, porém, uma publicação de um dos membros do grupo de trabalho do guia ICH Q1B recomenda a utilização de uma exposição de três a cinco vezes a radiação mínima utilizada nos testes confirmatórios (ANDERSON, 1996).

3.4 Métodos indicativos de estabilidade

Para acompanhar os resultados provenientes dos estudos de estabilidade em medicamentos é necessária a utilização de um método indicativo de estabilidade. O principal objetivo de um método indicativo de estabilidade é monitorar os resultados durante os estudos de estabilidade, a fim de garantir a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos (CIONE; TONHI; SILVA, 2007).

De acordo com o guia do *Food and Drug Administration* (FDA), publicado em 2000, um método indicativo de estabilidade é um procedimento analítico quantitativo validado que pode detectar as alterações com o tempo das propriedades relevantes do IFA e do medicamento. O método indicativo de estabilidade é capaz de mensurar com precisão e exatidão o(s) princípio(s) ativo(s), sem a interferência dos produtos de degradação, impurezas de processo, excipientes ou outras potenciais impurezas. (FDA, 2000).

O método indicativo de estabilidade pode ser de natureza específica ou seletiva. O método específico é aquele que produz resposta para um único analito, ou seja, por meio deste método consegue-se medir, inequivocamente o fármaco na presença dos produtos de degradação, excipientes e aditivos, que se espera que estejam

presentes na formulação. O método seletivo é aquele capaz de mensurar qualitativa e quantitativamente o fármaco e também os outros componentes presentes (impurezas e produtos de degradação) na amostra (BAKSHI; SINGH, 2002). Os métodos seletivos são os mais recomendados pelas agências reguladoras, uma vez que todos os produtos de degradação formados são bem separados uns dos outros e, portanto, há possibilidade de analisar simultaneamente e quantitativamente o fármaco, bem como os produtos de degradação (KATS, 2005).

Na consulta pública nº 68/2014, também é feita diferenciação e classificação dos métodos indicativos de estabilidade, de acordo com seu objetivo. Assim, um método pode ser indicativo de estabilidade somente para o teor (sendo capaz de quantificar um fármaco em meio aos seus produtos de degradação sem quantificar todos os produtos de degradação relevantes), ou somente para produtos de degradação (sendo capaz de quantificar todos os produtos de degradação relevantes, mas não o fármaco), ou pode ser um método indicativo de estabilidade para ambos os aspectos (capaz de quantificar o fármaco e os produtos de degradação) (BRASIL, 2014[a]).

Bakshi e Singh (2002) descrevem os passos para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade. O ponto de partida consiste em realizar um estudo crítico da estrutura química do IFA, avaliando os grupos funcionais e as prováveis rotas de degradação; o segundo passo consiste em coletar informações sobre suas propriedades físico-químicas, tais como pKa, log P, solubilidade, comprimento de onda de absorção e outros, a fim de selecionar técnicas de separação e detectores adequados. O próximo passo no desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade é a realização de estudos de degradação forçada para gerar os produtos de degradação, seguido pelas tentativas de separar o princípio ativo e os produtos de degradação formados. A etapa seguinte consiste em otimizar as condições do método que resultem na melhor separação e conseqüentemente, em um método seletivo. Os produtos de degradação devem ser identificados, ou seja, ter sua estrutura química elucidada, por meio do seu isolamento, seguido por análises espectrais (espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrofotometria na região do infravermelho), com o objetivo de providenciar os padrões de referência dos produtos de degradação, que serão

necessários na validação do método. O passo final é a validação do método indicativo de estabilidade seguindo os guias regulatórios (BAKSHI; SINGH, 2002).

3.4.1 Técnicas empregadas no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade

Devido à possibilidade de separar vários componentes durante a análise de amostras de estabilidade, métodos cromatográficos têm precedência sobre os métodos convencionais de análise (técnicas titulométricas e espectrofotométricas). A vantagem dos métodos cromatográficos é que estes possuem uma maior precisão e sensibilidade para determinar, até mesmo, pequenas quantidades de produtos de degradação produzidos. Várias técnicas cromatográficas têm sido utilizadas, mas a predominante é a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), em inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) com colunas convencionais, ou seja, que empregam fases estacionárias empacotadas com partículas totalmente porosas de diâmetro entre 3 e 5 μm (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A CLAE é considerada a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios analíticos de indústrias farmacêuticas e químicas (AL-SAYAH *et al.*, 2008). Porém, nos últimos anos, a demanda por métodos de análise rápidos e com elevada eficiência tem crescido significativamente. Cada vez mais existe a necessidade de utilização de métodos que permitam a determinação, com elevada eficiência, de um grande número de analitos, com curto tempo de análise.

Diante dessas necessidades, alternativas estão sendo desenvolvidas para reduzir o tempo e melhorar a eficiência de análises realizadas por CLAE. Uma delas refere-se à substituição das colunas com partículas totalmente porosas tradicionais por colunas com partículas de núcleo fundido. Outra opção é a Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (CLUE), em inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC), na qual as partículas porosas constituintes da fase estacionária possuem diâmetro médio inferior a 2 μm (GUILLARME *et al.*, 2010; PRADO, 2013).

3.4.1.1 Cromatografia a líquido de ultra eficiência – colunas sub 2 µm

Uma técnica que tem se mostrado muito importante diante da necessidade de análises mais rápidas e eficientes é a CLUE, que consiste em uma tecnologia que utiliza colunas de menor tamanho empacotadas com partículas de sílica de diâmetro inferior a 2 µm, proporcionando elevada eficiência cromatográfica, e consequentemente ganho em resolução, sensibilidade e rapidez. Ao benefício da alta eficiência se contrapõe a elevação da pressão do sistema cromatográfico, já que a pressão gerada é inversamente proporcional ao diâmetro das partículas, requerendo utilização de um sistema de CLUE, mais caro e de menor disponibilidade nos laboratórios (SWARTZ, 2005).

O sistema cromatográfico utilizado na CLUE é mais sofisticado, além de suportar pressões de até 15000 psi (cerca de 1000 bar), é equipado com detectores com menor tempo de resposta, maior taxa de aquisição de dados e menor volume interno da célula de detecção. Além disso, deve possuir tubulações de menor comprimento e diâmetro interno, diminuindo assim, o alargamento de bandas por efeito extracoluna (AMPARO, 2011; NGUYEN *et al.*, 2006; MARTINS, 2012).

Em uma revisão sistemática na qual se fez uma comparação entre CLAE e CLUE, houve a demonstração de aspectos importantes de ambas as técnicas revelando que a CLUE consiste em uma evolução tecnológica da CLAE, permitindo importante otimização em termos de resolução e sensibilidade. Os dados obtidos neste levantamento sugerem ainda que a CLUE pode apresentar melhor relação custo-benefício a médio ou longo prazos, além da possibilidade de minimizar o impacto ambiental e ocupacional decorrente do uso de menores volumes de reagentes e amostra, e assim, uma menor quantidade de resíduos gerados, contribuindo para a preservação ambiental (NOGUEIRA *et al.*, 2011; WREN; TCHELITCHEFF, 2006).

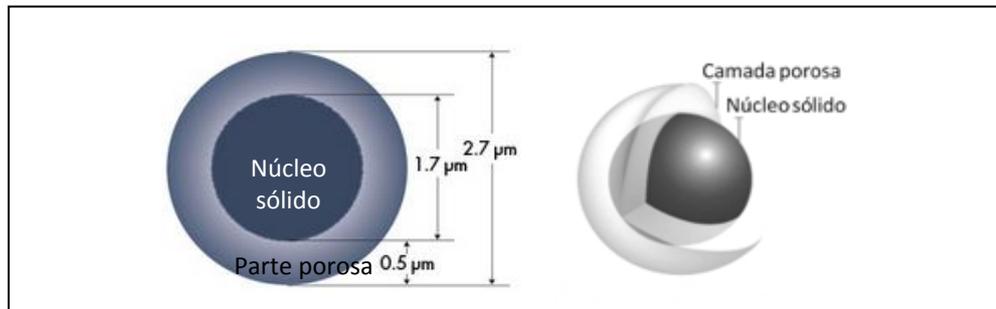
3.4.1.2 Colunas com partículas de núcleo fundido

Uma alternativa que exhibe eficiência comparável às partículas sub 2 µm, porém produzindo pressões inferiores, sendo portanto compatíveis com cromatógrafo a

líquido de alta eficiência, são as colunas com partículas de núcleo fundido (SALISBURY, 2008).

As colunas com partículas de núcleo fundido (**Figura 6**), também conhecidas como “superficialmente porosas”, são constituídas por um núcleo sólido de sílica fundida não poroso, normalmente de 1,7 μm de diâmetro, revestido por uma parte externa porosa com espessura geralmente de 0,5 μm (DESTEFANO; LANGLOIS; KIRKLAND, 2008).

Figura 6 – Representação esquemática de uma partícula de sílica superficialmente porosa.



Fonte: adaptado e traduzido de MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010.

O maior benefício desse tipo de coluna é a possibilidade de redução do tempo de análise, com eficiência cromatográfica comparável à proporcionada por colunas com partículas porosas sub 2 μm e manutenção da pressão em níveis compatíveis com os requeridos por um instrumento de CLAE convencional (400 bar ou 5800 psi) (ABRAHIM *et al.*, 2010; PRADO, 2013).

Em comparação com partículas porosas de diâmetros totalmente semelhantes, o caminho de difusão é muito mais curto, porque o interior do núcleo é composto por sílica fundida sólida, que é impenetrável pelos analitos. O menor caminho de difusão (0,5 μm) facilita a transferência de massa e reduz o caminho intra-partículas, o que contribui para que o efeito de alargamento de bandas seja minimizado. Outra característica a ser destacada é a distribuição homogênea de partículas de mesmo tamanho no leito cromatográfico, reduzindo a difusão turbulenta (GUILLARME *et al.*, 2010).

3.5 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

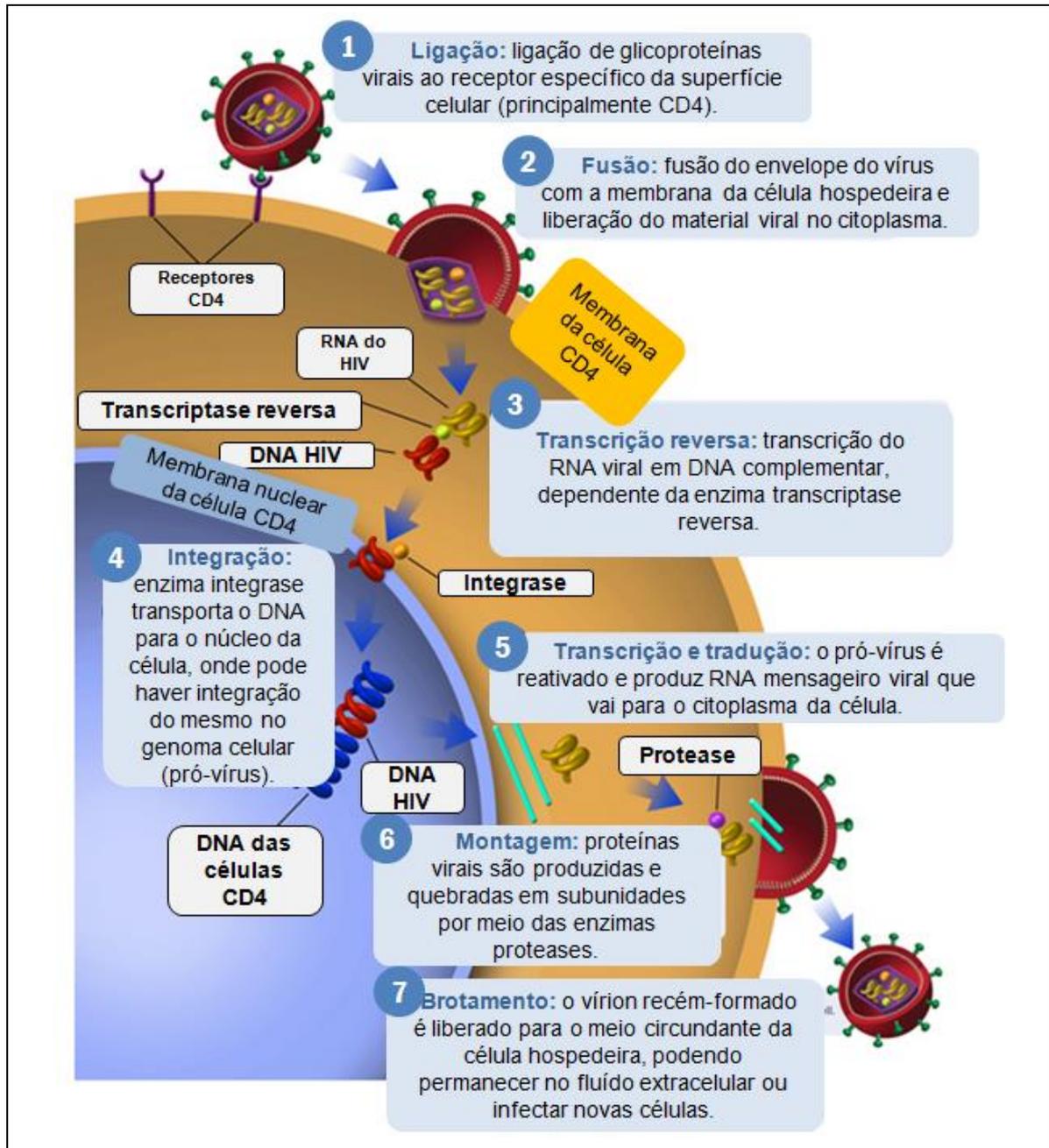
A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é uma doença infectocontagiosa causada por um retrovírus conhecido como vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*). O HIV ataca o sistema imunológico, majoritariamente os linfócitos T CD4+, que são células do sistema imunológico humano que desempenham funções essenciais na imunidade celular e humoral, nas quais as moléculas CD4 atuam como quimiorreceptores e, por consequência, compromete a função de defesa antes exercida por este sistema, deixando o indivíduo mais suscetível às infecções oportunistas (STRYER, 1995). Os vírus se multiplicam alterando o material genético dos linfócitos para criar cópias de si próprios e em seguida, rompem os linfócitos em busca de outros novos para continuar a infecção (BRASIL, 2014[b]).

No genoma (RNA) dos vírus HIV estão codificadas três principais enzimas para a multiplicação viral, são elas: a DNA polimerase RNA-dependente, conhecida como transcriptase reversa; uma protease; e a integrase viral. Após a fusão da dupla camada lipídica do vírus com a da célula hospedeira, o RNA viral penetra no citoplasma, onde sofre replicação, pela ação da enzima transcriptase reversa, produzindo uma fita dupla RNA-DNA de vida curta. O RNA original é degradado permitindo assim a formação de uma cópia do DNA do vírus de filamento duplo. O DNA fita dupla é então transportado até o núcleo da célula, onde é integrado a um cromossomo do hospedeiro pela integrase viral, formando o pró-vírus (GREENE; PETERLIN, 2002; FLEXNER *et al.*, 2012).

Após a sua integração, o pró-vírus representa um componente estável do genoma do hospedeiro, podendo permanecer em estado latente, sem produção de RNA ou proteína, porém sofrendo replicação com a divisão da célula. Quando uma célula infectada pelo vírus é ativada, ocorre produção de RNA e proteínas virais. As proteínas estruturais se organizam em torno do RNA genômico completo, formando um nucleocapsídeo. As proteínas do envelope e demais proteínas estruturais organizam-se na superfície da célula. Os cernes de nucleocapsídeo deslocam-se até esses locais e sofrem brotamento através da membrana celular, formando novas

partículas de HIV com envelope (GREENE; PETERLIN, 2002; FLEXNER *et al.*, 2012). O ciclo de vida do HIV é ilustrado na **Figura 7**.

Figura 7 – Ciclo de vida do vírus HIV.



Fonte: adaptado e traduzido de AIDSinfo, 2014.

Desde o início da epidemia da AIDS, em 1980, até o ano de 2013, cerca de 78.000.000 de pessoas no mundo se infectaram com o vírus HIV, e 39.000.000 de pessoas morreram em decorrência de doenças relacionadas à AIDS. No ano de 2013, constatou-se que 35.000.000 de pessoas eram portadoras do vírus, tendo sido

registrados neste ano, 2.100.000 de novos casos de infecção, um número 38% menor do que o contabilizado em 2001 (UNAIDS, 2014).

Em 2014, segundo estimativas do Ministério da Saúde, existiam no Brasil 734.000 pessoas infectadas pelo vírus HIV e, a cada ano, é registrada uma média de 39.700 novos casos. A faixa etária entre 25 e 39 anos concentra o maior número de casos de AIDS, sendo que os homens representam 65,0% e as mulheres 35,0% do total de casos registrados desde 1980. Foram identificados 278.306 óbitos tendo a AIDS como causa básica de morte desde 1980 até dezembro de 2013 no Brasil, sendo a maior parte deles registrados na região sudeste, correspondendo a 61,8%. De acordo com informações do Boletim Epidemiológico HIV AIDS (2014), há uma tendência significativa de queda do índice de mortalidade para o Brasil nos últimos dez anos, o qual passou de 6,1 óbitos para cada 100.000 habitantes em 2004 para 5,7 em 2013, o que representa uma redução de 6,6% (BRASIL, 2014[c]).

Apesar dos intensos esforços científicos em todo o mundo, até o momento não se conhece a cura para a AIDS. Portanto, a instituição da terapia antirretroviral tem por objetivo retardar a progressão da imunodeficiência, possibilitando maior qualidade de vida aos indivíduos portadores do vírus HIV e redução da morbidade, por meio da administração de uma combinação de fármacos antirretrovirais (BRASIL, 2014[b]).

No Brasil, desde 1996 o coquetel antiaids é distribuído gratuitamente pelo Ministério da Saúde a todos que necessitam. As políticas públicas brasileiras para a provisão de assistência à saúde de pacientes infectados pelo HIV têm tido reconhecimento em âmbito mundial, principalmente em decorrência das ações de garantia do acesso universal e gratuito aos antirretrovirais. Atribui-se a essas políticas parte do sucesso do tratamento, com reflexos na redução da mortalidade e internações devido ao HIV em anos recentes (ENÉAS, 2014; GOMES *et al.*, 2009).

Os antirretrovirais são fármacos que agem em diferentes alvos moleculares, dentre esses, destacam-se as enzimas importantes para o ciclo de replicação do vírus, sendo elas a transcriptase reversa, protease e integrase (YARCHOAN *et al.*, 1991). Atualmente, existem seis classes de agentes antirretrovirais (**Tabela 3**). As características exclusivas dos antirretrovirais consistem na administração ininterrupta

desses agentes durante toda a vida do indivíduo, para controlar a replicação do vírus, bem como na possibilidade do rápido aparecimento de resistência permanente a esses fármacos, se não forem utilizados de modo apropriado (FLEXNER *et al.*, 2012).

Tabela 3 – Classes e mecanismos de ação dos medicamentos antirretrovirais.

Classe	Mecanismo de ação	Fármacos
Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR)	Bloqueiam a replicação do genoma viral tanto inibindo competitivamente a incorporação dos nucleotídeos nativos quanto interrompendo o alongamento do DNA pró-viral em formação.	Abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina, zidovudina
Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa (INtTR)		Tenofovir
Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR)	Induzem uma alteração de configuração na estrutura tridimensional da enzima transcriptase reversa, reduzindo a sua atividade acentuadamente, atuando, dessa maneira, como inibidores não competitivos.	Efavirenz, nevirapina, etravirina
Inibidores da protease (IP)	Atuam na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV.	Atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir
Inibidores da fusão (IF)	Impedem a entrada do vírus na célula e, por isso, ele não pode se reproduzir.	Enfuvirtida
Inibidores da integrase (INN)	Bloqueiam a atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do DNA do HIV ao DNA humano. Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células.	Raltegravir

Fonte: adaptado de BRASIL, 2014[b] e FLEXNER *et al.*, 2012.

O Ministério da saúde pública, periodicamente, protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV, nos quais são propostos tratamentos para a terapia inicial com base na experiência médica, nos resultados de estudos clínicos, nas atualizações do conhecimento científico e na disponibilidade de novos medicamentos. A primeira linha de tratamento recomenda a combinação de três antirretrovirais, sendo um INTR em associação com um INtTR e um INNTR (lamivudina, tenofovir e enfavirenz), bem como a utilização de dois INTR em associação com um INNTR. Como tratamento de segunda linha, nas situações em que o uso de um INNTR esteja impossibilitado, recomenda-se a substituição do

mesmo por um IP potencializado com adjuvante farmacológico ritonavir, associado a dois INTR (BRASIL, 2014[b]).

A utilização da terapia combinada de antirretrovirais vem mostrando resultados positivos em todos os países nos quais os pacientes infectados pelo HIV têm acesso a esses medicamentos. É recomendado o início imediato após o diagnóstico de infecção por HIV (BRASIL, 2014[b]).

3.6 Nevirapina

Aprovada pelo FDA em 1996 para o tratamento da AIDS, a nevirapina foi o primeiro medicamento da classe dos inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa. Os INTR ligam-se a uma bolsa da transcriptase reversa do HIV (essa bolsa não é essencial para a função da enzima e tem a sua localização distante do sítio ativo), dessa forma, esses fármacos induzem uma alteração de configuração na estrutura tridimensional da enzima, reduzindo a sua atividade acentuadamente, atuando, assim, como inibidores não competitivos (FLEXNER *et al.*, 2012).

Este fármaco é a segunda escolha da classe dos INTR para o esquema antirretroviral, de modo que a nevirapina é utilizada preferencialmente em alternativa ao efavirenz em casos de contraindicação ou intolerância ao mesmo. É considerada uma opção segura, efetiva, e de baixo custo, além de ser produzida pela indústria nacional (BRASIL, 2014[b]).

Além disso, a nevirapina é indicada no esquema triplo em gestantes e profilaxia da transmissão vertical do vírus HIV. Durante a gestação o efavirenz é contraindicado por possuir potencial teratogênico, nesses casos, a sua substituição pela nevirapina é recomendada (BRASIL, 2014[b]).

A nota técnica nº 388/2012, publicada pelo Ministério da Saúde em 28 de setembro de 2012, introduz a nevirapina ao esquema de quimioprofilaxia da transmissão vertical do HIV para recém-nascidos de mães vivendo com HIV/AIDS que não receberam tratamento antirretroviral durante a gestação (BRASIL, 2012).

Alguns estudos, como os realizados por Maggi e colaboradores (2011) e por Podzamczar e colaboradores (2011), demonstram um melhor perfil metabólico relacionado ao uso de nevirapina, caracterizado por redução dos níveis de lipoproteína de baixa densidade, do inglês *Low Density Lipoproteins* (colesterol LDL) e aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade, do inglês *High Density Lipoproteins* (colesterol HDL), o que se torna uma boa alternativa para uso em pacientes diabéticos, portadores de coronariopatia, ou indivíduos com elevado risco cardiovascular, quando comparado ao uso de efavirenz (BRASIL, 2014[b]; MAGGI *et al.*, 2011; PODZAMCZER *et al.*, 2011). Em contrapartida, a nevirapina está associada ao maior risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade, portanto, não sendo indicada para pacientes hepatopatas (BRASIL, 2014[b]).

A nevirapina consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), no anexo II, que diz respeito aos medicamentos do componente estratégico da assistência farmacêutica, e está disponível nas formas farmacêuticas de comprimido (200 mg) e suspensão oral (10 mg/mL) (BRASIL, 2013[a]).

3.6.1 Farmacocinética

A nevirapina é bem absorvida, e a sua biodisponibilidade não é alterada pela presença de alimentos ou antiácidos. O fármaco atravessa facilmente a placenta e o leite materno, uma característica que incentivou o seu uso para prevenção da transmissão vertical do HIV (FLEXNER *et al.*, 2012; MIROCHNICK *et al.*, 1998).

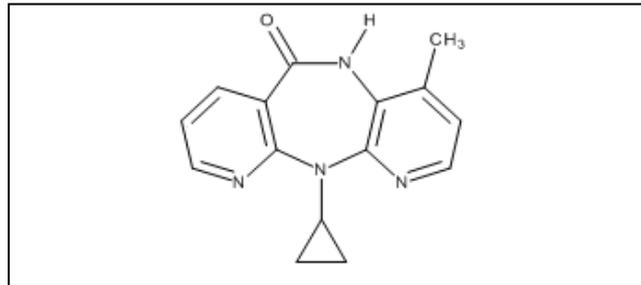
A nevirapina é eliminada principalmente por metabolismo hepático, sendo biotransformada em vários metabólitos hidroxilados, via metabolismo oxidativo do citocromo P450. A via principal de excreção é a renal (81,3% dos metabólitos hidroxilados conjugados ao ácido glicurônico na urina). Trata-se de um fármaco indutor moderado das CYP, incluindo a CYP3A4, dessa forma induz o seu próprio metabolismo, com conseqüente redução da meia-vida de 45 horas após a primeira dose para 25-30 horas depois de duas semanas. Para compensar essa redução, recomenda-se que a administração durante os primeiros 14 dias seja de uma dose de 200 mg uma vez ao dia e, em seguida, a dose é então aumentada para 200 mg duas vezes ao dia (400 mg/dia) (MEDICINANET, 2015).

Os picos de concentração plasmática da nevirapina, de $2 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ($7,5 \mu\text{M}$) são atingidos quatro horas após a administração de uma dose única de 200 mg. O estado de equilíbrio com concentrações de nevirapina de $4,5 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$ ($17 \pm 7 \mu\text{M}$) é atingido com dose de 400 mg/dia (MEDICINANET, 2015).

3.6.2 Propriedades físico-químicas

Quimicamente, a nevirapina (11-ciclopropil-5,11-diidro-4-metil-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-ona), **Figura 8**, é descrita pela fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ e possui massa molar de 266,30 g/mol (BUDAVARI, 1995).

Figura 8 – Estrutura química do IFA nevirapina.



Este IFA pode existir sob duas formas pseudopolimórficas, anidra e hemi-hidratada. A forma anidra é utilizada no desenvolvimento dos comprimidos, devido à sua maior solubilidade aquosa intrínseca ($90 \mu\text{g/mL}$ a 25°C), por não se mostrar higroscópica e a conversão na forma hemi-hidratada não ocorrer mesmo em amostras expostas a 92% de umidade relativa durante 24 meses a 30°C (SCIENTIFIC DISCUSSION VIRAMUNE, 2015; PEREIRA, 2007).

A nevirapina é fornecida na forma de base livre, sendo um fármaco lipofílico (Log P 83) e pKa igual a 2,8, caracterizando-se como uma base fraca (BUDAVARI, 1995; SCIENTIFIC DISCUSSION VIRAMUNE, 2015).

3.7 Métodos analíticos para determinação de nevirapina

Apesar de não estar presente na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010), monografias para controle de qualidade contendo métodos analíticos para

determinação de nevirapina em IFA e produtos acabados (comprimidos e suspensão oral) estão presentes na Farmacopeia Brasileira 4ª edição (FARMACOPEIA, 1988) e nas principais farmacopeias internacionais, dentre elas, Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2015), Farmacopeia Europeia (THE EUROPEAN, 2010), Farmacopeia Britânica (BRITISH, 2014) e Farmacopeia Internacional (THE INTERNATIONAL, 2015). É apresentado na **Tabela 4** um resumo dos parâmetros e métodos de análises farmacopeicos existentes para doseamento da nevirapina.

Ao analisar a **Tabela 4** é possível perceber que na maioria dos métodos analíticos compendiais para determinação de nevirapina a fase móvel é constituída por um modificador orgânico e um tampão não volátil (tampão fosfato), além disso, muitas vezes são utilizadas colunas modificadas. Em relação à detecção, são propostos diversos comprimentos de onda para análise da nevirapina. Apenas na Farmacopeia Internacional (THE INTERNATIONAL, 2015) há monografia para comprimidos em dose fixa combinada contendo nevirapina em associação com outros dois fármacos antirretrovirais (lamivudina e zidovudina).

Tabela 4 – Métodos farmacopeicos para determinação do teor de nevirapina em IFA e produto acabado (comprimidos e suspensão oral).

Farmacopeia	Matriz	Técnica	Fase móvel	Fase estacionária	Vazão (mL/min)	Eluição	Temperatura do forno	Deteção
Farmacopeia Brasileira 4ª edição (FARMACOPEIA, 1988)	IFA (anidra)	CLAE	Tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,0 e acetonitrila (60:40 v/v)	C ₈ , 4,6 mm x 250 mm, 3 a 10 µm	0,8	Isocrática	Ambiente	UV 237 nm
			IFA (anidra e hemi-hidratada)	CLAE	Acetonitrila e tampão fosfato de amônio monobásico 0,025 M (1:4 v/v)	Coluna capeada modificada com grupos alquil amida 4,6 mm x 150 mm,	1,0	Isocrática
Farmacopeia Americana 38ª edição (THE UNITED, 2015)	Comprimidos	CLAE	Acetonitrila e água (23:77 v/v)	C ₁₈ , 3,9 mm x 150 mm, 5 µm	1,0	Isocrática	-	UV 214 nm
			Suspensão oral	CLAE	Acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico	Coluna com grupos nitrila, 4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm Pré-coluna com grupos nitrila, 4,6 mm x 125 mm, 3,5 µm	1,5	Gradiente

Legenda:

CLAE = Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência.

IFA = Insumo Farmacêutico Ativo.

UV = Ultravioleta.

/continua

Tabela 4 – Métodos farmacopeicos para determinação do teor de nevirapina em IFA e produto acabado (comprimidos e suspensão oral) – Continuação.

Farmacopeia Britânica (BRITISH, 2014)	IFA (anidra)	CLAE	Acetonitrila e solução de dihidrogênio fosfato de amônio, pH 5,0 (20:80 v/v)	Coluna modificada com grupos hexadecilamidilsilil, 4,6 mm x 150 mm, 5 µm	1,0	Isocrática	35 °C	UV 220 nm
	IFA (hemi- hidratada)	CLAE	Acetonitrila e tampão acetato de amônio pH 5,0	Coluna capeada C ₁₈ , 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm	0,7	Gradiente	40°C	UV 282
Farmacopeia Europeia (THE EUROPEAN, 2010)	IFA (anidra)			Idem Farmacopeia Britânica				
Farmacopeia internacional (THE INTERNATIONAL, 2015)	IFA (nevirapina anidra e hemi- hidratada)	CLAE	Acetonitrila:solução de di-hidrogênio fosfato de amônio 3,6 g/L pH 5 (20:80 v/v)	Coluna modificada com grupos hexadecilamidilsilil, 4,5 mm x 150 mm, 5 µm	1,0	Isocrática	35 °C	UV 220 nm
	Comprimidos	CLAE Espectro- fotometria UV	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA
	Suspensão oral	CLAE	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA	Idem IFA
	Comprimidos de zidovudina, lamivudina e nevirapina	CLAE	Metanol e tampão acetato de amônio pH 4,5	Coluna modificada com grupos octil e octadecilsilanos 4,5 mm x 250 mm, 5 µm	1,3	Gradiente	-	UV 270 nm

Legenda:

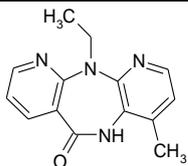
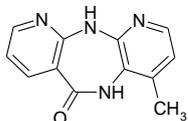
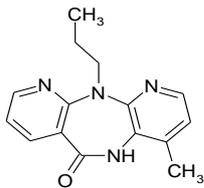
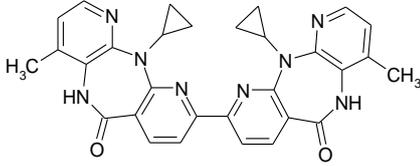
CLAE = Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência.

IFA = Insumo Farmacêutico Ativo.

UV = Ultravioleta.

Na monografia para controle de qualidade de nevirapina insumo farmacêutico ativo da Farmacopeia Americana 38ª edição (THE UNITED, 2015), são descritas duas substâncias relacionadas (nevirapina substância relacionada A e B). Nas Farmacopeias Internacional (THE INTERNATIONAL, 2015) e Europeia (THE EUROPEAN, 2010), além das substâncias relacionadas A e B, é descrita também a substância relacionada C e, na Farmacopeia Britânica (BRITISHI, 2014) além dessas, é descrita ainda a substância relacionada D. A estrutura molecular, fórmula molecular e massa molar desses compostos são apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Substâncias relacionadas da nevirapina descritas nas farmacopeias internacionais.

Substância relacionada	Estrutura molecular	Fórmula molecular	Massa molar
A		C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O	254,29 g/mol
B		C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O	226,23 g/mol
C		C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O	268,24 g/mol
D		C ₃₀ H ₂₄ N ₈ O ₂	528,27 g/mol

Fonte: adaptado de THE UNITED, 2015; THE INTERNATIONAL, 2015; THE EUROPEAN, 2010 e BRITISHI, 2014.

Além dos compêndios oficiais, encontram-se descritos na literatura vários métodos para quantificação de nevirapina isoladamente ou associada a outros fármacos antirretrovirais, em diferentes matrizes como comprimidos e plasma humano utilizando CLAE (BICHALA; RAO, 2015; HEESWIJK *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000). Foram encontrados também, métodos para análise da nevirapina e outros

antirretrovirais em plasma humano utilizando CLUE (ANTUNES *et al.*, 2011; ELENS *et al.*, 2009). Há também na literatura, métodos intitulados indicativos de estabilidade, ou seja, que permitem a determinação simultânea da nevirapina e dos produtos de degradação formados em condições de degradação forçada, conforme apresentado a seguir.

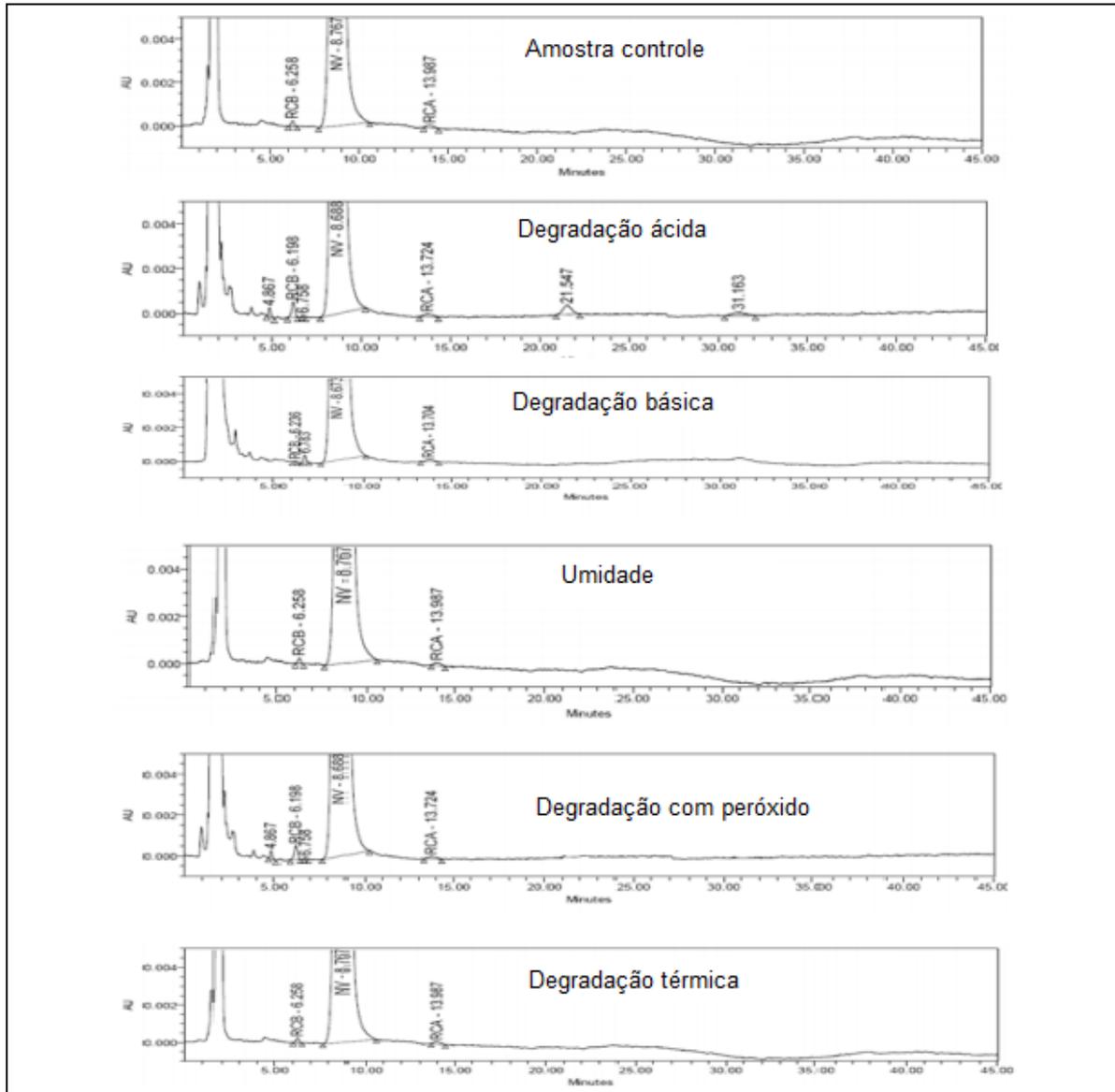
Um método indicativo de estabilidade para nevirapina IFA e comprimidos foi desenvolvido e validado por Kaul e colaboradores (2004) utilizando cromatografia em camada delgada de alta eficiência. A nevirapina foi submetida à hidrólise ácida/alcalina, oxidação, calor seco, calor úmido e fotodegradação. Observou-se a formação de produtos de degradação em meio ácido, alcalino e oxidativo. Os produtos de degradação formados foram bem resolvidos do princípio ativo, com valores de fator de retenção (R_f) significativamente distintos. A degradação forçada foi realizada expondo a amostra a HCl 5 M, NaOH 5 M, ambos sob refluxo a 70 °C, durante uma hora; peróxido de hidrogênio a 6% (p/v) e 50% (p/v), em banho-maria fervente durante 10 minutos e em seguida as amostras foram submetidas a refluxo a temperatura de 80 °C, durante duas horas; o pó do comprimido foi submetido a aquecimento a 100 °C durante 56 horas e o fármaco diluído em metanol foi submetido a refluxo a 100 °C, durante duas horas; amostra foi exposta também a luz solar direta durante 112 horas (KAUL *et al.*, 2004).

Aparna e colaboradores (2010) desenvolveram um método indicativo de estabilidade para comprimido de dose fixa combinada contendo lamivudina, zidovudina e nevirapina, utilizando CLAE de fase reversa, com eluição em gradiente. O método desenvolvido foi capaz de separar todos os IFAs, as substâncias relacionadas e impurezas já conhecidas dos mesmos. Um produto de degradação desconhecido, formado durante exposição das amostras ao estudo de estabilidade acelerado, foi isolado por meio de CLAE preparativa e, baseado em dados espectrais, a estrutura deste produto de degradação foi elucidada. Por meio dos resultados obtidos com espectrometria de massas, nos quais a zidovudina e o produto de degradação principal mostraram dois íons de fragmentação (íons filhos) semelhantes, concluiu-se que a impureza estava relacionada com a zidovudina. A partir de então, foram analisados espectros de ressonância magnética nuclear para hidrogênio e carbono e identificação dos principais grupos funcionais pela análise do espectro de absorção

no infravermelho do produto de degradação. Por fim propuseram um mecanismo de formação para este produto (APARNA *et al.*, 2010).

Navaneethan e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade, de acordo com diretrizes do ICH, utilizando CLAE de fase reversa, seletivo para nevirapina em comprimidos de dose fixa combinada, seus compostos relacionados A e B e os produtos de degradação formados quando o comprimido foi submetido a condições de degradação forçada. Para verificar a seletividade do método, ou seja, verificar se seria capaz de separar a nevirapina, seus produtos de degradação e componentes da matriz, submeteram os comprimidos a aquecimento a 80 °C, 85% de umidade relativa, luz (254 nm), meio ácido (HCl 0,1 M), meio alcalino (NaOH 0,1 M) e peróxido de hidrogênio 3% (v/v). Para o calor, luz e umidade, o período de exposição foi de dois dias e para ácido, base e peróxido foi de seis horas. Não foi observada degradação da amostra quando submetida às condições de umidade e calor; um produto de degradação foi observado em meio alcalino, formaram-se quatro picos de produtos de degradação em meio ácido e na amostra submetida a peróxido de hidrogênio formaram-se dois produtos de degradação. Todos esses produtos de degradação são classificados pelos autores como desconhecidos. Os picos referentes aos produtos de degradação, substâncias relacionadas e à nevirapina apresentaram resolução de no mínimo 1,2. As porcentagens de degradação do princípio ativo obtida em todas as condições de degradação forçada foram inferiores a 5%. Os cromatogramas obtidos após exposição da amostra a condições de estresse são apresentados na **Figura 9**. Os autores do estudo também injetaram os demais fármacos da dose fixa combinada (lamivudina e zidovudina) e seus compostos relacionados (zidovudina composto relacionado B, impureza diastereoisomérica da lamivudina, ácido salicílico e timina). O método foi capaz de quantificar a nevirapina na presença de todos esses analitos. A separação foi realizada por meio de uma eluição isocrática utilizando-se coluna Supelcosil ABZ® (4,6 mm x 150 mm, 5 µm) e fase móvel composta por tampão fosfato de amônio monobásico pH 4,5 e acetonitrila (70:30 v/v), vazão de 1,2 mL/min, temperatura da coluna de 30 °C, volume de injeção de 50 µL, detector ultravioleta em 220 nm e tempo de corrida de 45 minutos. A concentração da solução de trabalho utilizada foi de 240 µg/mL de nevirapina (NAVANEETHAN; KARUNAKARAN; ELANGO, 2012).

Figura 9 – Cromatogramas obtidos com as amostras submetidas à degradação forçada no estudo de Navaneethan e colaboradores (2012).



Legenda: NV = Nevirapina. RCA = Nevirapina substância relacionada A. RCB = Nevirapina substância relacionada B.

Fonte: adaptado e traduzido de NAVANEETHAN; KARUNAKARAN; ELANGO, 2012.

Sahoo e colaboradores (2013) propuseram um método indicativo de estabilidade para a nevirapina IFA e comprimidos utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência de fase reversa, com eluição isocrática, coluna Thermo Hypersil BDS® C₁₈ e fase móvel constituída por tampão dihidrogênio fosfato de amônio pH 2,5 e metanol (50:50 v/v). Realizaram estudos de degradação forçada com o intuito de avaliar a seletividade do método desenvolvido. Para isso, amostras de nevirapina foram expostas a peróxido de hidrogênio 3% (v/v), ácido clorídrico a 0,1 M a 40°C e a hidróxido de sódio a 0,1 M a 40 °C, ambos durante quatro horas. As porcentagens

de degradação obtidas em cada condição são apresentadas na **Tabela 6**. Apenas na condição oxidativa foi observada a formação de um pico referente a produto de degradação (SAHOO *et al.*, 2013).

Tabela 6 – Resultados dos estudos de degradação forçada obtido por Sahoo e colaboradores (2013).

Agente degradante	Concentração inicial (µg/mL)	Concentração final (µg/mL)	% degradação*
H ₂ O ₂ 3% (v/v)	100,10	69,66	30,40
HCl 0,1 M	100,20	85,43	14,74
NaOH 0,1 M	100,64	82,82	17,70

*% degradação = [(concentração inicial - concentração após degradação forçada) / concentração inicial] x 100

Fonte: adaptado e traduzido de SAHOO *et al.*, 2013.

Apesar do significativo número de métodos desenvolvidos e já descritos na literatura e em compêndios oficiais para a nevirapina IFA e produtos acabados, poucos podem ser considerados método indicativo de estabilidade e em nenhum destes são utilizadas técnicas modernas de análise que promovem elevada eficiência e rapidez de separação como CLUE e coluna de núcleo fundido.

Além disso, um estudo detalhado e completo abrangendo estudos de degradação forçada em todas as condições exigidas nas legislações, ou seja, estudos realizados com o IFA, produto acabado e placebo e que promova degradação superior a 10% e que sejam testadas todas as condições de estresse, incluindo meio ácido, alcalino, neutro, oxidativo, fotodegradação, degradação térmica, por íons metálicos e pela umidade; que envolva o desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade utilizando técnicas rápidas de separação, sem a utilização de tampões ou com utilização de tampões voláteis (compatíveis com espectrometria de massas); realização de estudo da cinética de degradação; caracterização estrutural e propostas de mecanismos de formação dos produtos de degradação para o IFA e comprimidos de nevirapina ainda não encontra-se descrito na literatura. Com o objetivo de suprir essa lacuna, o presente trabalho foi proposto e desenvolvido.

4 CAPÍTULO I: TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRA EFICIÊNCIA

4.1 Materiais

4.1.1 Substância química de referência, IFA e comprimidos

- Nevirapina anidra substância química de referência (SQR) disponibilizada pela Farmacopeia Americana (USP) lote F0D159 e teor de 99,70%.
- Nevirapina anidra IFA padronizado a partir da nevirapina SQR, fabricado por Zhejiang Huahai Pharmaceuticals Co., Ltd, lote MP2013100087 e teor de 99,94%.
- Nevirapina anidra IFA fabricado por Zhejiang Huahai Pharmaceuticals Co., Ltd, lote MP2012050083.
- Comprimidos contendo 200 mg de nevirapina (Nevirax[®]), lote Pi007/14, fabricados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED).
- Mistura de excipientes (placebo) utilizada na fabricação dos comprimidos, cujos componentes e suas respectivas funções farmacotécnicas são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Excipientes utilizados na fabricação do comprimido Nevirax[®].

Matéria-prima	Função farmacotécnica¹
Polivinilpirrolidona K-30 (PVPK-30)	Aglutinante
Glicolato amido sódico	Desintegrante
Lactose monohidratada	Diluyente
Celulose microcristalina 102	Aglutinante/diluyente
Dióxido de silício coloidal	Deslizante
Estearato de Magnésio	Lubrificante

¹A função farmacotécnica de cada excipiente foi determinada com base na quantidade utilizada de cada excipiente na produção de um lote industrial do comprimido Nevirax[®], de acordo com ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009.

4.1.2 Reagentes

- Água ultrapura.
- Reagentes grau analítico: acetato de amônio Synth (Diadema, Brasil), ácido acético glacial Vetec (Duque de Caxias, Brasil), ácido clorídrico Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), álcool etílico anidro (etanol) Sigma Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos da América - EUA), azobisisobutironitrila (AIBN) Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), brometo de potássio Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), cloreto de metileno (diclorometano) Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), hidróxido de sódio Mallinckrodt (Xalostoc, México), nitrato de prata Vetec (Duque de Caxias, Brasil), peróxido de hidrogênio Synth (Diadema, Brasil) e sulfato de cobre pentahidratado Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Solventes grau CLAE: acetonitrila J. T. Baker (Xalostoc, México) e metanol Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

4.1.3 Materiais e vidrarias

- Coluna cromatográfica ZORBAX Eclipse Plus[®], Agilent, C₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,8 µm).
- Frasco tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm de tamanho de poro.
- Hastes de metal verticais para suporte e garras.
- Kit para filtração a vácuo.
- Membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm, SARTORIUS.
- Pipeta automática P1000 GILSON e ponteiros de 1000 µL para uso em micropipetas.
- Placas de petri.
- Tubos de ensaio com tampa.

4.1.4 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.

- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.
- Banho-maria FULL GAUGE TIC-17C.
- Bomba de vácuo LABOPORT KNF N842.
- Câmara de estabilidade modelo KBF-720 WEISS.
- Câmara de fotoestabilidade modelo Pharma 500 L WEISS.
- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência WATERS ACQUITY® UPLC com software Empower.
- Espectrofotômetro SHIMADZU FTIR IR Prestige-21.
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800.
- Estufa NABERTHERM TR 60.
- Pastilhador de prensa hidráulica SHIMADZU SSP-10A.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIENT Q3.
- Software Excel® 2007.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da solubilidade da nevirapina

A solubilidade da nevirapina foi avaliada, separadamente, em água, etanol, acetonitrila, metanol, ácido clorídrico 1 M, cloreto de metileno (diclorometano), hidróxido de sódio 1 M, peróxido de hidrogênio 3% (v/v) e sulfato de cobre 0,05 M.

Para este procedimento, pesaram-se cerca de 10 mg do IFA e transferiram-se para erlenmeyer de 125 mL, alíquotas crescentes do solvente foram adicionadas até a completa solubilização do IFA. Após cada adição do solvente, agitou-se o erlenmeyer manualmente e, em seguida, o mesmo foi deixado em banho de ultrassom durante 1 minuto. Nos casos em que um volume de 100 mL de solvente não provocou solubilização, classificou-se o IFA como não solúvel nesse determinado solvente. O teste foi realizado em temperatura ambiente.

4.2.2 Identificação por espectrofotometria no infravermelho e no ultravioleta

O espectro de absorção na região do infravermelho da nevirapina foi obtido na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} . Foram preparadas pastilhas de nevirapina SQR e IFA, pesando-se 300 mg de brometo de potássio de grau espectroscópico e 1 mg de nevirapina. O pó foi misturado e levado para prensa manual para preparação da pastilha. Obteve-se espectro na região do infravermelho para a nevirapina SQR e para o IFA. Os espectros foram comparados para confirmar a identidade da amostra.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm para nevirapina SQR e IFA. Determinaram-se os comprimentos de onda em que ocorrem os máximos de absorção. As soluções de nevirapina SQR e IFA foram preparadas pesando-se 25 mg de nevirapina e transferindo-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila, após solubilização com o auxílio de ultrassom, completou-se o volume para 25 mL com água e diluiu-se com este solvente até obter solução a 20 $\mu\text{g/mL}$ de nevirapina. A solução branco foi constituída por uma mistura de acetonitrila e água nas mesmas proporções utilizadas para o preparo das amostras.

4.2.3 Testes de degradação forçada

Para o preparo das amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo, utilizou-se acetonitrila como cossolvente. Para verificar a quantidade de acetonitrila necessária para solubilizar 25 mg de nevirapina utilizados nas preparações amostras submetidas aos estudos de degradação forçada, adicionou-se acetonitrila de 1 mL em 1 mL a 25 mg de nevirapina IFA e levou-se a preparação para ultrassom durante 50 minutos, até que se formasse uma solução ou seja, uma preparação totalmente límpida e transparente, sem a presença de partículas visíveis.

Foram realizados também testes utilizando metanol como cossolvente para verificar possível existência de produtos de degradação secundários irreais, provenientes da reação entre a acetonitrila e o agente estressante. Então, procedeu-se ao mesmo preparo de amostra e à mesma exposição, com a única diferença de utilizar metanol no lugar da acetonitrila.

Com o objetivo de verificar a extensão da degradação e as propostas de mudança nas condições inicialmente utilizadas para que fosse atingida uma degradação da nevirapina de, no mínimo 10%, realizaram-se inicialmente testes preliminares de degradação forçada, submetendo o IFA, o produto acabado (comprimidos) de nevirapina e o placebo às condições de hidrólise ácida, alcalina, neutra, presença de íons metálicos, umidade, degradação térmica, fotolítica e oxidação com peróxido de hidrogênio e AIBN. As condições de degradação, tais como a concentração do agente estressante, bem como o tempo e temperatura de exposição foram aumentadas gradativamente até se conseguir a porcentagem de degradação desejada ou até que se alcançasse uma condição considerada extrema de estresse e, portanto, não mais condizente com situações reais às quais o fármaco e o medicamento poderiam ser expostos.

Para conhecer a natureza das amostras, mediu-se o pH das soluções resultantes, após a adição dos agentes degradantes. Optou-se por não realizar a neutralização das amostras antes da análise cromatográfica, uma vez que a neutralização não é recomendada devido à possibilidade de provocar precipitação ou reações secundárias (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005). Contudo, antes de injetar as amostras no cromatógrafo, as mesmas foram diluídas.

Os agentes estressantes, diluentes e fase móvel empregados no teste de degradação forçada também foram avaliados isoladamente, visando identificar os sinais cromatográficos provenientes dos mesmos, para que esses sinais não fossem confundidos com produtos de degradação.

As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo foram analisadas sempre em duas concentrações, 40 e 1000 µg/mL. O preparo da solução padrão de nevirapina, das amostras controle do IFA, comprimidos e placebo, bem como as amostras de IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação forçada são descritas a seguir.

4.2.3.1 Solução padrão de nevirapina

Para o preparo da solução padrão de nevirapina, pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina IFA padronizado e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 µg/mL de nevirapina. Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, em seguida, completou-se o volume com água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 40 µg/mL de nevirapina. Filtrou-se esta solução e injetou-se em sextuplicata no cromatógrafo.

4.2.3.2 Amostras de controle do IFA, comprimidos e placebo

Para o preparo da amostra controle do IFA, pesou-se, exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 µg/mL de nevirapina. Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, completou-se o volume com água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 40 µg/mL de nevirapina. Filtrou-se ambas as soluções (1000 µg/mL e 40 µg/mL de nevirapina) e injetou-se em triplicata no cromatógrafo.

Para o preparo da amostra controle do produto acabado (comprimidos), determinou-se o peso médio de 20 comprimidos de nevirapina, que foram triturados em seguida. Transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, quantidade de pó equivalente a, exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina. Em seguida, realizou-se o mesmo procedimento descrito para o preparo da amostra controle do IFA.

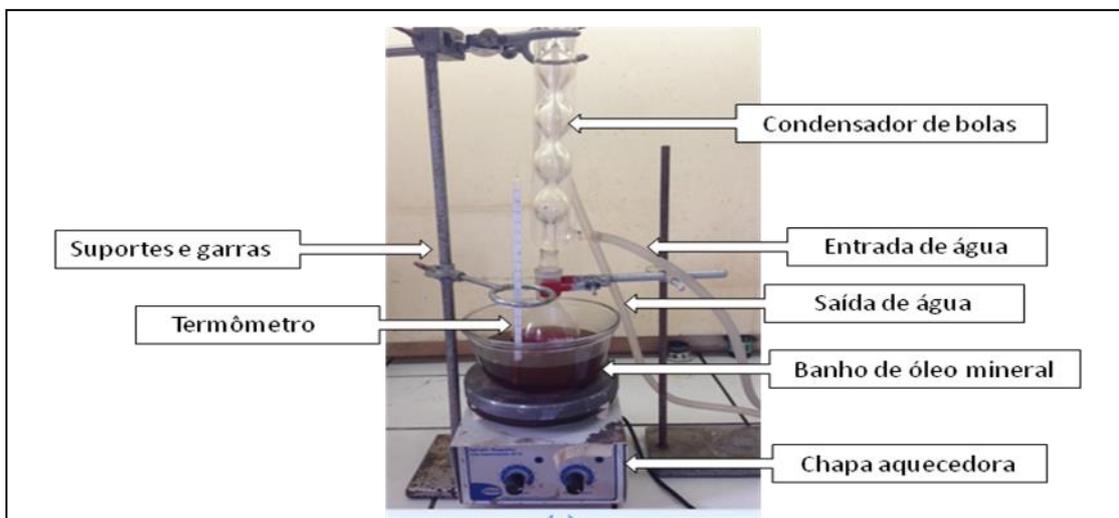
A amostra controle do placebo foi preparada da mesma forma que a amostra controle dos comprimidos, porém, no lugar do pó do comprimido, foram pesados 75 mg do pó proveniente da mistura dos excipientes que compõem o comprimido.

4.2.3.3 Degradação em meio ácido

Optou-se por iniciar os testes de degradação em meio ácido, submetendo as amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo a condições mais brandas de degradação, ou seja, utilizando ácido clorídrico (HCl) a 0,1 M e, em seguida, realizou-se testes utilizando ácido clorídrico mais concentrado, a 1 M. Os testes foram realizados à temperatura ambiente, em sistema de refluxo a cerca de 80 °C e em banho-maria a 50 °C. Os tempos de exposição foram variados, até que se conseguisse uma degradação significativa (10% a 30%) da nevirapina e formação de produtos de degradação.

As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação ácida foram preparadas da seguinte maneira: pesaram-se o equivalente 25 mg de nevirapina e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando ácido clorídrico (HCl 0,1 M ou HCl 1 M) e homogeneizou-se. Nos casos em que o teste foi realizado à temperatura ambiente, as amostras foram armazenadas sob abrigo da luz. Nos casos em que a amostra foi submetida a refluxo, transferiu-se todo o conteúdo do balão volumétrico para um balão de fundo redondo com rosca esmerilhada de 250 mL contendo um agitador magnético em seu interior, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado em um banho de óleo mineral a 80 °C, aquecido por uma chapa aquecedora, conforme ilustrado na **Figura 10**.

Figura 10 – Sistema de refluxo com condensador de bolas utilizado para os testes preliminares de degradação forçada da nevirapina IFA, comprimidos e placebo.



Nos casos em que as amostras foram colocadas em banho-maria a 50 °C, o conteúdo do balão volumétrico foi transferido para um tubo de ensaio de 25 mL com tampa, o qual foi colocado no equipamento de banho-maria.

Após a submissão dessas amostras a tempos variados, e após esfriamento, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, em seguida, completou-se o volume com água e homogeneizou-se. Ambas as soluções (a 1000 µg/mL e a 40 µg/mL de nevirapina) foram filtradas e injetadas em triplicata no cromatógrafo.

4.2.3.4 Degradação em meio alcalino

Os testes de degradação em meio alcalino (meio básico) foram iniciados submetendo-se as amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo a condições mais brandas de degradação, ou seja, utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e, em seguida, realizou-se testes utilizando hidróxido de sódio mais concentrado, a 1 M e a 5 M. Os testes foram realizados à temperatura ambiente, em sistema de refluxo a cerca de 80 °C e em banho-maria a 50 °C. Os tempos de exposição foram variados, até que se conseguisse uma degradação significativa ou então concluísse que a nevirapina é estável à hidrólise em meio alcalino. As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação em meio alcalino foram preparadas de maneira semelhante às amostras submetidas à degradação em meio ácido (item 4.2.3.3, página 68), porém, utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M, 1 M e 5 M) no lugar do ácido clorídrico.

4.2.3.5 Degradação em meio neutro (água)

Os testes de degradação em meio neutro foram iniciados submetendo-se as amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo a condições mais brandas de degradação, ou seja, primeiro realizaram-se testes à temperatura ambiente, em seguida as amostras foram expostas a 50 °C em banho-maria e por fim foram submetidas a refluxo a cerca de 80 °C. Os tempos de exposição foram variados, até que se conseguisse uma degradação significativa ou então concluísse que a nevirapina é estável à hidrólise em meio neutro. As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação em meio neutro foram preparadas

de maneira semelhante às amostras submetidas à degradação em meio ácido (item **4.2.3.3**, página 68), porém, utilizando-se água no lugar do ácido clorídrico.

4.2.3.6 Degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio

Os testes foram realizados submetendo-se as amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo à oxidação com peróxido de hidrogênio nas concentrações de 3% (v/v) e 30% (v/v). Os ensaios foram feitos à temperatura ambiente e em banho-maria a 50 °C, este último para acelerar a degradação da nevirapina. Os tempos de exposição foram variados, até que se conseguisse uma degradação significativa (10% a 30%) e formação dos produtos de degradação. As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação em meio oxidativo foram preparadas de maneira semelhante às amostras submetidas à degradação em meio ácido (item **4.2.3.3**, página 68), porém, utilizando-se peróxido de hidrogênio (3% v/v e 30% v/v) no lugar do ácido clorídrico.

4.2.3.7 Degradação oxidativa com AIBN

Para o preparo da solução de AIBN, pesaram-se exatamente, cerca de 617 mg de AIBN e transferiram-se para um balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de 60 mL de acetonitrila. Deixou-se em banho de ultrassom até completa solubilização (cerca de 20 minutos) e após esfriar, adicionou-se 15 mL de metanol e em seguida completou-se o volume para 100 mL utilizando água e homogeneizou-se.

As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação oxidativa utilizando AIBN foram preparadas da seguinte maneira: pesaram-se o equivalente 25 mg de nevirapina (75 mg de placebo) e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando solução de AIBN e homogeneizou-se. O conteúdo do balão volumétrico foi transferido para um tubo de ensaio de 25 mL com tampa, o qual foi colocado em banho-maria a 50 °C, durante sete dias.

4.2.3.8 Degradação com íons metálicos

Para verificar a estabilidade da nevirapina frente a íons metálicos, submeteu-se as amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo à reação com sulfato de cobre (CuSO_4) na concentração de 0,05 M. Os testes foram realizados à temperatura ambiente e em banho-maria a 50°C. O tempo de exposição foi de 14 dias. As amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo submetidas à degradação com íons metálicos foram preparadas de maneira semelhante às amostras submetidas à degradação em meio ácido (item 4.2.3.3, página 68), porém, utilizando-se sulfato de cobre 0,05 M no lugar do ácido clorídrico.

4.2.3.9 Degradação pela umidade

O IFA, o pó dos comprimidos e o placebo foram pesados e expostos em placas de petri, na câmara de estabilidade com temperatura de 30 ± 2 °C e uma umidade relativa de $75 \pm 5\%$, durante 45 dias. Após essa exposição, pesaram-se o equivalente 25 mg de nevirapina e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando água e homogeneizou-se. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com água e homogeneizou-se. Filtraram-se ambas as soluções (a mais concentrada a 1000 µg/mL e a diluída a 40 µg/mL de nevirapina) e injetou-se em triplicata no cromatógrafo.

4.2.3.10 Degradação térmica

O pó do IFA, dos comprimidos e placebo foram colocados em placas de petri e estas ficaram em estufa a 80 °C durante 7 dias. Após essa exposição, o preparo das amostras foi realizado conforme descrito para as amostras expostas à umidade relativa elevada (item 4.2.3.9, página 72).

4.2.3.11 Fotodegradação

Para o estudo de fotodegradação, as amostras em forma de pó do IFA, comprimidos e placebo foram pesados em duplicata, transferidas para placas de petri, e

submetidas à degradação na câmara de fotoestabilidade. A exposição foi de três ciclos a mais do que é exigido nas legislações de fotoestabilidade (ICH-Q1B, 1996), ou seja, as amostras foram expostas a 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m² (ultravioleta). Após essa exposição, o preparo das amostras foi realizado conforme descrito para as amostras expostas a umidade relativa elevada (item 4.2.3.9, página 72).

4.2.4 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando cromatografia a líquido de ultra eficiência

Com a finalidade de estabelecer as condições cromatográficas que resultassem na separação satisfatória entre a nevirapina e os produtos de degradação formados no estudo de degradação forçada, realizou-se, inicialmente, gradientes exploratórios com fase móvel constituída por água e acetonitrila. A corrida exploratória consistiu em realizar um gradiente com composição de 5% a 95% de modificador orgânico ao longo de um tempo de corrida de 60 minutos. As condições cromatográficas para a realização dos gradientes exploratórios são descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Condições cromatográficas dos gradientes exploratórios para eluição da nevirapina e dos produtos de degradação formados.

Parâmetros	Condições
Coluna	ZORBAX Eclipse Plus® C ₁₈ , 2,1 x 100 mm, 1,8 µm
Composição da fase móvel	Acetonitrila: água – eluição gradiente
Comprimento de onda	254 nm
Vazão da fase móvel	0,2 mL/min
Gradiente	0-60 minutos → 5 a 95% de acetonitrila
Temperatura do forno	30 °C
Tempo da corrida	60 minutos
Volume de injeção	5 µL

A partir dos resultados obtidos com as corridas exploratórias, vários métodos com eluição em gradiente foram propostos, alterando-se os tempos, vazão da fase móvel e temperatura, até que se conseguisse uma separação satisfatória entre a nevirapina e os produtos de degradação formados no estudo de degradação forçada. Para o desenvolvimento desses métodos com eluição em gradiente, testaram-se duas fases móveis diferentes: além da fase móvel constituída por

acetonitrila e água, testou-se outra fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,0 (ajustado com ácido acético glacial) e acetonitrila para verificar se os parâmetros cromatográficos, tais como fator de assimetria, número de pratos teóricos e resolução melhorariam.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Solubilidade da nevirapina

Os termos descritivos da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010), conforme **Tabela 9** foram utilizados para expressar a solubilidade da nevirapina. O termo parte refere-se ao número de mililitros de solvente necessário para solubilizar 1 g da substância. Por exemplo, para que uma substância seja considerada facilmente solúvel em um solvente, 1 g da mesma deve se dissolver em 1 a 10 mL do solvente. Como a massa de amostra pesada de nevirapina IFA foi de 10 mg, o volume de solvente utilizado foi proporcional à quantidade da amostra.

Tabela 9 – Termos descritivos de solubilidade e seus significados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: adaptado de FARMACOPEIA, 2010.

De acordo com a Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2015), a nevirapina é praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e em metanol. A forma hidratada também é pouco solúvel em propilenoglicol. De acordo com a Farmacopeia Europeia (THE EUROPEAN, 2010), a nevirapina anidra é praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel ou pouco solúvel em cloreto de metileno (diclorometano) e pouco solúvel em metanol.

Os volumes de solventes necessários para solubilizar 10 mg de nevirapina estão descritos na **Tabela 10**. A nevirapina foi classificada como praticamente insolúvel ou insolúvel em água; pouco solúvel em acetonitrila, ácido clorídrico 1 M, cloreto de metileno, etanol e metanol; muito pouco solúvel em hidróxido de sódio 1 M e praticamente insolúvel ou insolúvel em peróxido de hidrogênio 3% (v/v) e em sulfato de cobre 0,05 M. As classificações de solubilidade obtidas estão de acordo com as especificações presentes na monografia de nevirapina da Farmacopeia Americana e na Farmacopeia Europeia (THE UNITED, 2015, THE EUROPEAN, 2010).

Tabela 10 – Volumes de cada solvente necessário para a solubilização de 10 mg da nevirapina e respectiva classificação da solubilidade.

Solvente	Volume necessário	Classificação
Água	Não solubilizou em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Acetonitrila	7 mL	Pouco solúvel
Ácido clorídrico 1 M	5 mL	Pouco solúvel
Cloreto de metileno	3 mL	Pouco solúvel
Etanol	4 mL	Pouco solúvel
Hidróxido de sódio 1 M	23 mL	Muito pouco solúvel
Metanol	4 mL	Pouco solúvel
Peróxido de hidrogênio 3% (v/v)	Não solubilizou em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Sulfato de cobre 0,05 M	Não solubilizou em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel

4.3.2 Identificação da nevirapina por espectrofotometria no infravermelho

Os espectros obtidos para a nevirapina SQR e IFA foram sobrepostos para confirmar a identidade da amostra (**Figura 11**). A sobreposição dos dois espectros demonstra que se tratam da mesma substância, uma vez que possuem bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com intensidades semelhantes.

As principais bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho para a nevirapina SQR e IFA, bem como as atribuições relativas aos grupos funcionais da molécula, são apresentadas na **Tabela 11**.

Figura 11 – Espectros de absorção na região do infravermelho da nevirapina SQR (em preto) e nevirapina IFA (em vermelho).

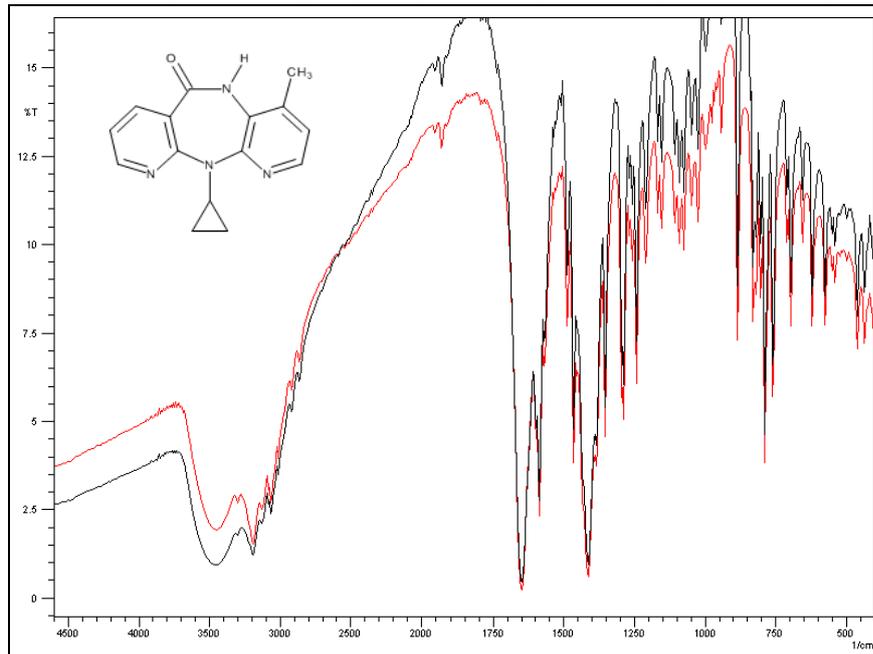


Tabela 11 – Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho da nevirapina IFA e SQR.

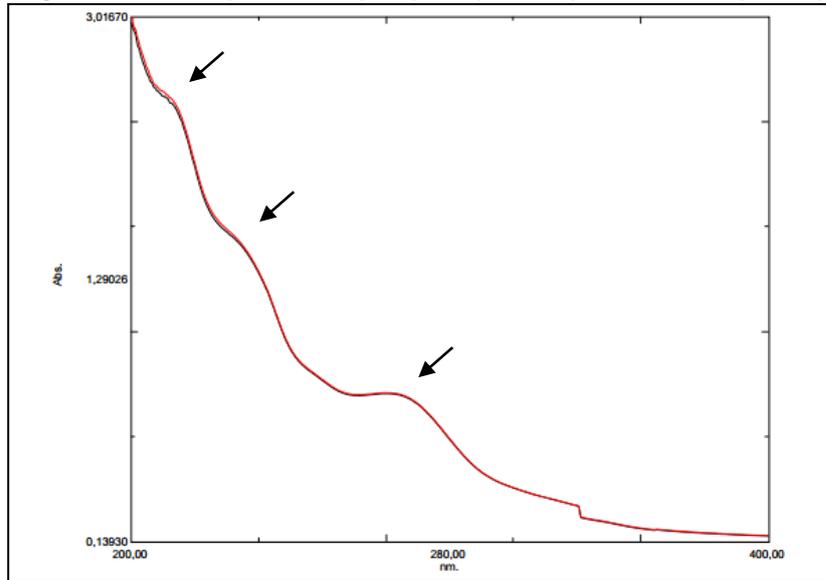
Número de onda	Atribuição e grupo funcional
1466 cm^{-1}	Deformação axial da ligação dupla carbono-carbono de compostos aromáticos
1585 cm^{-1}	Deformação axial da ligação dupla carbono-carbono de compostos aromáticos
1647 cm^{-1}	Deformação axial da ligação carbono-oxigênio de amida
3100 cm^{-1}	Deformação axial da ligação carbono-hidrogênio de aromático (carbono sp^2)
3450 cm^{-1}	Deformação axial da ligação nitrogênio-hidrogênio de amida

4.3.3 Identificação da nevirapina por espectrofotometria no ultravioleta

O espectro de absorção no ultravioleta obtido na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm a partir das soluções de nevirapina SQR e IFA a 20 $\mu\text{g/mL}$ em acetonitrila e água foram obtidos, sendo comparados os máximos de absorvância. Verificou-se sobreposição dos dois espectros, demonstrando que se tratam da mesma substância (**Figura 12**).

Os comprimentos de onda máximos de absorção obtidos para a nevirapina foram de 214 nm, 240 nm e 282 nm.

Figura 12 – Espectros de absorção na região do ultravioleta das soluções de nevirapina SQR (em preto) e IFA (em vermelho) a 20 µg/mL.



4.3.4 Estudos de degradação forçada

Apesar de ser exigido na legislação brasileira uma degradação mínima de 10% do IFA, não fica explícito como deve ser alcançada essa porcentagem de degradação, ou seja, não é definida qual é a concentração dos agentes estressantes, o tempo durante o qual a amostra deve ser exposta aos degradantes, nem a temperatura a ser utilizada durante os testes de degradação forçada. Por isso, as condições de degradação, tais como a concentração do agente estressante, o tempo e a temperatura de exposição foram aumentadas gradativamente até se conseguir a porcentagem de degradação desejada ou até que se alcançasse uma condição considerada extrema de estresse e, portanto, não mais condizente com situações reais às quais o fármaco e medicamento poderiam ser expostos.

Como dito anteriormente, as amostras de nevirapina foram analisadas sempre em duas concentrações (40 e 1000 µg/mL). Considerou-se interessante injetar as amostras de nevirapina em uma concentração mais elevada (1000 µg/mL), para a completa visualização dos produtos de degradação, uma vez que os picos referentes aos produtos de degradação podem ser pouco intensos. Porém, nessa concentração alta, não é possível quantificar a nevirapina, pois há formação de um pico com “platô”. Então, para a quantificação, ou seja, para se conhecer o teor do princípio ativo remanescente após o teste de degradação forçada, realizou-se uma

diluição para que fosse possível determinar a concentração da nevirapina após a submissão das amostras aos agentes estressantes.

A solução padrão de nevirapina foi utilizada para a quantificação da nevirapina remanescente após os testes de degradação forçada. E as amostras controle, seja do IFA, do produto acabado ou do placebo, foram utilizadas para verificar como seria o cromatograma quando as amostras não são submetidas aos agentes estressantes. Dessa forma, foi possível comparar o cromatograma obtido com as amostras controles e as amostras provenientes do estudo de degradação forçada e assim identificar inequivocamente, os picos referentes aos produtos de degradação, que surgiram após exposição da amostra aos agentes degradantes.

O peso médio encontrado para os comprimidos de nevirapina utilizados no estudo de degradação forçada foi de 793,33 mg.

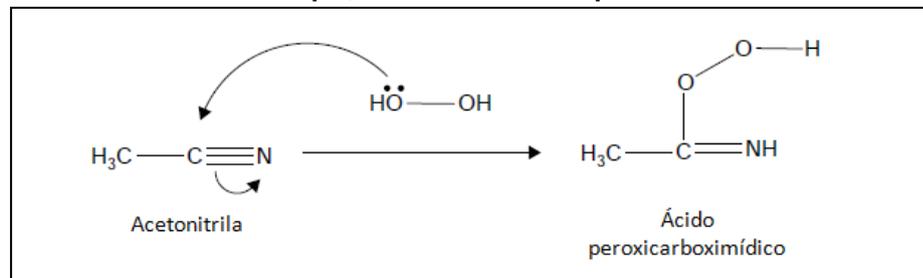
4.3.4.1 Utilização de cossolvente e pH das amostras

Um problema que é frequentemente encontrado ao se planejar um estudo de degradação forçada consiste na solubilidade do IFA. É o que acontece com a nevirapina, que é praticamente insolúvel em água (THE UNITED, 2015; THE EUROPEAN, 2010). Então, nesses casos, deve-se utilizar uma suspensão do fármaco no teste de degradação ou deve-se lançar mão de um artifício que consiste na utilização de um solvente auxiliar (cossolvente) para facilitar e/ou promover a dissolução do fármaco em condições de baixa solubilidade (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Os dois cossolventes mais empregados em estudos já descritos na literatura para diversos fármacos são a acetonitrila e o metanol. No entanto, é recomendado o uso de acetonitrila, uma vez que o metanol pode participar de reações secundárias, agindo como nucleófilo, podendo assim reagir com sítios eletrofílicos de fármacos que contenham, principalmente, grupamentos de ácido carboxílico, éster ou amida, ou com intermediários da reação e assim formar produtos de degradação secundários, ou seja, irreais. A acetonitrila é considerada um solvente praticamente inerte e deve ser preferencialmente utilizada nos testes de degradação hidrolíticas.

Para os testes com peróxido de hidrogênio, não é recomendado o uso de acetonitrila em pH superior a 7,0, uma vez que em soluções alcalinas, a acetonitrila pode reagir com o peróxido de hidrogênio levando à formação do ácido peroxicarboximídico (**Figura 13**). Esse ácido é mais susceptível ao "ataque nucleofílico" do que o peróxido de hidrogênio ou outro radical peróxido. Dessa forma, ao utilizar acetonitrila em meio alcalino para o teste de oxidação, não seria uma condição real de exposição do IFA, podendo ser formados produtos de degradação secundários que não representam possibilidades de formação nas condições reais, durante o prazo de validade do medicamento (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Figura 13 – Reação entre acetonitrila e peróxido de hidrogênio em elevados valores de pH, formando o ácido peroxicarboximídico.



Fonte: adaptado e traduzido de BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005.

É interessante utilizar a menor quantidade de cossolvente possível para promover a solubilização da amostra, sem, entretanto interferir nos estudos de degradação forçada. Em relação à quantidade de acetonitrila necessária para solubilizar os 25 mg de nevirapina utilizados nos estudos de degradação forçada, concluiu-se que 6 mL de acetonitrila e submissão da amostra durante 50 minutos a banho de ultrassom seriam necessários para promover a solubilização. Entretanto, optou-se por padronizar a utilização de 7 mL de acetonitrila como cossolvente, seguido pela submissão das amostras a banho de ultrassom durante 50 minutos para evitar possíveis problemas de solubilidade durante a realização dos testes de degradação forçada.

Diante dos valores de pH encontrados para as preparações expostas ao estudo de degradação forçada (**Tabela 12**), foi possível confirmar que a utilização de acetonitrila como cossolvente é adequada para os estudos de oxidação com peróxido de hidrogênio, uma vez que o pH resultante das amostras sob degradação do peróxido de hidrogênio é menor que 7,0, independente da concentração do

agente degradante utilizada (3% v/v ou 30% v/v). Portanto, optou-se por utilizar a acetonitrila como co-solvente em todas as condições de estresse.

Tabela 12 – Valores de pH encontrados nas soluções de nevirapina IFA a 1000 µg/mL submetidas aos testes de degradação forçada e das soluções diluídas a 40 µg/mL.

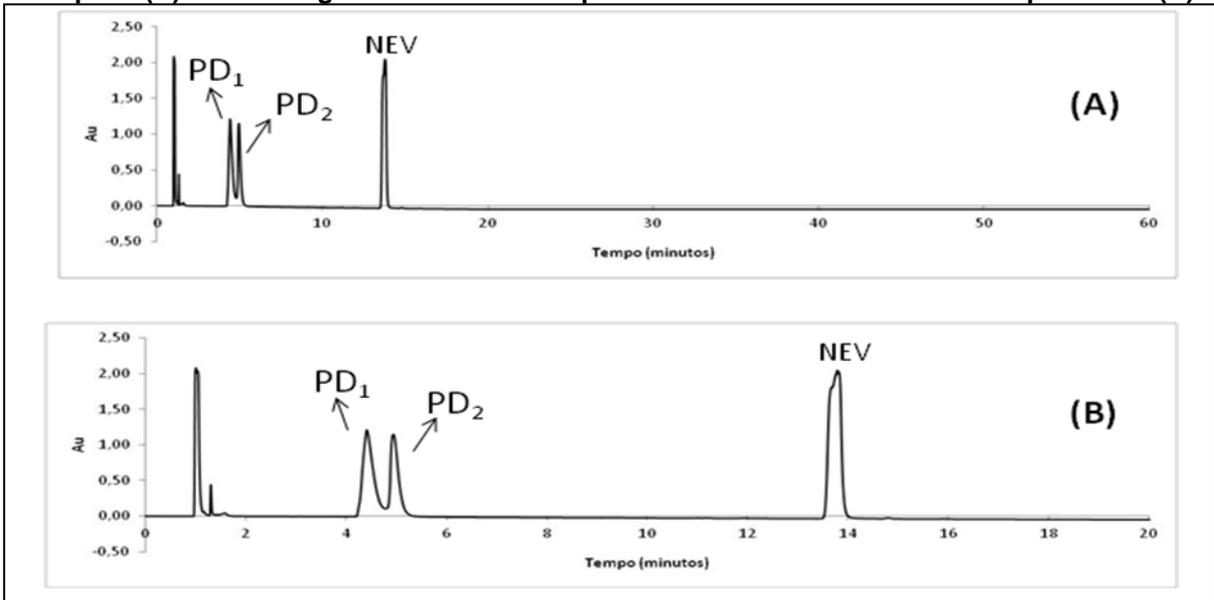
Solução	Valor de pH na solução concentrada a 1000 µg/mL	Valor de pH na solução diluída a 40 µg/mL
IFA + ACN + AIBN 37,6 mM	7,04	7,48
IFA + ACN + CuSO ₄ 0,05 M	4,15	5,02
IFA + ACN + HCl 0,1 M	1,17	2,49
IFA + ACN + HCl 1 M	0,38	1,56
IFA + ACN + H ₂ O ₂ 30% (v/v)	2,51	4,17
IFA + ACN + H ₂ O ₂ 3% (v/v)	3,72	5,17
IFA + ACN + NaOH 0,1 M	13,03	11,32
IFA + ACN + NaOH 1 M	13,89	12,78
IFA + ACN + NaOH 5 M	14,68	12,78

Legenda: ACN = Acetonitrila HCl = Ácido clorídrico
 AIBN = Azobisisobutironitrila IFA = Insumo Farmacêutico Ativo
 CuSO₄ = Sulfato de cobre NaOH = Hidróxido de sódio

4.3.4.2 Degradação em meio ácido

Quando submetida à reação com ácido clorídrico 0,1 M, seja com aquecimento (refluxo ou banho-maria) ou à temperatura ambiente, durante 24 horas, a nevirapina não degrada e não há formação de produtos de degradação. Diante deste resultado, optou-se por aumentar a concentração do ácido clorídrico para 1 M. Então os testes seguintes consistiram na reação do IFA, comprimidos e placebo com HCl 1 M, à temperatura ambiente e sob refluxo a 80°C, durante 24 horas. O resultado obtido pode ser visualizado no cromatograma proveniente do gradiente exploratório (condições descritas na **Tabela 8**, página 73), que evidencia o aparecimento de dois picos (PD₁ e PD₂) referentes a produtos de degradação, quando injetou-se as preparações de IFA e comprimidos concentradas, ou seja, a 1000 µg/mL (**Figura 14**).

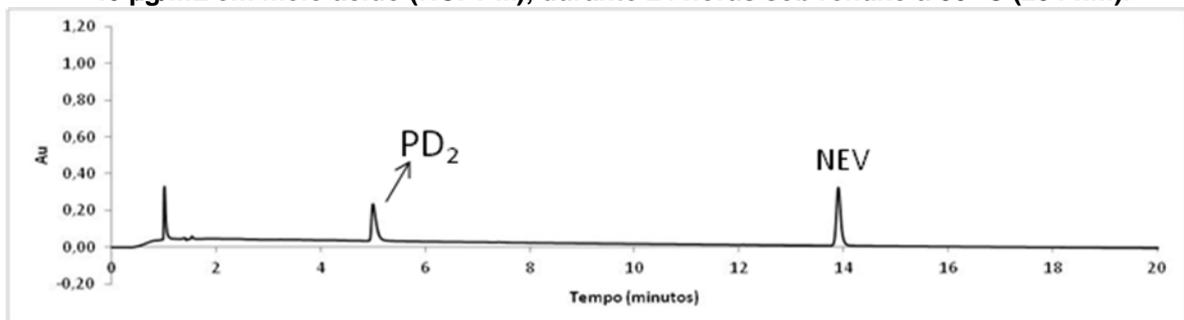
Figura 14 – Cromatogramas do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 8, página 73) obtido na degradação forçada da nevirapina IFA a 1000 µg/mL em meio ácido (HCl 1 M), durante 24 horas sob refluxo a 80 °C (254 nm). Cromatograma da corrida exploratória completa (A) e cromatograma referente aos primeiros 20 minutos da corrida exploratória (B).



Legenda: PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido; NEV = nevirapina.

Apenas um pico referente a produto de degradação (PD₂) apareceu no cromatograma quando injetou-se as preparações diluídas a 40 µg/mL (**Figura 15**). No placebo e no controle não há formação de nenhum outro pico adicional referente a produtos de degradação.

Figura 15 – Cromatograma referente aos 20 primeiros minutos do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 8, página 73) obtido na degradação forçada da nevirapina IFA a 40 µg/mL em meio ácido (HCl 1 M), durante 24 horas sob refluxo a 80 °C (254 nm).



Legenda: PD₂ = produto de degradação proveniente da hidrólise em meio ácido; NEV = nevirapina.

Para justificar o fato de aparecerem dois produtos de degradação nas amostras de nevirapina concentrada, ou seja, a 1000 µg/mL, e apenas um quando essa mesma amostra é diluída a 40 µg/mL, levanta-se a hipótese de que os produtos de

degradação PD₁ e PD₂ na verdade, tratem-se de uma única substância que, em pH muito extremo, como é o da amostra concentrada (pH = 0,38), apresenta-se em duas formas de ionização e por isso possuem tempos de retenção diferentes, então, ao diluir a amostra, o pH aumenta (pH = 1,56) e assim, a molécula se encontrará majoritariamente em uma única forma de ionização, aparecendo no cromatograma como um único pico. De acordo com Dolan (2015), há compostos que existem em duas formas (ionizada e não ionizada) cuja conversão entre elas é muito lenta, ou seja, o tempo de conversão é significativamente mais longo do que os tempos de retenção cromatográficos, de maneira que uma forma pode passar pela coluna cromatográfica antes que seja convertida na outra. Neste caso, dois picos distintos são visualizados no cromatograma (DOLAN, 2015). Não é possível, neste momento, confirmar essas hipóteses, é necessário realizar testes de identificação para verificar as estruturas das moléculas referentes aos produtos PD₁ e PD₂. Portanto, até que se consiga identificar os produtos referentes a esses picos, os mesmos serão tratados como duas substâncias diferentes, uma vez que o objetivo é o desenvolvimento de um método seletivo.

Testou-se também a degradação em meio ácido (HCl 1 M), em banho-maria a 50 °C e verificou-se os mesmos resultados obtidos com o refluxo. Portanto, com o intuito de facilitar a realização dos testes e tornar os estudos de degradação forçada mais seguros, optou-se por utilizar apenas aquecimento por meio do banho-maria e não mais o refluxo no caso da degradação em meio ácido.

4.3.4.3 Degradação em meio alcalino

Os testes de degradação em meio alcalino foram iniciados com a submissão do IFA, comprimidos e placebo a hidróxido de sódio 0,1 M, durante 24 horas sob temperatura ambiente e em banho-maria a 50 °C. Como não foi observada a redução da área sob o pico referente à nevirapina e nem a formação de novos picos, optou-se por utilizar o refluxo a 80 °C, durante 24 horas. Mesmo com o aumento da temperatura não foi observada degradação da nevirapina, então, o próximo passo foi aumentar a concentração de hidróxido de sódio para 1 M. Ainda assim, não foi observada degradação da nevirapina no IFA e nem nos comprimidos. Decidiu-se, então, aumentar o tempo de exposição ao refluxo com hidróxido de sódio 1 M, para

72 horas. Como não foi observada degradação, a última tentativa foi realizar a condição mais drástica proposta por Singh e Bakshi (2000), que consiste na submissão do IFA e comprimidos a hidróxido de sódio 5 M, sob refluxo a 80 °C, durante 24 horas. Ainda assim, não houve degradação da nevirapina e, em consonância com a árvore decisória proposta por Singh e Bakshi (2000) (**Figura 1**, página 36), classificou-se a nevirapina como praticamente estável à degradação em meio alcalino (SINGH; BAKSHI, 2000).

4.3.4.4 Degradação em meio neutro

Os testes degradação em meio neutro, ou seja, com a adição de água, foram iniciados com o IFA e comprimidos em solução durante 24 horas sob temperatura ambiente e em banho-maria a 50 °C. Como não foi observada a redução da área sob o pico referente à nevirapina, optou-se por utilizar o refluxo a 80 °C, durante 24 horas. Mesmo com o aumento da temperatura não foi observada degradação da nevirapina, dessa forma, o próximo passo foi aumentar o tempo de exposição e então, submeteram-se as amostras de nevirapina ao meio neutro durante 14 dias em banho-maria a 50 °C. Mesmo nessa condição, não foi observada degradação da nevirapina, que foi classificada como praticamente estável à degradação em meio neutro (SINGH; BAKSHI, 2000).

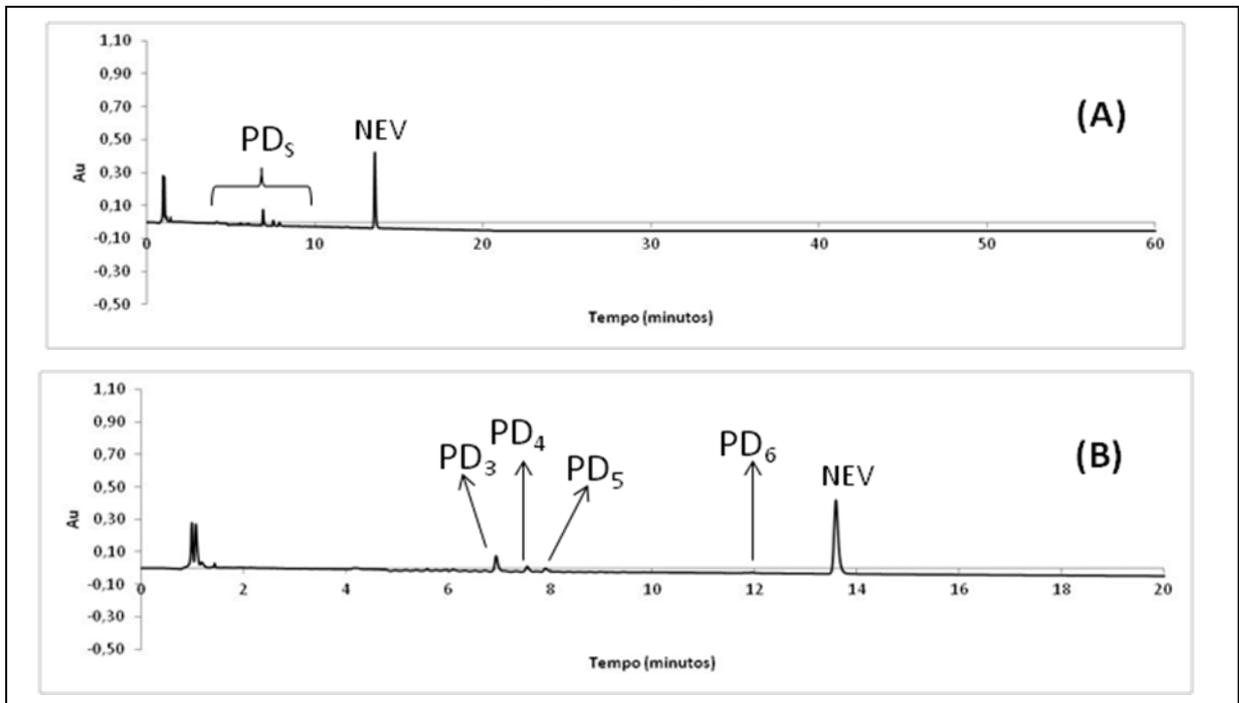
4.3.4.5 Degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio

Os primeiros testes foram realizados submetendo o IFA, produto acabado (comprimidos) e placebo à reação com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e a 30% (v/v), sob temperatura ambiente e sob aquecimento a 50 °C durante 24 horas.

A reação com peróxido de hidrogênio 30% (v/v) sob aquecimento a 50 °C durante 24 horas resultou na degradação de cerca de 50% da nevirapina no IFA e nos comprimidos e a formação de vários produtos de degradação. O peróxido de hidrogênio 30% (v/v) à temperatura ambiente também provocou degradação da nevirapina e formação de produtos de degradação, porém, em menor intensidade. A degradação com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) durante 24 horas a 50 °C resultou em degradação da nevirapina de cerca de 20% no IFA e nos comprimidos e

também a formação de, pelo menos, sete produtos de degradação nas amostras degradadas a 1000 µg/mL, sendo quatro deles principais, pois aparecem também nas amostras diluídas a 40 µg/mL. Na **Figura 16** são mostrados os cromatogramas referentes ao gradiente exploratório para amostras submetidas a peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) durante 24 horas a 50 °C. A degradação com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) durante 24 horas à temperatura ambiente não resultou na formação de produtos de degradação.

Figura 16 – Cromatogramas do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 8, página 73) obtido na degradação forçada da nevirapina comprimidos a 40 µg/mL em meio oxidativo (H₂O₂ 3% v/v), durante 24 horas a 50 °C (254 nm). Cromatograma da corrida exploratória completa (A) e cromatograma referente aos primeiros 20 minutos da corrida exploratória (B).



Legenda: PD₅ = produto de degradação provenientes oxidação com H₂O₂ 3% (v/v); PD₃ a PD₆ = produtos de degradação majoritários formados na oxidação com H₂O₂ 3% (v/v); NEV = nevirapina.

Diante desses resultados, considerou-se a utilização de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) uma condição muito drástica, que poderia estar provocando a formação de produtos de degradação secundários. Dessa forma, a partir de então, optou-se por utilizar nos estudos de degradação oxidativa, apenas o peróxido de hidrogênio a 3% (v/v).

4.3.4.6 Degradação oxidativa com AIBN

De acordo com Baertschi e colaboradores (2005), para que o AIBN atue como um iniciador da auto-oxidação é necessário que o mesmo seja solubilizado em uma mistura de acetonitrila (50% ou mais), água (até 25%) e metanol (10%), e seja mantido a uma temperatura entre 40° e 60°C, durante um período de até uma semana. É recomendado também que a concentração de AIBN seja 10 vezes superior à concentração do IFA na amostra (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Após submissão das amostras à reação com AIBN sob as condições descritas anteriormente (item **4.2.3.7**, página 71), não foi observada redução da área sob o pico da nevirapina e nem a formação de picos referentes a produtos de degradação. Dessa forma, pode-se dizer que a nevirapina é praticamente estável ao mecanismo auto-oxidativo provocado pelo AIBN.

4.3.4.7 Degradação com íons metálicos

A reação das amostras com sulfato de cobre 0,05 M, sob as condições descritas anteriormente (item **4.2.3.8**, página 71), não causou redução da área sob o pico da nevirapina e nem a formação de picos referentes a produtos de degradação. De acordo com a Consulta Pública nº 68/2014, devido à característica catalisadora ou promotora de reações dos íons metálicos, não se considera relevante a variação em sua concentração ou na temperatura de exposição da amostra. O teste deve ser realizado apenas em um parâmetro padrão e, caso não ocorra degradação após um período de duas semanas, o produto é considerado não susceptível a esse tipo de degradação (BRASIL, 2014[a]). Diante do exposto, pode-se considerar a nevirapina praticamente estável à degradação por íons metálicos.

4.3.4.8 Degradação sob umidade elevada

De acordo com o descrito na Consulta Pública nº68/2014, na parte experimental do estudo de degradação forçada, as amostras sem dissolver, ou seja, no estado sólido, devem ser submetidas a ambiente com umidade relativa alta (BRASIL, 2014[a]).

A nevirapina se mostrou praticamente estável à degradação pela umidade, já que quando as amostras foram submetidas a condições de umidade relativa elevada, como descrito anteriormente (item **4.2.3.9**, página 72), não foi observada redução da área sob o pico da nevirapina e nem a formação de picos referentes a produtos de degradação.

4.3.4.9 Degradação térmica

Na Consulta Pública nº68/2014, é exigido a realização de estudos de degradação forçada com aquecimento da amostra e a mesma não deve estar dissolvida (BRASIL, 2014[a]).

Após submissão das amostras a 80 °C durante sete dias, não foi observada redução da área sob o pico da nevirapina e nem a formação de picos referentes a produtos de degradação, concluindo-se que a nevirapina é praticamente estável à termólise.

4.3.4.10 Fotodegradação

Quando as amostras foram submetidas a condições fotolíticas (luz visível e ultravioleta), conforme descrito anteriormente (item **4.2.3.11**, página 72), não houve redução da área sob o pico da nevirapina e nem a formação de picos referentes a produtos de degradação. Nesse caso, pode-se considerar a nevirapina praticamente estável à fotodegradação.

4.3.5 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando cromatografia a líquido de ultra eficiência

Ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, é importante que o mesmo seja seletivo para o fármaco e os produtos de degradação formados e seja compatível com a cromatografia a líquido acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM), ou seja, quando for necessário o uso de tampão, estes devem ser voláteis e utilizados em baixas concentrações (10 mM a 50 mM). Além disso, é interessante utilizar eluição em gradiente (para garantir que compostos com

diferentes polaridades sejam eluídos) e uma ampla faixa de comprimento de onda de detecção (detector de arranjo de diodos - DAD).

As condições utilizadas na maioria dos métodos para doseamento da nevirapina IFA e comprimidos descritos nas farmacopeias internacionais e também nos artigos científicos relacionados à degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para a nevirapina (conforme apresentado no item **3.7**, página 54), não atendem a esses requisitos, uma vez que, na maioria dos casos, as fases móveis são constituída por tampão não volátil (tampão fosfato). Diante disso, ao desenvolver um novo método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação, optou-se por utilizar uma fase móvel que fosse compatível com o espectrômetro de massas, ou seja, que não possuísse tampão ou, se necessário, que o tampão utilizado fosse um tampão volátil. Esse procedimento foi adotado já que o mesmo método desenvolvido para a determinação da nevirapina e seus produtos de degradação seria utilizado para a identificação dos produtos de degradação empregando CLAE-EM/EM.

Os resultados dos testes de degradação forçada mostraram que apenas na condição ácida e oxidativa utilizando peróxido de hidrogênio, ocorre degradação da nevirapina e são formados novos picos referentes a produtos de degradação. As demais condições de degradação forçada não resultaram na redução da área sob o pico da nevirapina e nem na formação de produtos de degradação. Portanto, o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade foi realizado injetando-se amostras dessas duas condições (hidrólise ácida com HCl 1 M e oxidação com peróxido de hidrogênio 3% v/v) e tentando-se obter uma melhor resolução entre os picos da nevirapina e dos produtos de degradação formados. O comprimento de onda escolhido para obtenção dos cromatogramas e quantificação da nevirapina foi 254 nm, pois trata-se de um comprimento pouco seletivo e que é adequado para visualização e quantificação tanto dos produtos de degradação formados quanto da nevirapina.

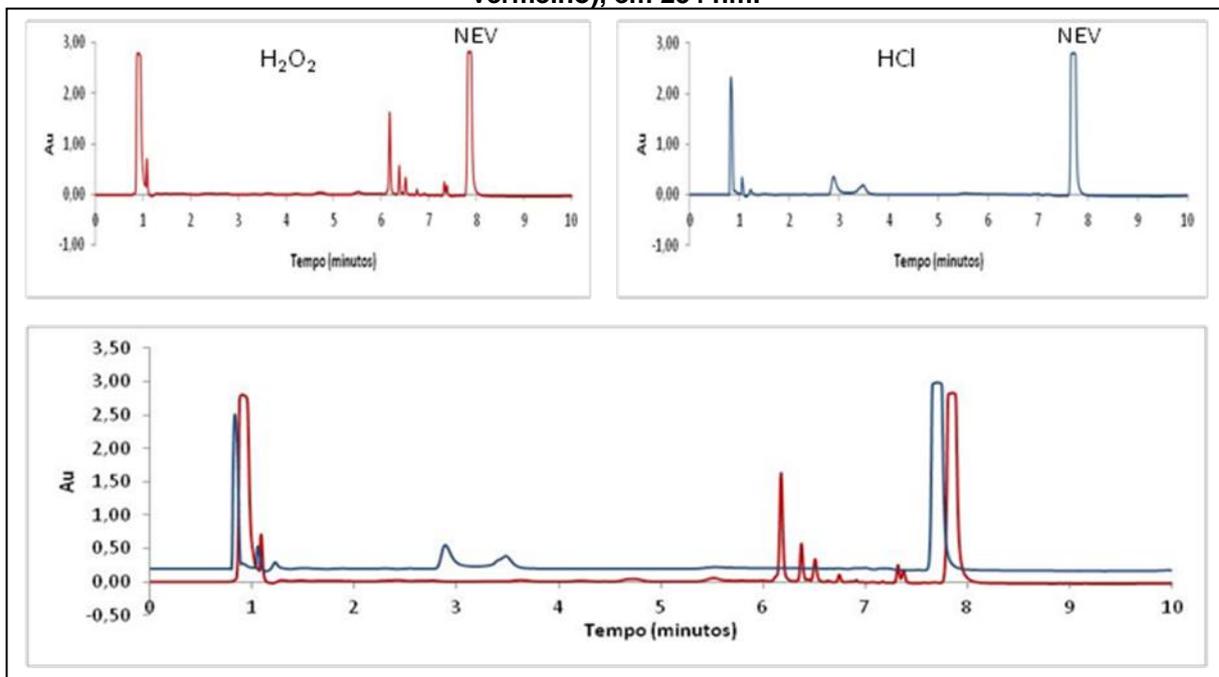
Após o desenvolvimento da eluição em gradiente exploratório, testou-se vários gradientes em busca de uma resolução adequada entre os picos do fármaco e dos produtos de degradação formados. O melhor gradiente obtido inicialmente está

apresentado na **Tabela 13**. A coluna cromatográfica utilizada foi a ZORBAX Eclipse Plus® C₁₈, com 100 mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno, com partículas de 1,8 µm, mantida a 30°C e o volume de injeção foi de 5 µL. A vazão da fase móvel foi de 0,25 mL/min. Os cromatogramas obtidos a partir dessa eluição em gradiente são apresentados na **Figura 17**.

Tabela 13 – Gradiente T5 proposto para a separação dos picos referentes à hidrólise em meio ácido e oxidação com peróxido de hidrogênio.

Tempo (min)	A % (v/v) (fase aquosa)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 4	92%	8%	Isocrática
4 - 5	92% → 80%	8% → 20%	Gradiente linear
5 - 6	80% → 70%	20% → 30%	Gradiente linear
6 - 8	70%	30%	Isocrática
8 - 9	70% → 92%	30% → 8%	Gradiente linear
9 - 10	92%	8%	Re-equilíbrio

Figura 17 – Cromatogramas obtidos a partir do gradiente T5 (Tabela 13), utilizando-se amostras de IFA a 1000 µg/mL provenientes da degradação em meio ácido (HCl 1 M, durante 48 horas a 50°C – em azul) e em peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante 48 horas a 50 °C (em vermelho), em 254 nm.

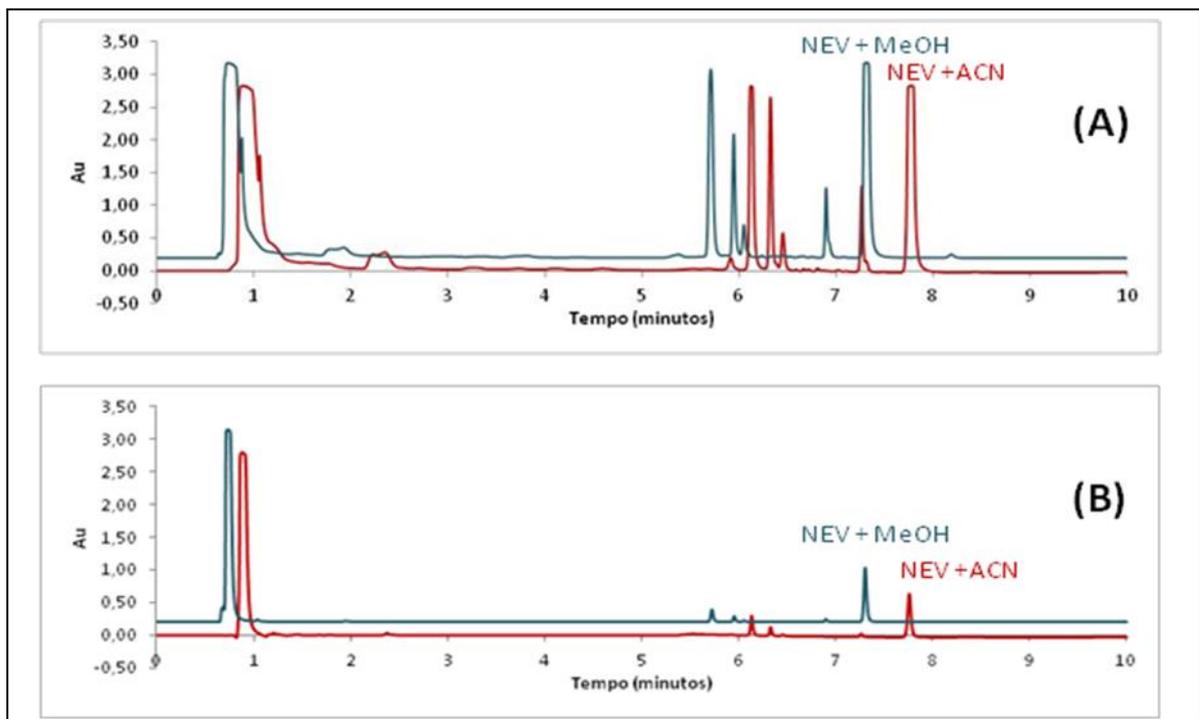


Os cromatogramas desenvolvidos utilizando fase aquosa constituída por água e por tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,0, não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, fator

de cauda e número de pratos teóricos). Diante deste resultado, optou-se por utilizar a fase aquosa constituída por água por ser mais simples e econômica.

A utilização de metanol como cossolvente no lugar da acetonitrila foi testada para verificar a possível ocorrência de reações secundárias. Como pode ser observado na **Figura 18**, ambos cossolventes promovem o mesmo perfil de degradação da nevirapina, com formação dos mesmos produtos de degradação. A única diferença é o menor tempo de retenção dos analitos nas amostras utilizando metanol como cossolvente.

Figura 18 – Cromatogramas obtidos pela degradação da nevirapina IFA a 1000 µg/mL (A) e a 40 µg/mL (B) submetida a peróxido de hidrogênio 30% (v/v) durante 24 horas a 50 °C, utilizando-se metanol (em azul) e acetonitrila (em vermelho) como cossolventes e gradiente T5 (254 nm).

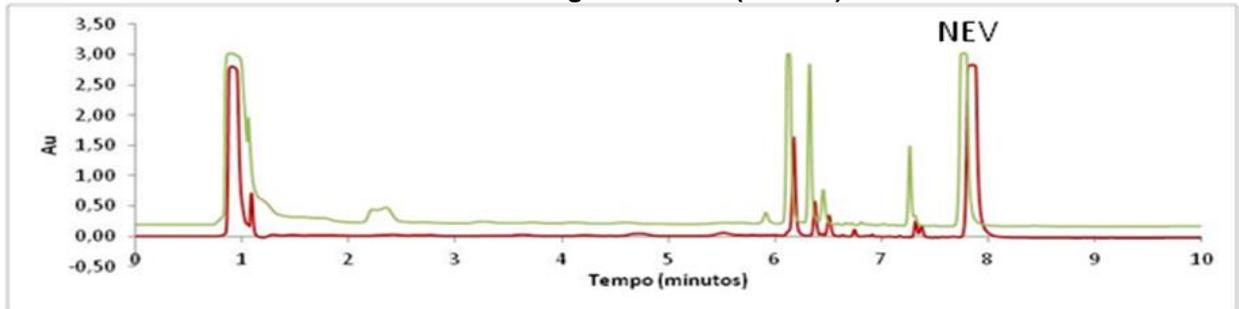


Legenda: ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; NEV = Nevirapina.

Testou-se também a utilização de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e a 30% (v/v) como agente degradante. Injetaram-se amostras degradadas por peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e a 30% (v/v) durante 24 horas a 50 °C, utilizando-se o gradiente T5 (**Tabela 13**, página 88) e o resultado obtido foi o apresentado na **Figura 19**. Ao analisar esta figura, percebe-se que a degradação promovida pelo peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) foi mais intensa e rápida, originando maior

quantidade de produtos de degradação. Por considerar muito drástica a degradação com o peróxido de hidrogênio 30% (v/v), optou-se por padronizar a utilização de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) como agente degradante.

Figura 19 – Amostras provenientes da degradação oxidativa da nevirapina IFA a 1000 µg/mL submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em vermelho e a 30% (v/v) em verde, durante 24 horas a 50 °C e gradiente T5 (254 nm).



Em seguida, outros gradientes foram desenvolvidos e testados, modificando-se os tempos e composição do gradiente, vazão 0,1; 0,2; 0,25 mL/min e mistura de ambos) e a temperatura (25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C). O método desenvolvido, que promoveu melhor resolução entre os picos da nevirapina e dos produtos de degradação foi o gradiente T20. O gradiente definitivo é apresentado na **Tabela 14** e os parâmetros do método indicativo de estabilidade desenvolvido e otimizado para a nevirapina utilizando CLUE são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 14 – Gradiente utilizado no método indicativo de estabilidade desenvolvido e otimizado para nevirapina utilizando CLUE (gradiente T20).

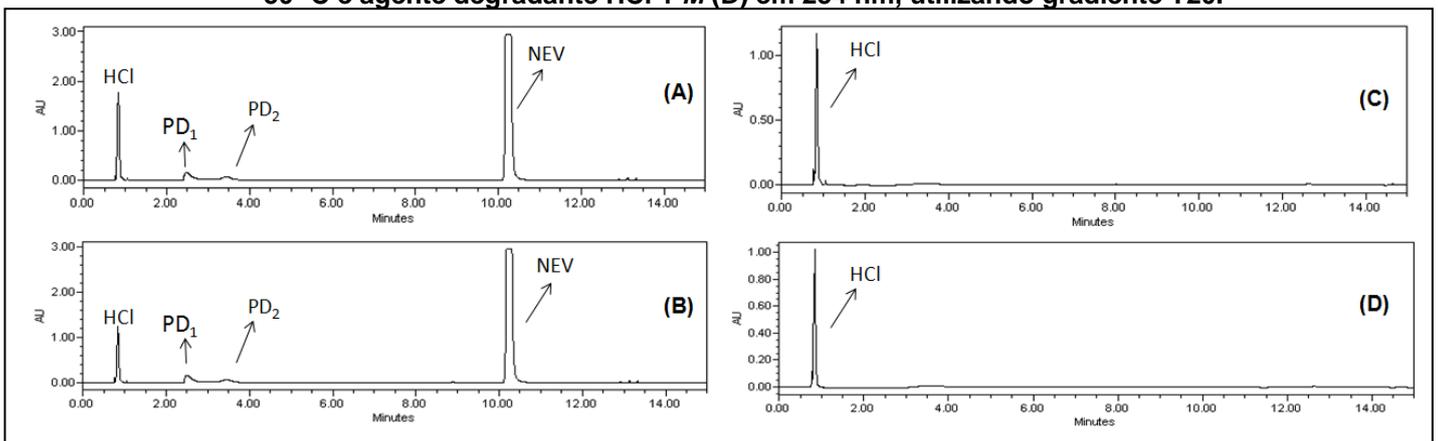
Tempo (min)	Vazão da fase móvel (mL/min)	A % (v/v) (água)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 4	0,25	92%	8%	Isocrática
4 - 5	0,25 → 0,20	92% → 80%	8% → 20%	Gradiente linear
5 - 6	0,25 → 0,10	80% → 70%	20% → 30%	Gradiente linear
6 - 9,9	0,10	70%	30%	Isocrática
9,9 - 10	0,10 → 0,2	70%	30%	Isocrática
10 - 11	0,20	70%	30%	Isocrática
11 - 12	0,20	70% → 10%	30% → 90%	Gradiente linear
12 - 13	0,20	10%	90%	Isocrática
13 - 14	0,2 → 0,25	10% → 92%	90% → 8%	Re-equilíbrio
14 - 15	0,25	92%	8%	Re-equilíbrio

Tabela 15 – Resumo das condições cromatográficas do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando CLUE.

Parâmetros	Condições cromatográficas
Comprimento de onda	254 nm (DAD)
Volume de injeção	5 µL
Coluna	ZORBAX Eclipse Plus® C ₁₈ , 2,1 x 100 mm, 1,8 µm
Temperatura do forno	30°C
Fase móvel	Acetonitrila e água

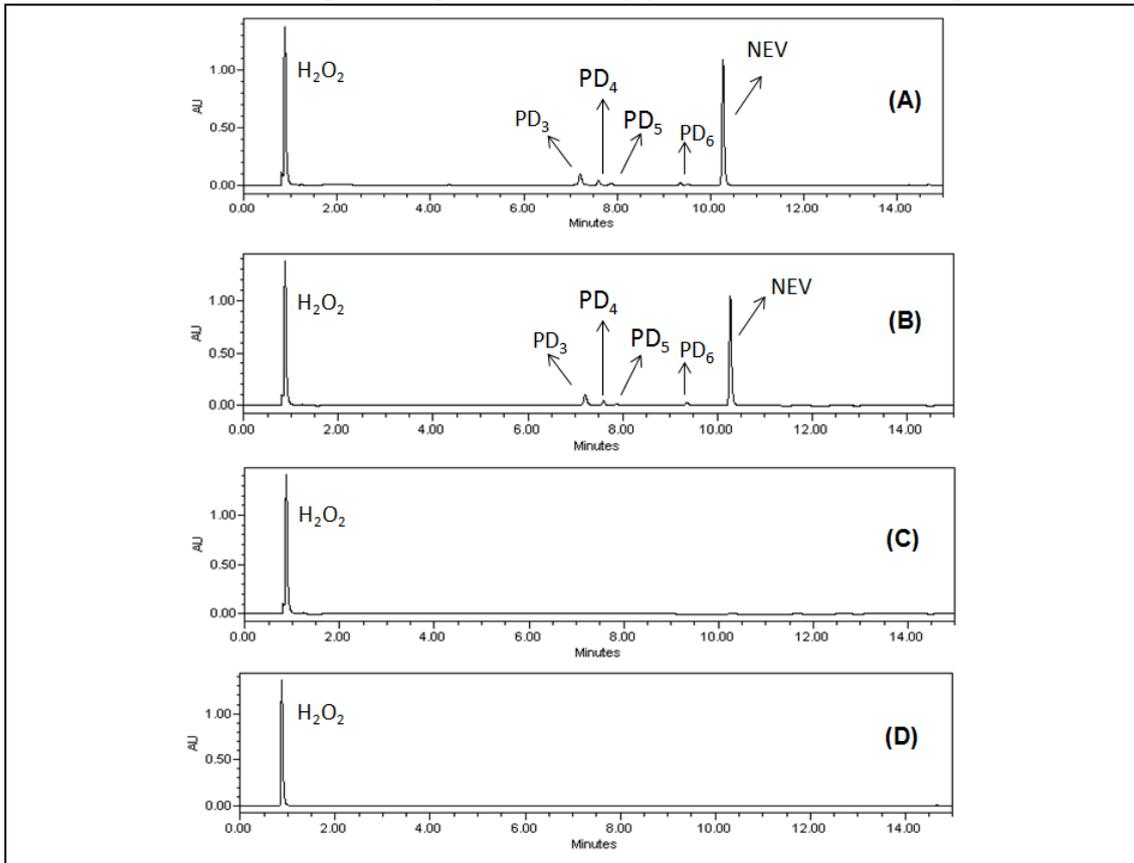
Todas as amostras de nevirapina IFA, comprimidos e placebo degradadas foram re-injetadas utilizando-se o gradiente definitivo (gradiente T20) e o resultado está apresentado nas **Figuras 20 e 21**. Percebe-se que o perfil de degradação é o mesmo tanto para a nevirapina IFA, quanto para os comprimidos de nevirapina, seja na degradação hidrolítica em meio ácido (**Figura 20**), seja na degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio (**Figura 21**), uma vez que os mesmos produtos de degradação são formados nas amostras degradadas de IFA e de comprimidos. No cromatograma do placebo submetido à degradação forçada, não há formação de novos picos.

Figura 20 – Cromatogramas provenientes da degradação da nevirapina IFA (A) e comprimidos (B) a 1000 µg/mL e placebo (C) submetidos a ácido clorídrico 1 M, durante 24 h a 50 °C e agente degradante HCl 1 M (D) em 254 nm, utilizando gradiente T20.



Legenda: PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido; NEV = nevirapina; HCl = ácido clorídrico.

Figura 21 – Cromatogramas provenientes da degradação da nevirapina IFA (A) e comprimidos (B) a 40 µg/mL e placebo (C) submetidos a peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante 24 h a 50 °C e agente degradante H₂O₂ (D) em 254 nm, utilizando gradiente T20.



Legenda: PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da oxidação com peróxido de hidrogênio; NEV = nevirapina; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio.

Os parâmetros cromatográficos como tempo morto, fator de retenção (k), número de pratos teóricos (N), resolução (R), fator de cauda obtidos com o método indicativo de estabilidade definitivo utilizando CLUE (gradiente T20 e condições cromatográficas descritas na **Tabela 15**, página 91) foram calculados para as amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação em meio ácido e oxidativo a 40 µg/mL e são apresentados na **Tabela 16**. O tempo morto, obtido com injeção de nitrato de prata a 0,01% (p/v), foi de 0,82 minutos.

Ao analisar a **Tabela 16** conclui-se que os parâmetros cromatográficos estão adequados de acordo com as recomendações descritas no guia do FDA, ou seja, os fatores de retenção são maiores que 2,0, garantindo assim, que o pico esteja bem resolvido do tempo morto e a resolução entre os picos de interesse foi maior que 2,0 (UNITED STATES, 1994). Além disso, o número de pratos teóricos encontrados foi

maior que 7000, sendo que para o pico da nevirapina foi de aproximadamente 240000 e os fatores de cauda encontrados foram menores que 1,50.

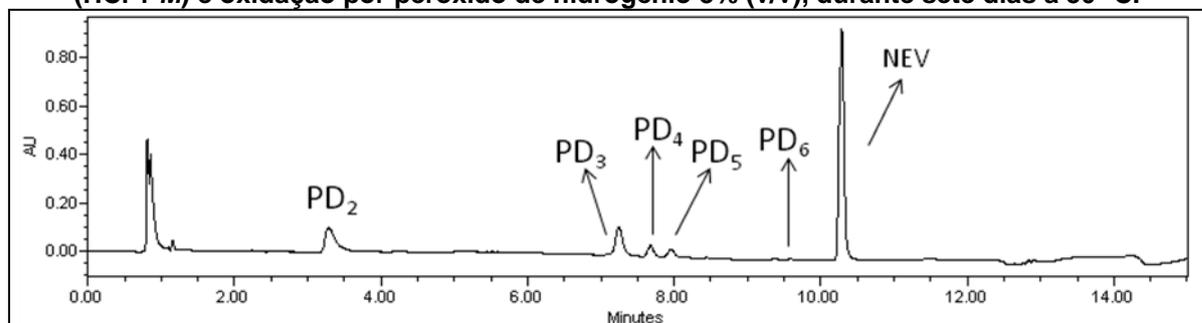
Tabela 16 – Parâmetros do sistema cromatográficos utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando CLUE.

Amostra	Analito	Tempo de retenção (t _R) (min)	Fator de retenção (k)	Número de pratos teóricos (N)	Fator de cauda	Resolução (R)
IFA proveniente da degradação ácida com HCl 1 M a 50 °C, durante 3 dias	PD ₂	3,59	3,38	7466	1,21	-
	NEV	10,27	11,52	240357	1,18	53,40
IFA proveniente da degradação oxidativa com H ₂ O ₂ 3% (v/v) a 50 °C, durante 3 dias	PD ₃	7,20	7,78	57925	1,12	-
	PD ₄	7,60	8,27	94159	1,29	3,42
	PD ₅	7,87	8,60	63960	1,11	2,40
	PD ₆	9,35	10,40	119390	1,03	12,43
	NEV	10,27	11,52	237801	1,17	8,16

Legenda: NEV = nevirapina; PD₂ = produto de degradação proveniente da hidrólise ácida (**Figura 20**); PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa (**Figura 21**).

Injetou-se também uma solução composta pela mistura das amostras de IFA provenientes da degradação ácida e oxidativa para comprovar a seletividade do método indicativo de estabilidade utilizando CLUE (**Figura 22**). Todos os picos apresentaram-se separados uns dos outros com resolução mínima de 2,0 (**Tabela 17**).

Figura 22 – Cromatograma obtido com o gradiente T20, em comprimento de onda de 254 nm, por meio da mistura de amostras de nevirapina IFA a 40 µg/mL submetidas a hidrólise ácida (HCl 1 M) e oxidação por peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante sete dias a 50 °C.



Legenda: PD₂ = produto de degradação proveniente da hidrólise em meio ácido; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação majoritários formados na oxidação com H₂O₂ 3% (v/v); NEV = nevirapina.

Tabela 17 – Resolução entre os picos nas amostras de nevirapina IFA e comprimidos de nevirapina contendo produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido e oxidação da nevirapina.

Amostra	Analito	Resolução
	PD ₂	-
Nevirapina insumo farmacêutico ativo e produtos de degradação	PD ₃	18,00
	PD ₄	2,67
	PD ₅	2,03
	PD ₆	10,15
	NEV IFA	6,83

Legenda: PD₁ a PD₅= produtos de degradação correspondentes aos mostrados na **Figura 22.**

A análise da pureza de pico da nevirapina obtida nos cromatogramas das amostras de nevirapina IFA e comprimidos submetidos às condições de degradação forçada (hidrólise ácida, básica, neutra, oxidação com peróxido de hidrogênio e AIBN, degradação térmica, degradação por íons metálicos, umidade e fotodegradação) nas concentrações de trabalho foram realizadas com auxílio do DAD. Para o pico ser considerado puro, de acordo com as especificações do equipamento, o ângulo de pureza deve ser inferior ao ângulo limite, ambos determinados pelo software *Empower 2*. O ângulo de pureza é uma medida da heterogeneidade espectral do pico baseada na comparação de espectros obtidos em vários pontos do pico e o ângulo limite são os efeitos não ideais quantificados durante a varredura dos espectros. Os valores do ângulo de pureza e do ângulo limite foram obtidos para cada condição de estresse e, como o ângulo pureza do pico da nevirapina foi inferior ao valor do ângulo limite em todas as amostras degradadas, conclui-se que o pico da nevirapina estava puro em todas as condições de estresse, ou seja, não havia outro analito eluindo no mesmo tempo de retenção do pico da nevirapina. Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método desenvolvido utilizando CLUE é seletivo para a nevirapina e seus produtos de degradação, podendo ser utilizado como método indicativo de estabilidade.

5 CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE UTILIZANDO COLUNA COM PARTÍCULAS DE NÚCLEO FUNDIDO

5.1 Materiais

5.1.1 Substância química de referência, IFA e comprimidos

Conforme o descrito no item 4.1.1 (página 63).

5.1.2 Reagentes

- Água ultrapura.
- Reagentes grau analítico: ácido clorídrico Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), AIBN Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), etanol Fluka (Saint Louis, EUA), hidróxido de sódio Mallinckrodt Analytical (Xalostoc, México), peróxido de hidrogênio Synth (Diabdema, Brasil), sulfato de cobre pentahidratado Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA) e uracila Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Solventes grau CLAE: acetonitrila J. T. Baker (Xalostoc, México), acetonitrila Merck (Darmstadt, Alemanha), acetonitrila Scharlau (Gato Pérez, Espanha) e metanol Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

5.1.3 Materiais e vidrarias

- Coluna cromatográfica de núcleo fundido Poroshell® 120 AGILENT C₁₈, (100 x 2,1 mm, 2,7 µm).
- Frasco tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm de tamanho de poro.
- Hastes de metal verticais para suporte e garras.
- Kit para filtração a vácuo.
- Membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm, SARTORIUS.

- Pipeta automática P1000 GILSON e ponteiras de 1000 µL para uso em micropipetas.
- Placas de petri.
- Tubos de ensaio com tampa.

5.1.4 Equipamentos e coluna cromatográfica

- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.
- Banho-maria FULL GAUGE TIC-17C.
- Bomba de vácuo LABOPORT KNF N842.
- Câmara de estabilidade modelo KBF-720 WEISS.
- Câmara de fotoestabilidade modelo Pharma 500 L WEISS.
- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência WATERS ACQUITY® UPLC com software Empower.
- Estufa NABERTHERM TR 60.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIENT Q3.
- Software Excel® 2007.

5.2 Métodos

5.2.1 Gradiente exploratório

Com a finalidade de estabelecer as melhores condições cromatográficas para a separação da nevirapina e dos produtos de degradação formados, realizou-se, inicialmente, gradientes exploratórios com fase móvel composta por acetonitrila e água. A partir dos resultados de tempo de retenção obtidos com a corrida exploratória foi estabelecida a condição isocrática utilizando-se os parâmetros descritos na **Tabela 18**.

Para o desenvolvimento do gradiente exploratório, prepararam-se amostras de nevirapina padrão a 40 µg/mL, nevirapina IFA controle e nevirapina IFA exposta às

condições ácidas (HCl 1 M) e oxidativa (H₂O₂ 3% v/v) a 1000 µg/mL e a 40 µg/mL, conforme descrito nos itens 4.2.3.1 (página 67), 4.2.3.2 (página 67), 4.2.3.3 (página 68) e 4.2.3.6 (página 71).

Tabela 18 – Estimativa da porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) para corrida isocrática baseada no tempo de retenção do último pico do gradiente exploratório de acordo com Snyder e colaboradores (1997).

T _R do último pico (minutos)	Estimativa da porcentagem de solvente orgânico		
	k = 5	k = 10	k = 20
5	6	0	---
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	62	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	---	100	94

Fonte: traduzido e adaptado de SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997.

As condições cromatográficas utilizadas para a realização dos gradientes exploratórios são descritas na **Tabela 19**.

Tabela 19– Condições cromatográficas para os gradientes exploratórios para eluição da nevirapina e seus produtos de degradação.

Parâmetros	Condições
Coluna	Poroshell® 120 Agilent, C ₁₈ , 100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm
Composição da fase móvel	Acetonitrila:água – eluição gradiente
Comprimento de onda	254 nm
Vazão da fase móvel	0,2 mL/min
Gradiente	0- 60 minutos → 5% a 95% de acetonitrila
Temperatura do forno	30 °C
Tempo da corrida	60 minutos
Volume de injeção	5 µL

5.2.2 Eluições isocráticas

Com o objetivo de tentar conseguir um método isocrático que fosse capaz de separar a nevirapina e todos os produtos de degradação formados nas condições de degradação ácida e oxidativa, as seguintes proporções da fase móvel composta por acetonitrila e água foram testadas: 84:16; 85:15; 86:14 e 80:20 (v/v). As demais condições utilizadas (coluna, vazão, volume de injeção, temperatura do forno e comprimento de onda) foram as descritas na **Tabela 19**, página 97.

5.2.3 Eluições em gradiente e otimização das condições cromatográficas

Após os testes com eluição isocrática, testou-se diversos gradientes, com diferentes proporções e composições da fase móvel, até que se obteve uma condição que possibilitou uma resolução adequada entre os picos referentes aos produtos de degradação e a nevirapina.

As amostras utilizadas nos testes para otimização do gradiente a ser utilizado no método indicativo de estabilidade foram preparadas pela exposição da nevirapina IFA a ácido clorídrico 1 M e a peróxido de hidrogênio 3% (v/v), nas concentrações de 1000 µg/mL e 40 µg/mL de nevirapina, preparadas conforme descrito nos itens **4.2.3.1** (página 67) e **4.2.3.6** (página 71).

A partir dos resultados obtidos com o primeiro gradiente testado, propôs-se diversas alterações no tempo, proporção e tipo do solvente orgânico a ser utilizado, com a finalidade de melhorar a resolução entre os picos. Inicialmente testou-se fase móvel composta por acetonitrila e água; em seguida metanol e água e, por fim, acetonitrila, metanol e água. Foram propostos e testados, no total, 34 gradientes diferentes e optou-se por aquele que produziu melhor separação entre os picos dos produtos de degradação e a nevirapina (resolução de, no mínimo, 2,0) e que proporcionou valores adequados dos seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k), fator de cauda e número de pratos teóricos (N).

As condições cromatográficas e gradiente do método indicativo de estabilidade otimizado e definitivo utilizando coluna de núcleo fundido (gradiente 34b) estão descritas nas **Tabelas 20 e 21** respectivamente.

Tabela 20 – Resumo das condições cromatográficas definitivas do método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.

Parâmetros	Condições
Coluna	Poroshell® 120 Agilent, C18, 100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm
Composição da fase móvel	Acetonitrila:água - eluição em gradiente
Comprimento de onda	254 nm
Vazão da fase móvel	0,2 mL/min
Gradiente	34b (Tabela 21)
Temperatura do forno	30 °C
Tempo da corrida	13 minutos seguidos de 3 minutos para re-equilíbrio da coluna
Volume de injeção	5 µL

Tabela 21 – Gradiente 34b, utilizado no método definitivo indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação empregando coluna de núcleo fundido.

Tempo (min)	A % (v/v) (água)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 3	95% → 90%	5% → 10%	Gradiente linear
3 - 6	90% → 84%	10% → 16%	Gradiente linear
6 - 8	84% → 75%	16% → 25%	Gradiente linear
8 - 11	75%	25%	Isocrática
11 - 13	75% → 20%	25% → 80%	Gradiente linear
13 - 15	20% → 95%	80% → 5%	Re-equilíbrio
15 - 16	95%	5%	Re-equilíbrio

5.2.4 Validação

O método indicativo de estabilidade desenvolvido (**Tabelas 20 e 21**) foi validado de acordo com as recomendações presentes na Resolução RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003), no Guia ICH Q2(R1) (ICH-Q2(R1), 2005) e procedimento de validação intralaboratorial definidos por Souza (2007). Todos os cálculos foram realizados com auxílio do software Microsoft Excel® 2007. As amostras foram preparadas e injetadas no cromatógrafo em ordem aleatória durante as análises de linearidade, precisão e

exatidão para evitar que variações temporais das condições cromatográficas interferissem no resultado e para garantir a independência dos resultados.

5.2.4.1 Preparo das soluções padrão e amostras de nevirapina

A solução padrão de nevirapina (40 µg/mL) foi preparada pesando-se exatamente, cerca de, 25 mg de IFA padronizado e transferindo-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 10 mL de acetonitrila e o balão foi levado a banho de ultrassom durante 50 minutos. Deixou-se esfriar e em seguida completou-se o volume com água e homogeneizou-se. Com o auxílio de uma pipeta transferiu-se 1 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com água e homogeneizou-se.

A solução amostra do IFA (40 µg/mL) foi preparada da mesma maneira que a solução padrão, porém, utilizando-se o IFA não padronizado.

Para o preparo da amostra de comprimidos (40 µg/mL de nevirapina) determinou-se o peso médio de 20 comprimidos que foram posteriormente triturados. Quantidade de pó equivalente a 25 mg de nevirapina foi transferida para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 10 mL de acetonitrila e o balão foi levado a banho de ultrassom durante 50 minutos. A seguir, realizou-se o mesmo procedimento descrito para o preparo da solução padrão.

Para o preparo da amostra de placebo pesaram-se exatamente, cerca de, 75 mg de placebo e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 10 mL de acetonitrila e o balão foi levado a banho de ultrassom durante 50 minutos. A seguir, realizou-se o mesmo procedimento descrito para o preparo da solução padrão.

5.2.4.2 Seletividade e adequabilidade do sistema

Para comprovar a seletividade do método, ou seja, sua capacidade de separar o fármaco e todos os produtos de degradação formados nas condições de degradação forçada às quais o IFA e comprimidos foram expostos, as preparações de IFA e comprimidos submetidas à hidrólise ácida (HCl 1 M) e oxidação por peróxido de

hidrogênio 3% v/v, durante 7 dias a 50 °C, foram misturadas em iguais proporções. Todos os picos devem se apresentar separados dos demais com uma resolução mínima de 2,0 (UNITED STATES, 1994).

Soluções em branco contendo os reagentes estressantes utilizados nos testes de degradação forçada (H_2O_2 3% v/v, AIBN, HCl 1 M, NaOH 1 M, CuSO_4 0,05 M e água) foram preparadas e injetadas. Na análise destas soluções, não devem aparecer picos interferentes nos mesmos tempos de retenção do pico da nevirapina e dos produtos de degradação formados.

Amostras preparadas conforme descrito nos testes de degradação forçada (item **4.2.3**, página 66), foram injetadas utilizando o método indicativo de estabilidade com coluna de núcleo fundido desenvolvido. Realizou-se teste de pureza de pico para o pico da nevirapina em todas as condições de estresse testadas (H_2O_2 3% v/v, AIBN, HCl 1 M, NaOH 1 M, CuSO_4 0,05 M, água, umidade a 75% UR, aquecimento a 80 °C e fotodegradação por luz UV e visível). Pelo teste de pureza de pico deve-se comprovar que o pico é atribuído a um só componente, ou seja, não há co-eluição (BRASIL, 2003).

Além disso, para que o método seja considerado seletivo, o diluente e o placebo não devem apresentar picos interferentes no mesmo tempo de retenção da nevirapina (BRASIL, 2013). Então a seletividade do método indicativo de estabilidade também foi avaliada para a forma farmacêutica comprimido, preparando-se solução a partir do placebo dos comprimidos Nevirax[®], com a finalidade de comprovar a ausência de pico(s) interferente(s) no tempo de retenção da nevirapina. O preparo da solução placebo foi realizada conforme descrito no item **5.2.4.1**, página 100. Foi injetado também uma solução do diluente, contendo acetonitrila e água nas mesmas proporções utilizadas no preparo das amostras.

Para verificar a adequabilidade do sistema cromatográfico, preparou-se uma solução padrão de nevirapina a 40 µg/mL, conforme descrito no item **5.2.4.1**, página 100 e a mesma foi injetada cinco vezes consecutivas no cromatógrafo. Em seguida avaliou-se os seguintes parâmetros para o pico principal da solução padrão: fator de

retenção (k), fator de cauda, desvio padrão relativo da área sob o pico da nevirapina (DPR área) e desvio padrão relativo do tempo de retenção (DPR t_R).

5.2.4.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva analítica para nevirapina com seis níveis de concentração igualmente espaçados, na faixa de 20% a 120% da concentração de trabalho de nevirapina (40 $\mu\text{g/mL}$). Para a construção da curva analítica, foram preparadas três soluções padrão estoque de nevirapina IFA padronizado a 400 $\mu\text{g/mL}$, pesando-se, em triplicata, exatamente, cerca de 40 mg de nevirapina IFA padronizado e transferindo-se quantitativamente para balões volumétricos de 100 mL, com o auxílio de 16 mL de acetonitrila. Deixou-se em banho de ultrassom durante 50 minutos. Após esfriar, completou-se o volume com água e homogeneizou-se.

Em seguida preparou-se as soluções amostras a 20%, 40%, 60%, 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho, por meio da diluição das soluções padrão estoque utilizando-se uma bureta de 10 mL, conforme apresentado na **Tabela 22**. Cada solução padrão estoque deu origem a seis soluções amostras, totalizando 18 soluções. As soluções foram preparadas aleatoriamente, em seguida foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas também aleatoriamente no cromatógrafo.

Tabela 22 – Preparo das soluções de nevirapina IFA padronizado para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.

Volume de solução padrão estoque (mL)	Água q.s.p. (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Nível de concentração*
1	50	8	20%
2	50	16	40%
3	50	24	60%
4	50	32	80%
5	50	40	100%
6	50	48	120%

*em relação à concentração de trabalho.

Os valores dispersos (*outliers*) foram identificados pelo teste de resíduo padronizado de *Jackknife* ($\alpha = 0,05$). O critério de aceitação utilizado foi que no máximo 22% dos dados originais da curva de calibração podem ser excluídos, além disso, se o ponto

for a terceira e última replicata do nível de concentração, não pode ser excluído (SOUZA, 2007).

Em seguida, testes estatísticos foram utilizados para verificar se os dados de regressão linear atendem às premissas para o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), sugerido por Souza e Junqueira (2005). O MMQO, também conhecido como regressão linear simples, parte das premissas que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, possuem variância constante ao longo do eixo x e são independentes. As premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de *Ryan-Joiner*, homoscedasticidade pelo teste de *Levene* modificado por *Brown e Forsythe* e independência dos resíduos da regressão pelo teste de *Durbin-Watson*. Em seguida, verificou-se a adequação dos dados ao modelo linear, ou seja, verificou-se se a regressão é significativa e se o desvio da linearidade não é significativo utilizando a análise de variância (ANOVA) (INMETRO 2011; SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Por fim, construiu-se a curva analítica com os valores de área sob o pico da nevirapina obtida para cada nível de concentração, determinou-se o coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (R), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a) e o gráfico de distribuição dos resíduos. A regressão linear foi calculada pelo MMQO e a linearidade foi avaliada por meio da estimativa de todos esses parâmetros.

5.2.4.4 Precisão

Avaliou-se a repetibilidade (precisão intra-corridas) do método indicativo de estabilidade por meio da quantificação da nevirapina no IFA e nos comprimidos em três níveis de concentração, a 40% (baixo), 100% (médio) e 120% (alto) da concentração de trabalho (40 µg/mL). Para cada nível de concentração foram preparadas três replicatas independentes. A precisão intermediária (inter-corridas) foi realizada pela repetição do mesmo procedimento em outro dia, por outro analista.

Em cada dia de análise foi preparada uma solução padrão conforme descrito no item **5.2.4.1** (página 100), utilizando nevirapina IFA padronizado a 100% da concentração de trabalho, ou seja, a 40 µg/mL de nevirapina.

Os resultados foram agrupados e calculou-se a média do teor de nevirapina e os desvios padrões relativos em cada nível do primeiro dia e dos dias consecutivos (no primeiro e segundo dias de análise).

5.2.4.5 Exatidão

A determinação da exatidão foi avaliada pelo método do placebo fortificado, em que quantidades conhecidas de nevirapina IFA foram adicionadas à misturas dos componentes da formulação (excipientes) com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação. A exatidão foi avaliada a partir de nove determinações contemplando os níveis de 40% (baixo), 100% (médio) e 120% (alto) da concentração de trabalho da nevirapina IFA e comprimidos, sendo realizada em triplicata para cada nível de concentração.

Para o preparo das concentrações finais de 40%, 100% e 120% de nevirapina, 75 mg de placebo da formulação dos comprimidos foram adicionados em nove balões volumétricos de 25 mL. Em seguida, foram adicionadas em cada balão volumétrico, quantidades adequadas de nevirapina IFA, conforme descrito na **Tabela 23** e 10 mL de acetonitrila. Os balões foram levados a banho de ultrassom durante 50 minutos. Após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando água e homogeneizou-se. Com o auxílio de uma pipeta, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com água e homogeneizou-se, obtendo-se dessa forma, os níveis de concentração final mostrados na **Tabela 23**. As amostras foram filtradas para *vials* e injetadas três vezes consecutivas no cromatógrafo.

Tabela 23 – Preparo das amostras para avaliação da exatidão do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.

Nível de concentração*	Quantidade de placebo (mg)	Quantidade de nevirapina IFA adicionada (mg)	Concentração teórica final (µg/mL)
40%	75	10	16
100%	75	25	40
120%	75	30	48

*em relação à concentração de trabalho.

A solução padrão foi preparada conforme descrito no item **5.2.4.1** (página 100), utilizando nevirapina IFA padronizado a 100% da concentração de trabalho, ou seja, a 40 µg/mL de nevirapina.

As porcentagens de recuperação foram calculadas pela relação entre as concentrações de nevirapina obtidas experimentalmente e as concentrações teóricas do mesmo fármaco nas preparações fortificadas, de acordo com a equação descrita a seguir (BRASIL, 2003).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

5.2.4.6 Robustez

A robustez foi avaliada variando-se deliberadamente algumas condições cromatográficas e de preparo das amostras e em seguida, verificando-se a influência das modificações nos resultados do teor de nevirapina. Em cada condição modificada foram realizadas injeções da nevirapina IFA padronizado (seis) e das amostras de nevirapina IFA (três) na concentração de 40 µg/mL.

Conforme é proposto na Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos elaborada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011), os parâmetros foram variados de acordo com o método estatístico de Youden e Steiner (YODEN; STEINER, 1975). Esse método consiste na análise multivariada e trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2011). As variáveis modificadas, bem como a distribuição dessas variáveis nos experimentos de robustez, estão descritas na **Tabela 24**.

O método é considerado robusto para todos os parâmetros testados se o efeito de cada variável for menor que o efeito maior. O cálculo do efeito maior foi realizado multiplicando-se o desvio padrão relativo entre os valores de teor nos oito experimentos por raiz de dois. O cálculo do efeito de cada variável foi realizado

subtraindo-se a média dos resultados obtidos nos quatro experimentos em que determinada variável foi utilizada em nível alto, pela média dos resultados obtidos nos quatro experimentos em que a mesma variável foi utilizada em nível baixo, conforme demonstrado na equação descrita a seguir (YOUNDEN; STEINER, 1975).

$$\text{Efeito da variável } A/a = \frac{(S + T + U + V)}{4} - \frac{(W + X + Y + Z)}{4}$$

Tabela 24 – Descrição das variáveis para avaliação da robustez do método indicativo de estabilidade para nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido.

Análises	A,a Temperatura da coluna	B,b Marca da acetoneitrila	C,c Volume de injeção	D,d Tempo de agitação da amostra no ultrassom	Resultado (%)
1	A 35 °C	B Scharlau®	C 7 µL	D 60 minutos	S
2	A 35 °C	B Scharlau®	c 3 µL	D 60 minutos	T
3	A 35 °C	b Merck®	C 7 µL	d 40 minutos	U
4	A 35 °C	b Merck®	c 3 µL	d 40 minutos	V
5	a 25 °C	B Scharlau®	C 7 µL	d 40 minutos	W
6	a 25 °C	B Scharlau®	c 3 µL	d 40 minutos	X
7	a 25 °C	b Merck®	C 7 µL	D 60 minutos	Y
8	a 25 °C	b Merck®	c 3 µL	D 60 minutos	Z

5.2.4.7 Limite de detecção

O limite de detecção foi estimado com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (ICH-Q2(R1), 2005), conforme a equação a seguir.

$$LD = \frac{3,3 \delta}{S}$$

em que:

LD = limite de detecção;

δ = desvio padrão da resposta (desvio padrão do coeficiente linear);

S = inclinação da curva analítica (valor de b para $y=bx+a$).

Para confirmar o limite de detecção teórico obtido a partir da equação, injetou-se uma solução de nevirapina IFA padronizado na mesma concentração obtida pela equação e em seguida foram realizadas diluições até que se obtivesse uma relação sinal/ruído de aproximadamente três (ICH-Q2(R1), 2005).

5.2.4.8 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estimado com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (ICH-Q2(R1), 2005), conforme a equação descrita a seguir.

$$LQ = \frac{10 \delta}{S}$$

em que:

LQ = limite de quantificação;

δ = desvio padrão da resposta (desvio padrão do coeficiente linear);

S = inclinação da curva analítica (valor de b para $y=bx+a$).

Para confirmar o limite de quantificação teórico obtido a partir da equação, injetou-se uma solução de nevirapina IFA padronizado na mesma concentração obtida pela equação e em seguida foram realizadas diluições até que se obtesse uma relação sinal/ruído de aproximadamente dez (ICH-Q2(R1), 2005).

5.3 Resultados

5.3.1 Desenvolvimento e otimização do método indicativo de estabilidade para nevirapina utilizando coluna com partículas de núcleo fundido

O desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando coluna com partículas de núcleo fundido foi realizado com o objetivo de oferecer uma alternativa que não fosse dependente da utilização de um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, já que este é um equipamento que possui preço elevado, sendo portanto, menos acessível que um cromatógrafo a líquido de alta eficiência convencional. Esse método foi utilizado também para a avaliação da cinética de degradação do IFA nevirapina e do produto acabado (compimidos) nas condições de oxidação e hidrólise ácida. Além disso, foi objetivo deste estudo utilizar este método em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas, visando a identificação dos produtos de degradação formados no estudo de degradação forçada da nevirapina.

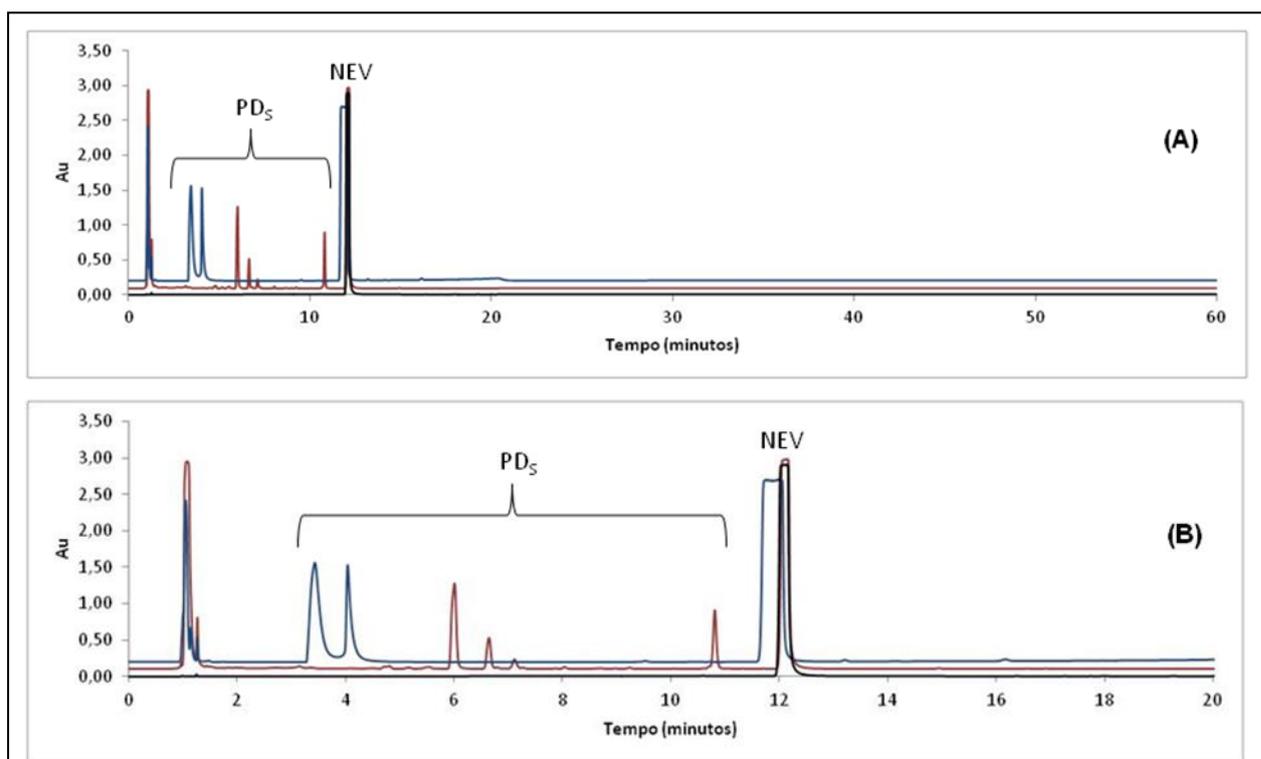
A corrida cromatográfica que proporciona condições seletivas, ou seja, que promove a separação do IFA e os produtos de degradação entre si, pode ser isocrática ou em gradiente. A separação utilizando gradiente é mais recomendada, pois garante uma melhor separação entre diferentes analitos, além de permitir a eluição de todo tipo de molécula (polar ou apolar) que tenha sido formado na degradação forçada; entretanto corridas isocráticas também são aceitáveis (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Para o desenvolvimento do método foram utilizadas amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida e oxidativa, uma vez que, de acordo com os resultados obtidos nos testes de degradação forçada (Capítulo I) essas foram as únicas condições de estresse que levaram à formação de produtos de degradação. Vale ressaltar que durante o desenvolvimento do método, amostras na concentração de 1000 µg/mL de nevirapina foram injetadas com o intuito de visualizar nitidamente todos os produtos de degradação formados e assim buscar a condição cromatográfica que resultasse na melhor separação entre eles, uma vez que nessa condição mais concentrada, os picos referentes a esses produtos encontram-se mais intensos. As amostras a 40 µg/mL foram injetadas para realizar a quantificação da nevirapina remanescente após exposição aos agentes degradantes.

5.3.1.1 Resultados obtidos com o gradiente exploratório e eluições isocráticas

Os cromatogramas obtidos com a realização do gradiente exploratório para as amostras de nevirapina IFA controle e IFAs expostas à degradação ácida e à degradação oxidativa são apresentadas na **Figura 23**.

Figura 23 – Cromatogramas do gradiente exploratório (condições descritas na Tabela 19, página 97) obtidos para amostras de nevirapina IFA controle (em preto), exposta à degradação ácida, durante três dias a 50 °C (em azul) e à degradação oxidativa, durante três dias a 50 °C (vermelho) a 1000 µg/mL. Cromatograma da corrida exploratória completa (A) e cromatograma referente aos primeiros 20 minutos da corrida exploratória (B).

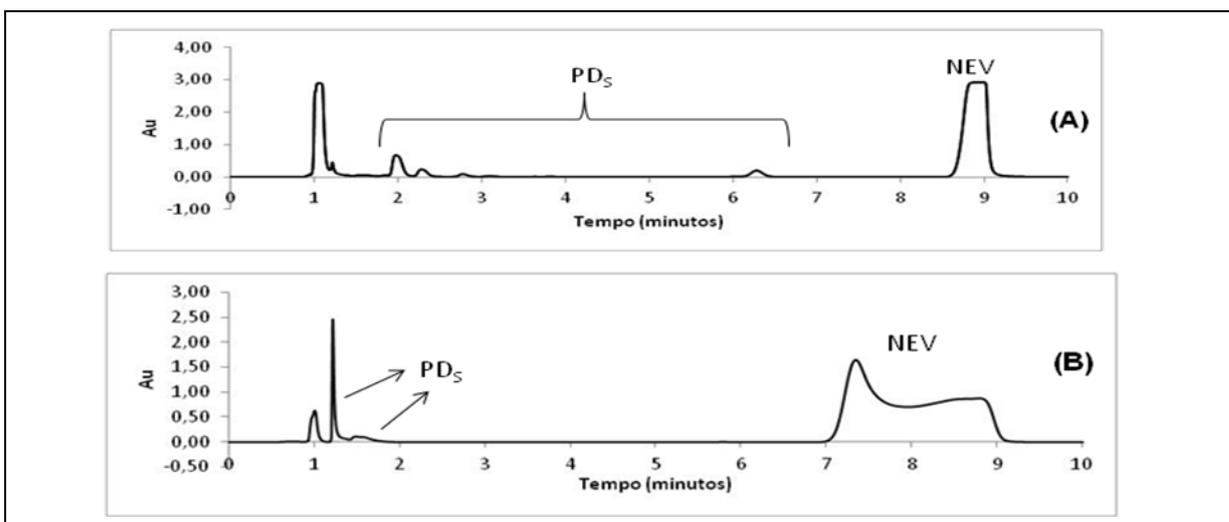


Legenda: PDs = produtos de degradação; NEV = nevirapina.

De acordo com Snyder e colaboradores (1997), utiliza-se o tempo de retenção do último pico do cromatograma e o fator de retenção desejado para estimar a composição da fase móvel para a eluição isocrática (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Dessa forma, a partir dos resultados obtidos no gradiente exploratório, estimou-se a porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) para a eluição isocrática, utilizando-se a **Tabela 18** (página 97) e o tempo de retenção do último pico eluído no gradiente exploratório (nevirapina, $t_R = 12,14$ minutos). Com base nesta tabela, a porcentagem de acetonitrila deveria ser de 16% (v/v) para se obter um fator de retenção (k) igual a 10.

Diante desses resultados teóricos testou-se, primeiramente, uma eluição isocrática com fase móvel composta por acetonitrila:água na proporção 16:84 (v/v) e os demais parâmetros cromatográficos utilizados estão descritos na **Tabela 19** (página 97). Os cromatogramas obtidos são mostrados na **Figura 24**.

Figura 24 – Cromatogramas obtidos com eluição isocrática utilizando-se como fase móvel 16% (v/v) de acetonitrila e 84% (v/v) de água e demais condições descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação oxidativa (A) e ácida (B) a 1000 µg/mL.



Legenda:PDs = produtos de degradação; NEV = nevirapina.

Como se pode perceber ao analisar a **Figura 24**, o resultado da eluição isocrática não foi satisfatório, uma vez que os picos referentes aos produtos de degradação em meio oxidativo ficaram largos e achatados, além disso, os produtos de degradação provenientes da hidrólise ácida eluíram muito próximo do tempo morto e o pico da nevirapina ficou deformado, provavelmente, pelo fato da proporção do solvente orgânico não ter proporcionado força suficiente para promover a eluição completa das moléculas de nevirapina em um curto espaço de tempo.

Optou-se então, por testar mais algumas proporções de fase móvel com eluição isocrática, porém, nenhuma delas resultou em uma separação adequada da nevirapina e dos produtos de degradação. Além disso, julgou-se que a utilização da eluição em gradiente seria mais favorável para um método indicativo de estabilidade, uma vez que o mesmo permitiria uma melhor resolução entre analitos de diferentes polaridades e a eluição de todos os possíveis produtos de degradação formados nos testes de degradação forçada em um menor intervalo de tempo.

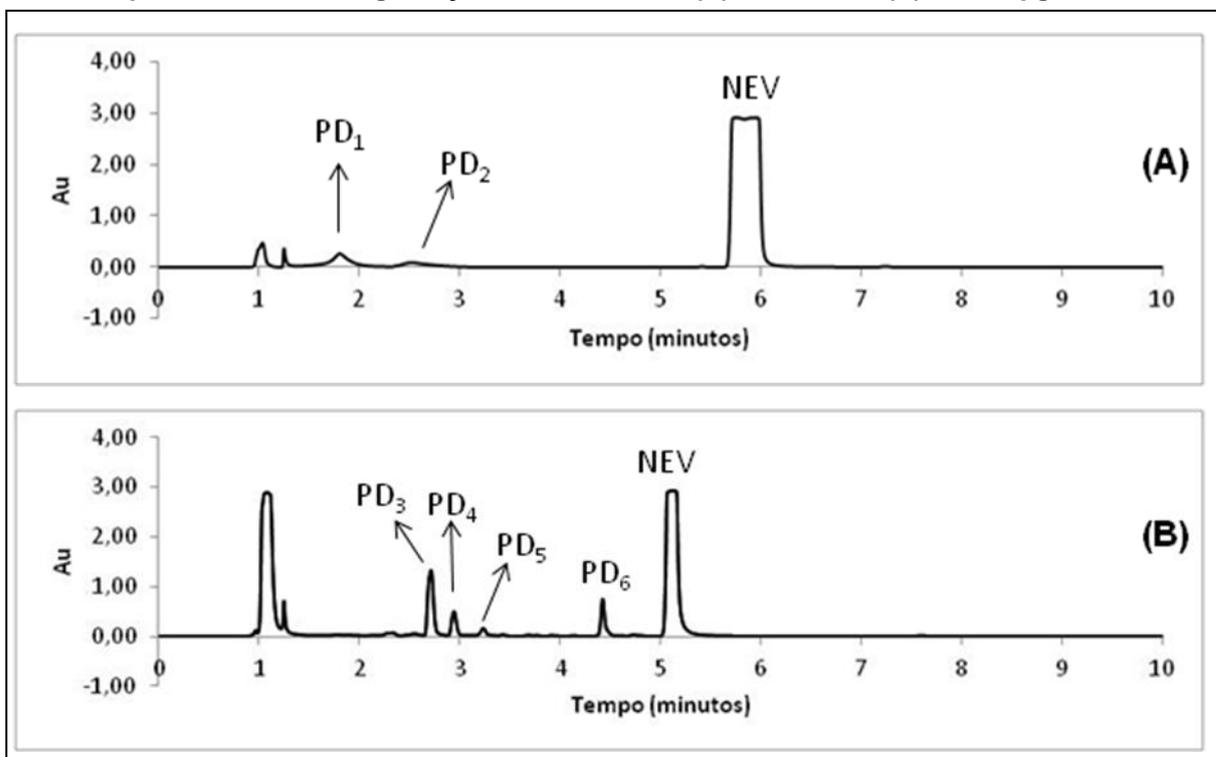
5.3.1.2 Desenvolvimento e otimização do método indicativo de estabilidade para nevirapina com eluição em gradiente

O primeiro gradiente testado (gradiente 1) é aquele apresentado na **Tabela 25** sendo as demais condições cromatográficas as mesmas descritas na **Tabela 19** (página 97). A partir do resultado obtido com esse primeiro gradiente (**Figura 25**), diversas alterações no tempo, na proporção do gradiente e no tipo do modificador orgânico foram propostas, com a finalidade de melhorar a resolução entre os picos.

Tabela 25 – Gradiente 1 (gradiente inicial) utilizado no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido

Tempo (min)	A % (v/v) (água)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 2	90% → 84%	10% → 16%	Gradiente linear
2 - 4	84% → 75%	15% → 25%	Gradiente linear
4 - 8	75%	25%	Isocrática
8 - 10	75% → 90%	25% → 10%	Re-equilíbrio

Figura 25 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 1 descrito na Tabela 25 e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação em meio ácido (A) e oxidativo (B) a 1000 µg/mL.

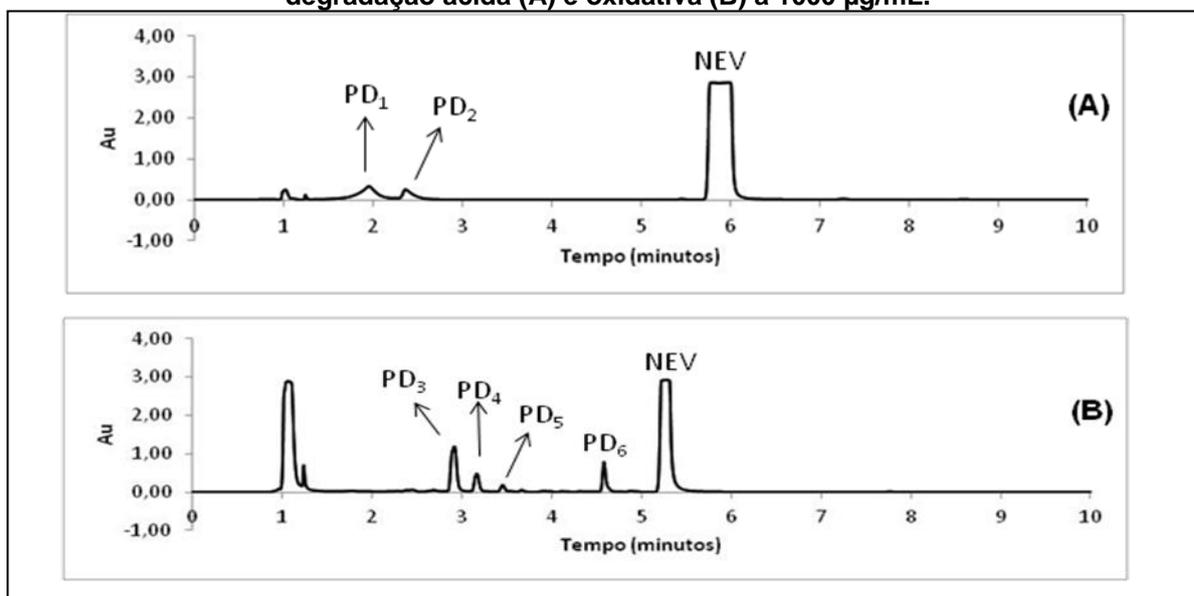


Legenda: PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise ácida; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa; NEV = nevirapina.

Analisando-se a **Figura 25**, percebe-se que o PD₁ elui muito próximo ao tempo morto e, além disso, os produtos de degradação PD₂ e PD₃ eluem praticamente no mesmo tempo de retenção e pode ser que não sejam o mesmo composto. Diante desses problemas, outros gradientes que iniciassem com uma composição de fase móvel mais fraca (baixa proporção de acetonitrila) e/ou possuíssem uma vazão menor foram propostos, para tentar aumentar o tempo de retenção dos produtos de degradação, resultando em uma melhor separação. Porém, com essas alterações, ocorreu alargamento e redução da altura dos picos referentes aos produtos de degradação e assim, não foi possível detectá-los adequadamente.

Da mesma forma que o gradiente 1, os gradientes propostos e testados na sequência proporcionaram separação satisfatória dos analitos provenientes da amostra de nevirapina submetida à degradação oxidativa, entretanto, os picos dos produtos de degradação provenientes do estresse em meio ácido ainda não apresentavam boa resolução, como exemplificado pelos cromatogramas obtidos com a utilização do gradiente 14 (**Tabela 26 e Figura 26**).

Figura 26 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 14, descrito na Tabela 26 (página 113) e demais condições descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação ácida (A) e oxidativa (B) a 1000 µg/mL.



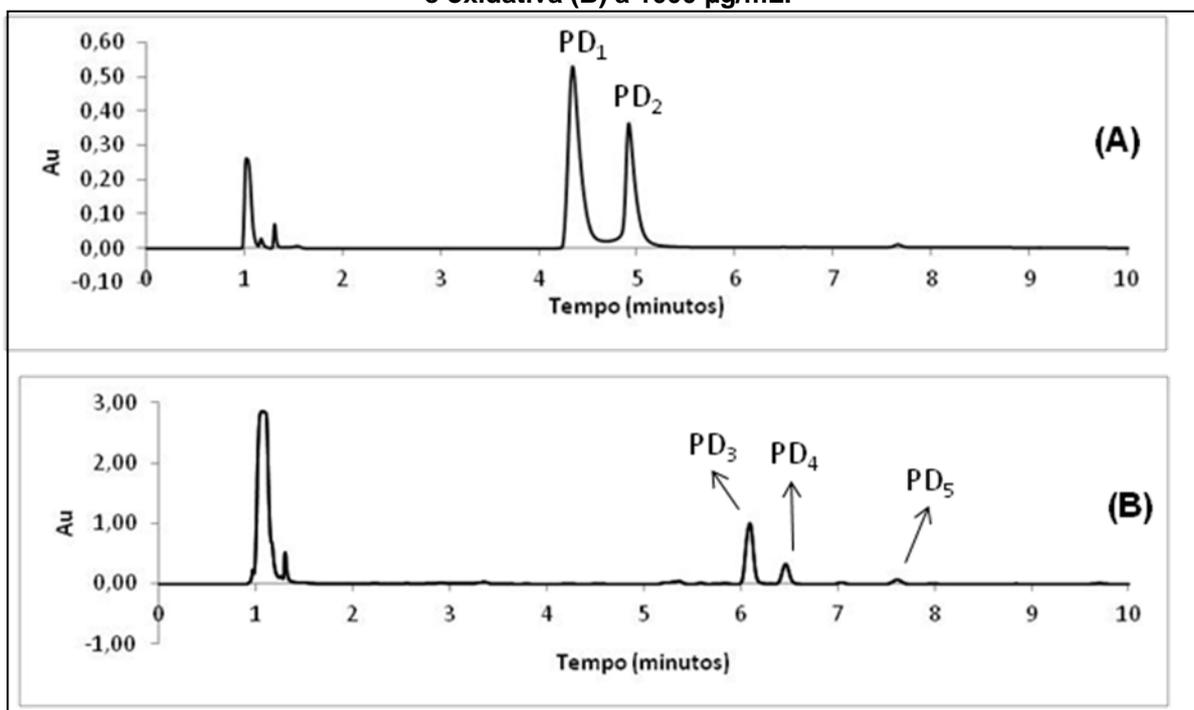
Legenda:NEV = nevirapina; PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise ácida; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa.

Tabela 26 – Gradiente 14 utilizado no desenvolvimento do indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.

Tempo (min)	A % (v/v) (água)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 1	91% → 86%	9% → 14%	Gradiente linear
1 - 3	86% → 75%	14% → 25%	Gradiente linear
3 - 6	75%	25%	Isocrática
6 - 10	75% → 91%	25% → 9%	Re-equilíbrio

Como a redução da proporção de acetonitrila no início do gradiente e a redução da vazão não estavam favorecendo a detecção dos analitos e a sua separação, realizou-se testes utilizando metanol como modificar orgânico. O metanol é um solvente que possui uma força de eluição inferior à da acetonitrila e, dessa forma, ao utilizá-lo, poderia-se conseguir um maior tempo de retenção dos analitos e, conseqüentemente, uma melhor separação. O teste inicial nesse caso, foi realizado utilizando-se o gradiente 1 (Tabela 25, página 111), porém, com utilização de metanol no lugar da acetonitrila. O resultado obtido é apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 1 descrito na Tabela 25 (página 111), porém, utilizando metanol como modificador orgânico e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de IFA provenientes da degradação ácida (A) e oxidativa (B) a 1000 µg/mL.



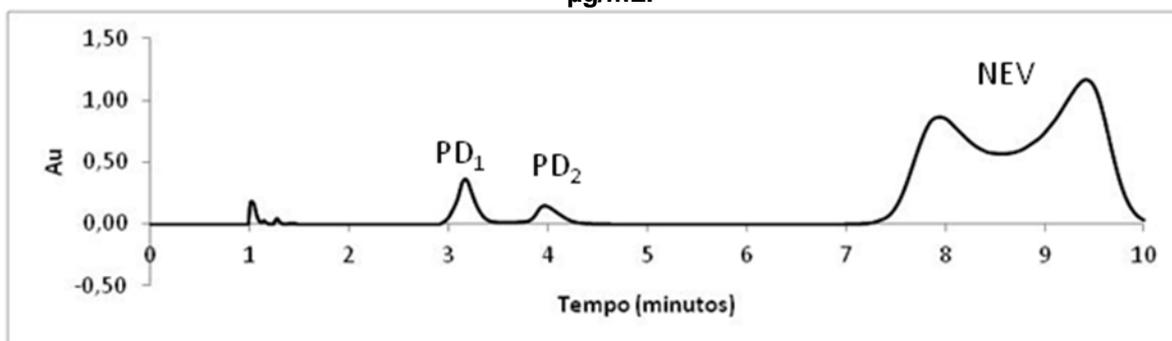
Legenda: NEV = nevirapina; PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise ácida; PD₃ a PD₅ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa.

Pode-se perceber que a resolução entre os picos referentes aos produtos de degradação ficou adequada, porém, com o tempo de corrida de 10 minutos, o metanol não apresentou força suficiente para promover a eluição do PD₆ e da nevirapina. Então, testou-se gradientes com maior proporção de metanol (**Tabela 27**), mas percebeu-se que o pico da nevirapina apresentava-se “dividido” (**Figura 28**). Não foi possível aumentar ainda mais a proporção de metanol, para solucionar o problema com o pico da nevirapina, pois este é um solvente mais viscoso que a acetonitrila e por isso, ao aumentar a sua proporção na fase móvel, ocorria aumento excessivo da pressão do sistema cromatográfico.

Tabela 27 – Gradiente 17, utilizado no desenvolvimento do indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.

Tempo (min)	A % (v/v) (água)	B % (v/v) (metanol)	Eluição
0 - 2	85% → 80%	15% → 20%	Gradiente linear
2 - 8	80% → 75%	20% → 25%	Gradiente linear
8 - 10	75%	25%	Isocrática

Figura 28 – Cromatograma obtido com o gradiente 17 (Tabela 27) utilizando-se metanol como modificador orgânico, para amostras de IFA provenientes da degradação ácida a 1000 µg/mL.



Legenda: NEV = nevirapina; PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise ácida.

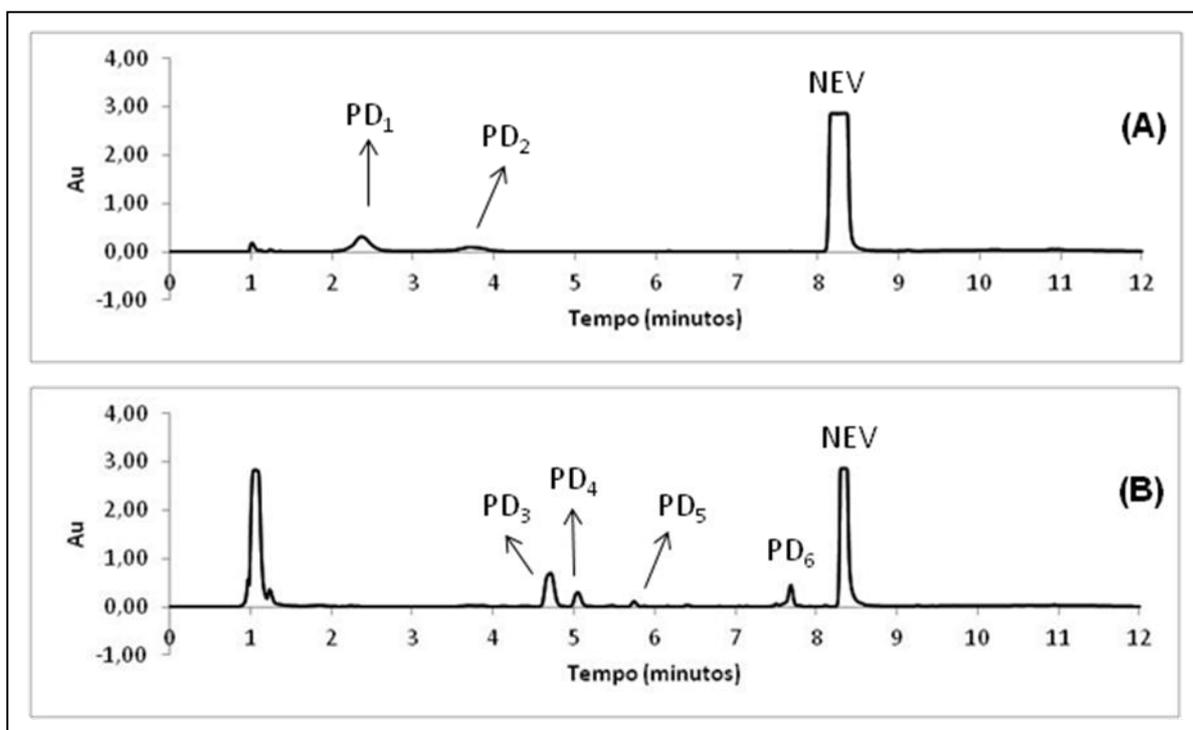
O passo seguinte no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade consistiu então em utilizar uma fase móvel constituída por um Eluente A (metanol:água 20:80 v/v) e Eluente B (acetonitrila), para que no início da corrida cromatográfica fosse utilizado predominantemente o Eluente A e assim promovesse a separação adequada dos produtos de degradação provenientes do estresse ácido e, após a eluição dos mesmos, seria utilizado o Eluente B que apresenta força suficiente para promover a eluição adequada dos produtos de degradação provenientes da

degradação oxidativa e da nevirapina. O melhor resultado obtido com essa composição de fase móvel foi o gradiente 23 (**Tabela 28** e **Figura 29**).

Tabela 28 – Gradiente 23, utilizado no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.

Tempo (min)	Eluente A % (v/v) (MeOH:H ₂ O 80:20)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 2	100%	0%	Isocrática
2 - 10	100% → 70%	0% → 30%	Gradiente linear
10 - 12	100%	0%	Re-equilíbrio

Figura 29 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 23 descrito na Tabela 28, para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida (A) e oxidativa (B) a 1000 µg/mL.



Legenda: NEV = nevirapina; PD₁ e PD₂ = produtos de degradação provenientes da hidrólise ácida; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa.

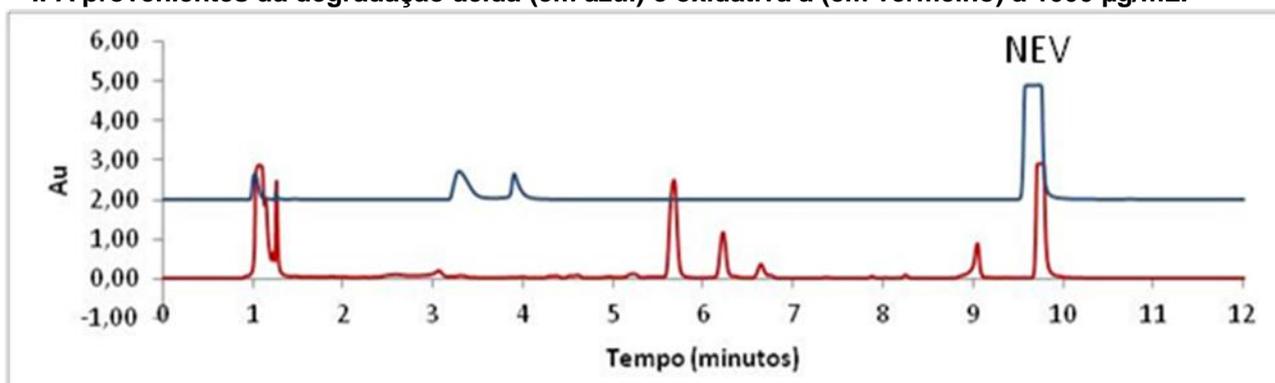
O gradiente 23 (**Tabela 28**, página 115) apresentou parâmetros cromatográficos e separação adequados para os produtos de degradação e a nevirapina (**Figura 29**). Contudo, com o intuito de desenvolver um método mais simples e de mais fácil preparo, realizaram-se mais alguns testes, modificando os gradientes até então testados, com o intuito de utilizar fase móvel constituída apenas por acetonitrila e água. O melhor resultado obtido foi o proveniente do gradiente 34a e condições cromatográficas descritas na **Tabela 29**. Os cromatogramas das amostras de

nevirapina submetidas à degradação ácida e oxidativa utilizando esse gradiente são apresentados na **Figura 30**.

Tabela 29 – Gradiente 34a, utilizado no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido.

Tempo (min)	A % (v/v) (água)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 - 3	95% → 90%	5% → 10%	Gradiente linear
3 - 6	90% → 84%	10% → 16%	Gradiente linear
6 - 8	84% → 75%	16% → 25%	Gradiente linear
8 - 10	75%	25%	Isocrática
10 - 12	75% → 95%	25% → 10%	Re-equilíbrio

Figura 30 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 34a descrito na Tabela 29 e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 19 (página 97), para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida (em azul) e oxidativa a (em vermelho) a 1000 µg/mL.

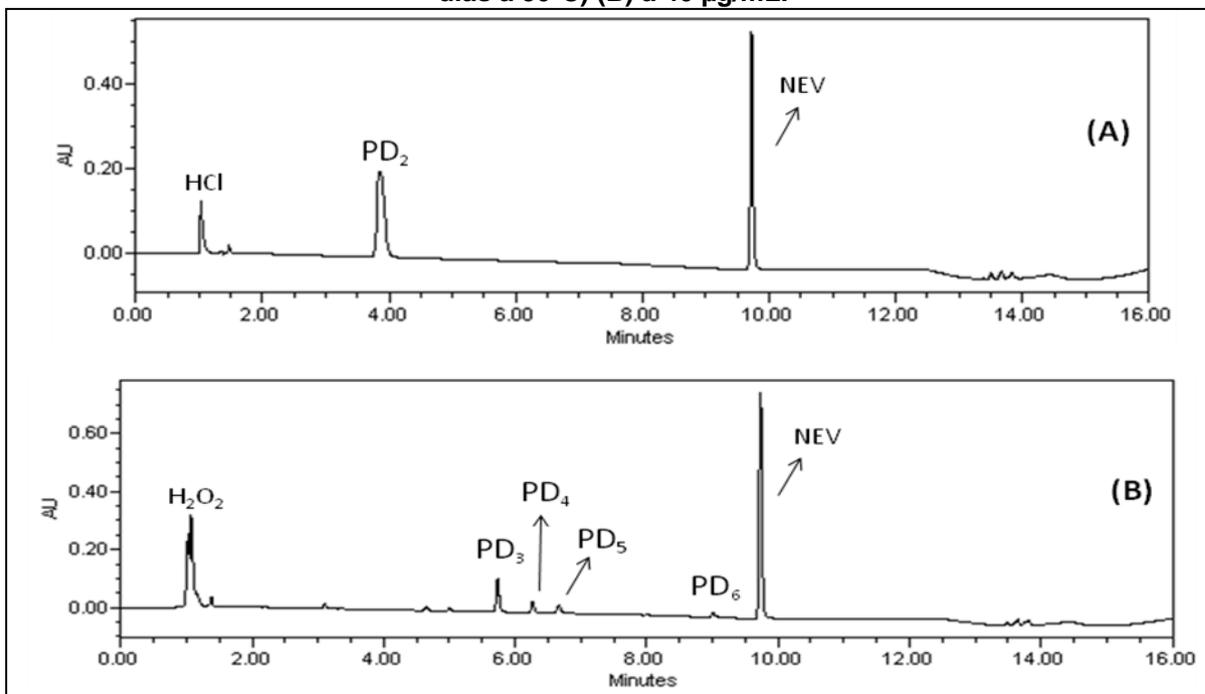


Legenda: NEV = nevirapina.

Algumas alterações nas condições finais do gradiente 34a foram feitas, de maneira a promover, no final da corrida, um aumento da proporção de solvente orgânico (acetonitrila) até 80% (v/v), com o objetivo de garantir que todo e qualquer analito presente na coluna fosse eluído e, por fim, acrescentou-se as condições para o re-equilíbrio da coluna, resultando assim no gradiente definitivo do método indicativo de estabilidade desenvolvido para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna de núcleo fundido: gradiente 34b, **Tabela 21**, página 99. As demais condições cromatográficas estabelecidas estão descritas na **Tabela 20**, página 99.

Os cromatogramas obtidos com o gradiente 34b para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida e oxidativa, são apresentadas na **Figura 31**.

Figura 31 – Cromatogramas obtidos com o gradiente 34b descrito na Tabela 21 e demais condições cromatográficas descritas na Tabela 20 (página 99), para amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação ácida (HCl 1 M, 10 dias a 50°C) (A) e oxidativa (H₂O₂ 3% v/v, 10 dias a 50°C) (B) a 40 µg/mL.



Legenda: NEV = nevirapina; PD₂= produto de degradação provenientes da hidrólise ácida; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa.

Ao analisar a **Figura 31**, pode-se perceber que apenas um produto de degradação é detectado no cromatograma obtido com a amostra de nevirapina IFA proveniente da degradação ácida a 40 µg/mL. Esse fato é discutido no item **4.3.4.2** (página 80).

Os parâmetros cromatográficos tempo morto, fator de retenção (k), número de pratos teóricos (N), resolução (R) e fator de cauda obtidos com o método indicativo de estabilidade definitivo (gradiente 34b) foram calculados para as amostras de nevirapina IFA provenientes da degradação em meio ácido e oxidativo a 40 µg/mL e são apresentados na **Tabela 30**. O tempo morto obtido com injeção de uracila a 50 µg/mL foi de 1,29 minutos.

Pelos resultados encontrados na **Tabela 30** conclui-se que os parâmetros cromatográficos estão adequados de acordo com as recomendações, ou seja, os fatores de retenção (k) encontrados foram maior que 2,0 (garantindo assim, que os picos estejam bem resolvidos do tempo morto) e a resolução entre os picos de interesse foi maior que 2,0 (UNITED STATES, 1994). Além disso, o número de

pratos teóricos encontrados foi maior que 16000 (mínimo aceitável de acordo com o relatório de desempenho da coluna com partículas de núcleo fundido utilizada) e para a nevirapina foi de aproximadamente 230000 e os fatores de cauda estavam na faixa recomendada, entre 0,8 e 1,5 (THE EUROPEAN, 2010), sendo o valor máximo encontrado de 1,47 para o PD₂.

Tabela 30 – Parâmetros do sistema cromatográficos utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido para a nevirapina e seus produtos de degradação utilizando coluna com partículas de núcleo fundido.

Amostra	Analito	Tempo de retenção (t _R)	Fator de retenção (k)	Número de pratos teóricos (N)	Fator de cauda	Resolução (R)
IFA proveniente da degradação ácida com HCl 1 M a 50 °C, durante 14 dias	PD ₂	3,97 min	2,08	16776	1,47	-
	NEV	9,75 min	6,56	232224	1,17	53,25
IFA proveniente da degradação oxidativa com H ₂ O ₂ 3% (v/v) a 50 °C, durante 14 dias	PD ₃	5,84 min	3,53	73194	1,18	-
	PD ₄	6,37 min	3,94	91333	1,08	6,43
	PD ₅	6,78 min	4,26	82496	1,03	4,61
	PD ₆	9,15 min	6,09	102133	1,08	22,63
	NEV	9,76 min	6,57	230591	1,15	7,07

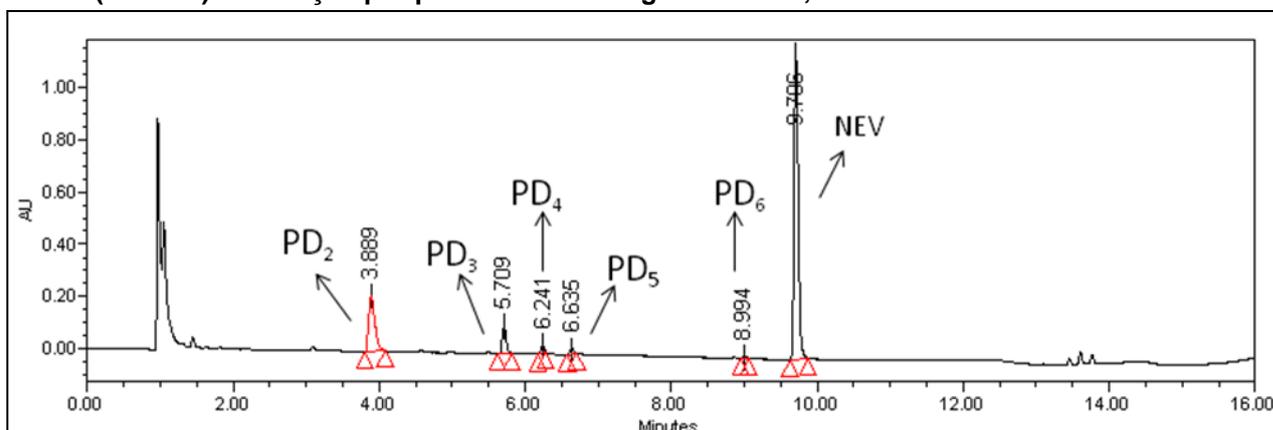
Legenda: NEV = nevirapina; PD₂ = produto de degradação proveniente da hidrólise ácida; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa.

5.3.2 Validação

5.3.2.1 Seletividade

Após a mistura das amostras de nevirapina IFA submetidas às condições de hidrólise em meio ácido (HCl 1 M) e oxidação por peróxido de hidrogênio 3% (v/v), durante sete dias a 50 °C, obteve-se o cromatograma apresentado na **Figura 32**, no qual há cinco picos referentes aos cinco produtos de degradação (PD₂ a PD₆), sendo um deles (PD₂) proveniente da amostra submetida à hidrólise em meio ácido e os demais provenientes da oxidação. Pode-se perceber pela análise da **Tabela 31** que os picos referentes aos principais produtos de degradação e a nevirapina apresentam-se separados um dos outros com uma resolução superior a 2,0. Resultado semelhante foi obtido para as amostras de comprimidos de nevirapina.

Figura 32 – Cromatograma obtido com o método definitivo indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido (gradiente 34b), em comprimento de onda de 254 nm, obtido para a mistura de amostras de nevirapina IFA a 40 µg/mL submetidas a hidrólise ácida (HCl 1 M) e oxidação por peróxido de hidrogênio 3% v/v, durante sete dias a 50 °C.



Legenda: NEV = nevirapina; PD₂ = produto de degradação proveniente da hidrólise ácida; PD₃ a PD₆ = produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa.

Tabela 31 – Resolução entre os picos nas amostras de nevirapina IFA e comprimidos de nevirapina contendo produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido e oxidação e nevirapina.

Amostra	Analito	Resolução
Nevirapina insumo farmacêutico ativo	PD ₂	-
	PD ₃	14,27
	PD ₄	5,45
	PD ₅	3,86
	PD ₆	18,64
	NEV IFA	5,79
Comprimidos de nevirapina	PD ₂	-
	PD ₃	14,44
	PD ₄	5,19
	PD ₅	3,69
	PD ₆	21,80
	NEV Comp	6,70

Legenda: NEV = nevirapina; PD₂ a PD₆ = produtos de degradação nomeados conforme **Figura 32**.

A análise da pureza de pico da nevirapina obtida nos cromatogramas das amostras de nevirapina IFA e de seus comprimidos submetidas às condições de degradação forçada (hidrólise ácida, básica, neutra, oxidação com peróxido de hidrogênio e AIBN, degradação térmica, degradação por íons metálicos, umidade e fotodegradação) nas concentrações de trabalho (40 µg/mL) foram realizadas com auxílio do DAD. Para o pico ser considerado puro, de acordo com as especificações do equipamento, o ângulo de pureza deve ser inferior ao ângulo limite, ambos

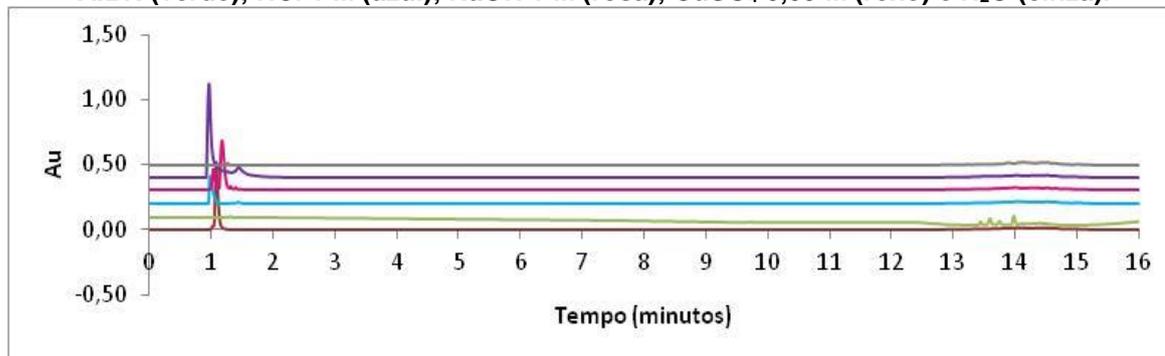
determinados pelo software *Empower 2*. Na **Tabela 32** são apresentados os valores de ângulo de pureza e ângulo limite dos picos referentes à nevirapina IFA e comprimidos submetidos às diversas condições de degradação forçada. Para todas as condições, o ângulo de pureza encontrado foi inferior ao ângulo limite, indicando que não houve interferentes que eluíram junto com os picos de nevirapina.

Tabela 32 – Ângulos de pureza e ângulos limites obtidos para o pico da nevirapina nas amostras de IFA e comprimidos submetidos às diversas condições de degradação forçada.

Condição de degradação forçada	Ângulo de pureza	Ângulo limite
IFA + ACN + AIBN 37,6 mM	0,416	1,002
Comprimidos + ACN + AIBN 37,6 mM	0,398	0,811
IFA + ACN + CuSO ₄ 0,05 M	0,085	0,695
Comprimidos + ACN + CuSO ₄ 0,05 M	0,315	0,639
IFA + ACN + HCl 1 M	0,276	0,442
Comprimidos + ACN + HCl 0,1 M	0,052	0,338
IFA + ACN + luz ultravioleta	0,457	1,162
Comprimidos + ACN + luz ultravioleta	0,435	0,935
IFA + ACN + luz visível	0,425	0,986
Comprimidos + ACN + luz visível	0,408	0,929
IFA + ACN + H ₂ O ₂ 3% (v/v)	0,289	0,472
Comprimidos + ACN + H ₂ O ₂ 3% (v/v)	0,483	0,616
IFA + ACN + umidade elevada	0,421	0,938
Comprimidos + ACN + umidade elevada	0,389	0,764
IFA + ACN + NaOH 1 M	0,072	0,564
Comprimidos + ACN + NaOH 1 M	0,057	0,367
IFA + ACN + H ₂ O	0,479	1,530
Comprimidos + ACN + H ₂ O	0,194	1,050
IFA + ACN + aquecimento (80°C)	0,515	1,696
Comprimidos + ACN + aquecimento (80°C)	0,502	1,794

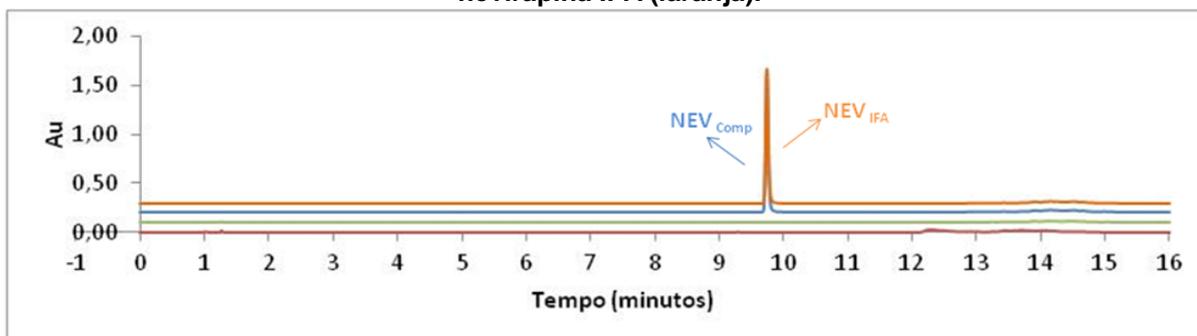
Os cromatogramas obtidos com cada um dos reagentes estressantes foram sobrepostos e são apresentados na **Figura 33**. Pode-se observar que não há picos provenientes dos agentes estressantes eluindo no mesmo tempo de retenção da nevirapina e dos produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido e da oxidação.

Figura 33 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos, com o gradiente 34b, em comprimento de onda de 254 nm, dos agentes estressantes H₂O₂ 3%v/v (vermelho), AIBN (verde); HCl 1 M (azul); NaOH 1 M (rosa); CuSO₄ 0,05 M (roxo) e H₂O (cinza).



Como mostrado na **Figura 34**, os excipientes e o diluente utilizado (acetonitrila e água) não interferem na determinação de nevirapina e nem dos produtos de degradação formados, uma vez que não há pico proveniente dos excipientes e do diluente eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 34 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos, com o gradiente 34b (254 nm), com a preparação contendo os excipientes do comprimido Nevirax[®] (vermelho), o diluente das amostras (acetonitrila e água, em verde), amostras de comprimidos de nevirapina (azul) e nevirapina IFA (laranja).



Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que o método desenvolvido foi seletivo para nevirapina e seus produtos de degradação.

Os valores médios e os desvios padrões relativos (DPR) dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos após cinco injeções da solução de nevirapina IFA padronizado utilizando o método indicativo de estabilidade desenvolvido (gradiente 34b), são apresentados na **Tabela 33**. Os resultados de adequabilidade do sistema foram satisfatórios. O DPR entre as áreas sob o pico da nevirapina e os tempos de retenção foram inferiores a 1%, o fator de cauda médio foi de 1,17, o fator de retenção (k) encontra-se entre 1 e 10 (BADMAN *et al.*, 2010, GUILLARME *et al.*,

2007; GUILLARME *et al.*, 2010; MCMASTER, 2007; PATNAIK, 1997; PRADO, 2013).

Tabela 33 – Valores médios e DPR dos parâmetros de adequabilidade do sistema.

	Área (AU.s)	T _R (min)	Fator de cauda	k
Média	4230813	9,76	1,17	6,57
DPR (%)	0,1974	0,1149	1,1881	0,1324

5.3.2.2 Linearidade

Avaliou-se a linearidade do método indicativo de estabilidade por meio da análise de uma curva analítica de seis níveis de concentração, igualmente espaçados, na faixa de 8 a 48 µg/mL, ou seja, de 20% a 120% da concentração de trabalho (40 µg/mL). Os resultados de concentração de nevirapina e respectiva área nos seis níveis testados são mostrados na **Tabela 34**.

Tabela 34 – Concentrações de nevirapina e valores de área para a construção da curva analítica do método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido.

Nevirapina (µg/mL)	Nível de concentração*	Replicata	Área (mAu.s)
7,99	20%	1	881,24933
8,09		2	891,79967
7,99		3	879,50033
15,98	40%	1	1773,84366
16,19		2	1789,80733
15,98		3	1790,65300
23,96	60%	1	2658,50033
24,28		2	2673,69867
23,97		3	2668,76500
31,95	80%	1	3507,87733
32,38		2	3519,08933
31,96		3	3541,49433
39,94	100%	1	4384,05833
40,47		2	4431,07267
39,95		3	4437,79633
47,93	120%	1**	5204,22667
48,56		2	5264,98033
47,94		3	5266,71367

*Em relação à concentração de trabalho.

**Outlier

Após a aplicação dos testes estatísticos, detectou-se apenas um *outlier*, o qual foi excluído do conjunto de dados, e concluiu-se que os resíduos atendem a todas as premissas necessárias para utilização dos métodos dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), conforme mostrado na **Tabela 35**.

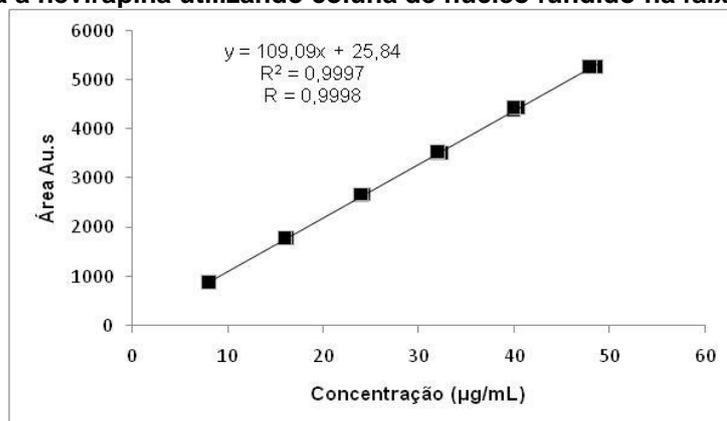
Tabela 35 – Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO.

Premissa	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de <i>outliers</i> pelo método <i>Jackknife</i>	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Apenas um ponto apresentou $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão de um ponto, considerado <i>outlier</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9621$ $R_{crítico} = 0,9437$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u=1,38050$ $d_{cal}=1,71660$ $4-d_u=2,61950$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i> ou <i>Levene modificado</i>	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L = 0,744$ $t_{crítico} = 2,131$	Há homoscedasticidade entre os resíduos.

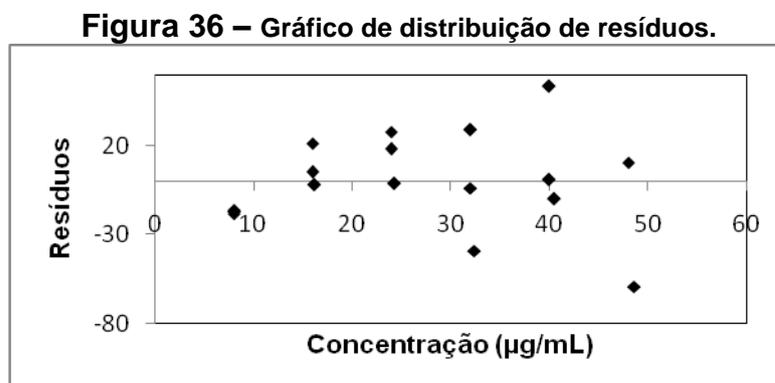
Fonte: tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007.

Diante dos resultados satisfatórios em relação às premissas, aplicou-se o MMQO aos dados da **Tabela 34**, e assim foi possível obter a curva analítica, a equação da reta, o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de correlação (R) que são apresentados na **Figura 35**.

Figura 35 – Curva analítica para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade para a nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido na faixa de 8 a 48 $\mu\text{g/mL}$.



O gráfico de distribuição de resíduos é apresentado na **Figura 36**. Ao analisá-lo é possível verificar uma distribuição aleatória dos pontos e, portanto, ausência de qualquer tendência.



O coeficiente de determinação foi próximo de 1 (0,9997), sendo o coeficiente de correlação maior que 0,99 (0,9998), estando de acordo com o preconizado pela Resolução RE nº 899/2003 (ANVISA), na qual é descrito que o critério mínimo aceitável para um método ser considerado linear, é que a curva analítica apresente um coeficiente de correlação (R) maior ou igual a 0,99 (BRASIL, 2003). Entretanto, de acordo com Thompson e colaboradores (2002), o coeficiente de correlação é inadequado para indicar a falta de ajuste ao modelo linear, não devendo ser utilizado como teste de linearidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Os coeficientes de correlação e de determinação indicam o grau de ajuste dos dados à curva, independente do modelo. Contudo, valores de R próximos a 1, não pertencem necessariamente a uma relação linear, podendo resultar de pontos bem ajustados a um modelo não linear (RSC, 2005; SOUZA, 2007).

Diante disso, realizou-se a análise da variância (ANOVA) para determinar a significância da regressão e do desvio de linearidade. Com os resultados obtidos, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de significância de 0,05 e que não há desvio de linearidade ($p > 0,05$), ou seja, o método demonstrou ser linear na faixa analisada (20% a 120% da concentração de trabalho).

5.3.2.3 Precisão

A precisão intra-corrída (repetibilidade) foi avaliada por meio de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, 40% (baixa), 100% (média) e 120% (alta) da concentração de trabalho, com três réplicas cada, tanto para nevirapina IFA quanto para comprimidos de nevirapina. O mesmo procedimento foi repetido em dia posterior, por outro analista, para se obter os resultados da precisão inter-corrídas (precisão intermediária). Os valores de teor médio determinados a partir dos resultados obtidos nos dois dias de análise e os desvios padrão relativos (DPR) encontrados para cada nível são apresentados nas **Tabelas 36 e 37**, para nevirapina IFA e seus comprimidos respectivamente.

Tabela 36 – Valores de teor médio e DPR estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas para nevirapina insumo farmacêutico ativo.

	Nível*	Teor médio (%)	DPR
1º dia de análise (intra-corrída)	40%	101,49	0,9741
	100%	100,58	0,9084
	120%	101,45	0,6946
2º dia de análise (inter-corrídas)	40%	101,05	0,6559
	100%	101,12	0,8179
	120%	101,09	1,8071
Inter-corrídas	40%	101,27	0,7825
	100%	100,85	0,8252
	120%	101,27	1,2274

*Em relação à concentração de trabalho.

Tabela 37 – Valores de teor médio e DPR estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas para comprimidos de nevirapina.

	Nível*	Teor médio (%)	DPR
1º dia de análise (intra-corrída)	40%	100,23	0,3589
	100%	101,19	1,6955
	120%	100,54	0,5302
2º dia de análise (inter-corrídas)	40%	99,70	1,8499
	100%	98,81	0,4805
	120%	99,87	0,4401
Inter-corrídas	40%	99,97	1,2246
	100%	100,00	1,7203
	120%	100,20	0,5688

*Em relação à concentração de trabalho.

De acordo com a Resolução RE nº 899/2003 (ANVISA), o valor máximo aceitável para os valores de DPR deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

Os valores de DPR obtidos foram inferiores a 2,0% e, portanto, o método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando coluna de núcleo fundido apresenta precisão intra-corrída (repetibilidade) e precisão inter-corrídas (precisão intermediária) satisfatórias.

5.3.2.4 Exatidão

Na **Tabela 38** estão apresentados os resultados referentes à porcentagem de analito recuperado após ter sido adicionado ao placebo e submetido ao mesmo procedimento de preparo da amostra de comprimidos de nevirapina.

Tabela 38 – Porcentagem de recuperação de nevirapina adicionada ao placebo para avaliação da exatidão do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando coluna com partículas de núcleo fundido.

Nível	n	Conc. Teórica (µg/mL)	Recuperado (µg/mL)	Porcentagem de recuperação	Médias (%)
40% (16 µg/mL)	1	16,03	16,12	100,58	100,67
	2	16,26	16,42	100,94	
	3	16,27	16,35	100,51	
100% (40 µg/mL)	1	40,43	39,73	98,27	98,28
	2	40,18	38,93	96,90	
	3	40,06	38,93	99,68	
120% (48 µg/mL)	1	48,29	47,91	99,21	99,56
	2	48,29	48,94	101,36	
	3	48,06	47,16	98,13	

Para que o método seja considerado exato, os valores para a recuperação média em cada nível de concentração devem estar entre 98,0% e 102,0% (GREEN, 1996).

Todos os valores de recuperação média encontraram-se entre 98% e 102%, indicando dessa forma, que o método apresentou exatidão adequada para quantificação da nevirapina em comprimidos.

5.3.2.5 Robustez

Após realização dos testes de robustez, calcularam-se os efeitos de cada variável e o efeito maior para que a influência das modificações propostas no método fosse avaliada. Os resultados obtidos no teste de robustez são apresentados na **Tabela 39**. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o método foi robusto para os parâmetros de temperatura da coluna, marca da acetoneitrila e volume de injeção, uma vez que os efeitos de cada variável foi inferior ao efeito maior calculado. Em relação ao tempo de agitação da amostra no ultrassom, verifica-se que o efeito desta variável (1,91) foi superior ao efeito maior (1,44), indicando assim, que este parâmetro é crítico para a confiabilidade dos resultados obtidos e, portanto, o tempo de agitação da amostra em ultrassom deve ser bem controlado e de, exatamente, 50 minutos.

Tabela 39 – Avaliação do efeito das variáveis na determinação de nevirapina utilizando método indicativo de estabilidade com coluna de núcleo fundido.

Variável		Média dos teores ¹	Efeito da variável ²	Efeito maior ³
Temperatura da coluna	A: 35°C	100,94	100,94 - 101,00 =	1,44
	a: 25°C	101,00	-0,06	
Marca da acetoneitrila	B: Scharlau®	100,95	100,95 – 100,99 =	
	b: Merck®	100,99	-0,04	
Volume de injeção	C: 7 µL	100,89	100,89 – 101,05 =	
	C: 3 µL	101,05	-0,16	
Tempo de agitação no ultrassom	D: 60 min	101,92	101,92 – 100,01 =	
	d: 40 min	100,01	1,91	

¹Média dos teores dos 4 experimentos realizados com determinada variável no nível alto ou baixo.

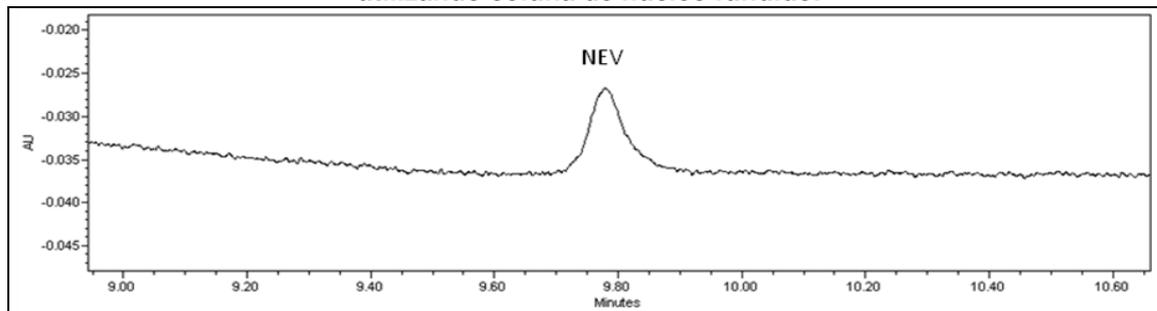
²Média dos teores dos 4 experimentos realizados com determinada variável no nível alto menos a média dos teores dos 4 experimentos realizados com a variável no nível baixo.

³Desvio padrão relativo (DPR) entre os teores obtidos nos 8 experimentos $\times \sqrt{2}$.

5.3.2.6 Limite de detecção

O limite de detecção teórico, estimado pela curva analítica, foi de 0,46 µg/mL. Como a relação sinal/ruído nesta concentração foi superior a três, diluições foram realizadas para determinar o limite de detecção real do método analítico. O limite de detecção real foi inferior a 0,092 µg/mL, uma vez que com esta concentração o valor da relação sinal ruído encontrado foi maior que três (**Figura 37**).

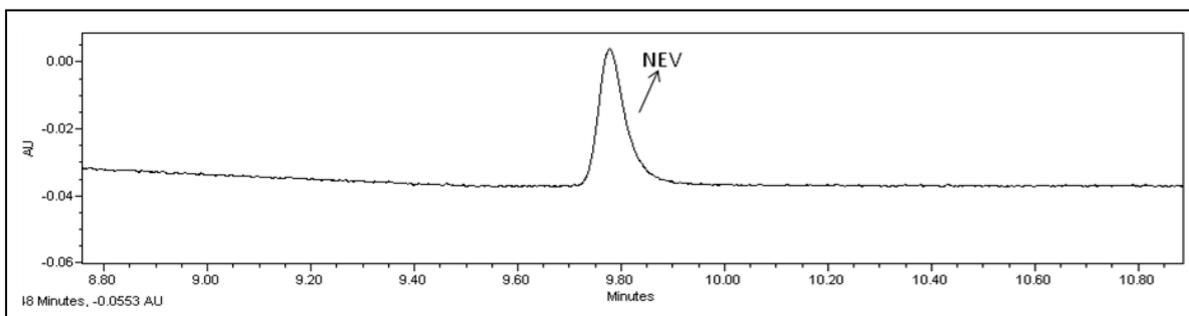
Figura 37 – Cromatograma para solução de nevirapina IFA a 0,092 µg/mL obtido para a confirmação do limite de detecção do método indicativo de estabilidade para a nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido.



5.3.2.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação teórico, estimado pela curva analítica foi de 1,39 µg/mL. Como a relação sinal/ruído nesta concentração foi superior a dez, foram realizadas diluições para determinar o limite de quantificação real do método desenvolvido. O limite de quantificação real foi inferior a 0,174 µg/mL, uma vez que com esta concentração o valor da relação sinal ruído foi maior que dez (**Figura 38**).

Figura 38 – Cromatograma para solução de nevirapina IFA a 0,174 µg/mL obtido para a confirmação do limite de quantificação do método indicativo de estabilidade para a nevirapina utilizando coluna de núcleo fundido.



6 CAPÍTULO III: Estudo da cinética, das rotas de degradação da nevirapina e da citotoxicidade das amostras degradadas

6.1 Materiais

6.1.1 Substância química de referência, IFA e comprimidos

Conforme o descrito no item 4.1.1 (página 63).

6.1.2 Reagentes

- Água ultrapura.
- Reagentes grau analítico: etanol Fluka (Saint Louis, EUA), ácido clorídrico Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), peróxido de hidrogênio Synth (Diadema, Brasil), acetato de etila Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), éter etílico Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), diclorometano Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), hexano Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), isopropanol Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), éter metil-terc-butilico Fischer-scientific (Saint Louis, EUA), clorofórmio Vetec (Duque de Caxias, Brasil).
- Solventes grau CLAE: acetonitrila J. T. Baker (Xalostoc, México) e metanol Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Outros: meio de cultura RPMI-1640 Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), soro fetal bovino (SFB), penicilina Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), estreptomicina Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA) e 3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5difeniltetrazólico (MTT) Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

6.1.3 Materiais e vidrarias

- Coluna cromatográfica de núcleo fundido Poroshell® 120 AGILENT C₁₈, (100 x 2,1 mm, 2,7 µm).
- Frasco tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm de tamanho de poro.
- Kit para filtração a vácuo.

- Membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 μm , SARTORIUS.
- Placa de cultura de células (TPP, 92096).
- Pipeta automática P1000 GILSON e ponteiros de 1000 μL para uso em micropipetas.
- Tubos de ensaio de vidro.

6.1.4 Equipamentos e coluna cromatográfica

- Agitador tipo vórtex MS1, IKA.
- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.
- Banho-maria FULL GAUGE TIC-17C.
- Bomba de vácuo LABOPORT KNF N842.
- Concentrador de amostras TecVap TE-0194 TECNAL.
- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência WATERS ACQUITY® UPLC com software Empower.
- Espectrofotômetro VersaMax ELISA MOLECULAR DEVICES CORPORATION e SOFTMAX® PRO SOFTWARE versão 5.
- Sistema CLAE-EM/EM composto por amostrador automático 2777, WATERS, forno de coluna CHM, WATERS, bomba binária 1525 μ , WATERS, espectrômetro de massas equipado com fonte de IES Quattro LC, WATERS, software MassLynx.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIENT Q3.
- Software Accelrys Draw
- Software Excel® 2007.

6.2 Métodos

6.2.1 Estudo da cinética de degradação forçada da nevirapina IFA e comprimidos

Realizou-se o estudo de cinética de degradação forçada da nevirapina IFA e comprimidos submetendo-os às condições de oxidação com peróxido de hidrogênio 3% (v/v), hidrólise em meio ácido com ácido clorídrico 1 M, hidrólise em meio alcalino com hidróxido de sódio 1 M, hidrólise em meio neutro com água e degradação na presença de íons metálicos com sulfato de cobre a 0,05 M. Os experimentos foram realizadas com amostras expostas ao aquecimento e à temperatura ambiente.

As amostras de degradação do IFA foram preparadas da seguinte maneira: pesou-se, exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando os agentes degradantes (H_2O_2 3% v/v, HCl 1 M, NaOH 1 M, H_2O e CuSO_4 5 M), e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de nevirapina. Essas amostras foram preparadas em duplicata para o estudo de cada agente degradante, de maneira que uma das réplicas foi mantida em banho-maria a 50 °C e a outra à temperatura ambiente. De dois em dois dias, com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, completou-se o volume com água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ de nevirapina. As soluções foram filtradas e injetadas em triplicata no cromatógrafo.

Para o preparo das amostras de nevirapina comprimidos, determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, que foram triturados posteriormente. Transferiu-se, quantidade de pó equivalente a, exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Continuou-se o procedimento conforme descrito para o preparo das amostras de degradação de nevirapina IFA.

Para o preparo das amostras de IFA e comprimidos controle, pesou-se, exatamente, o equivalente a 25 mg de nevirapina e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de nevirapina. Com o

auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, completou-se o volume com água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 40 µg/mL de nevirapina. As soluções foram filtradas e injetadas em triplicata no cromatógrafo.

O preparo do padrão foi realizado da mesma forma que o preparo do controle, porém, utilizando-se nevirapina IFA padronizado. Foram preparadas também amostras utilizando placebo no lugar da nevirapina IFA e amostras contendo apenas os agentes estressantes utilizados (solução branco).

As preparações provenientes do estudo de degradação forçada (IFA, comprimidos e placebo), bem como as soluções branco foram injetadas no cromatógrafo. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais dos interferentes, provenientes, por exemplo, do agente estressante, permitindo, dessa forma, a identificação e quantificação apenas dos picos referentes aos produtos de degradação.

O método cromatográfico utilizado para a análise das amostras foi o método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado utilizando coluna de núcleo fundido (gradiente 34b), cujas condições analíticas estão descritas nas **Tabelas 20 e 21**, página 99.

O estudo da cinética foi realizado durante o período de 14 dias e as coletas das amostras para as análises de teor da nevirapina remanescente e dos produtos de degradação formados foram realizadas a cada dois dias (48 em 48 horas). Determinou-se a porcentagem de nevirapina remanescente em cada coleta para cada situação de exposição aos agentes degradantes. Os gráficos de cinética foram construídos com base na área sob o pico da nevirapina em relação ao tempo de retirada da alíquota para as condições de degradação forçada com exposição a ácido clorídrico 1 M e peróxido de hidrogênio 3% (v/v), a 50 °C. Para avaliar o melhor ajuste da cinética de degradação utilizou-se a regressão linear para calcular a equação da reta do gráfico do fármaco remanescente (concentração, log concentração ou 1/concentração) em função do tempo e estabelecer o coeficiente de determinação R^2 .

Os tempos de exposição aos agentes degradantes ácido clorídrico 1 M e peróxido de hidrogênio 3% (v/v), a 50 °C, para obtenção de uma extensão de degradação adequada (10% a 30%), foram estimados a partir do estudo de cinética de degradação para nevirapina IFA e comprimidos submetidos a essas condições. Os produtos de degradação majoritários formados foram quantificados relacionando-se as suas respectivas áreas com a área da nevirapina IFA padronizado, devido à ausência dos padrões de produtos de degradação.

6.2.2 Identificação dos produtos de degradação

Com o objetivo de se propor estruturas químicas e mecanismos químicos de formação dos produtos de degradação majoritários, utilizou-se a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas sequencial, com ionização por *electrospray* e analisador do tipo triplo quadrupolo (CLAE-EM/EM).

Primeiramente realizou-se a infusão direta de soluções de nevirapina IFA no espectrômetro de massas para definir o modo de ionização, os íons a serem monitorados e demais parâmetros da espectrometria de massas. Os parâmetros espectrométricos e seus respectivos valores que foram estabelecidos durante a infusão direta na nevirapina IFA no espectrômetro de massas e que foram utilizados durante todas as análises por CLAE-EM/EM são apresentados na **Tabela 40**.

Tabela 40 – Parâmetros espectrométricos utilizados nas análises por CLAE-EM/EM.

Parâmetro da fonte IES (+)		Parâmetro do analisador de massas	
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Capilar	3,5 kV	Resolução de massas baixas (LM 1)	10,0
Cone	38 V	Resolução de massas altas (HM 1)	10,0
		<i>Ion Energy 1</i>	0,5
Extrator	2 V	Entrada	1,0
<i>RF lens</i> (rádio frequência)	0,5 V	Saída	10,0
Temperatura da fonte	100 °C	Resolução de massas altas (LM 2)	7,5
Temperatura de dessolvatação	350 °C	Resolução de massas altas (HM 2)	7,5
Fluxo do gás de dessolvatação	500L/h	<i>Ion Energy 2</i>	1,5
		Multiplicador de sinal	650

Nesse momento obtiveram-se também os espectros de varredura de massas e de fragmentação para a nevirapina.

Posteriormente, as amostras degradadas nas condições que apresentaram formação de produtos de degradação, ou seja, amostras submetidas ao peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico foram injetadas no modo de varredura (*scan*). O método cromatográfico foi adaptado para que todos os produtos de degradação apresentassem separação adequada entre si e os espectros de massas dos mesmos foram obtidos, e então pôde-se conhecer os valores das razões m/z dos produtos de degradação majoritariamente formados.

Em seguida, as razões m/z mais abundantes presentes no espectro de massas de cada produto de degradação foram selecionadas para que as mesmas fossem filtradas no primeiro analisador de massas e transferidos para uma cela de colisão (segundo analisador), onde repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (argônio) resultasse no aumento da energia potencial do íon e, conseqüentemente, na sua fragmentação. Esses íons produto (íon filho) passaram então por um terceiro analisador de massas e dessa forma foi possível determinar as razões m/z dos mesmos. Conhecendo-se as razões m/z mais abundantes de cada íon precursor dos produtos de degradação e dos respectivos íons produto, foi possível propor estruturas e rotas de formação para os produtos de degradação mais relevantes.

6.2.3 Estudo de citotoxicidade

6.2.3.1 Preparo das amostras

Antes de realizar o teste de citotoxicidade, foi necessário realizar uma etapa de preparo de amostra com o objetivo de isolar a nevirapina e os produtos de degradação formados do restante da matriz das amostras degradadas, constituída pelo agente estressante e acetonitrila. Então, primeiramente, realizaram-se extrações líquido-líquido utilizando diversos solventes, para verificar qual deles proporcionava uma melhor recuperação da nevirapina e dos produtos de degradação formados no estresse ácido e oxidativo.

Para a realização da extração líquido-líquido, transferiu-se 1 mL da amostra controle e das amostras degradadas de nevirapina IFA, preparadas conforme descrito a seguir, para tubos de ensaio de vidro. Testou-se iniciar a extração com amostras de nevirapina a 1000 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL, entretanto, as amostras que resultaram em uma concentração adequada de nevirapina para a realização do teste de citotoxicidade foram as descritas a seguir.

A amostra de nevirapina IFA controle foi preparada pesando-se exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina IFA que foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando água e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 µg/mL de nevirapina. Esta amostra foi diluída para concentração final de 200 µg/mL de nevirapina.

A amostra de nevirapina IFA submetida à oxidação foi preparada pesando-se exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina IFA que foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando peróxido de hidrogênio 3% (v/v) e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 µg/mL de nevirapina. Transferiu-se para tubo de ensaio com tampa e deixou-se em banho-maria a 50 °C, durante 10 dias. Após esse período de exposição, esta amostra foi diluída para concentração final de 200 µg/mL de nevirapina.

A amostra de nevirapina IFA submetida à hidrólise em meio ácido foi preparada pesando-se exatamente, cerca de 25 mg de nevirapina IFA que foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com o auxílio de 7 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom durante 50 minutos e após esfriar, completou-se o volume para 25 mL utilizando ácido clorídrico 1 M e homogeneizou-se, resultando em uma solução com concentração de 1000 µg/mL de nevirapina. Transferiu-se para tubo de ensaio com tampa e deixou-se em banho-maria a 50 °C, durante 10 dias.

Em seguida, adicionaram-se 3 mL de acetato de etila aos tubos contendo as amostras degradadas e submeteu-se a vórtex durante dois minutos a 2000 rotações

por minuto (rpm). Deixou-se a mistura em repouso até que se observasse a separação das fases e coletou-se 2,4 mL da parte orgânica e transferiu-se para um segundo tubo de ensaio. Submeteu-se esse segundo tubo à secagem em um concentrador de amostra. Por fim, reconstituiu-se a amostra adicionando-se 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e agitou-se em vórtex durante dois minutos a 2000 rpm. Filtrou-se para *vial* e injetou-se em triplicata no cromatógrafo a líquido de ultra eficiência utilizando o método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado (gradiente 34b, **Tabelas 20 e 21**, página 99). Para determinar a concentração da nevirapina em cada uma das amostras reconstituídas, utilizou-se uma solução de nevirapina IFA padronizada.

6.2.3.2 Realização do teste de citotoxicidade ou ensaio de viabilidade celular

O teste foi realizado no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais seguindo protocolo interno de realização de ensaio de citotoxicidade (ou ensaio de viabilidade celular), utilizando-se células mononucleares do sangue periférico humano obtidas a partir de sangue de indivíduos saudáveis.

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos produtos de degradação formados em meio ácido e oxidativo em células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis foi avaliada pelo ensaio de redução do 3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólico (MTT). O MTT é um sal tetrazólico que reage com as mitocôndrias de células viáveis formando um cristal de cor violeta, insolúvel em água, conhecido como formazan, que é solubilizado em DMSO (CARMICHAEL *et al.*, 1987).

As células foram colocadas em placa de cultura de células de 96 poços, nos quais foram distribuídos 100 µL da cultura celular na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL. Estas foram homogeneizadas em meio de cultura (RPMI) acrescido de soro fetal bovino e dos antibióticos, penicilina e estreptomina. A seguir, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂), em ambiente úmido, para conseguinte adição das amostras a serem testadas.

Para o preparo da solução estoque das amostras a serem testadas (amostra controle, amostra exposta a ácido clorídrico 1 M e amostra exposta a peróxido de hidrogênio 3% v/v), foi utilizado o solvente DMSO, resultando em uma concentração de 400 µg/mL de nevirapina em cada amostra. Em seguida procedeu-se a cinco diluições seriadas (1:10) a partir da solução estoque utilizando RPMI com 1% de suplementação de soro fetal bovino. As soluções resultantes dessas diluições foram as seguintes: 400 µg/mL, 40 µg/mL, 4 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,04 µg/mL e 0,004 µg/mL de nevirapina. Cada concentração foi testada em triplicata e em cada poço adicionaram-se 200 µL da respectiva solução.

Após incubação de 48 horas das placas, o meio em cada poço foi recolhido e o efeito citotóxico foi medido com o ensaio colorimétrico MTT. Para determinar a viabilidade das células, 100 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e as células foram incubadas durante três horas. Depois de retirar o líquido dos poços, o produto insolúvel de formazan foi dissolvido em DMSO. Em seguida, realizou-se a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. A sobrevivência das células foram avaliadas pela porcentagem da absorbância destas comparadas à sobrevivência das placas controles. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação descrita a seguir.

$$Viabilidade(\%) = \frac{Absorv\tilde{a}ncia\ da\ amostra}{Absorv\tilde{a}ncia\ do\ controle\ negativo} \times 100$$

O controle negativo foi constituído apenas pelas células, meio de cultura, soro fetal bovino e antibióticos. O controle positivo utilizado foi o etoposídeo, um fármaco antitumoral não seletivo, que passou por diluições equivalentes às das amostras.

6.3 Resultados

6.3.1 Estudo de cinética de degradação da nevirapina

6.3.1.1 Cinética de degradação oxidativa da nevirapina IFA e comprimidos utilizando peróxido de hidrogênio

Os resultados da quantificação da nevirapina remanescente nas amostras de IFA e comprimidos submetidas à oxidação por peróxido de hidrogênio 3% (v/v) à temperatura ambiente são mostrados nas **Figuras 39** e **40** respectivamente. Os produtos de degradação provenientes da amostra de nevirapina IFA e comprimidos submetidos à temperatura ambiente durante 14 dias foram formados em baixas quantidades. Após o período da avaliação da cinética (14 dias) a nevirapina degradou cerca de 10% no IFA (**Figura 39**) e cerca de 15% nos comprimidos (**Figura 40**).

Figura 39 – Teor de nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de nevirapina IFA submetidas a H_2O_2 3% (v/v) à temperatura ambiente, durante 14 dias.

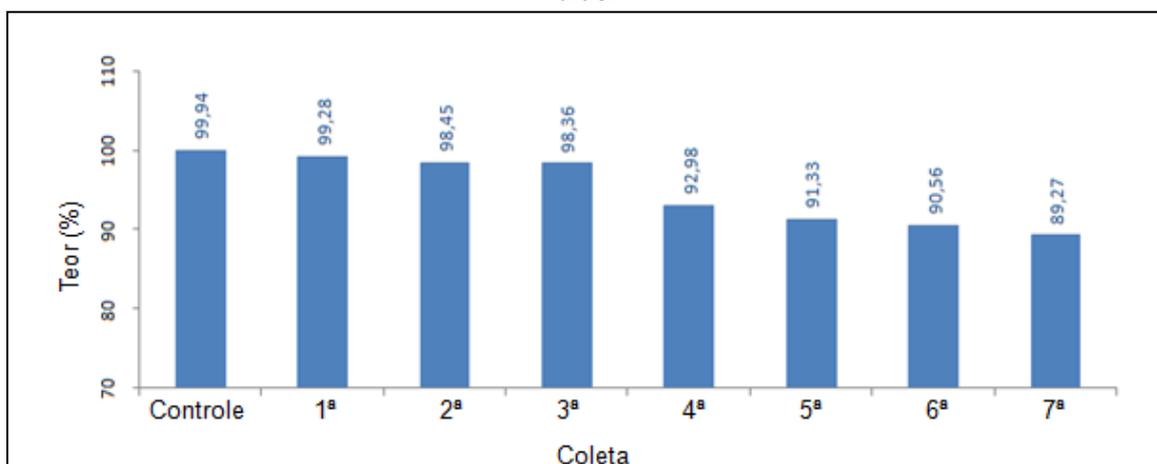
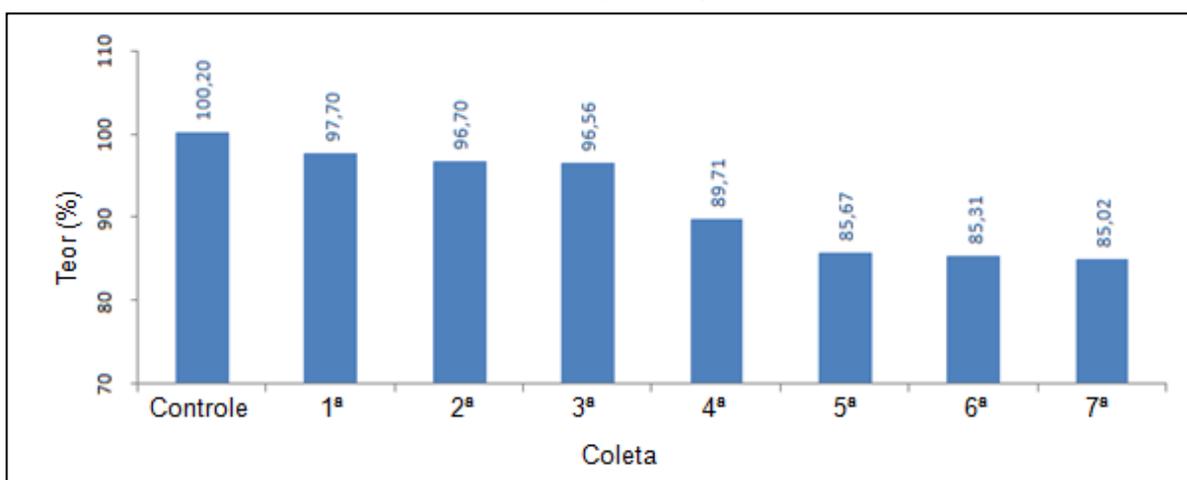


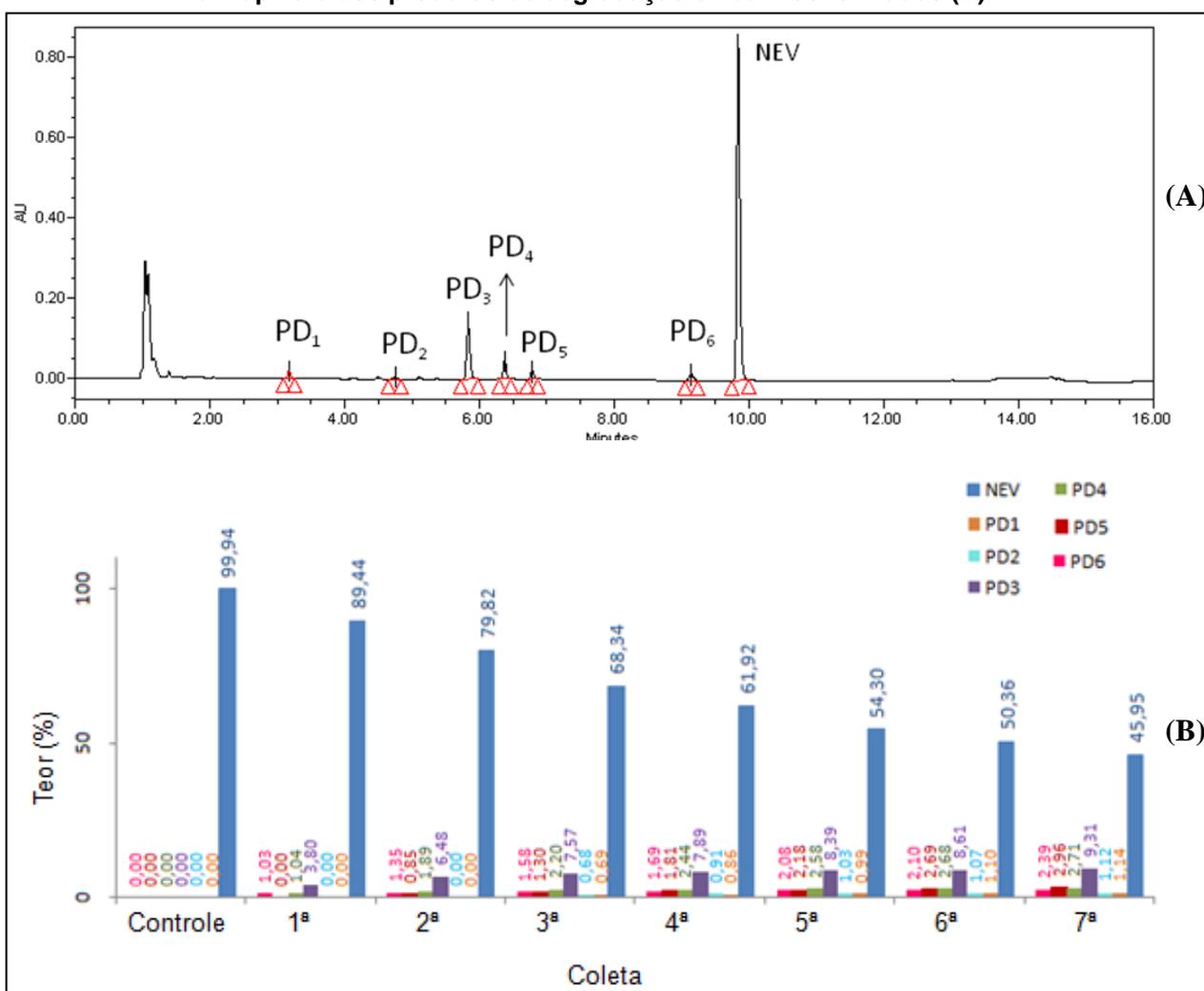
Figura 40 – Teor de nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de comprimidos de nevirapina submetidas a H_2O_2 3% (v/v) à temperatura ambiente, durante 14 dias.



Para as amostras de nevirapina IFA e comprimidos submetidas ao teste de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e aquecimento a 50 °C, foi possível quantificar a nevirapina remanescente e também os produtos de degradação

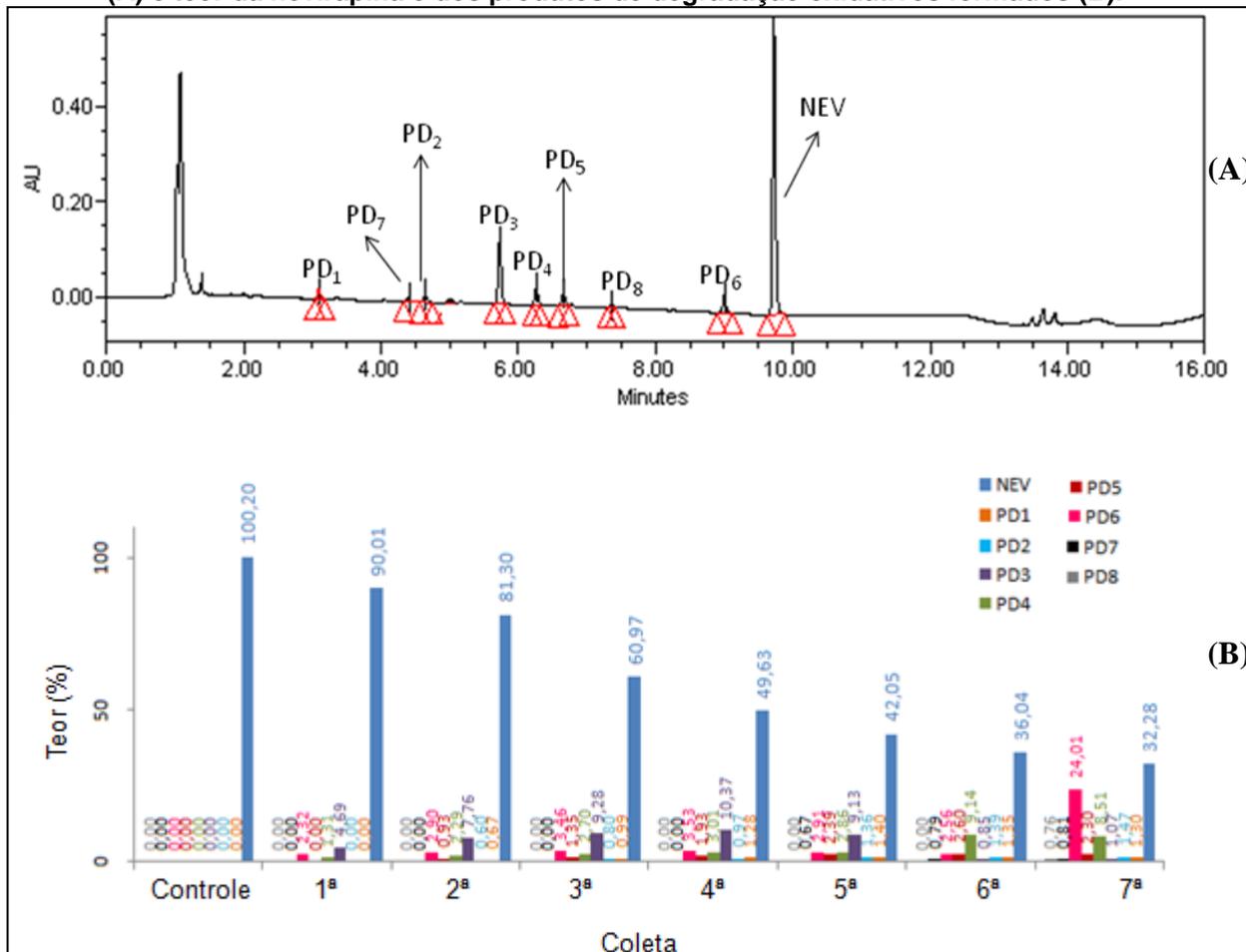
formados ao longo das sete coletas para estudo da cinética, conforme mostrado nas **Figuras 41** e **42**, respectivamente. Após o período do teste de cinética (14 dias) a nevirapina degradou cerca de 55% no IFA (**Figura 41**) e cerca de 70% nos comprimidos (**Figura 42**).

Figura 41 – Cromatograma obtido na 7^a coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de nevirapina IFA a 40 µg/mL, submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) a 50 °C (A) e teor da nevirapina e dos produtos de degradação oxidativos formados (B).



Legenda: PD1 a PD6 = produtos de degradação oxidativos obtidos na exposição de nevirapina IFA a H₂O₂3% (v/v) durante 14 dias a 50°C; NEV = nevirapina.

Figura 42 – Cromatograma obtido na 7ª coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de comprimidos de nevirapina a 40 µg/mL, submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) a 50 °C (A) e teor da nevirapina e dos produtos de degradação oxidativos formados (B).



Legenda: PD1 a PD8 = produtos de degradação oxidativos obtidos na submissão de comprimidos de nevirapina a H₂O₂3% (v/v) durante 14 dias a 50°C; NEV = nevirapina.

Após analisar e comparar os resultados apresentados nas **Figuras 39 a 42**, pode-se afirmar que a nevirapina é susceptível à degradação oxidativa, demonstrando degradação gradual e formação de quatro produtos de degradação majoritários (PD₃, PD₄, PD₅ e PD₆). A degradação à temperatura ambiente ocorre mais lentamente que aquela a 50 °C. A degradação oxidativa obtida nos comprimidos de nevirapina foi mais rápida do que a degradação no IFA e houve a formação de um maior número de produtos de degradação. Este resultado pode ter ocorrido pelo fato de, normalmente, os excipientes possuírem algumas impurezas ou íons metálicos, que podem agir como catalisadores, acelerando a oxidação da nevirapina (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005). Os perfis de degradação foram similares, ou seja, os principais produtos de degradação foram encontrados tanto no IFA quanto nos comprimidos.

A investigação do perfil de degradação do fármaco pode indicar tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que melhoram a integridade do IFA e do produto acabado. Demonstra-se assim, que o conhecimento do comportamento químico pode ser utilizado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada. Como a nevirapina apresentou-se susceptível à degradação em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio, recomenda-se algumas precauções durante a manufatura e estocagem do medicamento. Como o oxigênio é o principal responsável pela reação de oxidação, uma alternativa para evitar a degradação é o preenchimento total dos recipientes, ou a substituição de oxigênio por outro gás como o nitrogênio ou dióxido de carbono. Como esse processo é um tanto complicado, tem-se a possibilidade de utilizar adjuvantes farmacotécnicos como antioxidantes, que podem sofrer degradação preferencial em relação ao IFA ou agir como inibidores de cadeias de radicais livres, e assim haverá redução da degradação do IFA. Recomenda-se também o armazenamento em temperaturas reduzidas para que a velocidade de reação seja menor.

A partir dos resultados de degradação da nevirapina obtidos, construíram-se três tipos de gráficos que relacionam o tempo de análise com o teor da nevirapina remanescente, com o logaritmo na base 10 do teor e com o inverso do teor para as amostras de IFA e comprimidos degradadas com peróxido de hidrogênio sob aquecimento. Os resultados das equações da reta e dos coeficientes de determinação e correlação obtidos para cada uma delas são descritos na **Tabela 41**.

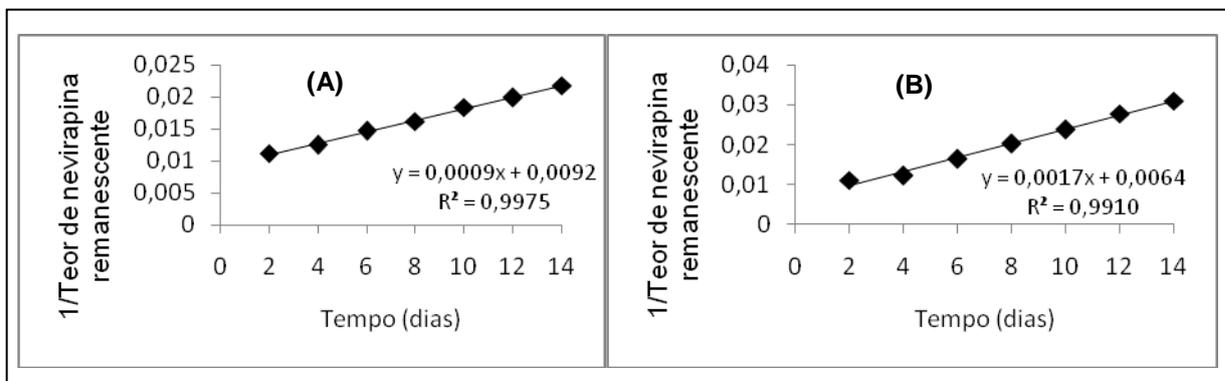
Tabela 41 – Equações da reta e coeficientes de determinação e correlação obtidos para os modelos matemáticos propostos em relação à degradação da nevirapina sob condição oxidativa (H₂O₂ 3% v/v a 50 °C).

Amostra	Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação (R ²)	Coefficiente de correlação (R)
IFA a 50 °C	Teor de nevirapina	$y = -3,6330x + 93,3704$	0,9686	0,9842
	Log ₁₀ do teor	$y = -0,0244x + 1,9925$	0,9912	0,9956
	Inverso do teor	$y = 0,0009x + 0,0092$	0,9975	0,9987
Comprimidos a 50 °C	Teor de nevirapina	$y = -5,046x + 95,4156$	0,9454	0,9723
	Log ₁₀ do teor	$y = -0,0394x + 2,0341$	0,9841	0,9920
	Inverso do teor	$y = 0,0017x + 0,0064$	0,9910	0,9955

Ao avaliar os resultados descritos na **Tabela 41**, pode-se concluir que foi encontrado um maior valor de coeficiente de determinação e correlação para o modelo matemático empregando o “tempo *versus* o inverso do teor” para amostras de IFA e de comprimidos submetidos à oxidação por peróxido de hidrogênio a 50 °C. Portanto, este modelo foi empregado na obtenção da curva e equações lineares as quais são representadas na **Figura 43**.

Utilizando-se as curvas obtidas na cinética de degradação (**Figura 43**), pode-se estimar os tempos necessários de exposição das amostras de nevirapina IFA e comprimidos ao peróxido de hidrogênio 3% (v/v) para se obter uma degradação de 30%. Conclui-se então que a nevirapina IFA deve ser submetida a peróxido de hidrogênio 3% (v/v) a 50 °C durante cinco dias e meio e para os comprimidos de nevirapina o período de exposição deve ser de quatro dias e meio para se obter 70% de nevirapina remanescente.

Figura 43 – Curvas de degradação obtidas quanto ao melhor ajuste à cinética de degradação em meio oxidativo. IFA a 50°C (A); comprimidos a 50°C (B).



6.3.1.2 Cinética de degradação em meio ácido da nevirapina IFA e comprimidos utilizando ácido clorídrico 1 M

Os resultados da quantificação da nevirapina remanescente nas amostras de IFA e comprimidos submetidas à hidrólise com ácido clorídrico 1 M à temperatura ambiente são mostradas nas **Figuras 44** e **45**, respectivamente. Ao final dos 14 dias de degradação forçada, a nevirapina degradou cerca de 10% no IFA (**Figura 44**) e cerca de 30% nos comprimidos (**Figura 45**).

Figura 44 – Teor da nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de nevirapina IFA submetidas a HCl 1 M à temperatura ambiente, durante 14 dias.

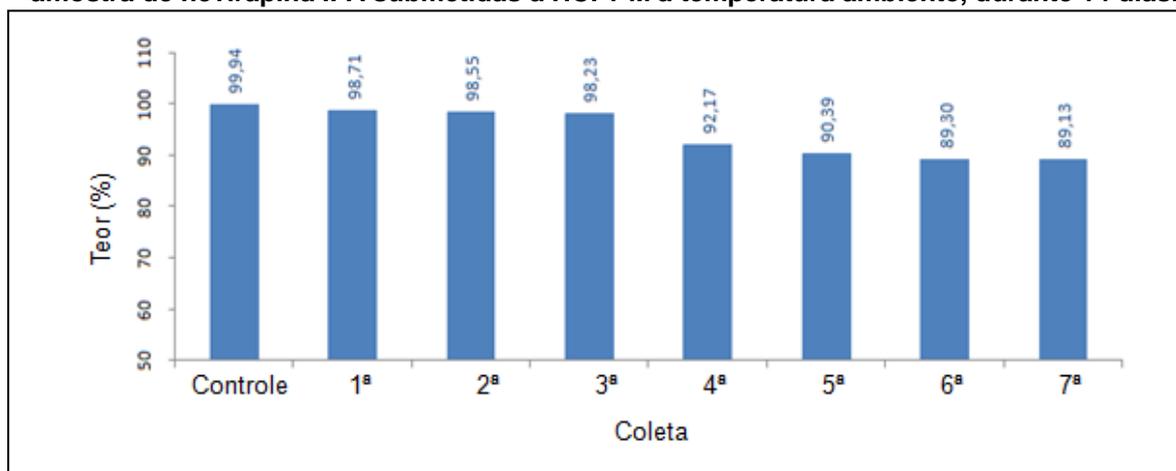
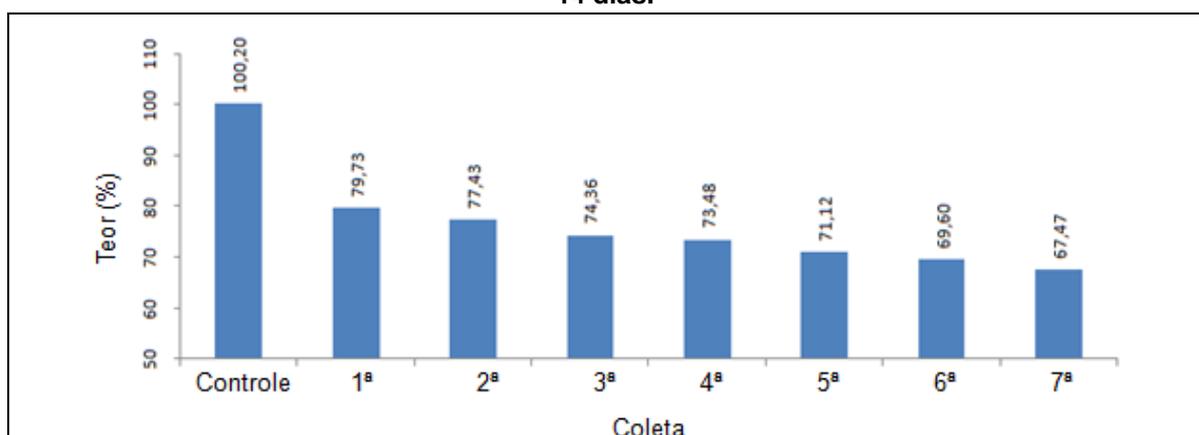
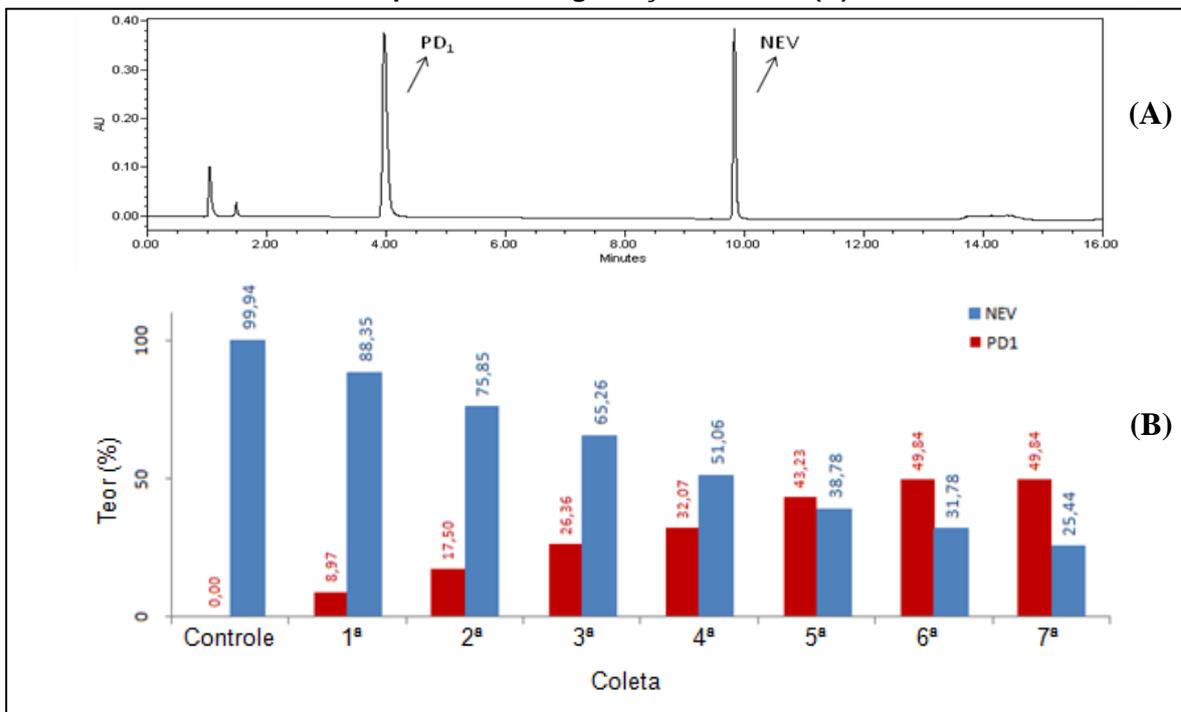


Figura 45 – Teor da nevirapina remanescente no estudo de cinética de degradação para amostra de comprimidos de nevirapina submetidas a HCl 1 M à temperatura ambiente, durante 14 dias.



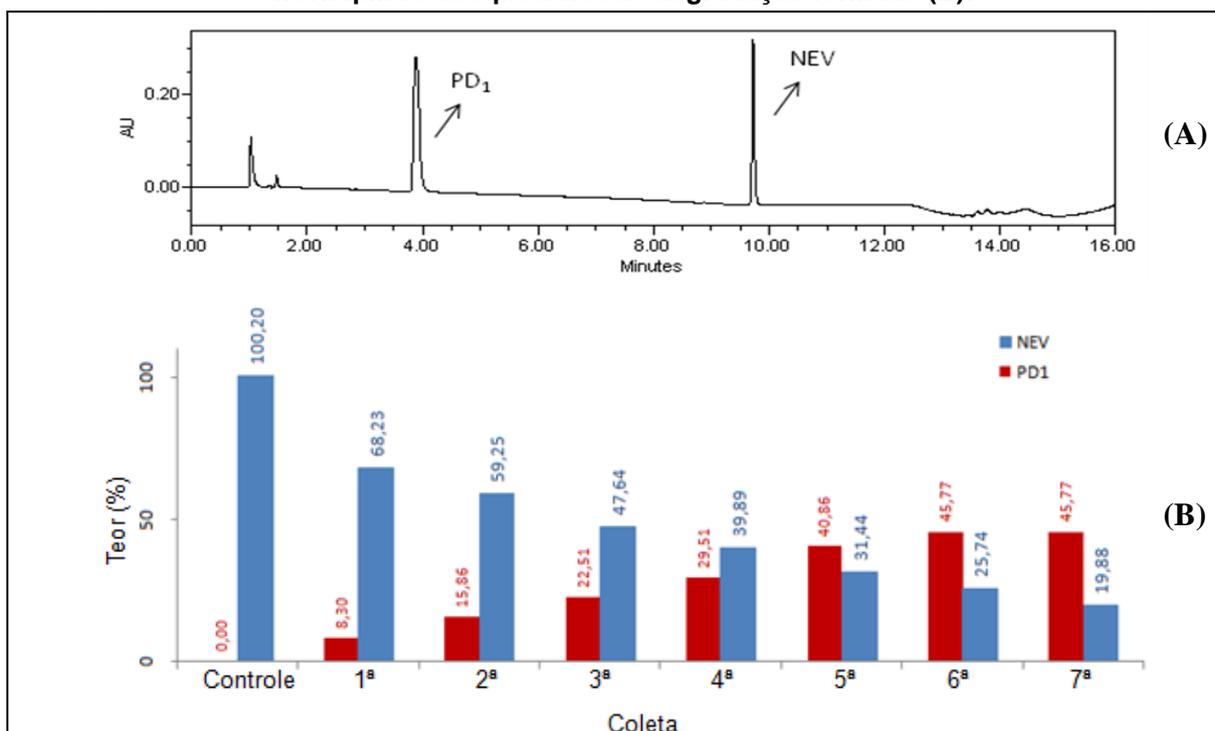
Para as amostras de nevirapina IFA e comprimidos submetidas ao teste de hidrólise utilizando ácido clorídrico 1 M e aquecimento a 50 °C, quantificou-se a nevirapina remanescente e também o produto de degradação formado ao longo das sete coletas para estudo da cinética, conforme mostrado nas **Figuras 46 e 47**. Durante este período de teste a nevirapina degradou cerca de 75% no IFA (**Figura 46**) e cerca de 80% nos comprimidos (**Figura 47**).

Figura 46 – Cromatograma obtido na 7ª coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de nevirapina IFA a 40 µg/mL, submetida a ácido clorídrico 1 M a 50 °C (A) e teor da nevirapina e do produto de degradação formado (B).



Legenda: PD₁ = produto de degradação obtido na submissão de nevirapina IFA a ácido clorídrico 1 M durante 14 dias a 50°C; NEV = nevirapina.

Figura 47 – Cromatograma obtido na 7ª coleta (após 14 dias de degradação) da amostra de comprimidos de nevirapina a 40 µg/mL, submetida a ácido clorídrico 1 M a 50 °C (A) e teor da nevirapina e dos produtos de degradação formado (B).



Legenda: PD₁ = produto de degradação obtido na submissão de comprimidos de nevirapina a ácido clorídrico 1 M durante 14 dias a 50°C; NEV = nevirapina.

Após analisar e comparar os resultados apresentados nas **Figuras 44 a 47**, pode-se afirmar que a nevirapina é muito susceptível à degradação hidrolítica em meio ácido, demonstrando degradação rápida e intensa e formação de um produto de degradação. Diante deste resultado, conclui-se que deve-se evitar ao máximo o contato do IFA com a umidade durante o armazenamento e fabricação do medicamento e, então, recomenda-se a utilização de embalagens impermeáveis, com o objetivo de evitar, ou ao menos, reduzir a hidrólise da nevirapina.

Em relação à influência da temperatura na degradação e a comparação de degradação no IFA e nos comprimidos, o resultado para degradação em meio ácido foi semelhante à degradação oxidativa, podendo-se chegar às mesmas conclusões.

É nítida a transformação da nevirapina no PD₁ proveniente da degradação em meio ácido, de forma que, ao observar os gráficos obtidos na cinética, percebe-se a redução do teor da nevirapina ao mesmo tempo que ocorre o aumento do teor do PD₁, até o momento que a altura e a área sob o pico referente ao produto de degradação torna-se maior que a da nevirapina.

A partir dos resultados de degradação da nevirapina obtidos, construíram-se três tipos de gráficos que relacionam o tempo de análise com o teor da nevirapina remanescente, com o logaritmo na base 10 do teor e com o inverso do teor para as amostras de IFA e comprimidos degradadas com ácido clorídrico sob aquecimento. Os resultados das equações da reta e dos coeficientes de determinação e correlação obtidos para cada uma delas são descritos na **Tabela 42**.

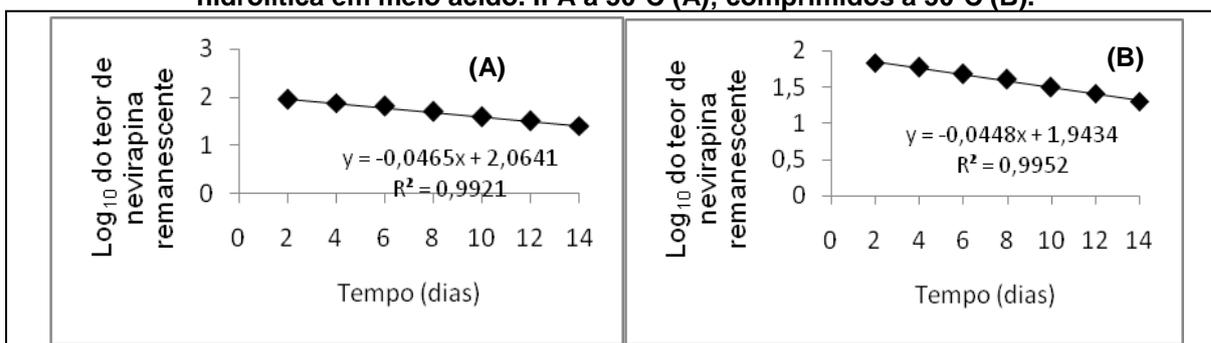
Ao avaliar os resultados descritos na **Tabela 42**, pode-se concluir que foi encontrado um maior valor de coeficiente de determinação e correlação para o modelo matemático empregando o “tempo *versus* o log na base 10 do teor” para amostras de IFA e de comprimidos submetidos à hidrólise em meio ácido a 50 °C. Portanto, este modelo foi empregado na obtenção da curva e equações lineares, as quais são apresentadas na **Figura 48**.

Tabela 42 – Equações da reta e coeficientes de determinação e correlação obtidos para os modelos matemáticos propostos em relação à degradação da nevirapina sob condição hidrolítica em meio ácido (HCl 1 M a 50°C).

Amostra	Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação (R ²)	Coefficiente de correlação (R)
IFA a 50°C	Teor de nevirapina	$y = -5,4170x + 97,1260$	0,9859	0,9929
	Log ₁₀ do teor	$y = -0,0465x + 2,0641$	0,9921	0,9960
	Inverso do teor	$y = 0,0023x + 0,0036$	0,9499	0,9736
Comprimidos a 50°C	Teor de nevirapina	$y = -4,0765x + 74,3377$	0,9865	0,9932
	Log ₁₀ do teor	$y = -0,0448x + 1,9434$	0,9952	0,9976
	Inverso do teor	$y = 0,0029x + 0,0053$	0,9449	0,9721

Utilizando-se as curvas obtidas na cinética de degradação (**Figura 48**), pode-se estimar os tempos de submissão da amostra ao ácido clorídrico 1 M para se obter uma degradação de 30%. Conclui-se, então, que a nevirapina IFA deve ser submetida a ácido clorídrico 1 M a 50 °C durante quatro dias e meio e para os comprimidos de nevirapina o período de exposição deve ser de dois dias para se obter 70% de nevirapina remanescente.

Figura 48 – Curvas de degradação obtidas quanto ao melhor ajuste à cinética de degradação hidrolítica em meio ácido. IFA a 50°C (A); comprimidos a 50°C (B).



6.3.1.3 Cinética de degradação em meio alcalino, neutro e com íons metálicos da nevirapina IFA e comprimidos

Para as demais condições estudadas na cinética (hidrólise alcalina, hidrólise neutra e degradação sob ação de íons metálicos), não ocorreu a formação de produtos de degradação e o teor de nevirapina remanescente se manteve entre 100,00 ± 2,00%,

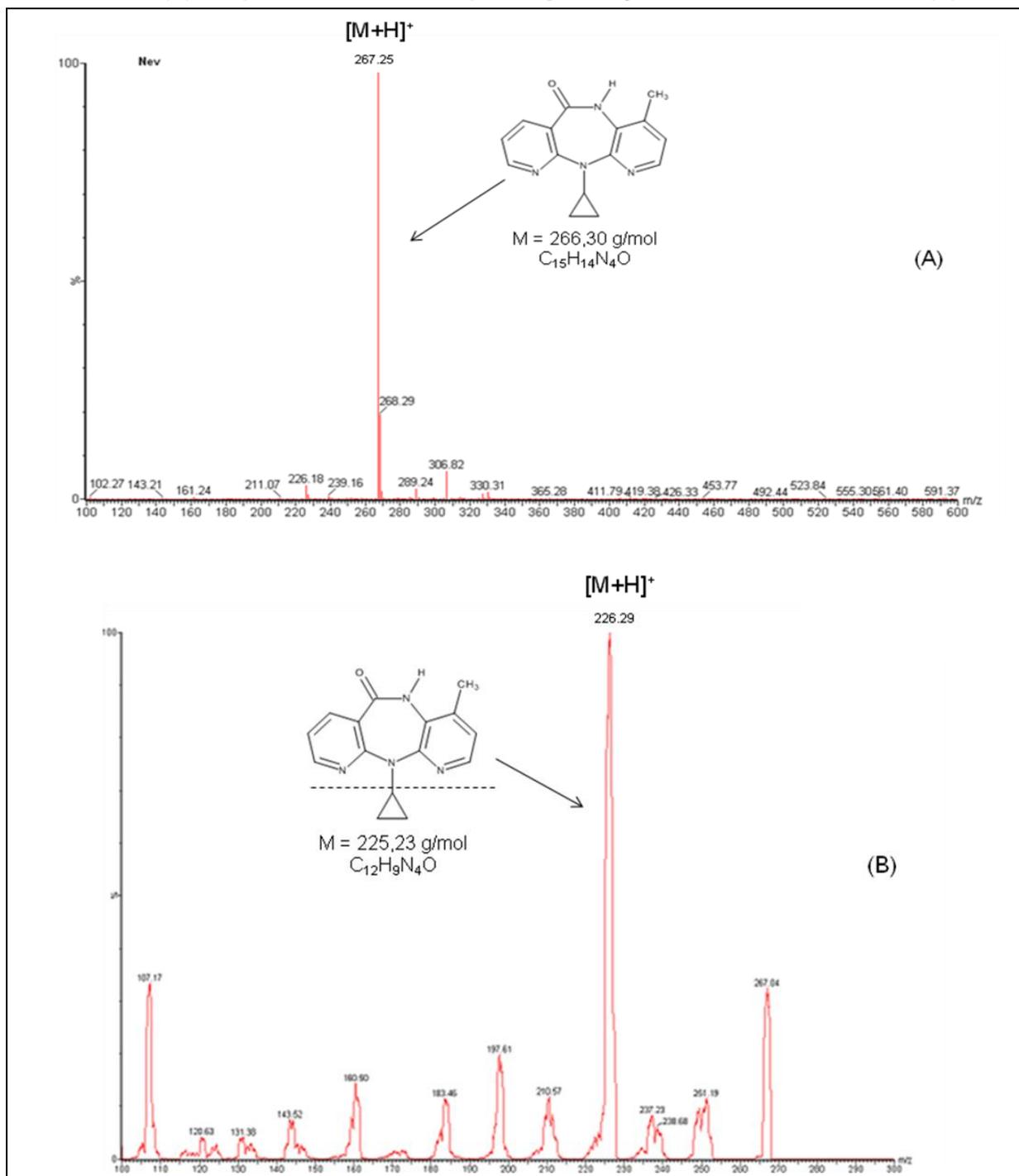
em relação à amostra controle, tanto nas amostras de IFA, quanto de comprimidos, tanto nas submetidas a aquecimento, quanto nas submetidas à temperatura ambiente. Dessa forma, pode-se concluir que a nevirapina é praticamente estável frente a essas condições de degradação forçada.

6.3.2 Propostas de elucidação estrutural dos produtos de degradação formados no estudo de degradação forçada em meio ácido e oxidativo

Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente as aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo quando se emprega espectrometria de massas, enquanto que substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas, sendo analisadas no modo negativo (CROTTI *et al.*, 2006). Como a nevirapina possui um grupo amida em sua estrutura e por se tratar de uma base fraca, optou-se por utilizar o método positivo de ionização (IES(+)).

O espectro de varredura de massas e de fragmentação obtidos para a nevirapina por meio da infusão direta estão representados na **Figura 49**.

Figura 49 – Espectros IES(+) da nevirapina. Espectros de varredura com íon precursor m/z 267,25 (A) e espectro de varredura após fragmentação com íon filho m/z 226,29 (B).



Para a realização das análises por CLAE-EM/EM, primeiramente tentou-se reproduzir o método desenvolvido e validado com a coluna de núcleo fundido (gradiente 34b, **Tabelas 20 e 21**, página 99). Porém, não foram obtidos bons resultados referentes à separação dos picos dos produtos de degradação obtidos no estudo de degradação forçada em meio ácido e oxidativo. Vários ajustes no gradiente foram testados, variando tempo e proporção dos componentes da fase

móvel. Como não foram obtidos resultados satisfatórios após essas alterações no método, optou-se por analisar as amostras degradadas utilizando-se gradiente exploratório. As condições utilizadas são apresentadas na **Tabela 43**.

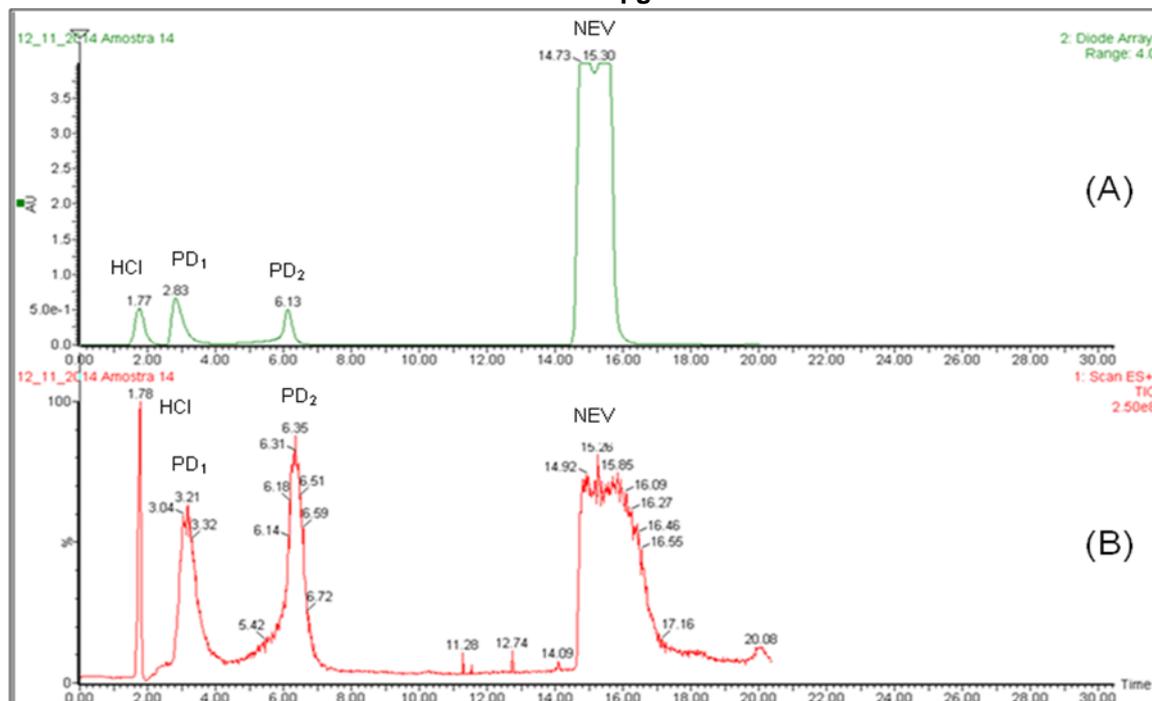
Tabela 43 – Condições cromatográficas do gradiente exploratório para eluição da nevirapina e dos produtos de degradação, utilizando CLAE-EM/EM.

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Inicialmente constituída por acetonitrila:água (5:95 v/v), seguida por gradiente acetonitrila de 5% a 95% em 60 minutos.
Vazão de fase móvel	0,2 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Coluna	Poroshell® 120 Agilent, C ₁₈ , 2,1 x 100 mm, 2,7 µm
Temperatura da coluna	30°C
Comprimento de onda	214 nm
Soluções testes	Amostras de nevirapina IFA degradadas em meio ácido e oxidativo nas concentrações de 1000 µg/mL e 40 µg/mL
Tempo de corrida	60 minutos

As amostras de nevirapina IFA analisadas foram preparadas utilizando como agentes degradantes ácido clorídrico 1 M e peróxido de hidrogênio 3% v/v, a 50 °C, durante sete dias.

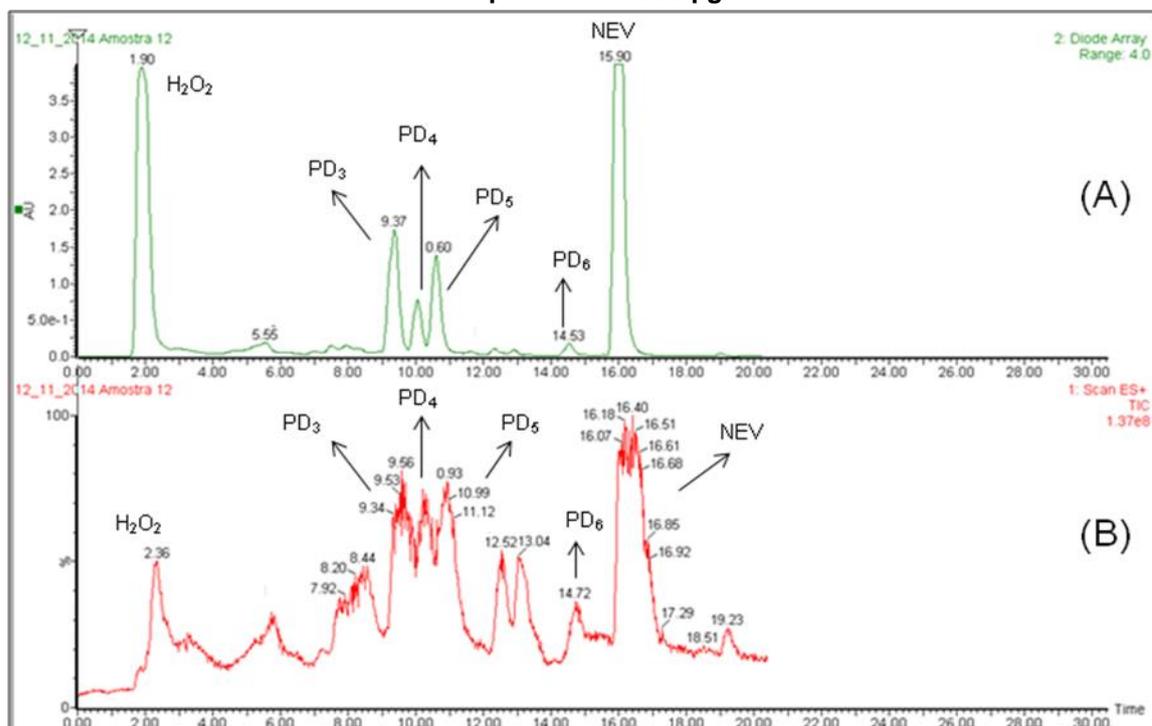
Os espectros obtidos pelo detector ultravioleta e detector de massas em modo *scan*, para as amostras provenientes da degradação em meio ácido e da degradação oxidativa são apresentados nas **Figuras 50** e **51**, respectivamente. Os principais produtos de degradação foram evidenciados.

Figura 50 – Espectros obtidos no detector ultravioleta (A) e no detector de massas (B) para amostras provenientes da degradação em meio ácido com ácido clorídrico 1 M da nevirapina IFA a 1000 µg/mL.



Legenda: PD₁ e PD₂= produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido; NEV = nevirapina.

Figura 51 – Espectros obtidos no detector ultravioleta (A) e no detector de massas (B) para amostras provenientes da degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) da nevirapina IFA a 1000 µg/mL.



Legenda: PD₃ a PD₆= produtos de degradação provenientes da oxidação com peróxido de hidrogênio 3% (v/v); NEV = nevirapina.

As razões m/z do íon precursor mais abundante do espectro de massas de cada um dos produtos de degradação formados (PD₁ a PD₆), bem como a razão m/z do pico mais intenso referente aos íons produtos (provenientes da fragmentação do íon precursor) são apresentados na **Tabela 44**.

Tabela 44 – Razão massa/carga do íon precursor dos produtos de degradação e principais íons produto.

	Produto de degradação	m/z íon precursor	m/z íon produto
Degradação com HCl	PD ₁	285,22	211,38
	PD ₂	285,22	
Degradação com H ₂ O ₂	PD ₃	283,21	227,42
	PD ₄	283,21	161,26
	PD ₅	189,14	150,25
	PD ₆	283,21	242,39

Legenda: PD₁ e PD₂= produtos de degradação provenientes da hidrólise em meio ácido; PD₃ a PD₆= produtos de degradação provenientes da oxidação com peróxido de hidrogênio 3% (v/v).

Ao analisar a **Tabela 44**, percebe-se que três produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa (PD₃, PD₄ e PD₆) apresentam a mesma razão m/z para o íon precursor, assim como os produtos de degradação provenientes da degradação em meio ácido (PD₁ e PD₂). Porém, no caso dos produtos de degradação provenientes da degradação oxidativa, as razões m/z são diferentes para os íons produto. Dessa forma, conclui-se que PD₃, PD₄ e PD₆ podem se tratar de moléculas isoméricas de posição.

Rowland e colaboradores (2007), desenvolveram método utilizando CLAE-EM/EM para monitorização de metabólitos oxidativos da nevirapina, em plasma humano. Os padrões dos metabólitos utilizados nesse trabalho foram sintetizados e tiveram sua estrutura e pureza confirmadas pelos próprios autores. As razões m/z do íon precursor e do íon produto utilizada para a quantificação dos metabólitos oxidativos da nevirapina por esses autores, são apresentados na **Tabela 45**.

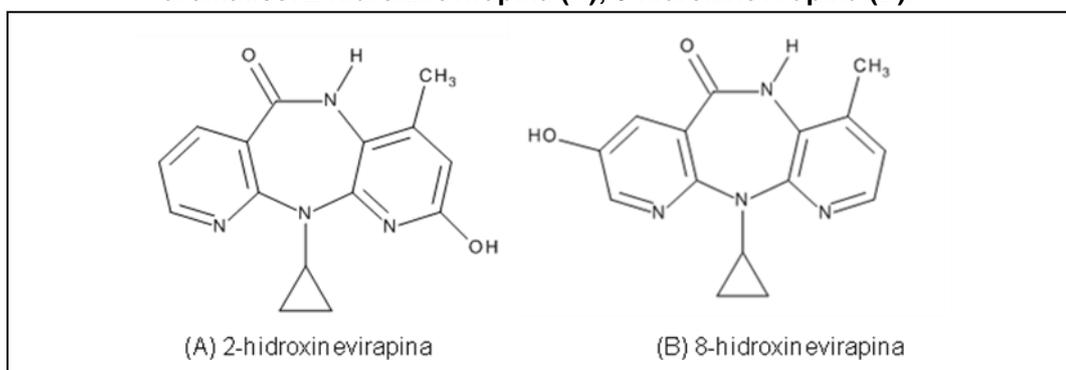
Tabela 45 – Razão massa/carga dos íons precursores e dos respectivos íons produto obtidos a partir dos metabólitos oxidativos da nevirapina determinados por Rowland e colaboradores (2007).

Metabólito oxidativo da nevirapina	m/z íon precursor	m/z íon produto
2-hidroxicinevirapina	283,2	160,8
3-hidroxicinevirapina	283,2	213,6
8-hidroxicinevirapina	283,2	242,0
12-hidroxicinevirapina	283,2	223,0
4-carboxinevirapina	297,2	278,9

Fonte: adaptado e traduzido de ROWLAND *et al.*, 2007.

Ao comparar as razões m/z dos íons precursores e íons produtos dos metabólitos oxidativos informadas por Rowland e colaboradores (2007), com as razões m/z obtidas na análise das amostras provenientes da degradação da nevirapina, é possível levantar a hipótese de que o PD₄ corresponde à 2-hidroxicinevirapina e o PD₆ corresponde à 8-hidroxicinevirapina (**Figura 52**) (ROWLAND *et al.*, 2007).

Figura 52 – Propostas de estruturas químicas para os produtos de degradação PD₄ e PD₆ provenientes da oxidação da nevirapina, formados por mecanismo de hidroxilação de anel aromático. 2-hidroxicinevirapina (A); 8-hidroxicinevirapina (B).



Diante dessas possíveis estruturas químicas dos produtos de degradação 2-hidroxicinevirapina e da 8-hidroxicinevirapina, mecanismos químicos de hidroxilação de anel piridínico que poderiam levar à formação de cada um desses produtos de degradação foram propostos, a partir da reação da nevirapina com peróxido de hidrogênio.

Os primeiros mecanismos propostos consistem no ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio ao carbono do anel aromático da nevirapina que é muito eletrofílico.

Nesse mecanismo ocorre a formação de um epóxido, resultando em um produto hidroxilado. As ilustrações dos mecanismos propostos para formação da 2-hidroxicinevirapina e da 8-hidroxicinevirapina são apresentadas nas **Figuras 53 e 54**.

Figura 53 – Mecanismos propostos para a formação da 2-hidroxicinevirapina por meio de reação molecular.

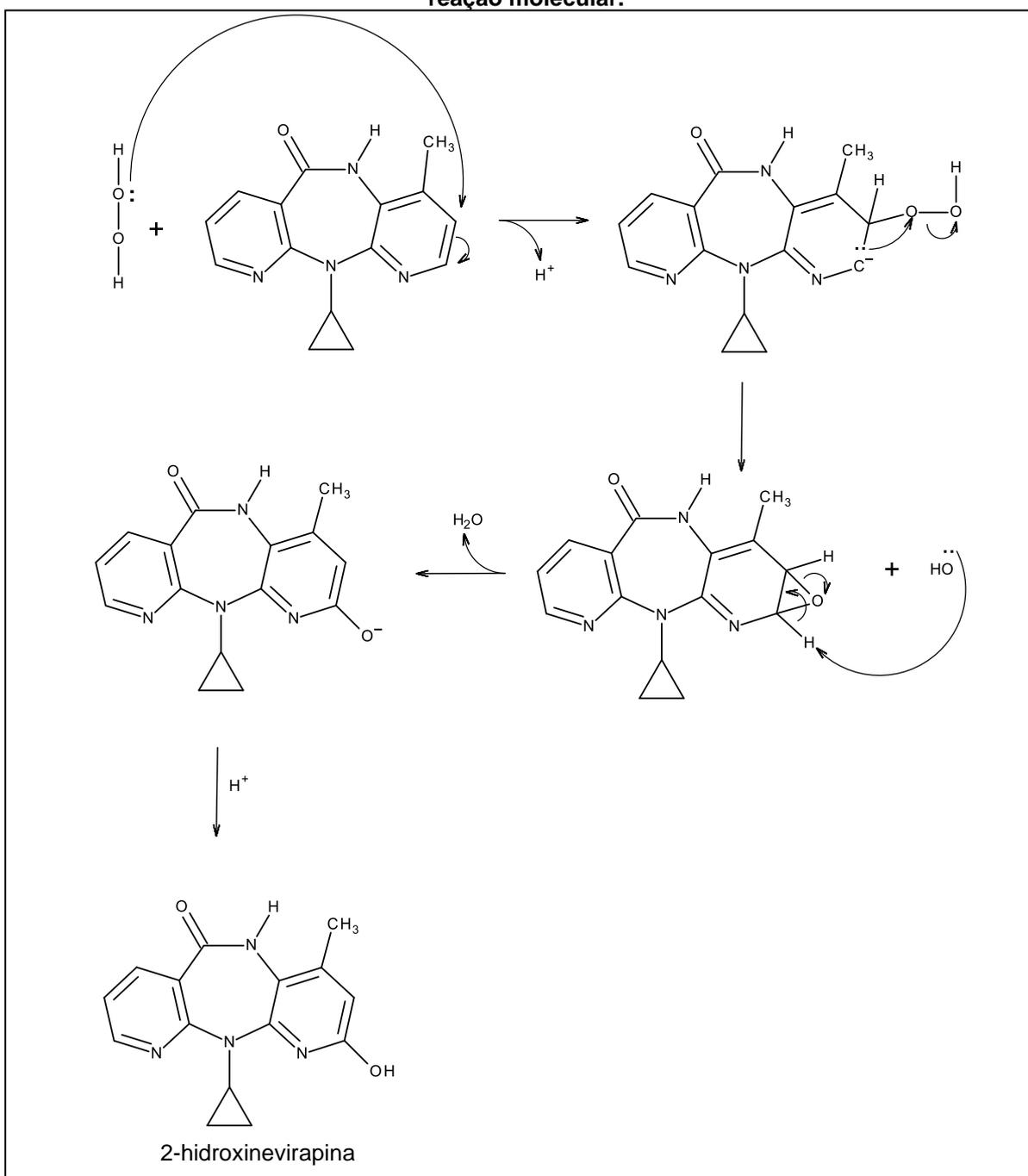
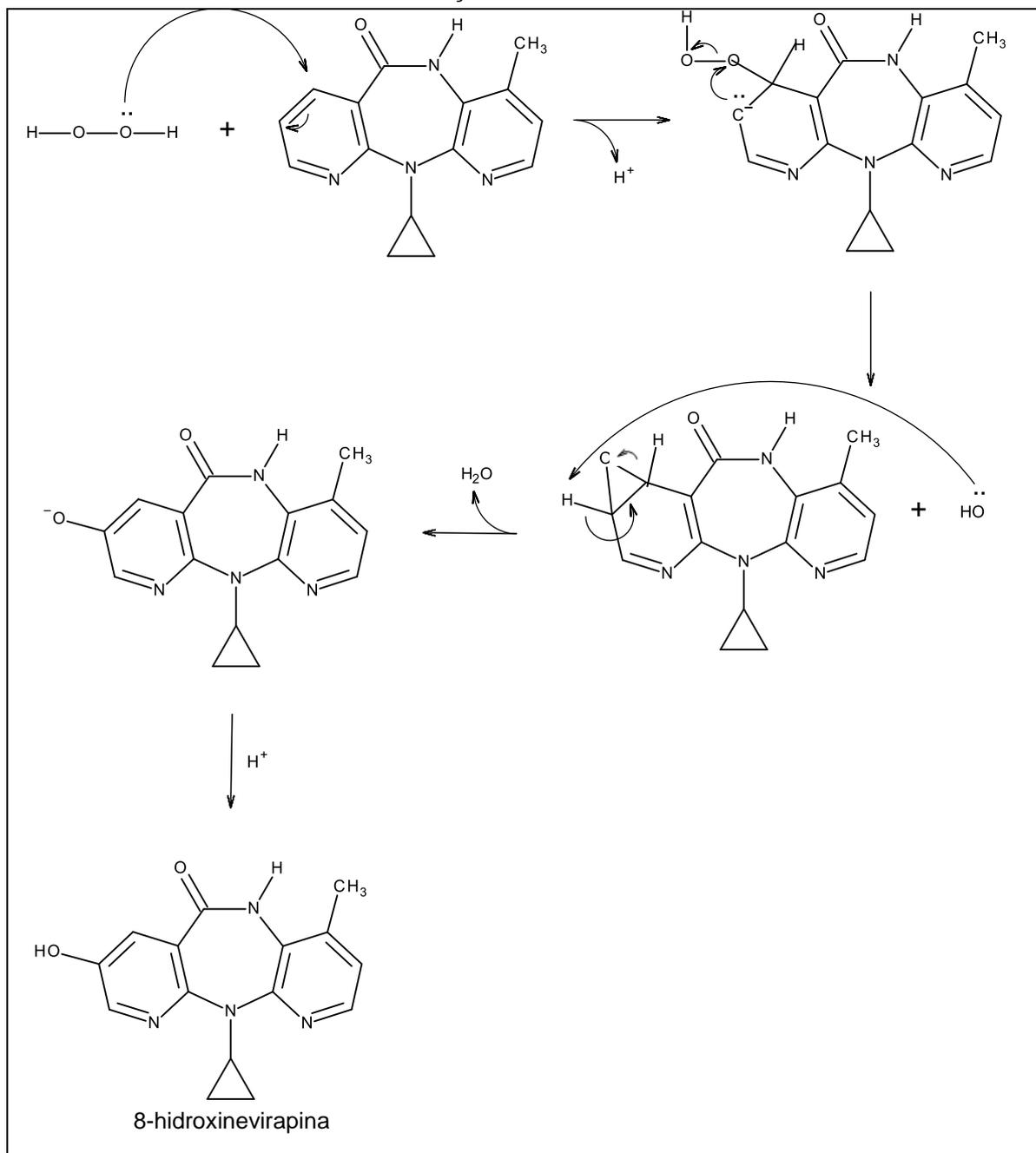


Figura 54 – Mecanismos propostos para a formação da 8-hidroxicinevirapina por meio de reação molecular.



Entretanto, pode ser que tenha-se alcançado energia de ativação suficiente para promover a quebra homolítica do peróxido de hidrogênio gerando assim, radicais hidroxilas e, nesse caso, o mecanismo de formação desses produtos de degradação poderia ser radicalar, conforme ilustrado nas **Figuras 55 e 56**. Pode ser também que ocorram ainda ambos os mecanismos propostos simultaneamente.

Figura 55 – Mecanismos radicalar propostos para a formação da 2-hidroxicinevirapina.

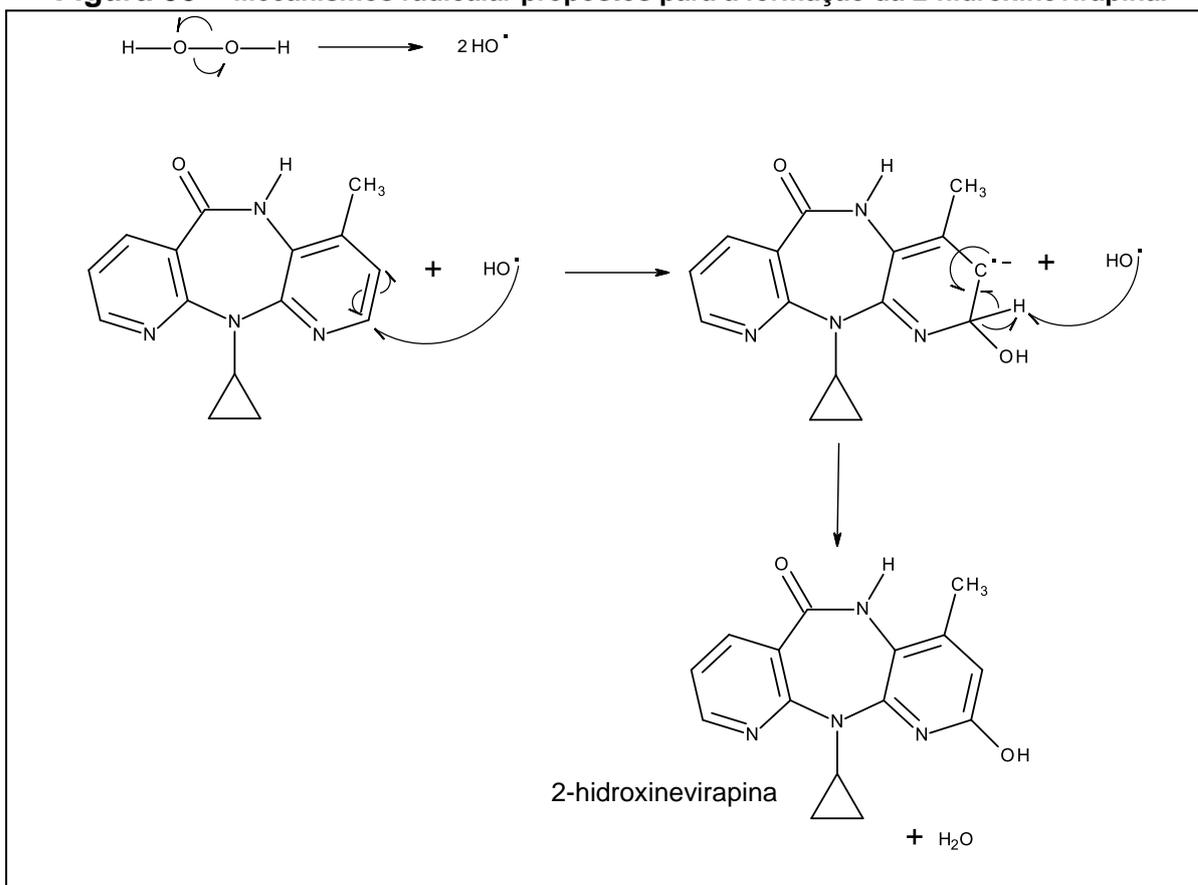
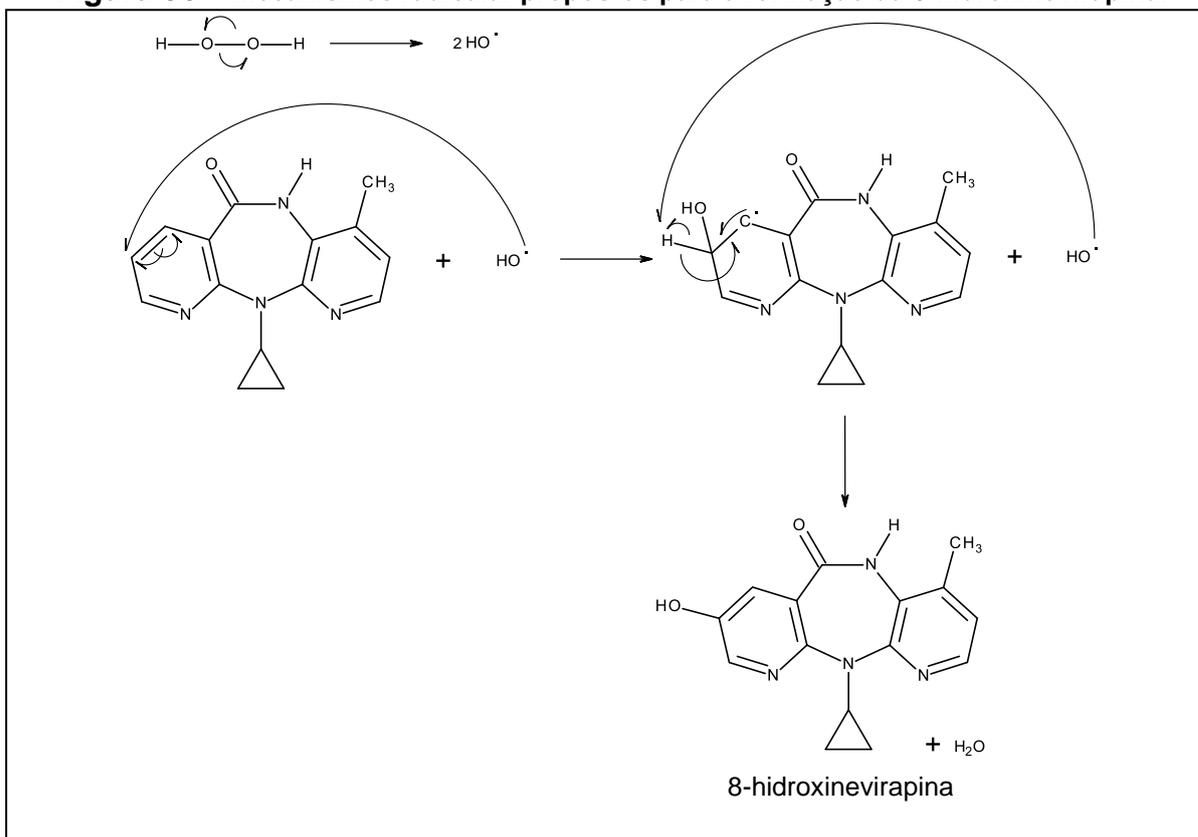
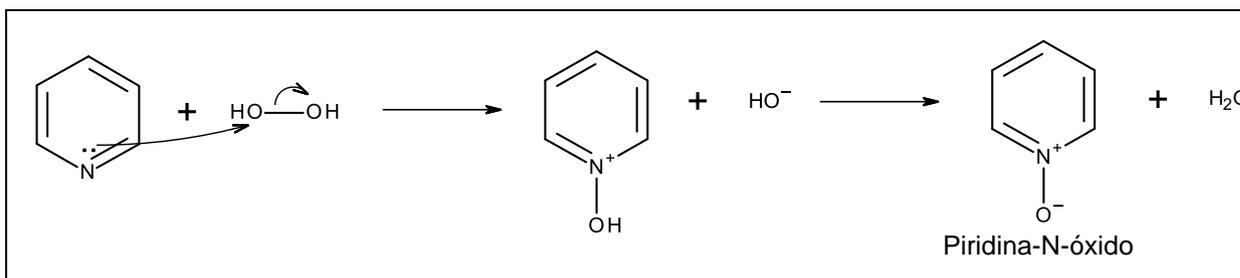


Figura 56 – Mecanismos radicalar propostos para a formação da 8-hidroxicinevirapina.



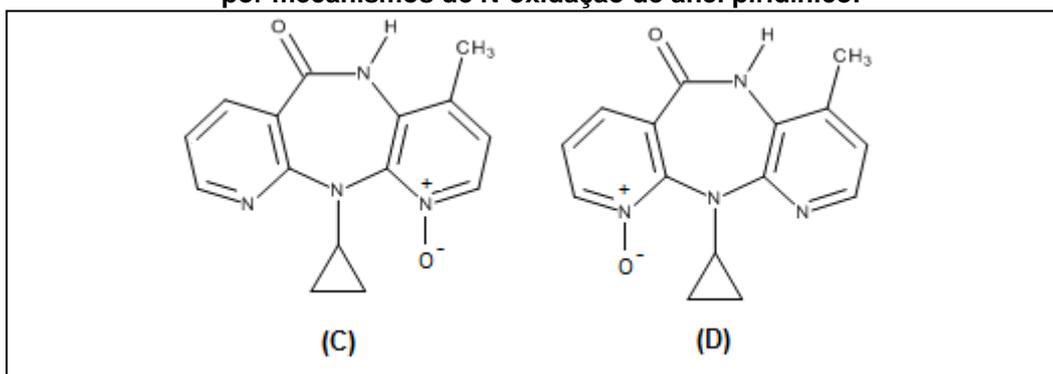
Entretanto, como a diferença de massa dos produtos PD₄ e PD₆ para a nevirapina é de 16, valor correspondente à massa molar de um átomo de oxigênio, pode ser que esses produtos de degradação (PD₄ e PD₆), sejam moléculas com o grupo N⁺-O⁻ (N-óxidos), ou seja, produtos provenientes da N-oxidação de anéis piridínicos (**Figura 57**) e não da sua hidroxilação. A N-oxidação de aminas é muito favorável na presença de peróxido de hidrogênio a 25 °C (ALVES, 1982).

Figura 57 – Mecanismo de N-oxidação de anéis piridínicos.



Caso esse tipo de mecanismo químico ocorra com a nevirapina, as possíveis estruturas químicas dos produtos de degradação PD₄ e PD₆ propostas estão apresentadas na **Figura 58**.

Figura 58 – Propostas de estruturas químicas para os produtos de degradação PD₄(C) e PD₆(D) provenientes da oxidação da nevirapina, formados por mecanismos de N-oxidação de anel piridínico.



Tanto a estrutura da molécula A (2-hidroxinevirapina) quanto a da molécula C proposta para ser o produto de degradação PD₄, ao sofrerem fragmentação, podem gerar íon produto com razão m/z de 160,8 (**Figura 59**). O mesmo acontece para a molécula B (8-hidroxinevirapina) e a molécula D, que podem resultar em íon produto

de razão m/z de 242,45 e também de 107,23 que são os íons de maior abundância no espectro de massas referente ao íon produto do PD₆ (**Figura 60**).

Figura 59 – Espectro de massas obtido a partir da fragmentação do íon precursor referente ao PD₄ e prováveis fragmentações das moléculas propostas para ser o PD₄ (A e C).

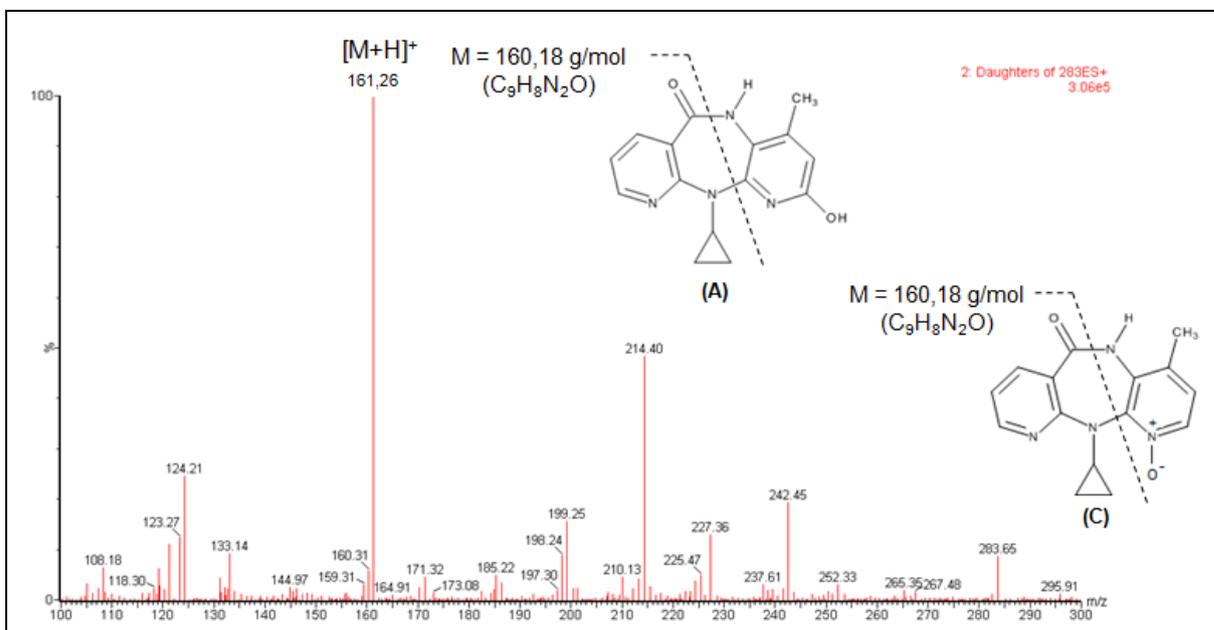
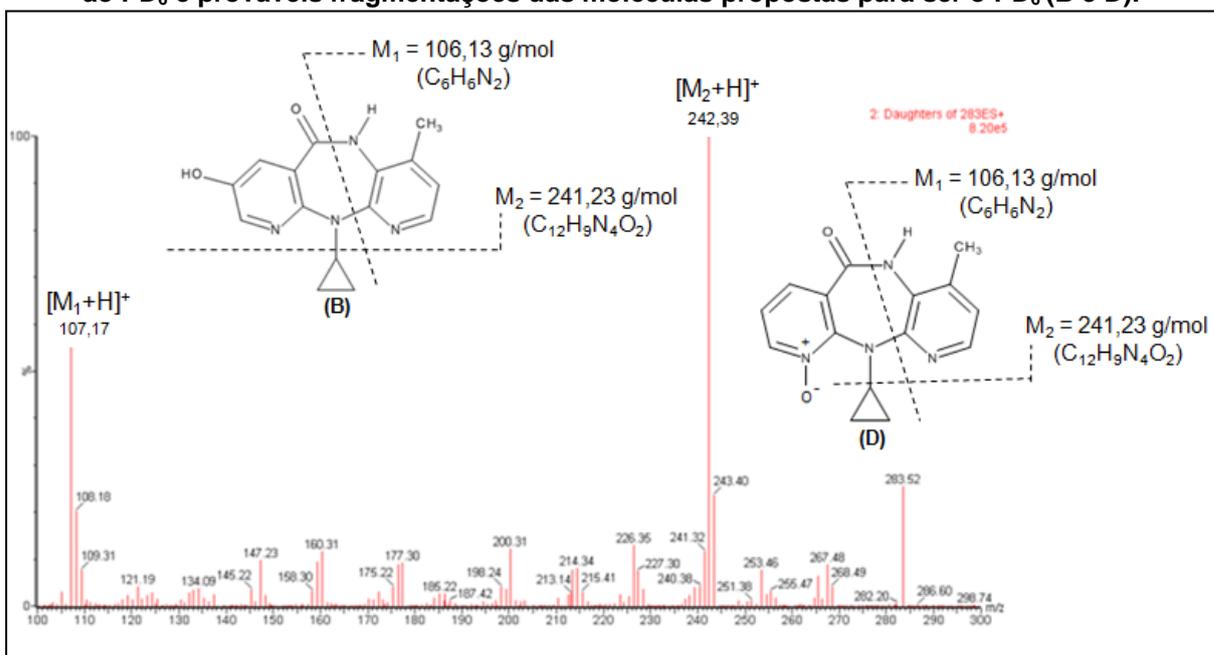


Figura 60 – Espectro de massas obtido a partir da fragmentação do íon precursor referente ao PD₆ e prováveis fragmentações das moléculas propostas para ser o PD₆ (B e D).



Conclui-se que os produtos de degradação PD₄ e PD₆ podem ser produtos provenientes de mecanismos de hidroxilação ou N-oxidação. Para que seja

realizada a identificação inequívoca desses produtos de degradação faz-se necessário a produção de maior quantidade desses produtos, seguido pelo isolamento e purificação dos mesmos, para que possam ser analisados por espectrofotometria na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Em relação aos produtos de degradação formados em meio ácido, propôs-se um mecanismo de hidrólise de amida para a formação de um produto de degradação com o mesmo valor de razão m/z (285) que o encontrado para os íons precursores dos produtos de degradação provenientes do meio ácido (**Figura 61**). O mecanismo de hidrólise em meio ácido proposto consiste no recebimento de um próton proveniente do ácido aquoso pela carbonila da amida, em seguida uma molécula de água ataca a carbonila protonada e posteriormente, um próton é perdido em um oxigênio e ganho no nitrogênio. Um hidrogênio de um dos oxigênios é perdido para a água, culminado na quebra do anel e conseqüente formação de um ácido carboxílico e uma amina (SOLOMONS *et al.*, 2012).

Além dos espectros de massas dos íons precursor e produto serem idênticos para os picos PD₁ e PD₂, existentes na amostra degradada em meio ácido a 1000 µg/mL de nevirapina, os espectros de absorção no ultravioleta (**Figura 62**) desses produtos de degradação também são muito semelhantes e, isso corrobora para que a hipótese levantada anteriormente (item 4.3.4.2, página 80), seja verdadeira, isto é, os dois picos que aparecem no cromatograma da amostra concentrada (1000 µg/mL) tratam-se de apenas uma molécula que, devido ao baixo pH da amostra degradada, encontram-se em dois estados de ionização diferentes e, por isso, ocorre a sua separação em dois picos.

Figura 61 – Mecanismo químico proposto (hidrólise em meio ácido de amida) para formação de um produto de degradação proveniente do estudo de estresse em meio ácido.

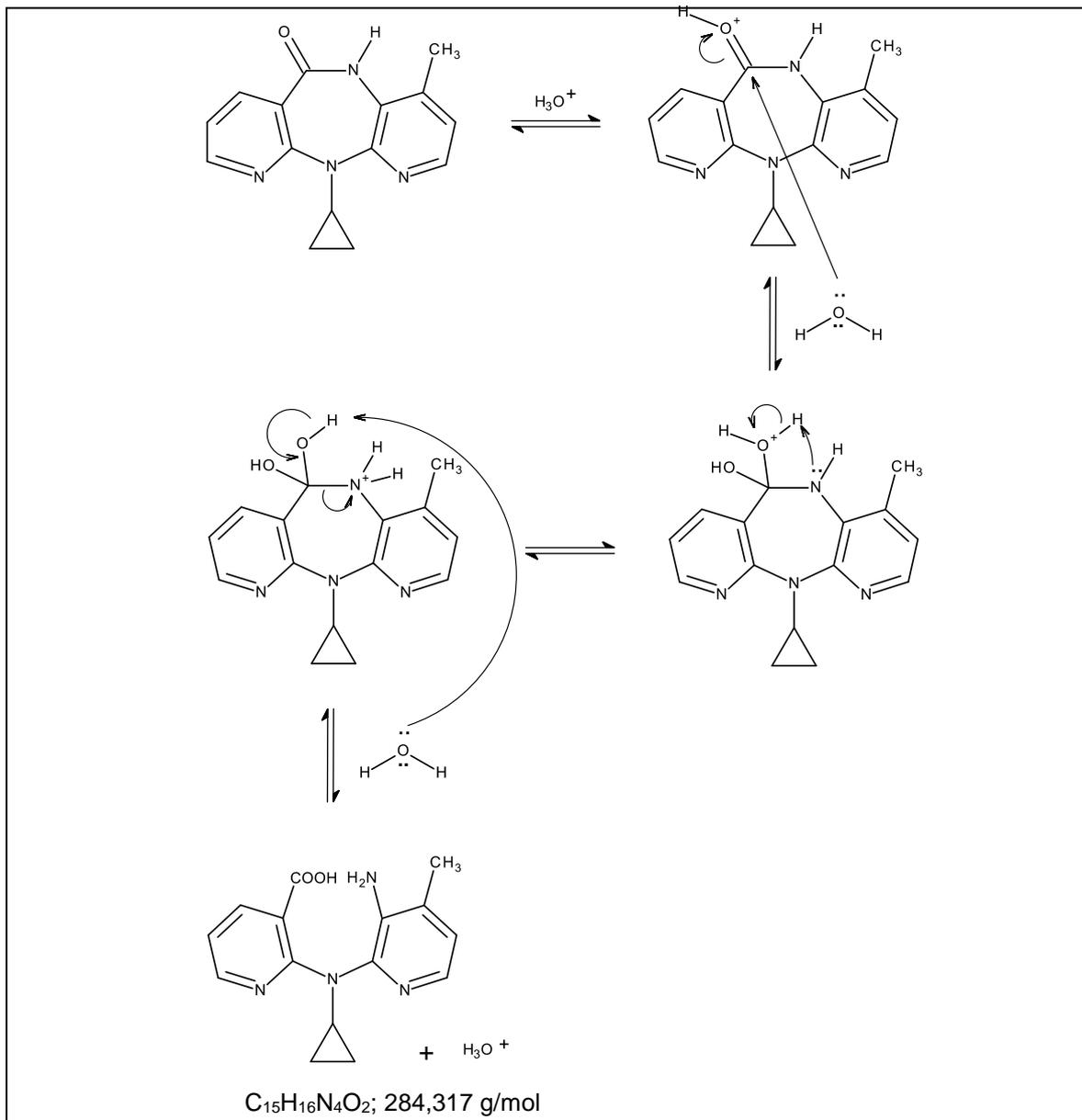
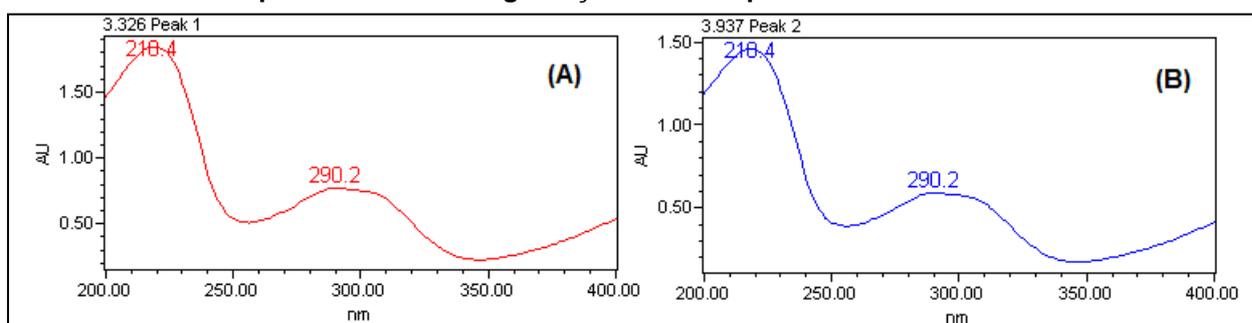


Figura 62 – Espectros de absorção na região do ultravioleta para os picos PD₁ (A) e PD₂ (B) provenientes da degradação da nevirapina em meio ácido.

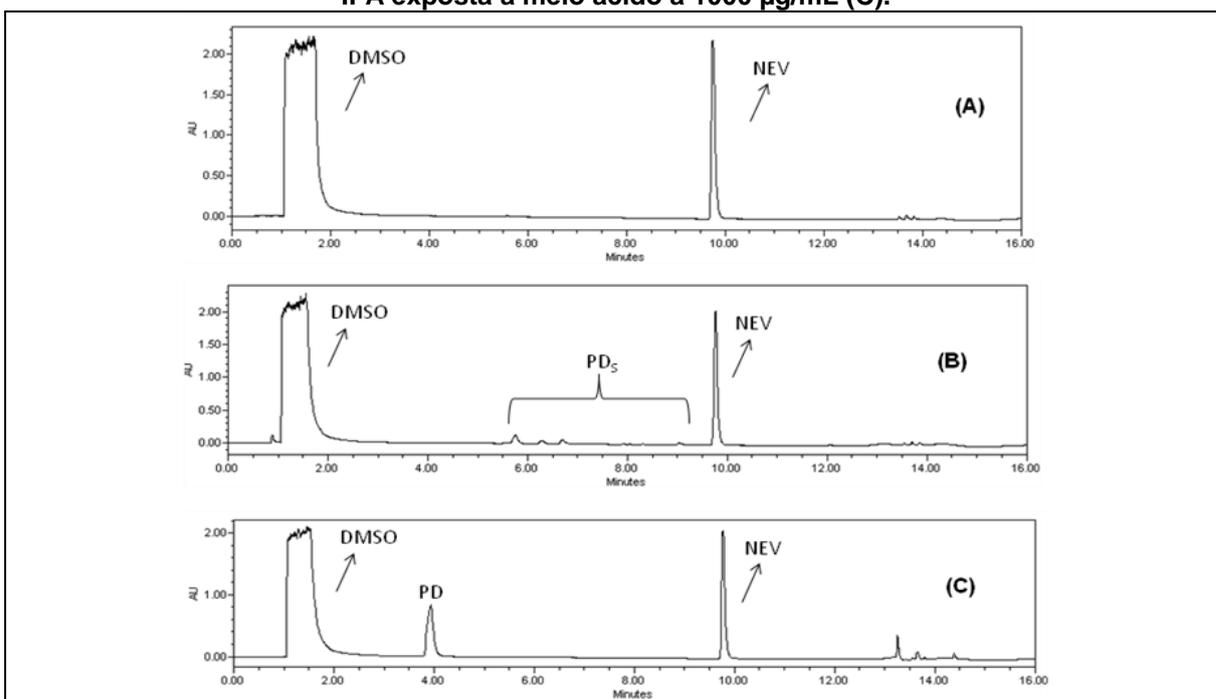


6.3.3 Resultados do ensaio de citotoxicidade *in vitro*

De acordo com levantamento bibliográfico previamente realizado, verificou-se que, na maioria dos estudos encontrados na literatura para determinação de nevirapina em plasma humano, utilizando como técnica de preparo de amostra a extração líquido-líquido, bons resultados foram encontrados com a utilização de acetato de etila e éter-metil-terc-butílico (MTBE) (ANTUNES *et al.*, 2011; HALDE; MUNGANTIWAR; CHINTAMANENI, 2011; HAMRAPURKAR *et al.*, 2010).

Para o isolamento da nevirapina e dos produtos de degradação formados nas amostras de nevirapina IFA expostas ao meio ácido e oxidativo, vários solventes foram testados: acetato de etila, éter etílico, diclorometano, hexano, isopropanol, MTBE, clorofórmio, mistura de acetato de etila:MTBE:diclorometano (4:3:3). Os melhores resultados foram obtidos com acetato de etila, que promoveu a recuperação tanto da nevirapina quanto dos produtos de degradação, como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 63**.

Figura 63 – Cromatogramas obtidos a partir da extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como agente extrator e DMSO para reconstituição das amostras de nevirapina IFA controle a 200 µg/mL (A), nevirapina IFA exposta a meio oxidativo a 200 µg/mL (B) e nevirapina IFA exposta a meio ácido a 1000 µg/mL (C).



Legenda: DMSO =dimetilsulfóxido; PDs = produtos de degradação; NEV = nevirapina.

A concentração de nevirapina em cada um dos tubos de vidro após a extração líquido-líquido e reconstituição com 1 mL de DMSO é mostrada na **Tabela 46**.

Tabela 46 – Concentração de nevirapina após extração líquido-líquido (LL) utilizando acetato de etila como agente extrator e reconstituição com 1 mL DMSO.

Amostra de partida	Concentração obtida após extração LL (µg/mL)
Nevirapina controle a 200 µg/mL	124
Nevirapina controle a 100 µg/mL	69
Nevirapina exposta à oxidação a 200 µg/mL	100
Nevirapina exposta à oxidação a 100 µg/mL	47
Nevirapina exposta à hidrólise ácida a 1000 µg/mL	104
Nevirapina exposta à hidrólise ácida a 200 µg/mL	56
Nevirapina exposta à hidrólise ácida a 100 µg/mL	29

Ao analisar a **Tabela 46**, percebe-se que para cada tipo de amostra (controle, exposta à oxidação e exposta à hidrólise ácida), a recuperação da nevirapina foi diferente e, conseqüentemente, a concentração de nevirapina obtida em cada tubo de ensaio após a extração líquido-líquido foi diferente. Como era necessário partir de uma solução a 400 µg/mL (solução estoque) de nevirapina no ensaio de citotoxicidade, utilizou-se aquelas amostras nas quais a recuperação foi maior, sendo elas: nevirapina controle e exposta à degradação oxidativa a 200 µg/mL e nevirapina exposta à hidrólise ácida a 1000 µg/mL. Dessa forma, três réplicas foram preparadas partindo-se de cada uma dessas amostras e, no final do procedimento de extração, reconstituiu-se com 250 µL de DMSO, resultando em amostras com concentração de cerca de 400 µg/mL de nevirapina (solução estoque). Os conteúdos das três réplicas de cada amostra foram unidos, para que se conseguisse o volume necessário para a realização do teste (650 µL). A partir das soluções estoque realizou-se cinco diluições seriadas (1:10) e todas essas soluções foram aplicada em triplicata nos poços contendo as células.

Nas análises de citotoxicidade medindo a absorvância de cristais de formazam dissolvidos em DMSO, todas as concentrações testadas (0,004; 0,04; 0,4; 4; 40 e 400 µg/mL) apresentaram o mesmo resultado. As concentrações a serem analisadas foram escolhidas com base na concentração plasmática máxima atingida pela nevirapina quando a dose administrada é de 400 mg/dia, que é de $4,5 \pm 1,9$ µg/mL

(MEDICINANET, 2015), de maneira que esta concentração se encontre próximo ao centro da curva.

Na **Tabela 47** estão apresentados os resultados de viabilidade celular encontrados para as amostras a 4 µg/mL, que corresponde à concentração mais próxima da concentração plasmática máxima atingida pela nevirapina após administração de dose correspondente a 400 mg/dia.

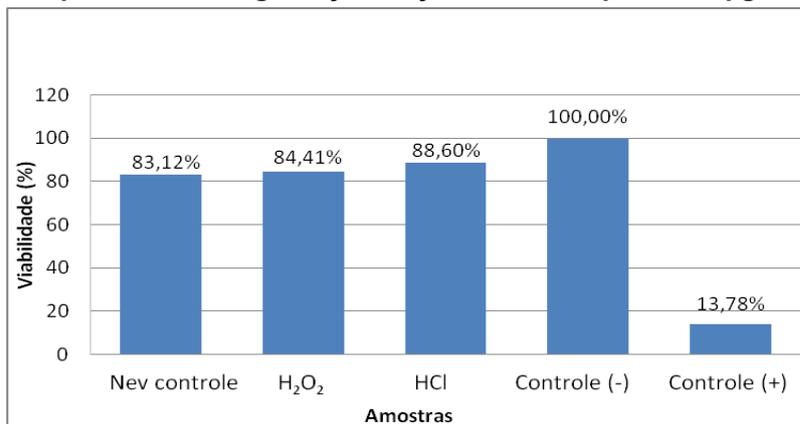
Tabela 47 – Viabilidade celular em células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis antes e após os testes de degradação forçada.

Amostra	Viabilidade (%) para amostras na concentração de 4 µg/mL
Nevirapina controle	87,69
Nevirapina + H ₂ O ₂	92,27
Nevirapina + HCl	98,57
Controle negativo	100,00
Controle positivo	16,23

O controle positivo (etoposídeo) reduziu drasticamente o percentual de viabilidade celular (16%), conforme esperado, enquanto que as amostras de nevirapina IFA submetidas às condições de degradação forçada em meio ácido e oxidativo, contendo produtos de degradação, não afetaram significativamente a viabilidade celular, ficando próximas de 100% (valor correspondente ao controle negativo), o que indica ausência de citotoxicidade.

Resultado semelhante foi obtido para as amostras degradadas a 40 µg/mL de nevirapina (**Figura 64**). De acordo com o resultado do teste t de *Student*, não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com a amostra controle de nevirapina e as amostras degradadas ($\alpha = 0,05$). Assim, pode-se concluir que, até mesmo em concentrações até dez vezes superiores à concentração plasmática máxima da nevirapina, não é observado citotoxicidade para células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis. Os resultados de viabilidade celular obtidos para as amostras de nevirapina são semelhante aos obtidos no estudo de Stenger (2011), que determinou a citotoxicidade de amostras de cloridrato de metformina IFA e comprimidos submetidas ao estudo de degradação forçada.

Figura 64 – Gráfico de viabilidade celular obtido no ensaio de citotoxicidade dos produtos de degradação forçada da nevirapina a 40 µg/mL.



A concentração inibitória para 50% das células (IC_{50}) encontrada para as amostras provenientes da degradação forçada foi de $111,30 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$ para amostra de nevirapina IFA exposta a peróxido de hidrogênio e de $132,35 \pm 1,50 \mu\text{g/mL}$ para amostra expostas ao meio ácido. Esse resultado corrobora a conclusão de que essas amostras não são citotóxicas, uma vez que a IC_{50} encontrada para essas amostras é muito superior à concentração plasmática máxima que a nevirapina atinge após administração de 400 mg/dia, que é de $4,5 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$.

7 CONCLUSÕES

Foi realizado um estudo de degradação forçada completo, no qual a nevirapina IFA, comprimidos e placebo foram submetidos às diversas condições de degradação forçada (hidrólise ácida, alcalina, neutra, presença de íons metálicos, umidade, degradação térmica, fotolítica e oxidação com peróxido de hidrogênio e AIBN), o qual viabilizou o desenvolvimento de dois métodos indicativos de estabilidade seletivos para a nevirapina e seus produtos de degradação, utilizando técnicas mais rápidas e eficientes de separação: cromatografia a líquido de ultra eficiência com coluna de partículas sub 2 μm e de núcleo fundido.

O método indicativo de estabilidade utilizando coluna de núcleo fundido foi validado, ou seja, todos os parâmetros de desempenho avaliados, dentre eles a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez foram satisfatórios tanto para IFA quanto para comprimidos. E por isso, pode ser aplicado tanto para o controle de qualidade quanto na avaliação dos estudos de estabilidade da nevirapina IFA e de formulação de comprimidos de nevirapina.

A nevirapina apresentou-se susceptível apenas à degradação em meio ácido e oxidativo com peróxido de hidrogênio. Em relação à estabilidade da nevirapina no IFA e nos comprimidos concluiu-se que a especialidade farmacêutica apresenta perfil de degradação semelhante ao do fármaco isolado, entretanto, com uma intensidade um pouco maior.

Foram propostas estruturas químicas e mecanismos químicos de formação para os produtos de degradação majoritariamente formados, com base em espectros obtidos por análises com CLAE/EM-EM. Porém, métodos complementares de isolamento e purificação somados a outras técnicas espectroscópicas de identificação, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio e infravermelho devem ser realizados para confirmar a estrutura química desses produtos de degradação.

Além disso, realizou-se estudos de citotoxicidade *in vitro* que demonstraram que os produtos de degradação formados em meio ácido e oxidativo não apresentam citotoxicidade frente às células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ABRAHIM, A. A.; MOHAMMAD A.; SKRDLA, P.; BEREZNITSKI, Y.; CHEN, Y.; WU, N. Practical comparison of 2,7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separation in pharmaceutical process development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, p. 131-137, 2010.
- AIDSinfo. HIV Overview. Education Materials, last reviewed 23/09/2014. Disponível em: <<http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/19/73/the-hiv-lifecycle>>. Acesso em: 1º mar 2015.
- ALSANTE, K. M.; MARTIM, L.; BAERTSCHI, S. W. A. Stress Testing Benchmarking Study. *Pharmaceutical Technology*, v. 27, n. 2, p. 60–72, 2003.
- AL-SAYAH, M. A.; RIZOS, P.; ANTONUCCI, V.; WU, N. High throughput of active pharmaceutical ingredients by UPLC. *Journal of Separation Science*, v. 31, p. 2167-2172, 2008.
- ALVES, R. J. *Síntese de derivados do alilbenzeno: havicol e 0-Benzilchavicol*. 1982. 110f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 1982.
- AMPARO, M. R.; FRANZINI, A. D.; SCHIAVON, B.; CARVALHO, L. S.; NETO, A. J. S. Influência dos parâmetros instrumentais sobre o desempenho de coluna de HPLC com partículas superficialmente porosas sub-3 μm . *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 2, p. 51-66, 2011.
- ANDERSON, N. H. Photostability testing: design and interpretation of tests on drug substances and dosage forms. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. Hanne Hjorth Tonnesen, p. 307, 1996.
- ANTUNES, M. V.; POETA, J.; RIBEIRO, J. P.; SPRINZ, E.; LINDEN, R. Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Quantification of HIV Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Protease Inhibitors in Human Plasma. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, nº. 1, p. 134-141, 2011.
- APARNA, P.; RAO, S. V.; THOMAS, K. M.; MUKKANTI, K.; GUPTA, P. B.; RANGARAO, K.; NARAYAN, G. K.; SANDIP, T.; UPENDRA, K. Identification, isolation, and characterization of potential degradation products in a triple combination lamivudine, zidovudine, and nevirapine tablet for oral suspension. *Pharmazie*, v. 65, n. 5, p. 331-335, 2010.
- BADMAN, E. R.; BEARDSLEY, R. L.; LIANG, Z.; BANSAL, S. Accelerating high quality bioanalytical LC/MS/MS assays using fused-core columns. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 2307-2313, 2010.
- BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. Taylor & Francis Group, 2nd ed., 2005.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BEDSE, G.; KUMAR, V.; SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC-MS/TOF and MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p. 55-63, 2009.

BHARDWAJ, S. P.; SINGH, S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, p. 113-120, 2008.

BICHALA, P. K.; RAO, A. L. Development and validation of newer analytical method for the estimation of nevirapine in bulk and in tablet dosage form by rp – HPLC method. *International Journal of Pharmaceutical Development and Technology*, v. 5, n. 1, p. 15-19, 2015.

BOCCARDI, G. Autoxidation of drugs: Prediction of degradation impurities from results of reactions with radical chain initiators. *Il Farmaco*, v. 49; p. 431–5, 1994.

BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 33, n. 4, p. 393-341, 2007.

BRASIL. Consulta Pública nº 68, de 29 de agosto de 2014 – Determina a publicação do guia regulatório para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 1º set. 2014[a].

BRASIL. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 15 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENAME - Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais. 8a Ed.; Brasília-DF, 2013[a].

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Nota técnica nº 388/2012 CQV/D-DST-AIDS-HV/SVS/MS, 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos, 2014[b].

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico HIV-AIDS, ano III, nº 1, Brasília, 2014[c].

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 1º ago. 2005.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 2 jun 2003.

BRASIL. Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 23 dez. 2013[b].

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationary Office, 2014.

BUDAVARI, S. The Merck index: na encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals., 12th ed, 1995.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, v. 47, 936-942, 1987.

CARVALHO, J. P., SANTOS A. S.; SÁ, A. S., TEIXEIRA C. S., NOGUEIRA M. S. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. *Revista Brasileira de Medicina e Farmácia*. v. 34, n. 6, p. 22-27, 2005.

CIONE, A. P.; TONHI, E; SILVA P. Stability Indicating Methods. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, *Yukihiro Shoyama* (Ed.), ISBN: 978-953-307-682-9, 2007.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DESTEFANO, J. J.; LANGLOIS, T. J.; KIRKLAND, J. J. Characteristics of Superficially-Porous Silica Particles for Fast HPLC: Some Performance Comparisons with Sub-2-µm Particles. *Journal of Chromatographic Science*, v. 46, 2008.

DOLAN, J. *Do I get Two Peaks for Ionic Compounds?* HPLC Solutions series of guidance. Disponível em: <<http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/699-/HPLC-Solutions-7-Do-I-get-Two-Peaks-for-Ionic-Compounds>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

ELENS, L.; VERITER, S.; FAZIO, V. D.; VANBINST, R.; BOESMANS, D.; WALLEMACQ, P.; HAUFROID, V. Quantification of 8 HIV-Protease Inhibitors and 2 Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Clinical Chemistry*, v. 55:1, p. 170–174, 2009.

ENÉAS, P. C. R. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma. 2014. 256f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2014.

FARMACOPEIA Brasileira, 4ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1988.

FARMACOPEIA Brasileira, 5ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FDA. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*, 2000.

FLEXNER, C.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. Agentes antirretrovirais e tratamento da infecção pelo HIV. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12th ed. Porto Alegre: AMGH, p. 1623- 1663, 2012.

FREITAS, N. C. C.; NASCIMENTO, A. P. Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor em atenolol comprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada*, v. 35, n. 2, p. 285-291, 2014.

GRIMM, W. Extension of the International Conference on Harmonisation Tripartite Guidelines for stability testing of new drug substances and products to countries of Climatic Zones III and IV. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, p. 313-325, 1998.

GOMES, R. R. F. M.; MACHADO, C. J.; ACURCIO, F. A.; GUIMARÃES, M. D. C. Utilização dos registros de dispensação da farmácia como indicador da não-adesão à terapia antirretroviral em indivíduos infectados pelo HIV. *Caderno de Saúde Pública*, v. 25, p. 495-506, 2009.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREENE, W. C.; PETERLIN, B. M.; Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*, v. 8, p. 673-680, 2002.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Recent developments in liquid chromatography-impact on qualitative and quantitative performance. *Journal of Chromatography A*, v. 1149, p. 20-29, 2007.

GUILLARME, D.; RUTA, J.; RUDAZ, J.; VEUTHEY, J. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 1069-1082, 2010.

HALDE, S.; MUNGANTIWAR, A.; CHINTAMANENI, M. Simple, precise and accurate HPLC method of analysis for nevirapine suspension from human plasma. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 73, p. 416-421, 2011.

HAMRAPURKAR, P.; PHALE, M.; PATIL, P.; SHAN, N. Determination of Nevirapine in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *International Journal of PharmTech Research*, v. 2, p. 1316-1324, 2010.

HEESWIJK, R. P. G.; HOETELMANS, R. W.; MEENHORST, P. L.; MULDER, J. W.; BEIJNEN, J. H. Rapid determination of nevirapine in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, v. 713, p. 395–399, 1998.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1B – stability testing: photostability testing of new drug substances and products*, 1996.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1A(R2) – Stability Test of New Drug Substances and Products*, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q2(R1) – Validation of analytical procedures: text and methodology*, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q3A(R2) – Impurities in New Drug Substances*, 2006.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ-CGCRE-008, revisão 04. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro, 2011.

KATS, M. Forced degradation studies: regulatory considerations and implementation. *Advanstar Communications, Inc.*; 2005. Disponível em: < <http://www.biopharminternational.com/forced-degradation-studies-regulatory-considerations-and-implementation> >. Acesso em: 25 fev. 2015.

KAUL, N.; AGRAWAL, H.; PARADKAR, A. R.; MAHADIK, K. R. HPTLC method for determination of nevirapine in pharmaceutical dosage form. *Talanta*, v. 62, p. 843–852, 2004.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 857–68, 1999.

LEITE, E. G. *Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos*. 2005. 199f. Dissertação (Pós graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005.

LI, Q. C.; TOUGAS, T.; COHEN, K.; LEE, R.; MEAGAN, P.; CORSON, M.; MUCHNICK, T. Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Assay of and Determination of Related Organic Impurities in Nevirapine Drug Substance. *Journal of Chromatographic Science*, v. 38, 2000.

MAGGI, P.; BELLACOSA, C.; CARITO, V.; PERILLI, F.; LILLO, A.; VOLPE, A. TRILLO, G.; ANGIETTA, D.; REGINA, G.; ANGARANO, G.. Cardiovascular risk factors in patients on long-term treatment with nevirapine - or efavirenz-based regimens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 896-900, 2011.

MALDANER, L.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, São Paulo, 2010.

MARTINS, K. C. *Avaliação e comparação da cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de ultra eficiência empregando fármacos antidiabéticos orais como modelo*. 2012. 63f. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2012.

MCMMASTER, M. C. *HPLC A Practical User's Guide*. 2nd ed. *New York: John Wiley & Sons*, 238 p., 2007.

MEDICINANET. Bula eletrônica Nevirapina. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/8266/nevirapina.htm>>. Acesso em: 8 jan. 2015.

MELO, O. R. S. *Produtos de degradação: regulamentação sanitária e proposta de monografia para qualificação*. 2012. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.

MERCOSUL. *Resolução GMC 53/96*: Aprova o regulamento técnico denominado “Estabilidade de produtos farmacêuticos” para a aplicação da resolução GMC 23/95. 1996. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

MIROCHNICK, M.; FENTON, T.; GAGNIER, P.; PAV, J.; GWYNNE, M.; SIMINSKI, S.; SPERLING, R. S.; BECKERMAN, K.; JIMENEZ, E.; YOGEV, R.; SPECTOR, S. A.; SULLIVAN, J. L. Pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their neonates. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 250 Team. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 178, p. 368-374, 1998.

NARAYANAM, M.; HANDA, T.; SHARMA, P.; JHAJRA, S.; MUTHE, P. K.; DAPPILI, P. K.; SHAS, R. P.; SINGH, S. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 191–217, 2014.

NAVANEETHAN, G.; KARUNAKARAN, K.; ELANGO, K. P. Development and Application of Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Nevirapine and Its Impurity in Combination Drug Product. *Acta Chromatographica*, v. 24:4, p. 575-587, 2012.

NAVARATHAM, S. Photochemical and photophysical methods used in study of drug photoreactivity. Photostability of drugs and drug formulations. *Hanne Hjorth Tonnesen*, p. 256, 2004.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 µm stationary phases in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1128, p. 105–113, 2006.

NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N.; SINGH, A. K. Méritos comparativos da cromatografia em fase líquida de alta eficiência em escala

convencional e minituarizada. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 2, p.44–50, 2011.

PATNAIK, P. Handbook of environmental analysis. 2nd ed. *New Yourk: CRC press*, 1997.

PEREIRA, B. G. *A influência do polimorfismo na dissolução de cristais de nevirapina*. 2007. 79f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.

PODZAMCZER, D.; ANDRADE-VILLANUEVA, J.; CLOTET, B.; TAYLOR, S.; ROCKSTROH, J., K.; REISS, P.; DOMINGO, P.; GELLERMANN, H. J.; ROSSI, L.; CAIRNS, V.; SORIANO, V. Lipid profiles for nevirapine vs. atazanavir/ritonavir, both combined with tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine over 48 weeks, in treatment-naïve HIV-1-infected patients (the ARTEN study). *Br. HIV Medicine*, [S.l.], v. 12, p. 374-382, 2011.

PRADO, L. M. F. *Avaliação de diferentes tipos de fases estacionárias para separações rápidas em cromatografia líquida utilizando antidiabéticos orais como modelo*. 2013. 189f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2013.

RAO, N. R.; KIRAM, S. S. M.; PRASANTHI, N. L. Pharmaceutical Impurities: An Overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 44, n. 3, p.301-310, 2010.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 335–377, 2003.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, F. J.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T.D.; MICHEL, M. G. Available guidance and Best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

RSC (Royal Society of Chemistry). *Analytical Methods Committee Brief: Is my calibration linear?*, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, 6th ed, 2009.

ROWLAND, L. S.; MACGREGOR, T. R.; CAMPBELL, S. J.; JENKINS, R.; PEARSALL, A. B.; MORRIS, J. P. Quantitation of five nevirapine oxidative metabolites in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 856, p. 252–260, 2007.

SAHOO, M.; KUMAR, B. V. V. R.; TRIPATHY, N. K.; PATRO, S. K. Stability indicating RP-HPLC method for determination of nevirapine in pure and tablet form. *Der Pharma Chemica*, v. 5(2), p. 103-110, 2013.

SALISBURY, J. J. Fused-Core Particles: A Practical Alternative to Sub-2 Micron Particles. *Journal of Chromatographic*. v. 46, p. 883-886, 2008.

SCIENTIFIC discussion viramune. European Medicine Agency. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000183/WC500051478.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2015.

SILVA, K.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M.; PASSOS, R.; FARIA, A.; ROLIM NETO, P. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R.A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 69, p. 148– 173, 2012.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology*, v. 24, p. 1-14, 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2th ed. New York: John Wiley & Sons, 765 p., 1997.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; JOHNSON, R. G. *Química orgânica*. v. 2, 10^a ed., Livros Técnicos e Científicos Editora, 2012.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.

STENGER, F. C. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade do cloridrato de metformina em comprimidos e estudo de citotoxicidade dos produtos de degradação*. 2011. 123f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2011.

STEWART, P.; TUCKER, I. Prediction of drug stability – part 2: Hydrolysis. *The Australian Journal of Hospital Pharmacy*, v. 15, p. 11-16, 1985.

STRYER, L. Antibodies and T-cell receptors. *Biochemistry*. 4th. ed. New York: W. H. Freeman, p.384-386, 1995.

SWARTZ. M. E. UPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 28, p. 1253-1263, 2005.

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 38. 36 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), 2010.

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia. *WHO Drug Information*. World Health Organization, v. 18, n° 1, 2006; 2nd Supplement, 2011 e 3rd Supplement, 2013. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5407e/7.4.html>>. Acesso em: 19 jan. 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*. v. 74, p. 835-855, 2002.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global statistics, 2014. Disponível em: <http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1510_2008GlobalReport_en.zip>. Acesso em: 1º mar. 2015.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. Rockville: FDA, 33 p. 1994.

VADAS, E. B.; GENNARO, A. R. *Remington – A Ciência e a Prática da Farmácia*. Editora Guanabara Koogan, 20ª edição, 2004.

WASYLASCHUK, W. R.; HARMON P. A.; WAGNER G. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 96, p. 106–116, 2007.

WREN, S. A. C.; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*, v. 1119, p. 140-146, 2006.

YARCHOAN, R.; PLUDA, J. M.; PERNO, C. F.; MITSUYA, H.; BRODER, S. Antiretroviral therapy of human immunodeficiency virus infection: current strategies and challenges for the future. *Blood*, v. 78, p. 859-884, 1991.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. Stability of drugs and dosage forms. Ed. *Kluwer Academic Publishers*, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 48th ed. Arlington: AOAC, 88 p., 1975.

APÊNDICE A – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do - Simpósio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR - 2014), realizado na cidade de Belo Horizonte - MG, em agosto de 2014.





TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA NEVIRAPINA INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E COMPRIMIDOS

Assis, J.C.^{1*}; Reis, N. F. A.¹; Fialho, S. L.²; Pianetti, G. A.¹; Fernandes, C.¹

¹ Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico. Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte (MG), Brasil.

* je-camille14@hotmail.com

Palavras-chave: nevirapina, comprimidos, AIDS, controle de qualidade

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença infectocontagiosa, de alta prevalência no Brasil e no mundo, causada por um retrovírus conhecido como vírus da imunodeficiência humana (HIV). O HIV ataca o sistema imunológico, deixando o indivíduo mais suscetível às infecções oportunistas. A nevirapina é um componente da farmacoterapia aplicada ao tratamento da AIDS, de grande importância e ampla utilização, sendo assegurado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde¹. Tem se como objetivo, com o presente trabalho, avaliar a qualidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) e dos comprimidos de nevirapina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O IFA (nevirapina anidra) bem como os comprimidos, foram gentilmente cedidos pela FUNED. O primeiro foi avaliado de acordo com suas características físicas, apresentando-se como um pó branco e inodoro, praticamente insolúvel em água e pouco solúvel em diclorometano, etanol, metanol e propilenoglicol. A identificação foi realizada pela comparação dos espectros de absorção na região do infravermelho e ultravioleta do IFA com os respectivos espectros da substância química de referência. A sobreposição dos espectros demonstra que se trata de uma mesma substância, uma vez que possui bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda e intensidades semelhantes. Os ensaios de pureza realizados foram perda por dessecação, cinzas sulfatadas e metais pesados, para os quais o IFA apresentou resultados em concordância com os exigidos pela FB 5².

Na avaliação da qualidade dos comprimidos de Nevirapina 200 mg, foram realizados testes físicos, tais como, determinação de peso, dureza, friabilidade e desintegração, utilizando-se equipamentos específicos para cada teste². Todos os medicamentos foram considerados adequados em relação aos testes realizados, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Determinação de parâmetros físicos para controle de qualidade de comprimidos de Nevirapina 200 mg.

Parâmetro	Valor encontrado	Valor estabelecido pela FB 5
Peso médio	797,33 mg	Peso Médio \pm 5%
Dureza	Média=72,2 N	Informativo
Friabilidade	Perda=0,336%	Perda \leq 1,5%
Tempo de desintegração	Menos de 5 minutos	Máximo de 30 minutos

CONCLUSÃO

Tanto o IFA quanto os comprimidos de nevirapina foram considerados adequados nos testes de controle de qualidade realizados, apresentando conformidade com as especificações farmacopeicas. Posteriormente, IFA e comprimidos serão submetidos a outros testes de controle de qualidade.

AGRADECIMENTOS

FAPEMIG, CAPES, FUNED e Farmacopeia Brasileira.

1 BRASIL. Ministério da saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos, 2013.

2 FARMACOPEIA Brasileira, 5ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

APÊNDICE B – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO - 2014), na cidade de Campos do Jordão - SP, em setembro de 2014.



TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICADOR DE ESTABILIDADE PARA NEVIRAPINA

Jéssica C. Assis, Naialy F. A. Reis, Silvia L. Fialho, Gerson A. Pianetti, Christian Fernandes

Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
- Belo Horizonte-MG, Brasil - CEP 31270-901

je-camille14@hotmail.com

INTRODUÇÃO - A prevalência da AIDS no Brasil e no mundo é muito alta. O principal objetivo da terapia antirretroviral é retardar a progressão da imunodeficiência possibilitando maior qualidade de vida aos portadores do vírus HIV pela administração de uma combinação de fármacos antirretrovirais. A nevirapina é um importante componente da farmacoterapia aplicada ao tratamento da AIDS e atua inibindo a multiplicação viral e prevenindo a transmissão materno-fetal do HIV. O desenvolvimento de estudos sobre a degradação da nevirapina é de extrema relevância, visto que permite determinar as transformações estruturais deste princípio ativo, detectar potenciais produtos de degradação e determinar as condições acidentais de exposição que podem ser deletérias para o fármaco e medicamentos. Para acompanhar os resultados provenientes dos estudos de estabilidade é necessária a utilização de um método indicador de estabilidade.

OBJETIVOS - Realizar estudo de degradação forçada da nevirapina e desenvolver e otimizar método indicador de estabilidade seletivo para o insumo farmacêutico ativo e seus produtos de degradação.

MATERIAIS E MÉTODOS - O insumo farmacêutico ativo, comprimidos e placebo, foram expostos a condições de hidrólise neutra (H_2O), ácida (HCl 1 M), básica ($NaOH$ 1 M), oxidação (H_2O_2 3% v/v) e presença de íons metálicos ($CuSO_4$ 0,05 M), com e sem aquecimento. Após 24 horas, alíquotas de 5 μL dessas soluções nas concentrações de 1 mg/mL e 0,04 mg/mL foram injetadas em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UHPLC), com detector DAD, utilizando coluna C_{18} (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) mantida à temperatura de 30°C e fase móvel composta de acetonitrila e água (eluição gradiente).

RESULTADOS - O método cromatográfico otimizado apresentou tempo de corrida de 13 minutos e o gradiente variou de 92:8 a 10:90 de água/acetonitrila, seguida do reequilíbrio da coluna, e o fluxo da fase móvel também variou entre 0,1 mL/min e 0,25 mL/min durante o gradiente. A nevirapina apresentou tempo de retenção de 10,3 minutos. As amostras de insumo farmacêutico ativo e comprimidos expostas ao peróxido de hidrogênio apresentaram a maior degradação, cerca de 20%, com formação de pelo menos sete produtos de degradação com tempos de retenção entre 7 e 10 minutos. Foram observados dois novos picos nas alíquotas provenientes da degradação ácida, com tempos de retenção de 2,5 e 3,4 minutos; porém, não foi observado mudança no teor da nevirapina nessas mesmas amostras. Nas demais condições de estresse não foi observada degradação significativa, nem a formação de novos picos.

CONCLUSÃO - A nevirapina é um fármaco susceptível à degradação oxidativa. O método desenvolvido e otimizado demonstrou ser seletivo para a determinação de nevirapina na presença dos produtos de degradação formados nas condições testadas, podendo ser utilizado durante estudos de estabilidade.

Agradecimentos - FAPEMIG, CAPES, FUNED e Farmacopeia Brasileira.

APÊNDICE C – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do - Simpósio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR - 2014), realizado na cidade de Belo Horizonte - MG, em agosto de 2014.





DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DA NEVIRAPINA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICADOR DE ESTABILIDADE UTILIZANDO UHPLC

Reis, N. F. A.^{1*}; Assis, J.C.¹; Fialho, S. L.²; Pianetti, G. A.¹; Fernandes, C.¹

¹ Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico. Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte (MG), Brasil.

*naialy@gmail.com

Palavras-chave: Nevirapina, AIDS, Degradação Forçada, Estabilidade

INTRODUÇÃO

A prevalência da AIDS no Brasil e no mundo é muito alta. O principal objetivo da terapia antirretroviral é retardar a progressão da imunodeficiência possibilitando maior qualidade de vida aos portadores do vírus HIV pela administração de uma combinação de fármacos antirretrovirais. A nevirapina é um importante componente da farmacoterapia aplicada ao tratamento da AIDS e atua inibindo a multiplicação viral e prevenindo a transmissão materno-fetal do HIV¹.

Dessa forma, com esse trabalho tem-se como objetivo a realização de estudo de degradação forçada oxidativa da nevirapina e desenvolvimento e otimização de método indicador de estabilidade seletivo para o insumo farmacêutico ativo (IFA) e os produtos de degradação formados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O IFA, comprimidos e placebo, foram expostos à condição de oxidação (peróxido de hidrogênio 3% v/v), durante 24 horas sob aquecimento em banho-maria a 50°C e sob temperatura ambiente durante 5 dias. Após esse período de exposição, alíquotas de 5 µL dessas soluções nas concentrações de 1 mg/mL e 0,04 mg/mL foram injetadas em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UHPLC), com detector DAD, utilizando coluna C₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) mantida à temperatura de 30°C e fase móvel composta de acetonitrila e água (eluição gradiente).

O método cromatográfico otimizado apresentou tempo de corrida de 13 minutos

e o gradiente variou de 92:8 a 10:90 de água:acetonitrila, seguida do reequilíbrio da coluna, e o fluxo da fase móvel também variou entre 0,1 mL/min e 0,25 mL/min durante o gradiente. A nevirapina apresentou tempo de retenção de 10,3 minutos. As amostras de IFA e comprimidos expostas ao peróxido de hidrogênio sob aquecimento apresentaram maior degradação, cerca de 20%, com formação de, pelo menos, sete produtos de degradação com tempos de retenção entre 7 e 10 minutos. As amostras mantidas à temperatura ambiente apresentaram degradação de cerca de 10% e formação de cinco picos (correspondentes aos picos majoritários formados nas amostras submetidas ao aquecimento). As amostras de placebo não apresentaram picos.

CONCLUSÃO

A nevirapina é um fármaco susceptível à degradação oxidativa e o aquecimento favorece a sua degradação. O perfil de degradação é o mesmo tanto para o IFA quanto para o comprimido (excipientes não influenciam na degradação). O método desenvolvido e otimizado demonstrou ser seletivo para a determinação de nevirapina na presença dos produtos de degradação formados na exposição ao peróxido de hidrogênio.

AGRADECIMENTOS

FAPEMIG, CAPES, FUNED e Farmacopeia Brasileira.

1 BRASIL. Ministério da saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos, 2014.

