

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEASE RITONAVIR
MATÉRIA-PRIMA E CÁPSULAS**

CAROLINA LUPI DIAS

Porto Alegre, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEASE RITONAVIR
MATÉRIA-PRIMA E CÁPSULAS**

*Dissertação apresentada por **Carolina Lupi Dias**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2006

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 05.07.2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

D541d Dias, Carolina Lupi
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas / Carolina Lupi Dias – Porto Alegre : UFRGS, 2006. – xxii, 129 p.: il., tab.,fig.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Ritonavir : cápsulas. 2. Validação : métodos de análise de fármacos. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 4. Espectrofotometria ultravioleta. 5. Polimorfismo. 6. Estabilidade. I. Fröhlich, Pedro Eduardo. II. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich agradeço o incentivo, a confiança, a disponibilidade e a dedicação constantes prestadas na orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria Bergold, pela amizade, estímulo, atenção e colaboração com os esclarecimentos prestados.

Ao Laboratório Farmoquímico Cristália, que, através do Farmacêutico Roberto Debom Moreira, nos cedeu amostras do fármaco, permitindo a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica que disponibilizou os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

Aos professores do Laboratório de Química Farmacêutica: Dra. Grace Gosmann e Dr. Jarbas Alves Montanha pela convivência e esclarecimentos prestados.

Ao Prof. Dr. Vítor Pereira e aos Laboratórios de Análises de Difração de Raios X e do Departamento de Mineralogia e Petrologia do Instituto de Geociências (UFRGS) pela atenção e auxílio na realização das análises de difração de raios X e microscopia.

Ao Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia (UFRGS) pela execução das análises de *DSC*.

Aos amigos e colegas (atuais e antigos) do Laboratório de Química Farmacêutica: Inara, Eliane, Andréa, Rochele, Vanessa, Sirlei, Samuel, Luiz, Marquinho, Marinês, Tiago, Alexandre, Letícia, Gilcéia, Laura, Lúcia, Liliana e Lidiane, pela ótima convivência, apoio e amizade sincera.

À amiga e colega Daniela Ghisleni, pela amizade de todas as horas.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio, fundamentais durante este período e sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. <i>Objetivos gerais.....</i>	7
2.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	7
3. REVISÃO.....	9
3.1. <i>Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....</i>	11
3.2. <i>Inibidores de protease.....</i>	13
3.2.1. Ritonavir.....	15
3.2.1.1. Descrição.....	15
3.2.1.2. Apresentação, dosagem e administração.....	17
3.2.1.3. Mecanismo de ação.....	18
3.2.1.4. Farmacocinética.....	19
3.2.1.5. Interações e contra-indicações.....	20
3.2.1.6. Precauções e reações adversas.....	21
3.3. <i>Determinação do ritonavir.....</i>	22
3.4. <i>Validação do método analítico.....</i>	25

4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. <i>Matéria-prima e produto farmacêutico</i>	29
4.2. <i>Caracterização da matéria-prima e análise qualitativa do produto acabado</i>	30
4.2.1. <u>Caracteres físicos</u>	30
4.2.2. <u>Solubilidade</u>	30
4.2.3. <u>Constantes físico-químicas</u>	30
4.2.3.1. Ponto de fusão.....	30
4.2.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	31
4.2.3.3. Rotação específica.....	32
4.2.4. <u>Identificação</u>	32
4.2.4.1. Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	32
4.2.4.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	32
4.2.4.3. Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D).....	33
4.2.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	33
4.2.4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	33
4.2.5. <u>Ensaio de pureza da matéria-prima</u>	34
4.2.5.1. Ponto de fusão, DSC e Rotação específica.....	34
4.2.5.2. CLAE e CCD.....	34
4.2.5.3. Determinação de umidade.....	34
4.2.5.4. Avaliação da forma cristalina.....	35
4.2.5.4.1. Microscopia.....	35
4.2.5.4.2. Difração de raios X.....	35
4.3. <i>Análise quantitativa da matéria-prima</i>	36
4.3.1. <u>Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)</u>	36
4.3.1.1. Validação do método UV para a matéria-prima.....	36
4.3.1.1.1. Linearidade.....	36

4.3.1.1.1.1. Curva padrão.....	36
4.3.1.1.2. Precisão.....	37
4.3.1.1.3. Exatidão.....	38
4.3.1.1.4. Especificidade.....	38
4.3.2. <u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u>	39
4.3.2.1. Validação do método CLAE para a matéria-prima.....	39
4.3.2.1.1. Especificidade.....	39
4.3.2.1.2. Linearidade.....	41
4.3.2.1.2.1. Curva padrão.....	41
4.3.2.1.3. Precisão.....	41
4.3.2.1.4. Exatidão.....	42
4.4. <i>Análise quantitativa do produto acabado</i>	43
4.4.1. <u>Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)</u>	43
4.4.1.1. Validação do método UV-D para a forma farmacêutica cápsula.....	43
4.4.1.1.1. Especificidade.....	43
4.4.1.1.2. Linearidade.....	44
4.4.1.1.2.1. Curva padrão.....	45
4.4.1.1.3. Precisão.....	45
4.4.1.1.4. Exatidão.....	46
4.4.1.1.4.1. Teste de recuperação.....	46
4.4.2. <u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u>	48
4.4.2.1. Validação do método CLAE para a forma farmacêutica cápsula.....	48
4.4.2.1.1. Especificidade.....	48
4.4.2.1.2. Linearidade.....	50
4.4.2.1.2.1. Curva padrão.....	50
4.4.2.1.3. Precisão.....	51
4.4.2.1.4. Exatidão.....	52

4.4.2.1.4.1. Teste de recuperação.....	52
4.4.2.1.5. Robustez.....	53
4.5. <i>Estudos preliminares de estabilidade para o ritonavir matéria-prima</i>	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. <i>Caracterização da matéria-prima e análise qualitativa do produto acabado</i>	57
5.1.1. <u>Caracteres físicos</u>	57
5.1.2. <u>Solubilidade</u>	57
5.1.3. <u>Constantes físico-químicas</u>	58
5.1.3.1. Ponto de fusão.....	58
5.1.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	58
5.1.3.3. Rotação específica.....	61
5.1.4. <u>Identificação</u>	61
5.1.4.1. Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	61
5.1.4.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	66
5.1.4.3. Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D).....	67
5.1.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	68
5.1.4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	70
5.1.5. <u>Ensaio de pureza</u>	71
5.1.5.1. Ponto de fusão, DSC e Rotação específica.....	71
5.1.5.2. CLAE e CCD.....	71
5.1.5.3. Determinação de umidade.....	72
5.1.5.4. Avaliação da forma cristalina.....	72
5.1.5.4.1. Microscopia.....	73
5.1.5.4.2. Difração de raios X.....	77
5.2. <i>Análise quantitativa da matéria-prima</i>	81

5.2.1. <u>Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)</u>	81
5.2.1.1. Validação do método UV para a matéria-prima.....	81
5.2.1.1.1. Linearidade.....	81
5.2.1.1.1.1. Curva padrão.....	81
5.2.1.1.2. Precisão.....	83
5.2.1.1.3. Exatidão.....	84
5.2.1.1.4. Especificidade.....	84
5.2.2. <u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u>	85
5.2.2.1. Validação do método CLAE para a matéria-prima.....	86
5.2.2.1.1. Especificidade.....	86
5.2.2.1.2. Linearidade.....	88
5.2.2.1.2.1. Curva padrão.....	88
5.2.2.1.3. Precisão.....	90
5.2.2.1.4. Exatidão.....	91
5.3. <i>Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do ritonavir</i>	91
5.4. <i>Análise quantitativa do produto acabado</i>	93
5.4.1. <u>Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)</u>	93
5.4.1.1. Validação do método UV-D para a forma farmacêutica cápsula.....	94
5.4.1.1.1. Especificidade.....	94
5.4.1.1.2. Linearidade.....	97
5.4.1.1.2.1. Curva padrão.....	97
5.4.1.1.3. Precisão.....	99
5.4.1.1.4. Exatidão.....	100
5.4.1.1.4.1. Teste de recuperação.....	100
5.4.2. <u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u>	101
5.4.2.1. Validação do método CLAE para a forma farmacêutica cápsula.....	101

5.4.2.1.1. Especificidade.....	101
5.4.2.1.2. Linearidade.....	104
5.4.2.1.2.1. Curva padrão.....	104
5.4.2.1.3. Precisão.....	106
5.4.2.1.4. Exatidão.....	107
5.4.2.1.4.1. Teste de recuperação.....	107
5.4.2.1.5. Robustez.....	108
5.5. <i>Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do ritonavir em cápsulas</i>	110
5.6. <i>Estudos preliminares de estabilidade para o ritonavir matéria-prima</i>	111
5.6.1. <u>Degradação térmica</u>	113
5.6.2. <u>Fotólise</u>	114
6. CONCLUSÕES	115
7. REFERÊNCIAS	119

ANEXO

FORMAÇÃO ACADÊMICA

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

ARV – anti-retrovirais

BHT – butil-hidroxitolueno

CÁP – cápsulas

CCD – cromatografia em camada delgada

DAD – detector de arranjo de fotodiodos

DPR – desvio padrão relativo

DSC – calorimetria exploratória diferencial

IPs – inibidores de protease

LOP – lopinavir

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MO – microscopia óptica

R – solução amostra acrescida de ritonavir SQR

R_f – fator de retenção

RTV – ritonavir

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SQR – substância química de referência

UV-D – ultravioleta derivada

UV-D² – ultravioleta derivada na segunda ordem

VIH – vírus da imunodeficiência humana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de replicação do VIH, um exemplo de retrovírus, mostra os sítios de ação dos agentes antivirais (RAFFANTI e HAAS, 2001).....	12
Figura 2- Ritonavir ligado à protease..... (www.chem.ucsb.edu/~molvisual/chem162.html)	14
Figura 3- Fórmula estrutural do ritonavir.....	15
Figura 4- Vídeo-micrografia das formas I e II do ritonavir (CHEMBURKAR <i>et al.</i> , 2000).....	17
Figura 5- Interações do ritonavir com o sítio ativo da protease do VIH..... (www.rosalindfranklin.edu/~walters_lect.html)	18
Figura 6- Fotografia da cápsula de Norvir® (www.link.med.ed.ac.uk/RIDU/RTV.htm)	29
Figura 7- DSC do ritonavir matéria-prima, polimorfo I e II.....	60
Figura 8- Espectro de absorção na região do IV para o ritonavir.....	62
Figura 9- Espectro de absorção na região do IV para os polimorfos I e II do ritonavir.....	65
Figura 10- Espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de RTV SQR e amostra (matéria-prima) em metanol (20 µg/ml).....	66
Figura 11- Espectros de absorção na região do UV (ordem zero) referentes às soluções de ritonavir SQR e cápsulas em metanol (20 µg/ml).....	67
Figura 12- Espectros de absorção na região do UV-D ² referentes às soluções de ritonavir SQR e cápsulas em metanol (20 µg/ml).....	68
Figura 13- Cromatogramas das soluções de RTV SQR e amostra (matéria-prima) em metanol (200 µg/ml).....	69
Figura 14- Cromatogramas das soluções de ritonavir SQR e cápsula em metanol (200 µg/ml).....	69
Figura 15- Cromatograma obtido por CCD para identificação do ritonavir. Revelação por UV (254 nm) e por exposição a vapores de iodo.....	70
Figura 16- Microscopia óptica (MO) das formas I e II do ritonavir.....	75
Figura 17- Microscopia óptica (MO) do ritonavir (matéria-prima).....	75
Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos polimorfos I e II do ritonavir.....	76

Figura 19- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cristais da matéria-prima do ritonavir.....	76
Figura 20- Difrátogramas dos polimorfos I e II do ritonavir e da matéria-prima em estudo.....	79
Figura 21- Representação gráfica da curva padrão média do RTV para UV.....	83
Figura 22- Especificidade do método CLAE para o RTV. Cromatogramas dos potenciais produtos de degradação: degradação térmica, teste de oxidação e fotólise.....	87
Figura 23- Especificidade do método CLAE para o RTV. Cromatogramas dos potenciais produtos de degradação: hidrólise ácida e alcalina.....	88
Figura 24- Representação gráfica da curva padrão média do RTV para CLAE (validação para a matéria-prima).....	89
Figura 25- Espectros na região do UV (ordem zero e 2ª derivada) para a solução de excipientes e de ritonavir em metanol (20µg/ml).....	95
Figura 26- Espectros na região do UV (ordem zero e 2ª derivada) para o RTV SQR e cápsulas.....	97
Figura 27- Espectro UV-Ordem Zero e UV-D ² para soluções de ritonavir SQR de 10 a 30 µg/ml em metanol.....	97
Figura 28- Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir SQR para UV-D ²	99
Figura 29- Especificidade do método CLAE para as cápsulas de RTV. Cromatograma da solução de ritonavir SQR (200 µg/ml) e da solução de excipientes (placebo).....	102
Figura 30- Especificidade do método CLAE para as cápsulas de RTV. Cromatogramas dos potenciais produtos de degradação: degradação térmica, teste de oxidação e fotólise.....	103
Figura 31- Especificidade do método CLAE para as cápsulas de RTV. Cromatogramas dos potenciais produtos de degradação: hidrólise ácida e hidrólise alcalina.....	104
Figura 32- Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir SQR para CLAE (validação para as cápsulas).....	106
Figura 33- Avaliação da robustez do método CLAE para determinação do ritonavir. Cromatogramas da solução de RTV cápsulas em metanol (200 µg/ml): alteração na proporção de metanol na fase móvel.....	109

Figura 34- Avaliação da robustez do método CLAE para determinação do ritonavir. Cromatogramas da solução de RTV cápsulas em metanol (200 µg/ml): alteração da coluna analítica.....	109
Figura 35- Espectro na região do IV para o ritonavir (MOFFAT <i>et al.</i> , 2004).....	Anexo
Figura 36- Espectro de absorção na região do UV para o ritonavir (MOFFAT <i>et al.</i> , 2004).....	Anexo
Figura 37- Difrátogramas das formas I e II do ritonavir. (BAUER <i>et al.</i> , 2001).....	Anexo
Figura 38- Ângulos de torção da molécula do RTV com diferenças significativas entre os dois polimorfos (BAUER <i>et al.</i> , 2001).....	Anexo
Figura 39- Redes de ligações de hidrogênio para a forma I do ritonavir (BAUER <i>et al.</i> , 2001).....	Anexo
Figura 40- Redes de ligações de hidrogênio para a forma II do ritonavir (BAUER <i>et al.</i> , 2001).....	Anexo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Determinação de anti-retrovirais em fluidos biológicos por CLAE.....	23
Tabela 2- Soluções para o teste de recuperação por UV-D ²	47
Tabela 3- Soluções para o teste de recuperação por CLAE.....	53
Tabela 4- Ponto de fusão do ritonavir.....	58
Tabela 5- Dados obtidos por DSC para a matéria-prima do RTV, polimorfos I e II.....	60
Tabela 6- Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o ritonavir.....	63
Tabela 7- Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do RTV por UV.....	82
Tabela 8- ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do RTV por UV.....	83
Tabela 9- Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de RTV matéria-prima por espectrofotometria UV para avaliação da precisão intra e interdias.....	84
Tabela 10- Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do RTV por CLAE (validação para a matéria-prima).....	89
Tabela 11- ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do RTV por CLAE (validação para a matéria-prima).....	90
Tabela 12- Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de RTV por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias (validação para a matéria-prima).....	90
Tabela 13- Análise comparativa: Resultados obtidos na determinação do RTV por UV e CLAE.....	91
Tabela 14- Teste t de <i>Student</i> para os valores obtidos na determinação do RTV por UV e CLAE.....	92
Tabela 15- Resultado do teste de especificidade do método UV-D ² para determinação do ritonavir SQR na presença dos excipientes.....	96
Tabela 16- Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do ritonavir SQR por UV-D ²	98
Tabela 17- ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do ritonavir por UV-D ²	99

Tabela 18- Resultados obtidos em quatro diferentes dias na quantificação das amostras de ritonavir cápsulas por espectrofotometria UV-D ² para avaliação da precisão intra e interdias.....	100
Tabela 19- Resultados obtidos para o teste de recuperação do ritonavir SQR por espectrofotometria UV-D ²	101
Tabela 20- Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do ritonavir SQR por CLAE (validação para as cápsulas).....	105
Tabela 21- ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do ritonavir por CLAE (validação para as cápsulas).....	106
Tabela 22- Resultados obtidos em quatro diferentes dias na quantificação das amostras de ritonavir cápsulas por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias (validação para as cápsulas).....	107
Tabela 23- Resultados obtidos para o teste de recuperação do ritonavir SQR por CLAE.....	107
Tabela 24- Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do ritonavir em metanol (200 µg/ml).....	110
Tabela 25- Análise comparativa: Resultados obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas por UV-D ² e CLAE.....	110
Tabela 26- Teste t de <i>Student</i> para os valores obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas por UV-D ² e CLAE.....	111
Tabela 27- Valores experimentais obtidos na determinação do teor de ritonavir matéria-prima por CLAE para avaliação da estabilidade térmica.....	113
Tabela 28- Valores experimentais obtidos na determinação do teor de ritonavir matéria-prima por CLAE para avaliação da fotoestabilidade.....	114
Tabela 29- Dados de difração de raios X de monocristal (BAUER et al, 2001).....	Anexo
Tabela 30- Dados de difração de raios X para a matéria-prima do ritonavir.....	Anexo
Tabela 31- Dados de difração de raios X para o polimorfo I do ritonavir.....	Anexo
Tabela 32- Dados de difração de raios X para o polimorfo II do ritonavir.....	Anexo

RESUMO

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas

O ritonavir (RTV) é um anti-retroviral, inibidor da protease do VIH, produzido nas formas farmacêuticas cápsula e solução oral sob o nome comercial Norvir® (Abbott). Levando-se em consideração que o RTV está sendo sintetizado no Brasil e que não existem métodos oficiais para o seu doseamento na forma farmacêutica cápsula, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos para assegurar a qualidade do produto acabado. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a validação de métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo do RTV matéria-prima e cápsulas, assim como a realização de estudo preliminar para avaliar a estabilidade da matéria-prima. A identificação e caracterização do fármaco e seus polimorfos (forma I e II) foi realizada através da análise do ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial (DSC), rotação específica, métodos espectrofotométricos na região do infravermelho (IV) e do ultravioleta (UV), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV), além da difração de raios-X. Para a determinação quantitativa foram validados, segundo normas da International Conference on Harmonization (ICH), os métodos de espectrofotometria na região do UV, ordem-zero e segunda derivada (UV-D²), e CLAE. A análise estatística demonstrou equivalência entre os métodos CLAE / UV para a determinação do teor da matéria-prima e entre os métodos CLAE / UV-D² para a determinação do RTV nas cápsulas. No estudo preliminar de estabilidade térmica e fotoestabilidade, a matéria-prima foi submetida à temperatura de 60 °C por 30 dias e permaneceu sob luz branca por até 15 dias respectivamente. A CLAE foi o método empregado na análise do teor e pureza das amostras submetidas às degradações, sendo que os resultados demonstraram a estabilidade da matéria-prima nas condições testadas, não havendo redução significativa do teor do fármaco nem aparecimento de potenciais produtos de degradação.

Palavras-chave: ritonavir cápsulas, CLAE, UV-D², polimorfismo, estabilidade.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methods for determination of protease inhibitor ritonavir bulk substance and capsules

Ritonavir (RTV) is a HIV-protease inhibitor, available as capsule and oral solution (Norvir®). Considering that the drug has been produced in Brazil and there are no official methods to quantify RTV capsules, it became necessary the development and validation of methods for ensuring the quality of pharmaceutical formulations. The objective of this work was the validation of these analytical methods for the qualitative and quantitative analysis of RTV bulk substance and capsules. A preliminary study of stability was also performed. RTV identification and polymorphs I and II characterization were performed by using several techniques such as: melting point, differential scanning calorimetry (DSC), optical rotation, infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectrophotometry, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC), optical and scanning electron microscopy, and powder X-ray diffraction. The HPLC, zero-order UV spectrophotometric and second-derivative UV spectrophotometric (UV-D²) methods were validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines for the quantitative determination of RTV bulk substance and capsules. The statistics analysis showed that HPLC / UV methods were equivalent to assay bulk substance and HPLC / UV-D² methods were equivalent to assay capsules. The preliminary studies of thermal and photostability were conducted by exposing RTV samples at 60 °C during 30 days and under fluorescent lamp during 15 days. The developed HPLC method was used to assay the drug and detect its potential degradation products. The results showed that the RTV bulk substance was stable and there was no evidence of its degradation, under the established conditions.

Key words: ritonavir capsules, HPLC, second-derivative UV spectrophotometry, polymorphism, stability.

1. INTRODUÇÃO

Com o reconhecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) a partir de 1981, e a identificação do agente causal em 1983, a pesquisa de terapia antiviral teve renovados interesses e esforços no desenvolvimento de anti-retrovirais (ARV). Em 1984, ocorriam relatos de substâncias com suposto efeito contra o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (MACHADO, 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que sejam 40,1 milhões de infectados pelo VIH no mundo todo, incluindo-se 2,3 milhões de crianças (WHO, 2005).

Apesar do conflito diplomático em torno da quebra de patentes, a área de pesquisa em fármacos no Brasil tem recebido estímulos para o seu crescimento, devido à política federal de incentivo à produção de genéricos para o tratamento da SIDA. No final de abril de 2001 foi anunciado o início da produção da substância ativa de quatro medicamentos ARV. O Laboratório Farmoquímico Cristália foi o primeiro a fazer a síntese da matéria-prima para a produção destes medicamentos no Brasil, sendo que, até então, a maior parte da matéria-prima utilizada pelos laboratórios brasileiros para produzir medicamentos anti-VIH era importada. A FarManguinhos, fabricante de fármacos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), instituição de ensino e pesquisa ligada ao Ministério da Saúde, que produz alguns dos medicamentos ARV que compõem o coquetel para o tratamento da SIDA esteve em negociação com o Laboratório Cristália para a aquisição da matéria-prima, visando ao aumento da participação do laboratório público nas vendas de medicamentos para o Ministério da Saúde, o que traria, além dos benefícios sociais de garantia do acesso aos medicamentos para os pacientes com SIDA, os benefícios econômicos da quebra de patentes para os países periféricos (COMCIÊNCIA, 2001).

Em 2004, o governo brasileiro gastou US\$ 260 milhões em medicamentos ARV, sendo que, desse valor, aproximadamente 80% foi gasto para adquirir os medicamentos importados. Atualmente, o Brasil produz oito ARV e discute a quebra de patente de novos medicamentos. A produção nacional de

medicamentos ARV é fator essencial para a viabilidade da distribuição universal e gratuita dos mesmos. Hoje, aproximadamente 162 mil pacientes estão em tratamento com os 17 ARV distribuídos pelo Sistema Único de Saúde. Os ARV produzidos no Brasil são a didanosina (ddI), a lamivudina (3TC), a zidovudina (AZT), a estavudina (d4T), o indinavir, o ritonavir (RTV), a nevirapina e a associação AZT-3TC em um mesmo comprimido (BRASIL, 2005a).

Diferentes estudos para a determinação do inibidor de protease ritonavir foram publicados, no entanto, tratam-se de trabalhos para monitoramento clínico em fluidos biológicos, quantificando fármacos antivirais em diferentes associações.

Levando-se em consideração que o ritonavir é sintetizado no país, além de produzido na forma farmacêutica cápsula e solução oral, e considerando-se que não existem métodos oficiais (farmacopéicos) para o seu doseamento na forma farmacêutica cápsula, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos para assegurar a qualidade do produto acabado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar, segundo normas da *International Conference on Harmonisation* (ICH), métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo do ritonavir matéria-prima e na forma farmacêutica cápsula, além de estudo preliminar para avaliar a estabilidade da matéria-prima.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a substância química de referência através da determinação do ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial (*DSC*), rotação específica, análise espectrofotométrica na região do infravermelho (IV), determinação da umidade através da perda por dessecação, registro da forma cristalina por microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio-X.
- ✓ Desenvolver métodos para identificação do ritonavir matéria-prima por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- ✓ Desenvolver métodos para identificação do ritonavir cápsulas por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- ✓ Desenvolver e validar método quantitativo por CLAE e por UV para determinação do ritonavir matéria-prima.
- ✓ Desenvolver e validar método quantitativo por CLAE e por UV-D para determinação do ritonavir cápsulas.
- ✓ Comparar estatisticamente os métodos quantitativos propostos.
- ✓ Realizar estudos preliminares de estabilidade térmica e fotoestabilidade para a matéria-prima.

3. REVISÃO

3.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

O vírus da imunodeficiência humana (VIH tipo 1 e 2) é o agente etiológico que provoca a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), que em fase aguda replica-se na ausência de qualquer resposta imunológica, atingindo altas concentrações no sangue. Foi originalmente isolado em Paris, em maio de 1983, por Luc Montagnier (ALTFELD e WALKER, 2004). Desde a entrada do VIH no organismo, ocorre replicação contínua e de alto grau, principalmente em órgãos linfáticos (MACHADO, 1998). O VIH possui uma capacidade única de livrar-se da resposta humoral (anticorpos) para a infecção, atacando e matando as células T CD4⁺, e, então, destruindo efetivamente o sistema imune do corpo (MARTIN, 1998).

A transmissão do vírus ocorre por contato sexual, transfusão sanguínea ou de produtos derivados do sangue, trocas de seringas ou agulhas com pessoas infectadas, transmissão intra-uterina e através do leite materno de mãe infectada (SETHI, 2002). O diagnóstico da infecção aguda pelo VIH-1 baseia-se na detecção plasmática da replicação viral e na ausência de anticorpos anti-VIH-1, dado que estes não estão presentes na fase precoce da infecção; devendo assim, ser subseqüentemente confirmado com um teste de anticorpos positivo (soro-conversão) dentro das semanas seguintes (ALTFELD e WALKER, 2004).

Para adultos, em países desenvolvidos, o tempo médio para desenvolvimento de SIDA após a infecção inicial é de cerca de 10 a 11 anos, na ausência de tratamento anti-retroviral. Alguns indivíduos, no entanto, adoecem mais precocemente, enquanto outros podem permanecer muitos anos sem sintomas; essa variação pode ser explicada pelas complexas interações entre características da cepa viral e características genéticas, imunológicas, etárias e ambientais de cada paciente (MACHADO, 1998).

Em geral, posteriormente, doenças oportunistas causadas por parasitas, bactérias, fungos, micobactérias e viroses, associam-se à infecção por VIH.

Neoplasias como sarcoma de Kaposi e linfoma de Burkitt podem ocorrer comumente (SETHI, 2002). Os sintomas clínicos da infecção aguda pelo VIH-1 foram descritos pela primeira vez em 1985 como sendo uma doença que se assemelhava à mononucleose infecciosa. Os sintomas mais freqüentes são a febre, “rash” máculo-papular, úlceras orais, linfadenopatia, artralgia, faringite, mal estar geral, perda de peso, meningite asséptica e mialgia (ALTFELD e WALKER, 2004).

O VIH é um vírus de ARN do grupo dos retrovírus, nos quais ocorre uma atividade de enzima transcriptase reversa que fabrica uma cópia de ADN a partir do molde de ARN viral. A cópia de ADN é, em seguida, reintegrada ao genoma do hospedeiro, passando a denominar-se provírus, e transcrita tanto no ARN genômico quanto no ARN_m para ser traduzida em proteínas virais; gerando assim novas partículas virais (RAFFANTI e HAAS, 2001).

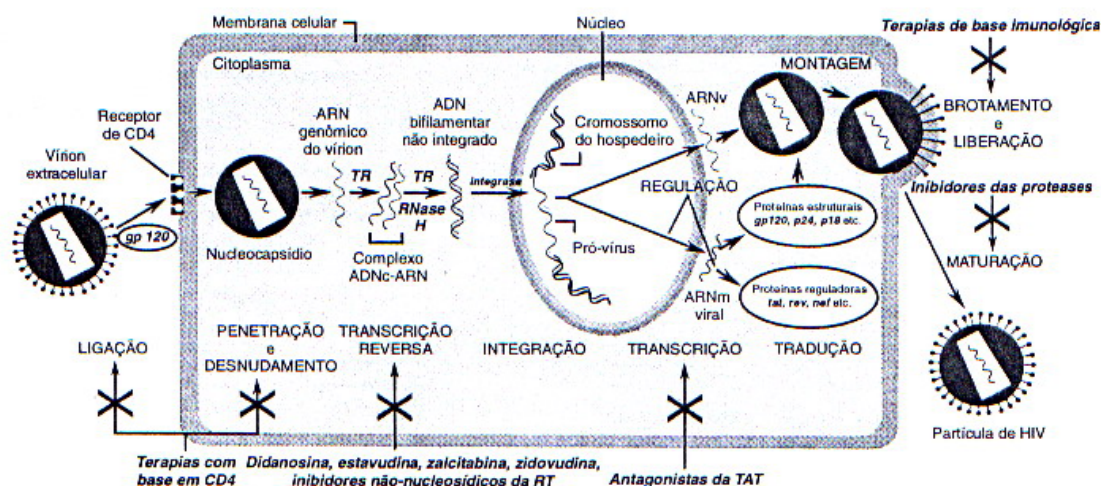


Figura 1 - Ciclo de replicação do VIH, um exemplo de retrovírus, mostra os sítios de ação dos agentes antivirais (RAFFANTI e HAAS, 2001).

Os agentes antivirais têm alguns mecanismos de ação comuns e certas particularidades diferenciais. O ciclo de replicação do VIH tem sido

exaustivamente estudado a fim de determinar os alvos possíveis da ação de antivirais. Inicialmente é possível impedir adsorção do vírus a receptores celulares específicos, sua penetração e desnudamento no citoplasma das células do hospedeiro. No entanto, ainda não foi possível desenvolver fármacos que atuem nessas etapas e sejam clinicamente úteis (MACHADO, 1998). Basicamente, dois tipos de fármacos anti-VIH são usados na terapêutica: inibidores específicos para a *transcriptase reversa* (TR) e *inibidores da protease* do VIH (IPs). A combinação dos inibidores da TR e dos IPs do VIH favorece a redução da carga viral a níveis negligenciáveis. O tratamento (*cocktail*) consiste de três fármacos anti-VIH, incluindo um ou dois IPs, otimizando o efeito anti-retroviral (SETHI, 2002).

Desenvolvimento de resistência contra todos os anti-retrovirais ocorre quando usados em monoterapia. Hoje, existe consenso de que, na maioria das situações, o tratamento anti-retroviral deve basear-se em associações de fármacos. Como a transmissão de cepas resistentes de VIH pode ocorrer, a profilaxia pós-exposição em acidentes punctórios deve incluir um ou mais fármacos não utilizados pelo paciente-fonte (MACHADO, 1998).

Estudos recentes comparam as terapias anti-retrovirais, investigando vantagens e desvantagens das diferentes associações de fármacos, assim como de suas doses e posologias quanto ao desenvolvimento de resistência, toxicidade, efeitos adversos e aderência ao tratamento (MURPHY, 2003; COOPER *et al.*, 2003).

3.2 Inibidores de protease

A seqüência da protease do VIH-1 foi publicada primeiramente em 1985, sua atividade enzimática foi relatada no ano seguinte e sua estrutura cristalina determinada em 1989. Em 1990, diversos grupos de inibidores peptídicos da protease do VIH foram relatados. Saquinavir, o primeiro inibidor de protease VIH-1, entrou em testes clínicos em 1992 e recebeu aprovação do *United*

States Food and Drug Administration (FDA) três anos mais tarde. A elucidação tridimensional da estrutura da protease do VIH facilitou o desenho da estrutura básica de fármacos racionais (RAFFANTI e HAAS, 2001).

Os IPs do VIH pertencem a diferentes grupamentos químicos e exercem atividade anti-retroviral, demonstrada pela redução da antigenemia p24, pela diminuição da carga viral e pela elevação da contagem de células CD4 sangüíneas. Os fármacos não têm ação nos vírus latentes, em estágio de pró-vírus incorporados ao genoma da célula. Caracterizam-se por sua alta potência anti-retroviral, agindo em baixas concentrações, e por sua especificidade contra a protease dos VIH-1, com isto tendo pequena toxicidade para as células humanas e praticamente não agindo em proteases humanas, como a tripsina ou a renina (TAVARES, 1996; KOROLKOVAS, 2004).

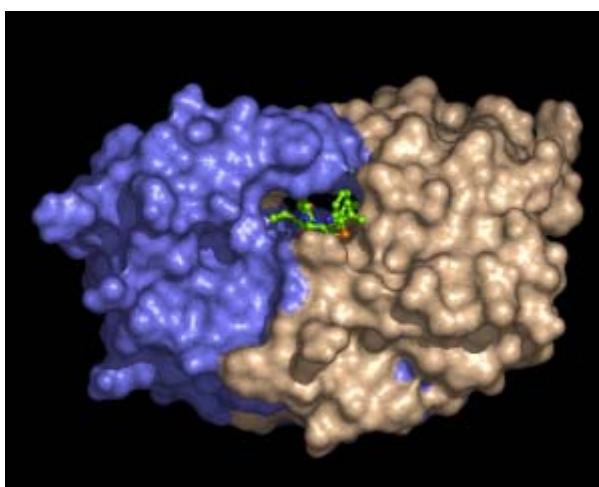


Figura 2 - Ritonavir ligado à protease.

(www.chem.ucsb.edu/~molvisual/chem162.html, acessado em jan/2006)

A maioria dos IPs de primeira geração são estruturas de alta massa molecular como peptídeos, com baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, com baixa biodisponibilidade e tempo de meia-vida comumente curto, devido às hidrólises peptídicas ou ao metabolismo hepático.

Estratégias com o objetivo de acentuar a solubilidade em água e aumentar a estabilidade metabólica conduziram à identificação de diversos candidatos clínicos promissores. Exemplos de IPs aprovados para o tratamento de pacientes infectados pelo VIH incluem o saquinavir (Invirase[®]), o indinavir (Crixivan[®]) e o ritonavir (Norvir[®]), entre outros (MARTIN, 1998).

3.2.1 Ritonavir

O ritonavir, também conhecido pelas siglas A-84538 e ABT-538, é um inibidor competitivo peptidomimético de protease, derivado do hidroximetileno, desenvolvido pelo laboratório Abbott com o nome comercial NORVIR[®] (TAVARES, 1996; BUDAVARI, 1996; KOROLKOVAS, 2004). Sua aprovação pelo FDA ocorreu em março de 1996 como monoterapia ou em combinação com análogos nucleosídicos (SETHI, 2002; FDA, 2004).

3.2.1.1 Descrição

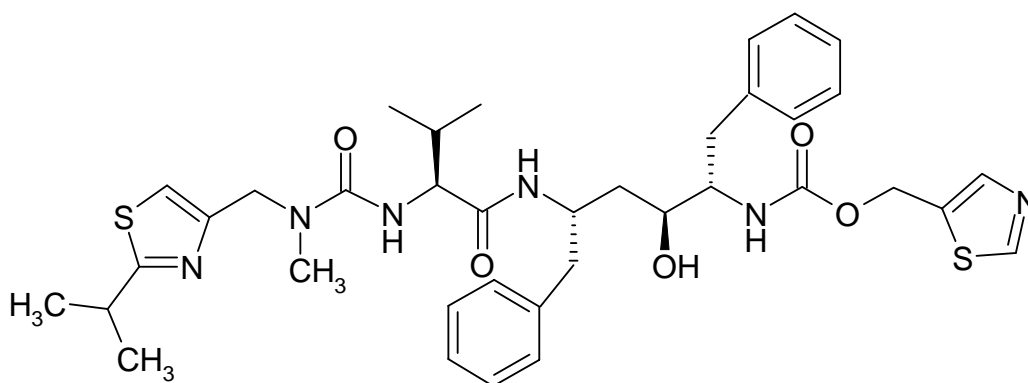


Figura 3 - Fórmula estrutural do ritonavir

Fórmula molecular: C₃₇H₄₈N₆O₅S₂

Massa molecular: 720,95.

Chemical Abstracts Service (CAS): 155213-67-5

(BUDAVARI, 1996; The International Pharmacopoeia, 2005).

Nome Químico:

Éster 5-tiazolil-metil do ácido [5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]-10-hidroxi-2-metil-5-(1-metil-etil)-1-[2-(1-metil-etil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11-bis(fenil-metil)-2,4,7,12-tetra-azatridecan-13-óico (BUDAVARI, 1996; ABBOTT, 2001).

Éster 5-tiazolil-metil do ácido (5S,8S,10S,11S)-10-hidroxi-2-metil-5-(1-metil-etil)-1-[2-(1-metil-etil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11-bis(fenil-metil)-2,4,7,12-tetra-azatridecan-13-óico (MORISSETTE *et al.*, 2003).

Apresenta-se como pó branco ou quase branco, de sabor amargo-metálico. É livremente solúvel em metanol e etanol, solúvel em isopropanol, ligeiramente solúvel em acetona, muito pouco solúvel em acetonitrila e praticamente insolúvel em água (ABBOTT, 2001; WHO, 2005).

O polimorfismo do ritonavir foi identificado dois anos após estar liberado para o mercado, quando alguns lotes de Norvir[®] cápsulas falharam nas especificações de dissolução comprometendo a biodisponibilidade oral do fármaco. O estudo do caso revelou a existência de uma segunda forma cristalina (Figura 4) com propriedades físicas diferentes, tais como a solubilidade (CHEMBURKAR *et al.*, 2000). Pesquisa posterior encontrou cinco formas polimórficas, incluindo as duas anteriormente conhecidas (MORISSETTE *et al.*, 2003).

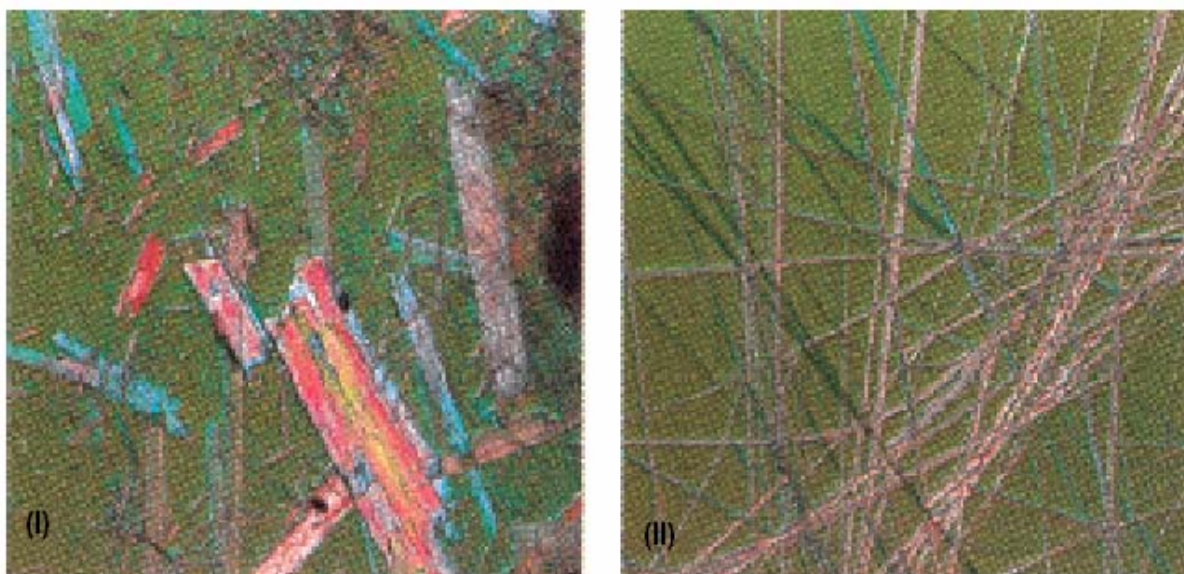


Figura 4 - Vídeo-micrografia dos cristais das formas I e II do ritonavir (CHEMBURKAR *et al.*, 2000).

Estudos preliminares farmacocinéticos e de relação estrutura-atividade foram realizados para testar uma nova série de inibidores estruturalmente relacionados ao ritonavir apresentando diferentes substituintes. Os análogos mostraram maior potência antiviral intrínseca, mas não apresentaram biodisponibilidade oral e concentração plasmática satisfatórias, fornecendo, entretanto, potencial para futura exploração de pró-fármacos estratégicos (CHEN *et al.*, 2003).

3.2.1.2 Apresentação, dosagem e administração

Norvir[®] (Abbott) encontra-se disponível nas seguintes formas farmacêuticas:

- Cápsulas (100 mg)
- Solução Oral (80 mg/ml)

A administração é feita por via oral, 600 mg 2 vezes ao dia (6 cápsulas ou 7,5 ml a cada 12 horas) (KOROLKOVAS, 2004).

3.2.1.3 Mecanismo de ação

A protease (ou proteinase) dos vírus da imunodeficiência humana (VIH-1 e VIH-2) é essencial para a replicação viral. Essa enzima provoca a clivagem de precursores polipeptídicos, participando de modo fundamental na formação de proteínas do capsídeo viral e outras proteínas estruturais (codificadas nos genes GAG) e de proteínas enzimáticas (codificadas nos genes POL). Quando a protease é inibida, a célula infectada continua a produzir partículas dos VIH, porém estas partículas são morfologicamente imaturas e têm marcada redução na atividade da transcriptase reversa e de outras enzimas, inclusive a própria protease, não podendo infectar outras células. A protease dos VIH é uma aspartil-protease, cujas subunidades peptídicas já foram identificadas (TAVARES, 1996).

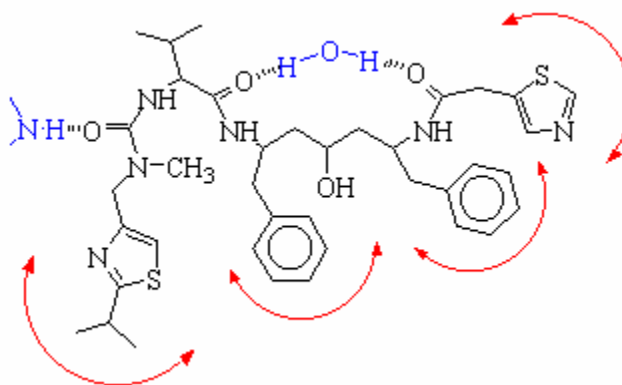


Figura 5 - Interações do ritonavir com o sítio ativo da protease do VIH. Em azul: interações de hidrogênio. Em vermelho: interações com sítios específicos da protease (www.rosalindfranklin.edu/.../walters_lect.html, acessado em jan/2006).

O ritonavir liga-se reversivelmente ao local ativo da protease do VIH (Figura 5), impedindo o processamento do polipeptídeo e a maturação subsequente do vírus. As partículas virais produzidas na presença do ritonavir são imaturas e não infecciosas. A replicação viral em pacientes tratados com ritonavir leva à seleção e acúmulo progressivo de mutação de resistência ao fármaco. Isolados de VIH-1 com resistência ao ritonavir têm sido selecionados *in vitro*. Análises genótípicas destes isolados mostraram mutações no códon 84, 82, 71 e 46. Outras mutações associadas à resistência crescente ocorrem nos códons 20, 32, 54, 63 e 90 (RAFFANTI e HAAS, 2001; ABBOTT, 2001).

3.2.1.4 Farmacocinética

A absorção do ritonavir é apenas ligeiramente afetada pela dieta e depende da formulação. É absorvido por via oral, apresentando biodisponibilidade próxima de 100% ao ser ingerido junto com alimentos (TAVARES, 1996; RAFFANTI e HAAS, 2001). Após dose de 600 mg da solução oral, o pico máximo de concentração de ritonavir foi alcançado entre, aproximadamente, 2 e 4 horas depois de administrado sob jejum ou com alimentos (514 Kcal), respectivamente. Quando a solução oral foi administrada juntamente com alimentos, o pico de concentração do ritonavir reduziu 23% e a extensão da absorção reduziu 7%, comparada às condições em jejum. Em dois estudos separados, as cápsulas e a solução oral apresentaram curvas de concentração plasmática X tempo (ASC) de $121,7 \pm 53,8$ e $129,0 \pm 39,3$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, respectivamente, quando uma dose de 600 mg foi administrada juntamente com alimentos. A absorção global do ritonavir em cápsulas foi 13% maior quando administrado com uma refeição (615 Kcal), quando comparada às condições em jejum (ABBOTT, 2001).

O ritonavir é metabolizado primeiramente no fígado por isoformas do citocromo P450, em especial a CYP3A4, e em menor grau a CYP2D6. O ritonavir e cinco de seus metabólitos são eliminados do corpo através da urina

(11%, principalmente metabólitos) e fezes (86% na forma inalterada e metabólitos). O metabólito de oxidação isopropiltiazol (M-2) é o principal e apresenta atividade antiviral similar ao fármaco de origem, entretanto as concentrações plasmáticas deste metabólito são baixas (RAFFANTI e HAAS, 2001; ABBOTT, 2001; SETHI, 2002).

A meia-vida plasmática do ritonavir é de 3-5 horas e a $C_{máx}$ de 11,2 mg/ml. A ligação às proteínas plasmáticas é de 98-99%, principalmente à albumina sérica e à glicoproteína- α 1 ácida humana. O volume de distribuição é de 0,41 L/kg após dose única de 600 mg e a depuração em estado de equilíbrio é de 9 L/h (KOROLKOVAS, 2004).

A co-administração do ritonavir aumenta a área sob a curva plasmática (ASC), a meia-vida e as concentrações mínimas de saquinavir, indinavir, amprenavir e lopinavir. Esse efeito pode permitir o uso de doses mais baixas de um segundo inibidor de protease. O uso do ritonavir como “potencializador farmacocinético” para aumentar as concentrações plasmáticas de outros inibidores de protease do VIH, tornou-se prática comum, e existem muitos estudos clínicos dessas associações em andamento. Para fármacos com biodisponibilidade oral limitada, como o saquinavir e o lopinavir, o ritonavir aumenta acentuadamente os níveis plasmáticos destes fármacos e intensifica o efeito anti-retroviral. O lopinavir encontra-se somente disponível em co-formulação com o ritonavir. O ritonavir também anula o efeito deletério do alimento sobre a biodisponibilidade do indinavir (RAFFANTI e HAAS, 2001).

3.2.1.5 Interações e contra-indicações

O ritonavir tem potente efeito inibitório sobre a CYP3A4, aumentando os níveis plasmáticos de muitos fármacos, incluindo amiodarona, propafenona, derivados do esporão do centeio, pimozida, cisaprida, triazolam e midazolam, além da claritromicina, desipramina, etinilestradiol, sulfametoxazol e

trimetoprima. O ritonavir pode aumentar acentuadamente as concentrações de rifabutina e causar toxicidade. A administração concomitante de agentes que induzem a atividade da CYP3A4, como a rifampicina, pode reduzir os níveis de ritonavir e também deve ser evitada. A erva-de-São João também pode reduzir os níveis de ritonavir. As formulações em cápsulas e a solução oral contêm álcool e podem produzir reações desagradáveis se forem administradas com dissulfiram ou metronidazol (RAFFANTI e HAAS, 2001; ABBOTT, 2001; SETHI, 2002).

Norvir[®] é contra-indicado a pacientes que possuam hipersensibilidade conhecida ao ritonavir ou a algum de seus excipientes (ABBOTT, 2001; KOROLKOVAS, 2004).

3.2.1.6 Precauções e reações adversas

O fármaco é pouco tolerado no início do tratamento e provoca elevação de triglicerídeos séricos em mais de 20% dos pacientes (TAVARES, 1996). Para reduzir a intolerância observada nas primeiras semanas de terapia, quando o ritonavir é prescrito nas doses máximas aprovadas para adultos e adolescentes, deve-se iniciar o uso do fármaco em dose de 300 mg a cada 12 horas, devendo a dose ser gradualmente aumentada para 600 mg a cada 12 horas no 14º dia de terapia. O ritonavir é melhor tolerado quando ingerido com a refeição (RAFFANTI e HAAS, 2001).

As reações adversas mais comuns, tais como náuseas, diarreia, vômitos, anorexia, dores abdominais e distúrbios neurológicos foram relatadas com o uso do ritonavir em monoterapia ou associado com outros análogos de nucleosídeos (SETHI, 2002).

A segurança em crianças menores de 12 anos e seu uso na gravidez ainda não foram avaliadas, assim como se desconhece se o ritonavir é excretado pelo leite (ABBOTT, 2001; KOROLKOVAS, 2004).

A resistência cruzada entre o ritonavir e inibidores da transcriptase reversa é improvável, devido ao modo de ação e enzimas envolvidas; e a resistência cruzada para outros inibidores de protease ainda não foi totalmente avaliada (SETHI, 2002; KOROLKOVAS, 2004).

3.3 Determinação do ritonavir

A literatura científica apresenta diversos trabalhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação simultânea de anti-retrovirais e seus metabólitos em fluidos biológicos com o objetivo de monitoramento clínico (Tabela 1). Entretanto, métodos para a determinação do ritonavir na forma farmacêutica cápsula não foram encontrados.

Tabela 1 - Determinação de anti-retrovirais em fluidos biológicos por CLAE

COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO	REFERÊNCIA
ODS-AQ (5 cmX4 mm, 3 µm) ou ODS-2	acetonitrila:metanol:perclorato de tetrametilamônio 0,01M em solução aquosa de ácido trifluoroacético (0,1%) (40:5:55)	UV 205 nm	MARSH <i>et al.</i> , 1997
Zorbax SB-C18 (75X4,6 mm, 3,5 µm) / Chromguard C18 (10X3 mm)	acetonitrila:água com 25 mM de acetato de sódio e 25 mM de ácido hexanossulfônico (44:56) pH 4,0	UV 239 nm	HOETELMANS <i>et al.</i> , 1998
Kromasil C-8 (150X4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico (55:45) pH 8,0	UV 240 nm	FRAPPIER <i>et al.</i> , 1998
C-18 Nucleosil 100 (5 µm)	acetonitrila:tampão fosfato com 0,02%heptanossulfonato de sódio (gradiente) pH5,15	UV 201 nm	MARZOLINI <i>et al.</i> , 2000
C-18 (250X4,6 mm, 5 µm)	Gradiente F.M. A e B : F.M. A - acetonitrila:solução aquosa de tetrametilamônio 0,025 mM com 0,2% ácido trifluoroacético (55:45) F.M. B – metanol: solução aquosa de tetrametilamônio 0,025 mM com 0,2% ácido trifluoroacético (55:45)	UV 239 nm (ritonavir)	DAILLY <i>et al.</i> , 2001
Waters C-18 (150X3,9 mm, 5 µm)	acetonitrila:tampão fosfato de potássio 15 mM (pH 5,75) (gradiente)	UV 210, 240, 220 nm	SARASA-NACENTA <i>et al.</i> , 2001
Sensyu Pack ODS C-18 (150X4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:tampão fosfato de potássio (pH 5,6) (43:57)	UV 215 nm	YAMADA <i>et al.</i> , 2001
Symmetry C-18 (250X4,6 mm) / Sentry guard Symmetry C-18 (20X3,9 mm)	acetonitrila:tampão fosfato (gradiente)	UV 211 4 240 nm (detector com arranjo de diodo)	LEIBENGUTH <i>et al.</i> , 2001
Luna C-18 (150X4,6 mm) à 60 °C	acetonitrila:água (gradiente)	UV 250 nm	SIMON <i>et al.</i> , 2001
Supelcosil LC-18-DB (7,5 cmX4,6 mm, 3 µm)	acetonitrila:água (gradiente)	MS	VILLANI <i>et al.</i> , 2001
Sulpeco LC-18-DB (3,3 mmX3,0 mm, 3 µm)	Metanol:solução aquosa de acetato de amônio 15 mM (gradiente)	MS	VOLOSOV <i>et al.</i> , 2001
Hypersil C-18 (100X4,6 mm, 3 µm)	acetonitrila:tetraidrofurano:tampão diidrogenofosfato (pH 4,0) (32:10:58)	UV 210 nm	JANOLY <i>et al.</i> , 2002
Phenomenex fenil-hexil à 40 °C	acetonitrila:tampão fosfato de potássio 10 mM (50:50)	UV 205 nm	RAY <i>et al.</i> , 2002

Tabela 1 - Determinação de anti-retrovirais em fluidos biológicos por CLAE (continuação)

ChromCart (125X4,0 mm) Nucleosil 100-5 µm C-18 AB com pré-coluna (8X4 mm)	acetonitrila:tampão fosfato de potássio (pH 5,07) com 0,02% de heptanossulfonato de sódio (gradiente)	UV 201 e 282 nm	MARZOLINI <i>et al.</i> , 2002
Stability C-18	acetonitrila:tampão fosfato 50 mM (pH 5,65) (gradiente)	UV 240, 215 e 260 nm	TITIER <i>et al.</i> , 2002
Waters X-Terra C-18 (150X4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:água com 3 mM de pirrolidina (42:58)	UV 240nm (ritonavir) (detector com arranjo de diodo)	TRIBUT <i>et al.</i> , 2002
Novapak C-18 (15 cmX2,1 mm, 4 µm)	Gradiente: F.M. A : acetonitrila(28%)/metanol (29,5%)/tampão pH 5 (42,5%) F.M. B : acetonitrila(75%)/água (25%)	UV 265 e 210 nm	POIRIER <i>et al.</i> , 2002
Zorbax XDB C-8 (2,1 mmX50 mm, 5 µm) / pré-coluna Zorbax XDB C-8 (2,1 mmX12,5 mm, 5 µm)	Gradiente: tampão pH 4,1 : acetonitrila	MS/MS	CHI <i>et al.</i> , 2002
Supelguard™ Discovery® C-8 (25 cmX4,6 mm, 5 µm) à 27 °C/ Discovery C-8 (2 cmX4 mm, 5 µm)	Gradiente: acetonitrila:metanol:tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 3,1)	UV 210 nm	TURNER <i>et al.</i> , 2003
Nova-Pack (Waters) C-18 (150X3,9 mm)	acetonitrila (140 ml) : trietilamina (75 µl) : tampão diidrogenofosfato de sódio 5 mM (160 ml - pH 6,0)	UV 210 e 239 nm	JUSTESEN <i>et al.</i> , 2003
OmniSpher 5 C-18 (150X4,6 mm, 5 µm)	Gradiente acetonitrila:tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 5,75)	UV 215 nm	DROSTE <i>et al.</i> , 2003
Phenomenex C-18 (250X4,6 mm, 5 µm)	Gradiente: acetonitrila:trietilamina (0,15%) : (pH 5,0)	UV 210nm (detector com arranjo de diodo)	WALSON <i>et al.</i> , 2003
Waters Symmetry C-18 (30X2,1 mm, 3,5 µm)	Gradiente acetonitrila:tampão acetato 5 mM (pH 3,25)	MS	FRERICHS <i>et al.</i> , 2003
Nucleosil C-18 HD (125X2 mm, 5 µm) / pré-coluna (8X2 mm)	Gradiente: F.M. A: acetonitrila com metanol (30%) :tampão carbonato de amônio (pH 9,3) (5:95) F.M. B: acetonitrila com metanol (30%) :tampão carbonato de amônio (pH 9,3) (95:5)	MS	RENTSCH, 2003
Radial-Pak Nova-Pak C18 (100X8 mm, 4 µm) / pré-coluna Guard-Pak Inserts Nova-Pak C18	39% Tampão fosfato 50 mM (pH 5.9), 22% metanol e 39% acetonitrila.	UV 205 nm	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2005

espectrofotometria no ultravioleta (UV); espectrometria de massas (MS)

3.4 Validação de método analítico

Para a garantia de que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente são necessárias verificações. Essas verificações são coletivamente conhecidas como validação. A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, se suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico (CITAC/EURACHEM, 2002).

O padrão de validação aplicado aos procedimentos analíticos na indústria farmacêutica é bastante elevado, pois se baseia em dois fatores: o produto será ingerido por uma pessoa geralmente enfraquecida pela doença e, portanto, mais susceptível às impurezas; e segundo, o valor terapêutico do princípio ativo está associado a uma estreita variação nas suas concentrações (CLURCZAK, 1998).

O planejamento dos estudos de validação é um aspecto fundamental para garantir que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos e que o método forneça informações confiáveis, visto que a validação da metodologia analítica é considerada um dos requisitos essenciais no registro de medicamentos (BRITAIN, 1998). Os laboratórios de análise devem realizar a validação de métodos para atender ao governo ou a outros órgãos regulamentadores sendo que os dados obtidos devem fazer parte do conjunto de informações que será apresentado a agências como o FDA (SWARTZ e KRULL, 1998). No Brasil o processo de validação é regido pela Resolução Específica n° 899 (Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos), publicada em dois de junho de 2003 (BRASIL, 2003).

Tanto os órgãos regulamentadores federais como a *United States Pharmacopeia* (USP 29, 2006) incorporam as diretrizes da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of*

Pharmaceuticals for Human Use (ICH), que tratam especificamente da validação de métodos: a ICH Q2A, “Text on Validation of Analytical Procedures” e a ICH Q2B “Validation of Analytical Procedures: Methodology” (SWARTZ e KRULL, 1998).

A guia Q2A estabelece as características de validação para os diferentes tipos de procedimentos analíticos: testes de identificação; ensaios-limite e para quantificação de impurezas e para quantificação da substância ativa na matéria-prima ou no produto acabado. As principais características incluem:

✓ *Especificidade / Seletividade*

✓ *Linearidade*

✓ *Precisão*

Repetibilidade

Precisão Intermediária

✓ *Exatidão*

✓ *Robustez*

A guia Q2B complementa a guia anterior incluindo dados experimentais e estatísticos importantes para a determinação das características de validação (ICH, 1994; ICH, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima e produto farmacêutico

O ritonavir (RTV), com teor declarado de 99,53% (lote 1022/03), foi gentilmente cedido pela empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, assim como os polimorfos I (lote 049/05 – teor: 100,12%) e II (lote 050/05 – teor: 101,67%), o medicamento NORVIR[®] (lote 074672E21) na forma farmacêutica cápsulas e o anti-retroviral lopinavir (lote 1348/03).

A validação dos métodos quantitativos para o ritonavir matéria-prima, após caracterização, foi realizada frente ao polimorfo correspondente utilizado como substância química de referência (SQR).

A matéria-prima adquirida foi submetida a diferentes ensaios de caracterização, inclusive frente às especificações apresentadas no texto final da monografia do fármaco para inclusão na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005), a fim de utilizá-la como SQR no desenvolvimento e validação dos métodos quantitativos propostos para o produto farmacêutico.



Figura 6 - Fotografia da cápsula de Norvir[®] (Abbott)
(www.link.med.ed.ac.uk/RIDU/RTV.htm, acessado em jan/2006)

As cápsulas de gelatina mole (100 mg RTV), ilustradas na Figura 6, são brancas, gravadas com 100, o logotipo e o código da empresa. Devem ser mantidas sob refrigeração (2-8 °C) e ao abrigo da luz. Excipientes: butil-hidroxitolueno, etanol, gelatina, óxido de ferro, ácido oléico, óleo de rícino polioxil 35 e dióxido de titânio (ABBOTT, 2001).

4.2 Caracterização da matéria-prima e análise qualitativa do produto acabado

4.2.1 Caracteres físicos

Aspecto, cor e odor do fármaco foram avaliados conforme especificações descritas na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).

4.2.2 Solubilidade

O ensaio foi realizado conforme descrito na F. Bras. IV (1988). Os solventes utilizados foram metanol e acetonitrila, de acordo com as informações descritas na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).

4.2.3 Constantes físico-químicas

4.2.3.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão do ritonavir foi determinado em dois equipamentos:

- ✓ Equipamento automático METTLER TOLEDO FP90, onde o fármaco é adicionado em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento e introduzidos verticalmente no equipamento, sendo possível a determinação simultânea de até 3 amostras. Para a calibração foi utilizado o ácido benzóico (Mettler ME-18555 A.8.92 Calibration Substance com ponto de fusão 122,4 °C), SQR que acompanha o equipamento.

- ✓ Equipamento segundo Koffler (REICHERT), em que pequena quantidade do fármaco é adicionada entre lâmina e lamínula e estas colocadas sobre um bloco metálico. A temperatura é controlada por um reostato e a amostra é observada através de um microscópio. A temperatura de fusão é então determinada pela observação simultânea da amostra e do termômetro acoplado ao bloco metálico aquecido. Para a calibração foi utilizado o ácido benzóico (ponto de fusão 122,4 °C) como SQR. Foram realizadas três determinações do ritonavir.

4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O experimento de calorimetria exploratória diferencial para os polimorfos I e II do ritonavir e para a matéria-prima foi realizado no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia (UFRGS). O equipamento utilizado foi SHIMADZU DSC-60 acoplado ao integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (Collection Monitor versão 2.0, 1997-2003) e ao controlador de fluxo FC-60A, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 ml/min. Velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 140 °C.

4.2.3.3 Rotação específica

A análise foi realizada em polarímetro PERKIN ELMER 341, utilizando cubetas de 1 dm de percurso óptico e comprimento de onda de raia D de sódio (589,3 nm) a 20 °C ±0,5 °C. Foram preparadas soluções a 2% (p/V) de ritonavir em metanol, conforme especificação da Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).

4.2.4 Identificação

4.2.4.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido utilizando-se pastilhas de brometo de potássio contendo, separadamente, ritonavir, polimorfo I e II. As pastilhas foram analisadas em espectrofotômetro SHIMADZU FTIR-8101.

4.2.4.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A identificação do ritonavir matéria-prima através da espectrofotometria na região do UV foi realizada com o preparo de soluções do ritonavir SQR e amostra em metanol na concentração de 20 µg/ml para obtenção dos espectros UV entre 300 e 200 nm. O equipamento e os parâmetros utilizados para identificação do fármaco estão descritos em *Análise quantitativa da matéria-prima* no item 4.3.1.

4.2.4.3 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)

Para a identificação do ritonavir no produto acabado foram preparadas soluções do ritonavir SQR e das cápsulas em metanol na concentração de 20 µg/ml para obtenção dos espectros UV de 2ª ordem (UV-D²) entre 250 e 220 nm. O equipamento e os parâmetros utilizados para identificação do fármaco estão descritos em *Análise quantitativa do produto acabado* no item 4.4.1.

4.2.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A identificação do ritonavir matéria-prima foi determinada através de seu respectivo tempo de retenção, comparado com o tempo de retenção do ritonavir SQR, conforme método descrito para *Análise quantitativa da matéria-prima* em 4.3.2.

A identificação do ritonavir no produto acabado foi determinada através de seu respectivo tempo de retenção, comparado com o tempo de retenção do ritonavir SQR, conforme método descrito para *Análise quantitativa do produto acabado* em 4.4.2.

4.2.4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O sistema eluente empregado para o desenvolvimento do método de identificação do ritonavir por CCD é composto por mistura de álcool isopropílico, hexano e hidróxido de amônio 6 M (5:3:2, V/V/V). Os cromatogramas foram desenvolvidos em cromatofolhas de alumínio recobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ (MERCK). Soluções de ritonavir matéria-prima (RTV) e cápsulas (CÁP), assim como de lopinavir (LOP) foram preparadas em metanol na concentração de 10 mg/ml. Após aplicação de 6 µl de cada solução, as placas cromatográficas foram dispostas em cubas previamente saturadas com o eluente escolhido. A revelação foi realizada por meio de

vapores de iodo e lâmpada ultravioleta a 254 nm, determinando-se os valores dos fatores de retenção para o ritonavir matéria-prima e cápsulas e para o lopinavir.

4.2.5 Ensaio de pureza da matéria-prima

4.2.5.1 Ponto de fusão, DSC e Rotação específica

Conforme métodos descritos para *Constantes físico-químicas* em 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.3, respectivamente.

4.2.5.2 CLAE e CCD

Conforme métodos descritos para *Identificação* em 4.2.4.4 e 4.2.4.5, respectivamente.

4.2.5.3 Determinação de umidade

A determinação de umidade na matéria-prima do fármaco foi realizada através da perda por dessecação em estufa a 105 °C por 2 horas, de acordo com as especificações da Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).

4.2.5.4 Avaliação da forma cristalina

4.2.5.4.1 Microscopia

A forma cristalina do ritonavir matéria-prima foi determinada através de análise por microscopia óptica (MO) e por microscopia de varredura eletrônica (MEV). As análises no microscópio óptico em luz natural foram realizadas no Laboratório do Departamento de Mineralogia e Petrologia do Instituto de Geociências (UFRGS). As análises por MEV (JEOL / JSM 6060) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS).

4.2.5.4.2 Difração de raios X

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Difração de Raios X do Instituto de Geociências (UFRGS). O equipamento utilizado foi o difratômetro de raios X - D 5000 (SIEMENS), ânodo de cobre e energia de 25 mA e 40 Kv. O intervalo de varredura foi de 2° a 72° 2θ, com passo de 0,02° 2θ por segundo. Os valores de d foram calculados com base no ângulo 2θ utilizando a equação de Bragg.

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Onde:

n = ordem de difração

d = distância entre os planos atômicos

θ = ângulo onde há interferência construtiva das ondas espalhadas, que resulta em um pico no difratograma

λ = comprimento de onda da radiação cobre Kα (1,54056 nm)

4.3 Análise quantitativa da matéria-prima

4.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

As soluções do ritonavir SQR e amostra da matéria-prima foram preparadas em metanol e submetidas à análise. Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 240 nm, utilizando metanol como branco.

4.3.1.1 Validação do método UV para a matéria-prima

4.3.1.1.1 Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas SQR desenvolvidas, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA).

4.3.1.1.1.1 Curva padrão

A partir de solução de ritonavir SQR em metanol na concentração de 1 mg/ml, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 10 ml, completando-se os volumes com metanol e obtendo-se concentrações de 100,0, 150,0, 200,0, 250,0 e 300,0 $\mu\text{g/ml}$. A partir destas soluções, foram realizadas diluições de 2,0 ml de cada uma para balões volumétricos de 20 ml com metanol, obtendo-se soluções com concentrações finais de 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Foram realizadas três leituras para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das absorvâncias em função das concentrações de ritonavir nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.3.1.1.2 Precisão

Foram pesadas seis amostras com, exatamente, cerca de 10 mg de ritonavir matéria-prima. Dissolveu-se em metanol e transferiu-se, quantitativamente, para balões volumétricos de 20 ml, obtendo-se soluções metanólicas a 500,0 µg/ml. Homogeneizou-se e realizou-se diluição de 1 ml de cada solução analítica para 25 ml com metanol, obtendo-se soluções com concentração final de 20,0 µg/ml.

Preparou-se solução de ritonavir SQR em metanol na concentração de 20 µg/ml.

Foram realizadas três leituras para cada solução de análise.

A concentração (C_a) em µg/ml das soluções amostra de ritonavir, foi determinada a partir da equação abaixo:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

A_a = absorvância da solução amostra de ritonavir

C_{SQR} = concentração da solução de ritonavir SQR

A_{SQR} = absorvância da solução de ritonavir SQR

O teor (C%) de ritonavir foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra de ritonavir

C_t = concentração teórica da solução amostra de ritonavir

A precisão intradia foi avaliada através do desvio SQR relativo (DPR) das médias das seis determinações. A precisão interdias foi avaliada através do DPR obtido em três dias diferentes de análise.

4.3.1.1.3 Exatidão

A exatidão do método UV para determinação quantitativa do teor da matéria-prima do ritonavir foi inferida a partir da comparação de seus resultados com os de um segundo método bem caracterizado, neste caso o método por CLAE (ICH Q2B, 1996).

4.3.1.1.4 Especificidade

Apesar de conhecidas as limitações de especificidade e seletividade da espectrofotometria na região do UV, a validação do método quantitativo proposto foi complementada com a investigação de sua especificidade frente aos potenciais produtos de degradação do fármaco. O ensaio foi realizado através de testes de degradação forçada em que soluções de ritonavir foram expostas à degradação térmica, fotólise, oxidação, condições ácidas e alcalinas por 24 horas. O procedimento foi realizado de acordo com o item 4.3.2.1.1 e os resultados foram comparados com os da solução do branco e da matéria-prima não submetida às degradações, determinados nas condições especificadas.

4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para quantificação da matéria-prima do ritonavir foi utilizado cromatógrafo a líquido SHIMADZU LC-10AD, equipado com detector SPD-M10AV_{VP} de arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10A_{VP} e injetor manual RHEODYNE. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP.

Após ensaios preliminares para a determinação do ritonavir foram selecionados os melhores parâmetros para a validação do método:

- ✓ *Coluna*: C₈ de fase reversa LiChrocart[®]/LiChrospher[®], 125 × 4.0 mm (5 µm) - Merck (pré coluna Phenomenex[®])
- ✓ *Fase móvel*: mistura de metanol e água (67:33, V/V), pH 6,0
- ✓ *Fluxo da fase móvel*: 1,0 ml/minuto
- ✓ *Volume da injeção*: 20 µl
- ✓ *Detecção*: 210 nm

4.3.2.1 Validação do método CLAE para a matéria-prima

4.3.2.1.1 Especificidade

A interferência de potenciais produtos de degradação foi investigada através de testes de degradação forçada. Soluções de ritonavir foram expostas à degradação térmica, fotólise, oxidação, condições ácidas e alcalinas por 24 horas. No mínimo três soluções foram geradas para avaliação de cada condição de estresse: a solução amostra submetida à degradação, o “branco” ou solução sem adição da amostra submetida à degradação do mesmo modo que a solução amostra e a solução de ritonavir matéria-prima que foi mantida sob condições normais sem ter sido submetida às degradações.

- ✓ *Degradação térmica*: aquecimento da solução amostra (2 mg/ml) e do branco (metanol sem adição de amostra) em estufa a 80 °C.
- ✓ *Fotólise*: exposição da solução amostra (2 mg/ml) e do branco em cubetas de quartzo (UV-CUVETTE MICRO-BRAND) à lâmpada de radiação UV 352 nm (Black Light Blue Lamp-Orion UV-A, 30 W, 130 V, $1,26 \times 10^{-3}$ watts/cm²) em câmara espelhada (100x16x16 cm). Cubetas com solução amostra e do branco envoltas com papel alumínio também foram colocadas à câmara com o objetivo de verificar alguma interferência devida à elevação da temperatura em seu interior, que, após 24 horas, aproximou-se de 30 °C.
- ✓ *Oxidação*: exposição da solução amostra (2 mg/ml) e do branco, separadamente, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, V/V) na proporção de 1:5 (V/V).
- ✓ *Hidrólise ácida*: exposição da solução amostra (2 mg/ml) e do branco, separadamente, ao ácido clorídrico (HCl 1 M) na proporção de 1:5 (V/V).
- ✓ *Hidrólise alcalina*: exposição da solução amostra (2 mg/ml) e do branco, separadamente, ao hidróxido de sódio (NaOH 1 M) na proporção de 1:5 (V/V).

As alíquotas da solução amostra foram neutralizadas (quando necessário), diluídas e filtradas antes de serem injetadas no CLAE. Os resultados foram comparados com os da solução do branco e da matéria-prima não submetida às degradações, injetados da mesma maneira. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico do ritonavir.

4.3.2.1.2 Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas SQR desenvolvidas, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA).

4.3.2.1.2.1 Curva padrão

A partir de uma solução de ritonavir SQR em metanol na concentração de 1,0 mg/ml, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 10 ml, completando-se os volumes com fase móvel e obtendo-se, respectivamente, concentrações finais de 100,0, 150,0, 200,0, 250,0 e 300,0 $\mu\text{g/ml}$.

Foram realizadas três determinações para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das áreas dos picos de ritonavir em função das concentrações de ritonavir SQR nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.3.2.1.3 Precisão

Foram pesadas seis amostras com, exatamente, cerca de 10 mg de ritonavir matéria-prima. Dissolveu-se em metanol e transferiu-se, quantitativamente, para balões volumétricos de 20 ml. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se soluções a 500,0 $\mu\text{g/ml}$. Homogeneizou-se e realizou-se diluição de 4,0 ml de cada solução analítica para 10 ml com fase móvel, obtendo-se soluções com concentração final de 200,0 $\mu\text{g/ml}$.

Preparou-se solução de ritonavir SQR em fase móvel na concentração de 200,0 µg/ml.

Foram realizadas três determinações para cada solução de análise.

A concentração (C_a) em µg/ml das soluções amostra de ritonavir, foi determinada de acordo com a equação abaixo:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

A_a = área absoluta do pico para a solução amostra de ritonavir

C_{SQR} = concentração da solução de ritonavir SQR

A_{SQR} = área absoluta do pico para a solução de ritonavir SQR

O teor (C%) de ritonavir foi calculado a partir da seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra de ritonavir

C_t = concentração teórica da solução amostra de ritonavir

A precisão intradia foi avaliada através do desvio SQR relativo (DPR) das médias das seis determinações. A precisão interdias foi avaliada através do DPR obtido em três dias diferentes de análise.

4.3.2.1.4 Exatidão

A exatidão do método CLAE para quantificação do ritonavir matéria-prima foi inferida através dos resultados obtidos para os parâmetros de linearidade,

precisão e especificidade, conforme descrito pela ICH Q2B (1996) para a validação de métodos de doseamento de matérias-primas.

4.4 Análise quantitativa do produto acabado

4.4.1 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)

Após observação da interferência dos excipientes das cápsulas no espectro UV de ordem zero para análise quantitativa do ritonavir, as condições espectrofotométricas para a validação do método de UV-D foram selecionadas a partir de ensaios preliminares com soluções do ritonavir SQR, das cápsulas e dos excipientes isolados. A partir disto, determinou-se a ordem da derivada, o comprimento de onda (λ), o delta lambda ($\Delta\lambda$) e o fator de escala a ser utilizado na validação do método.

As soluções do ritonavir SQR e das cápsulas foram preparadas em metanol e submetidas à análise. Os espectros de UV-D² foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-2201, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 222,3 nm, $\Delta\lambda=2$ nm e fator de escala 30, utilizando metanol como branco.

4.4.1.1 Validação do método UV-D para a forma farmacêutica cápsula

4.4.1.1.1 Especificidade

A avaliação da interferência dos excipientes da formulação no método UV-D² para quantificação do ritonavir foi realizada através da análise do placebo do

conteúdo das cápsulas: butil-hidroxitolueno (BHT), ácido oléico, óleo de rícino e etanol.

A concentração dos excipientes da formulação utilizada no preparo da solução placebo foi baseada na literatura (KIBBE *et al*, 2000). A partir do peso médio de vinte cápsulas (939,1 mg), determinou-se o conteúdo referente aos excipientes. Foram utilizados, aproximadamente, 42 mg de BHT, 1,25 ml de óleo de rícino, 4 ml de etanol e 85 mg de ácido oléico, quantidade equivalente a cinco cápsulas de ritonavir 100 mg. Diluiu-se com metanol até concentração correspondente a 20 µg/ml de ritonavir. Homogeneizou-se e filtrou-se a solução dos excipientes.

Foram analisadas, separadamente, as soluções de ritonavir SQR, da amostra de ritonavir cápsulas, conforme indicado no item 4.4.1.1.3, e dos excipientes para posterior sobreposição e avaliação dos espectros. Testes preliminares foram realizados para avaliar a capacidade do método desenvolvido na determinação de uma mesma concentração de ritonavir SQR na presença de proporções crescentes de excipientes. Para isso, foram preparadas soluções contendo 20 µg/ml de ritonavir SQR e mistura dos excipientes, proporcional a concentração do fármaco em soluções da cápsula que contivessem de 0 a 30 µg/ml ritonavir.

4.4.1.1.2 Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas SQR desenvolvidas, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA).

4.4.1.1.2.1 Curva padrão

A partir de uma solução de ritonavir SQR em metanol na concentração de 500,0 µg/ml, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 50 ml, completando-se os volumes com metanol e obtendo-se, respectivamente, concentrações finais de 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 µg/ml.

Foram realizadas três leituras para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das absorvâncias em função das concentrações de ritonavir nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.4.1.1.3 Precisão

Foram transferidos, quantitativamente, o conteúdo de 10 cápsulas de ritonavir (100 mg), para balão volumétrico de 100 ml, obtendo-se uma solução metanólica inicial a 10 mg/ml. A solução foi homogeneizada e filtrada. A partir do filtrado, foram preparadas seis soluções metanólicas de ritonavir a 20,0 µg/ml em quatro diferentes dias. Cada solução foi preparada a partir da transferência de alíquotas de 2,5 ml do filtrado, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 50 ml, completando-se o volume com metanol. Desta solução foram transferidas alíquotas de 1,0 ml para balões volumétricos de 25 ml, completando-se o volume com o mesmo solvente.

Preparou-se uma solução de ritonavir SQR em metanol na concentração de 20,0 µg/ml.

Foram realizadas três leituras para cada solução de análise.

A concentração (C_a) em µg/ml das soluções amostra de ritonavir (cápsulas), foi determinada a partir da equação abaixo.

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

A_a = absorvância da solução amostra de ritonavir

C_{SQR} = concentração da solução de ritonavir SQR

A_{SQR} = absorvância da solução de ritonavir SQR

O teor (C%) de ritonavir nas cápsulas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra de ritonavir

C_t = concentração teórica da solução amostra de ritonavir

A precisão intradia foi avaliada através do desvio SQR relativo (DPR) das médias das seis determinações. A precisão interdias foi avaliada através do DPR obtido em quatro dias diferentes de análise.

4.4.1.1.4 Exatidão

4.4.1.1.4.1 Teste de recuperação

Preparou-se solução de ritonavir SQR a 50,0 µg/ml em metanol. Para isso, foram pesados e dissolvidos, quantitativamente, 10 mg da SQR em metanol e diluídos em balão volumétrico de 100 ml (100,0 µg/ml). Transferiu-se alíquota de 25,0 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

A solução amostra foi preparada transferindo-se alíquota de 5,0 ml da solução inicial (10 mg/ml), descrita no item 4.4.1.1.3, para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com metanol (500,0 µg/ml) e diluindo-se 5,0 ml desta solução para balão volumétrico de 50 ml com o mesmo solvente (50,0 µg/ml).

Para o preparo da solução amostra acrescida de ritonavir SQR (R) foram transferidos para balões volumétricos de 50 ml, alíquotas de 10,0 ml da solução amostra e alíquotas de 5,0, 10,0 e 15,0 ml da solução de ritonavir SQR, obtendo-se soluções em metanol com concentração total do fármaco de 15,0, 20,0 e 25,0 µg/ml, respectivamente, em triplicata. Soluções de ritonavir SQR (SQR) e amostra (A) a 10,0 µg/ml foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 50 ml.

Tabela 2 - Soluções para o teste de recuperação por UV-D²_{λ=222,3 nm}

	Volume da solução amostra de ritonavir cápsulas (ml)*	Volume da solução de ritonavir SQR (ml)*	Concentração final em balão vol. 50 ml (µg/ml)
SQR	–	10,0	10,0
A	10,0	–	10,0
R ₁	10,0	5,0	15,0
R ₂	10,0	10,0	20,0
R ₃	10,0	15,0	25,0

* Solução a 50 µg/ml

O teor recuperado de ritonavir SQR foi calculado a partir da equação que segue.

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C_R = concentração da solução amostra acrescida de ritonavir SQR ($\mu\text{g/ml}$): solução amostra de ritonavir cápsula + solução de ritonavir SQR

C_A = concentração da solução amostra de ritonavir cápsula ($\mu\text{g/ml}$)

C_{SQR} = concentração da solução de ritonavir SQR ($\mu\text{g/ml}$)

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para quantificação do ritonavir cápsulas foram utilizados os mesmos equipamentos e parâmetros descritos na validação do método CLAE para a matéria-prima de acordo com o item 4.3.2.

4.4.2.1 Validação do método CLAE para a forma farmacêutica cápsula

4.4.2.1.1 Especificidade

A avaliação da interferência dos excipientes da formulação no método CLAE para quantificação do ritonavir foi realizada através da análise do placebo do conteúdo das cápsulas: butil-hidroxitolueno (BHT), ácido oléico, óleo de rícino e etanol.

A concentração dos excipientes da formulação utilizada no preparo da solução placebo foi baseada na literatura (KIBBE *et al.* 2000). A partir do peso médio de vinte cápsulas (939,1 mg), determinou-se o conteúdo referente aos excipientes. Foram utilizados, aproximadamente, 42 mg de BHT, 1,25 ml de óleo de rícino, 4 ml de etanol e 85 mg de ácido oléico, quantidade equivalente a cinco cápsulas de ritonavir 100 mg. Diluiu-se com metanol até concentração

correspondente a 200 µg/ml de ritonavir. Homogeneizou-se e filtrou-se a solução dos excipientes.

Foram analisadas, separadamente, as soluções de ritonavir SQR, da amostra de ritonavir cápsulas, conforme indicado no item 4.4.2.1.3, e dos excipientes para posterior avaliação dos cromatogramas.

A interferência de potenciais produtos de degradação também foi investigada através de testes de degradação forçada. Soluções amostra de ritonavir cápsulas foram expostas à degradação térmica, fotólise, oxidação, condições ácidas e alcalinas por 24 horas. No mínimo três soluções foram geradas para avaliação de cada condição de estresse: a solução amostra submetida à degradação, o “branco” ou solução sem adição da amostra submetida à degradação do mesmo modo que a solução amostra e a solução de ritonavir SQR que foi mantida sob condições normais sem ter sido submetida às degradações.

- ✓ *Degradação térmica*: aquecimento da solução amostra (1 mg/ml) e do branco (metanol sem adição de amostra) em estufa a 80 °C.
- ✓ *Fotólise*: exposição da solução amostra (1 mg/ml) e do branco em cubetas de quartzo (UV-CUVETTE MICRO-BRAND) à lâmpada de radiação UV 352 nm (Black Light Blue Lamp-Orion UV-A, 30 W, 130 V, 1,26 x 10⁻³ watts/cm²) em câmara espelhada (100x16x16 cm). Cubetas com solução amostra e do branco envoltas com papel alumínio também foram colocadas à câmara com o objetivo de verificar alguma interferência devida à elevação da temperatura em seu interior, que, após 24 horas, alcançou 30 °C.
- ✓ *Oxidação*: exposição da solução amostra e do branco, separadamente, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%, V/V) na proporção de 1:1 (V/V).
- ✓ *Hidrólise ácida*: exposição da solução amostra e do branco, separadamente, ao ácido clorídrico (HCl 1 M) na proporção de 1:1 (V/V).

✓ *Hidrólise alcalina*: exposição da solução amostra e do branco, separadamente, ao hidróxido de sódio (NaOH 1 M) na proporção de 1:1 (V/V).

As alíquotas da solução amostra foram neutralizadas (quando necessário), diluídas e filtradas antes de serem injetadas no CLAE. Os resultados foram comparados com os da solução do branco e da SQR injetados da mesma maneira. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico do ritonavir.

4.4.2.1.2 Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias. A partir das três curvas SQR desenvolvidas, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA).

4.4.2.1.2.1 Curva padrão

A partir de uma solução de ritonavir SQR em metanol, na concentração de 1,0 mg/ml, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml foram transferidas, com o auxílio de bureta, para balões volumétricos de 10 ml, completando-se os volumes com a fase móvel e obtendo-se, respectivamente, concentrações finais de 100,0, 150,0, 200,0, 250,0 e 300,0 $\mu\text{g/ml}$.

Foram realizadas três determinações para cada solução. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das áreas dos picos de ritonavir em função das concentrações de ritonavir SQR nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.4.2.1.3 Precisão

Foram transferidos, quantitativamente, o conteúdo de 10 cápsulas de ritonavir (100 mg), para balão volumétrico de 100 ml, obtendo-se uma solução metanólica inicial a 10 mg/ml. A solução foi homogeneizada e filtrada. A partir do filtrado, foram preparadas seis soluções metanólicas de ritonavir a 200,0 µg/ml em quatro diferentes dias. Cada solução foi preparada a partir da transferência de alíquotas de 5,0 ml do filtrado para balões volumétricos de 50 ml, completando-se o volume com metanol. Desta solução foram transferidas alíquotas de 5,0 ml para balões volumétricos de 25 ml, completando-se o volume com a mistura de metanol e água (80:20, V/V).

Preparou-se uma solução de ritonavir SQR em mistura de metanol e água (80:20, V/V) na concentração de 200,0 µg/ml.

Foram realizadas três determinações para cada solução de análise.

A concentração (C_a) em µg/ml das soluções amostra de ritonavir (cápsulas), foi determinada de acordo com a equação abaixo:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

A_a = área absoluta do pico para a solução amostra de ritonavir

C_{SQR} = concentração da solução de ritonavir SQR

A_{SQR} = área absoluta do pico para a solução de ritonavir SQR

O teor (C%) de ritonavir nas cápsulas foi calculado a partir da seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra de ritonavir

C_t = concentração teórica da solução amostra de ritonavir

A precisão intradia foi avaliada através do desvio SQR relativo (DPR) das médias das seis determinações. A precisão interdias foi avaliada através do DPR obtido em quatro dias diferentes de análise.

4.4.2.1.4 Exatidão

4.4.2.1.4.1 Teste de recuperação

Preparou-se solução de ritonavir SQR a 1,0 mg/ml em mistura de metanol e água (80:20, V/V). Para isso, foram pesados e dissolvidos, quantitativamente, 20 mg da SQR em metanol e diluídos em balão volumétrico de 20 ml.

A solução amostra foi preparada transferindo-se alíquota de 5 ml da solução inicial (10 mg/ml), descrita no item 4.4.2.1.3, para balão volumétrico de 50 ml e completando-se o volume com metanol (1 mg/ml).

Para o preparo da solução amostra acrescida de ritonavir SQR (R) foram transferidos para balões volumétricos de 50 ml, alíquotas de 8,0 ml da solução amostra e alíquotas de 1,0, 2,0 e 3,0 ml da solução de ritonavir SQR, obtendo-se soluções em mistura de metanol e água (80:20, V/V) com concentração total de 180,0, 200,0 e 220,0 µg/ml, respectivamente, em triplicata. Soluções de ritonavir SQR (SQR) e amostra (A) a 160,0 µg/ml foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 50 ml.

O teor recuperado de ritonavir SQR foi calculado a partir da equação que segue.

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C_R = concentração da solução amostra acrescida de ritonavir SQR ($\mu\text{g/ml}$): solução amostra de ritonavir cápsula + solução de ritonavir SQR

C_A = concentração da solução amostra de ritonavir cápsula ($\mu\text{g/ml}$)

C_{SQR} = concentração da solução de ritonavir SQR ($\mu\text{g/ml}$)

Tabela 3 - Soluções para o teste de recuperação por CLAE

	Volume da solução amostra de RTV cápsulas (ml)*	Volume da solução de ritonavir SQR (ml)*	Concentração final em balão vol. 50 ml ($\mu\text{g/ml}$)
SQR	–	8,0	160,0
A	8,0	–	160,0
R ₁	8,0	1,0	180,0
R ₂	8,0	2,0	200,0
R ₃	8,0	3,0	220,0

* Solução a 1 mg/ml

4.4.2.1.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através das seguintes alterações:

- ✓ proporção dos solventes da fase móvel: metanol e água (70:30, V/V)
- ✓ coluna analítica: C₈ (150×4,6 mm; 5 μm) - Shimadzu.

4.5 Estudos preliminares de estabilidade para o ritonavir matéria-prima

Amostras de ritonavir foram submetidas à degradação térmica e expostas à lâmpada de luz branca em câmara espelhada, conforme normas do ICH, para avaliação preliminar da estabilidade da matéria-prima. O teor e a pureza do fármaco foram determinados pelo método de CLAE com detecção por DAD.

- ✓ *Degradação térmica*: seis amostras com cerca de 5 mg de ritonavir foram submetidas à estufa com temperatura de 60 °C (± 2 °C) por até 30 dias, respectivamente. Ao fim da exposição, cada amostra foi dissolvida e diluída em metanol a 200 µg/ml em duplicatas.
- ✓ *Fotólise*: quatro amostras com cerca de 5 mg de ritonavir foram submetidas à câmara de luz branca fluorescente fria por até 15 dias, respectivamente. Amostras adicionais cobertas com papel alumínio foram colocadas a cada tempo com o objetivo de verificar a interferência da temperatura na câmara (28 °C). Ao fim da exposição, cada amostra foi dissolvida e diluída em metanol a 200 µg/ml em duplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima e análise qualitativa do produto acabado

Os testes de caracterização da SQR se justificam devido à publicação do texto final para a monografia do ritonavir na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005) ter sido posterior à aquisição da matéria-prima e do respectivo certificado de análise pelo laboratório farmoquímico Cristália, de forma que as informações referentes à descrição da substância se destinam à avaliação preliminar da integridade da mesma.

5.1.1 Caracteres físicos

O fármaco apresenta-se como pó amorfo branco e inodoro, resultado que indica conformidade com a especificação apresentada no texto final para a monografia do ritonavir inscrita na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).

5.1.2 Solubilidade

A solubilidade foi testada conforme descrito no item 4.2.2. O fármaco apresentou-se livremente solúvel em metanol e muito pouco solúvel em acetonitrila. Resultado que auxiliou o desenvolvimento dos métodos de quantificação do ritonavir matéria-prima e na forma farmacêutica cápsula.

5.1.3 Constantes físico-químicas da SQR

5.1.3.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão do ritonavir foi determinado em dois equipamentos de acordo com o item 4.2.3.1. Os valores obtidos em três determinações do ponto de fusão do fármaco são apresentados na Tabela 4. Utilizou-se o ácido benzóico (122,4 °C) para calibração.

Tabela 4 – Valores obtidos para o ponto de fusão do ritonavir.

Equipamento	1	2	3
Koffler (Reichert)	121 °C	122 °C	121 °C
Mettler Toledo FP 90	122,0 °C	122,8 °C	122,3 °C

O ponto de fusão apresentado na literatura por ambos os polimorfos é de 122 °C (BAUER *et al.*, 2001; MORISSETE *et al.*, 2003).

A determinação do ponto de fusão serve como indicador da identidade e pureza do fármaco quando seus resultados são analisados, paralelamente, com outros testes de identificação e pureza.

5.1.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (*DSC – differential scanning calorimetry*) é o método de análise térmica mais amplamente utilizado, no qual as diferenças no fluxo de calor na substância amostra e referência são medidas como uma função da temperatura da amostra, enquanto estas são submetidas a um programa de temperatura controlada. Trata-se de um método

calorimétrico no qual são medidas diferenças em energia (BRITTAIN *et al.*, 1991; SKOOG *et al.*, 2002).

A *DSC* é, freqüentemente, a técnica de análise térmica preferida devido à capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. O *DSC* fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos clássicos, ocasionalmente, não permitem, além de fornecer a entalpia de fusão, indicar a pureza de uma amostra, determinando se esta sofreu alguma degradação, decomposição ou conversão polimórfica durante o processo de fusão. A natureza cristalina da substância também pode ser observada através da *DSC* como uma transição exotérmica, entre outros comportamentos térmicos, auxiliando na determinação da qualidade de fármacos durante sua produção (CLAS *et al.*, 1999).

Os valores de entalpia de fusão (ΔH_{fus}) encontrados na literatura para as formas I e II do ritonavir são, respectivamente, 78,2 e 87,8 J/g (MORISSETE *et al.*, 2003). BAUER e colaboradores (2001) não encontraram diferenças significativas na análise de *DSC* para os dois polimorfos.

O ensaio de *DSC* foi realizado a fim de verificar o comportamento térmico das formas I e II do ritonavir, assim como da SQR, de acordo com o descrito no item 4.2.3.2.

A Figura 7 ilustra as curvas de *DSC* dos polimorfos do ritonavir e da SQR. A fusão do fármaco é observada através dos picos endotérmicos apresentados nos termogramas. Os dados obtidos para cada amostra, respectivamente, são apresentados na Tabela 5.

LAW e colaboradores (2001) utilizaram a técnica de análise térmica *DSC* na análise de dispersões sólidas contendo ritonavir amorfo – PEG (polietilenoglicol) 8000, enquanto ZHOU e colaboradores (2002) aplicaram a calorimetria exploratória diferencial para analisar a estabilidade física de cinco

compostos amorfos (ritonavir, ABT-229, fenofibrato, sucrose e paracetamol) e seus comportamentos de cristalização.

A aplicação do *DSC* na caracterização de polimorfos é apresentada por BRITTAIN e colaboradores (1991) e, mais recentemente, por VIPPAGUNTA e colaboradores (2001). A caracterização das diferentes formas cristalinas do ritonavir por *DSC* foi realizada em diferentes trabalhos: CHEMBURKAR *et al.*, 2000; BAUER *et al.*, 2001 e MORISSETTE *et al.*, 2003.

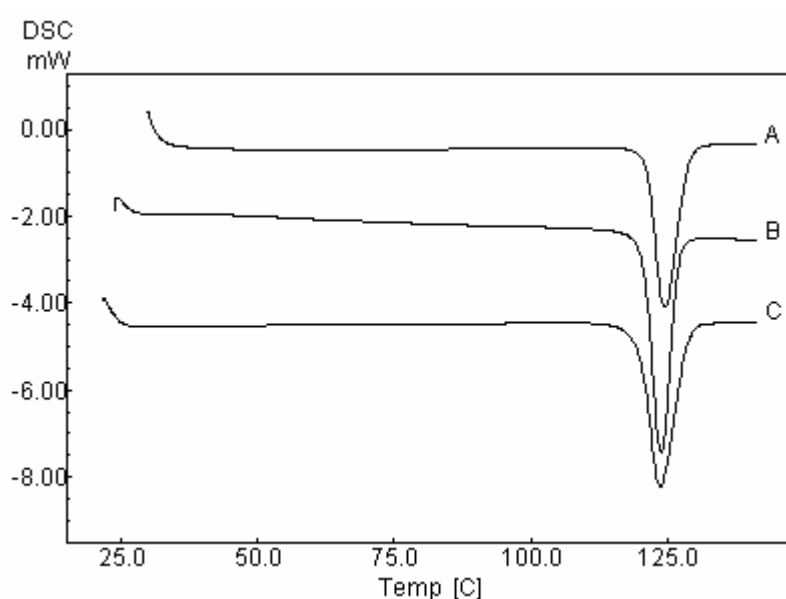


Figura 7 - Calorimetria exploratória diferencial do ritonavir SQR (A), polimorfo I (B) e II (C) realizadas no equipamento SHIMADZU DSC-60 acoplado ao integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (Collection Monitor versão 2.0, 1997-2003) e ao controlador de fluxo FC-60A sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 ml/min. Velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

Tabela 5 - Dados obtidos por *DSC* para o ritonavir SQR, polimorfos I e II.

	Ritonavir SQR	Polimorfo I	Polimorfo II
<i>Peak</i> (°C) ¹	124,66	123,90	123,75
<i>Onset</i> (°C) ²	121,28	120,65	119,98
<i>Heat</i> (J/g) ³	-86,56	-80,40	-89,43

1 – Fim da fusão, 2 – Início da fusão, 3 – Valor de entalpia (ΔH).

5.1.3.3 Rotação específica

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.2.3.3. Os valores de referência para rotação óptica específica, $[\alpha]_D^{20 \text{ } ^\circ\text{C}}$, no texto final para a monografia do fármaco inscrita na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005) são de $+7^\circ$ a $+10,5^\circ$. O resultado encontrado, $+8,14^\circ$, média de cinco determinações, encontra-se dentro da especificação, servindo como auxiliar na identificação e indicador de pureza da matéria-prima analisada.

5.1.4 Identificação

5.1.4.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV é ensaio de identificação por excelência (F. Bras. IV). A análise espectrofotométrica da matéria-prima na região do infravermelho foi realizada de acordo com o item 4.2.4.1 e o espectro está ilustrado na Figura 8.

As bandas de absorção características do fármaco, segundo MOFFAT e colaboradores (2004), e as possíveis atribuições, com base em bibliografia de referência (PAVIA *et al.*, 1996; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; NAKANISHI e SOLOMON, 1977), encontram-se na Tabela 6.

A técnica espectrofotométrica na região do infravermelho mostra-se bastante útil na caracterização física de fármacos (BRITTAİN *et al.*, 1991). A análise de polimorfismo em fármacos cristalinos pode ser realizada por espectroscopia no IV combinada a outras técnicas analíticas (VIPPAGUNTA *et al.*, 2001).

Diferentes publicações utilizaram a espectroscopia na região do IV na caracterização de polimorfos do ritonavir (BAUER *et al.*, 2001; MORISSETTE *et al.*, 2003).

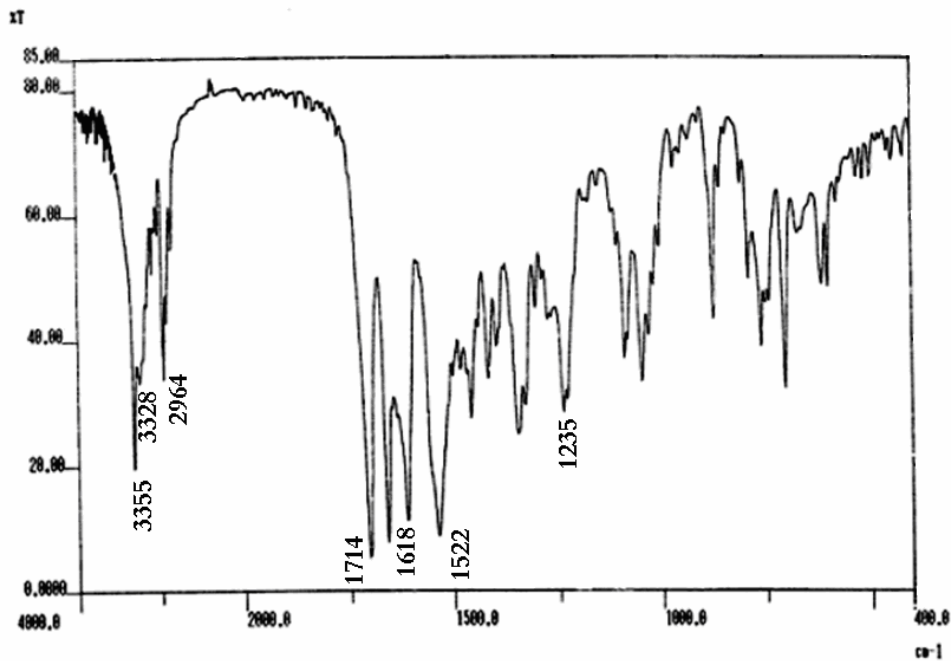


Figura 8 - Espectro de absorção na região do IV para o ritonavir em KBr (4000 a 400 cm^{-1}).

A Figura 9 apresenta os espectros na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) para os polimorfos I e II do ritonavir respectivamente. As principais bandas de absorção, características do fármaco, estão presentes para ambos os polimorfos, no entanto, observam-se diferenças entre os dois espectros no que se refere à forma e intensidade destas bandas.

CHEMBURKAR e colaboradores (2000) citam apenas diferença de aproximadamente 19 números de onda (*wavenumbers*): $6085,6 \text{ cm}^{-1}$ ($1653 \mu\text{m}$) para a forma I e $6066,7 \text{ cm}^{-1}$ ($1648 \mu\text{m}$) para a forma II. Embora a região referida não seja observada nos espectros realizados neste trabalho, é possível diferenciar os polimorfos I e II através de seus respectivos espectros de IV entre 4000 e 400 cm^{-1} .

Tabela 6 - Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o ritonavir.

Frequência (cm^{-1}) *	Atribuições **
3355	Deformação axial N-H de amida
3328	Deformação axial O-H de álcool
2964	Deformação axial C-H de alcano
1714	Deformação axial C=O da carbonila
1618	Deformação axial C=C e C=N (anel aromático e tiazol)
1522	Deformação angular N-H
1235	Deformação axial C-O e C-N

* MOFFAT *et al.*, 2004

** PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; NAKANISHI e SOLOMON, 1977.

A literatura (MOFFAT *et al.*, 2004) apresenta o espectro de absorção no IV para o ritonavir na região de 2000 a 650 cm^{-1} (Figura 35 do ANEXO), mas não cita a possibilidade de polimorfismo para o fármaco. Quando comparado aos resultados obtidos no presente trabalho apresenta semelhança com o espectro apresentado pelo polimorfo I. Para o polimorfo II, não se encontrou referência do espectro de IV na literatura.

Sabendo-se que espectros de IV de soluções de ambas as formas I e II do ritonavir apresentam-se idênticos, independente da forma original que foi dissolvida (CHEMBURKAR *et al.*, 2000), recomenda-se que, nos casos em que amostra e padrão do fármaco apresentem diferenças espectrais, realize-se a solubilização e recristalização de ambos no mesmo solvente e nas mesmas condições, repetindo-se, então, a análise dos espectros.

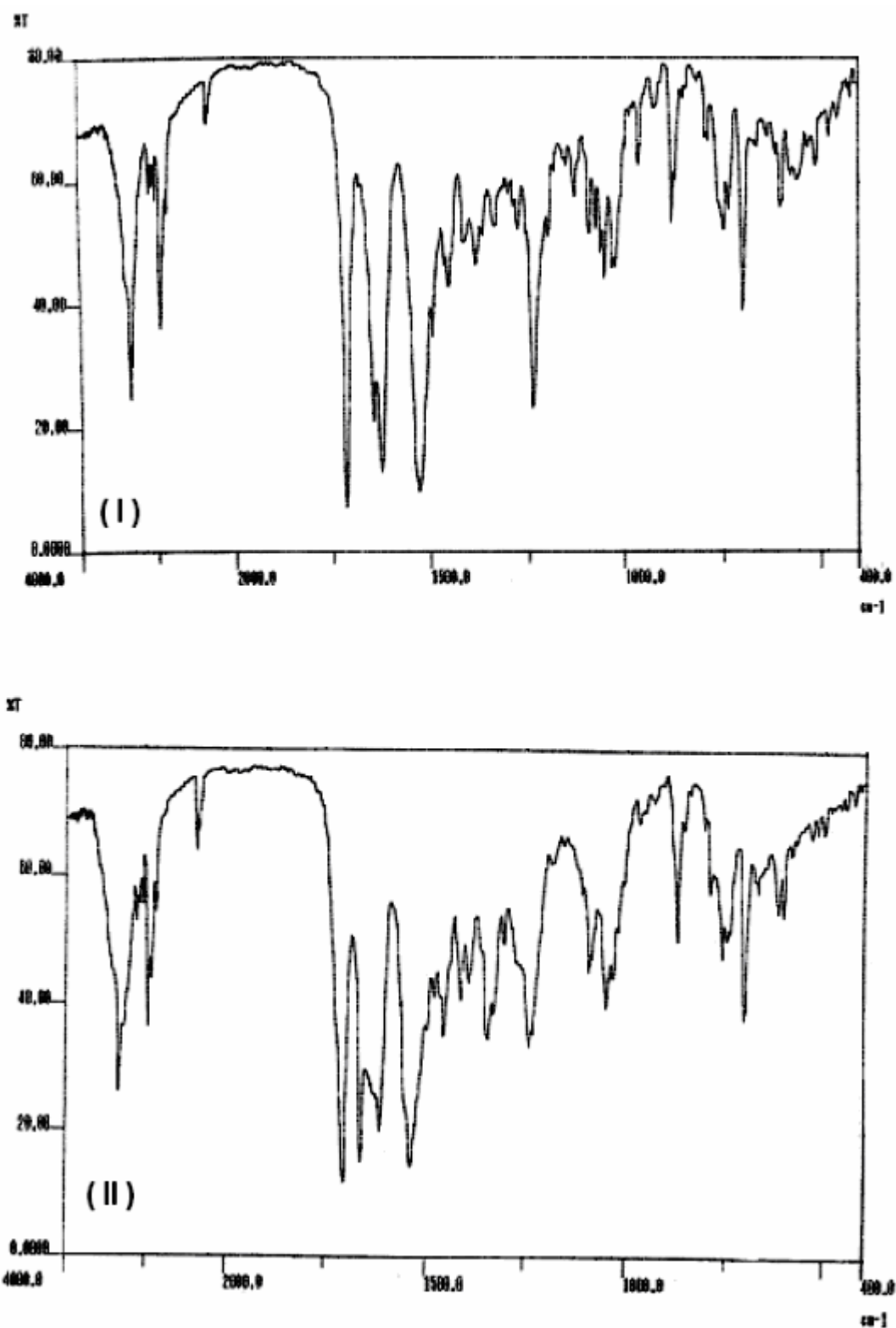


Figura 9 - Espectros de IV para os polimorfos I e II do ritonavir em KBr (4000 a 400 cm^{-1}).

5.1.4.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A análise espectrofotométrica das soluções de ritonavir SQR e amostra na região do UV foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.2.

A Figura 10 ilustra os espectros obtidos com as soluções de ritonavir SQR e amostra da matéria-prima (20 µg/ml) em metanol na região do ultravioleta. O ritonavir apresenta máximos de absorção nos comprimentos de onda próximos a 210 e 240 nm, de acordo com o espectro apresentado na literatura (MOFFAT *et al.*, 2004) e ilustrado na Figura 36 do ANEXO.

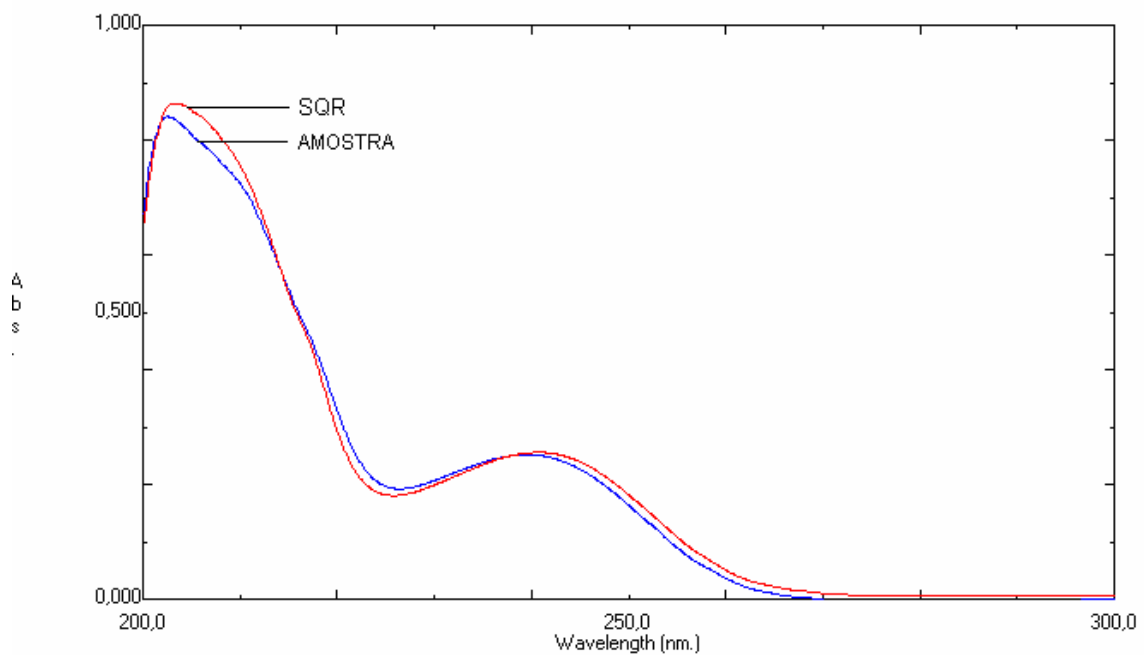


Figura 10 - Espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de RTV SQR e amostra em metanol (20 µg/ml).

Os espectros obtidos para análise do ritonavir SQR e amostra da matéria-prima por espectrofotometria na região do UV apresentam o mesmo perfil, apontando a mesma identidade para ambas as soluções.

5.1.4.3 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)

A análise espectrofotométrica derivada da solução de ritonavir SQR e cápsulas na região do UV-D² foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.3.

A Figura 11 ilustra os espectros obtidos com as soluções de ritonavir SQR e cápsulas (20 µg/ml) em metanol na região do UV (ordem zero) e mostra, claramente, a interferência na absorção devida aos excipientes da formulação.

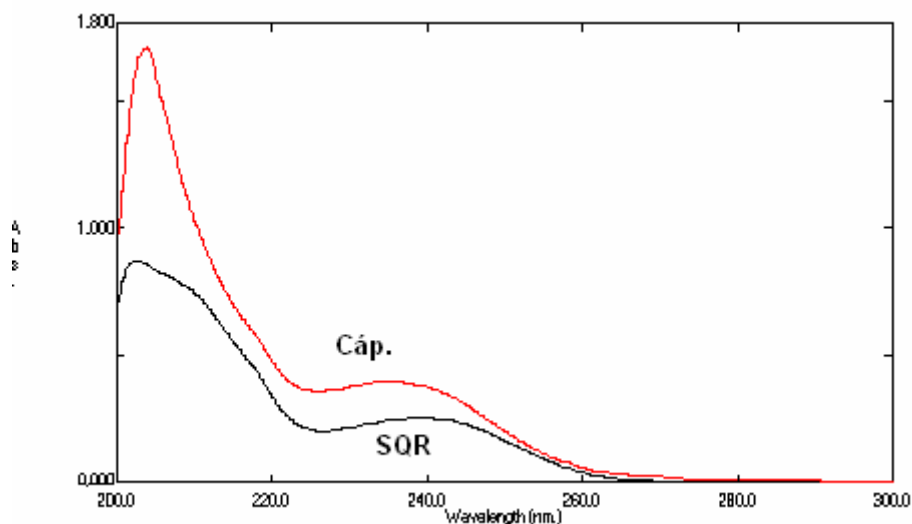


Figura 11 - Espectros de absorção na região do UV (ordem zero) referentes às soluções de ritonavir SQR e cápsulas em metanol (20 µg/ml).

A Figura 12 apresenta os espectros na região do UV-D² para as soluções de ritonavir SQR e cápsulas (20 µg/ml) em metanol. Neste caso, ambas as soluções mostram-se com mesmo perfil e intensidade de absorção no comprimento de onda de interesse (222,3 nm).

Na espectrofotometria derivada os espectros são obtidos colocando-se em gráfico a primeira ou segunda derivada da absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. Frequentemente, esses gráficos revelam

detalhes espectrais que não são observados em um espectro normal (SKOOG *et al.*, 2002). Deste modo, torna-se possível identificar e medir a concentração do analito na presença de interferentes.

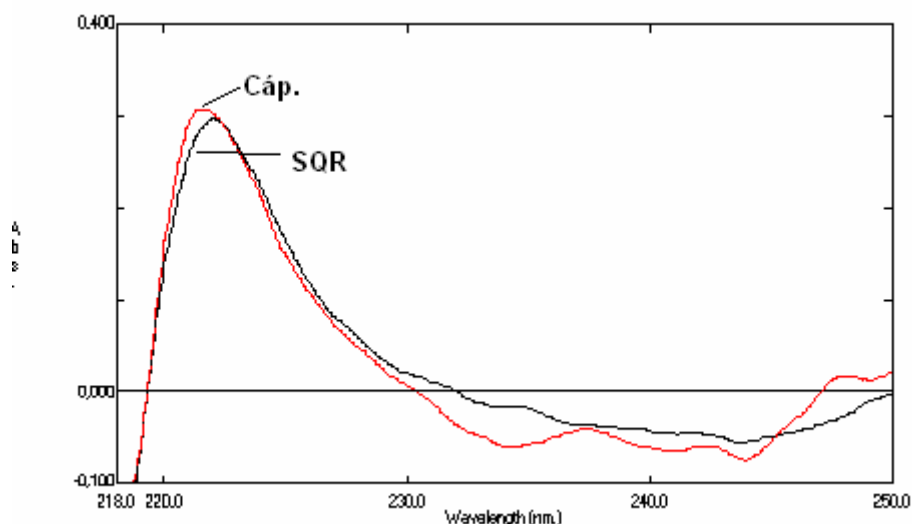


Figura 12 - Espectros de absorção na região do UV-D² referentes às soluções de ritonavir SQR e cápsulas em metanol (20 µg/ml).

5.1.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Figura 13 apresenta os cromatogramas da solução de ritonavir SQR e amostra da matéria-prima, respectivamente. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da solução amostra, obtida no método de CLAE, descrito no item 4.3.2 para a quantificação do ritonavir matéria-prima, correspondeu àquele do pico principal da solução padrão.

A Figura 14 apresenta os cromatogramas da solução de ritonavir SQR e cápsulas, respectivamente. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da solução amostra (cápsulas), obtida no método de CLAE, descrito no item 4.4.2 para a quantificação do ritonavir na forma farmacêutica,

correspondeu àquele do pico principal da solução de referência (ritonavir SQR), aproximadamente 7,8 minutos.

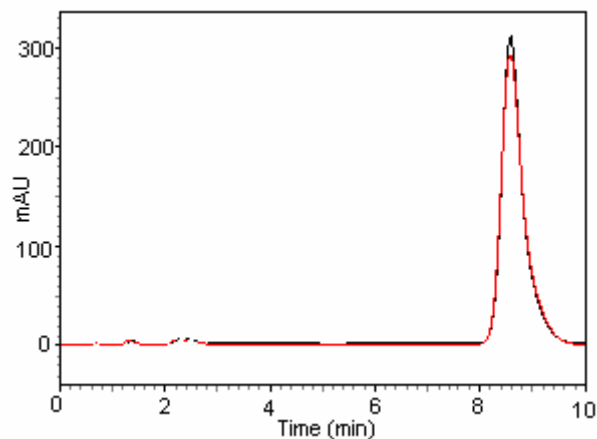


Figura 13 - Cromatogramas das soluções de ritonavir (matéria-prima) SQR (preto) e amostra (vermelho) em metanol (200 µg/ml). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 µm), pré-coluna Phenomenex®, temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20µl.

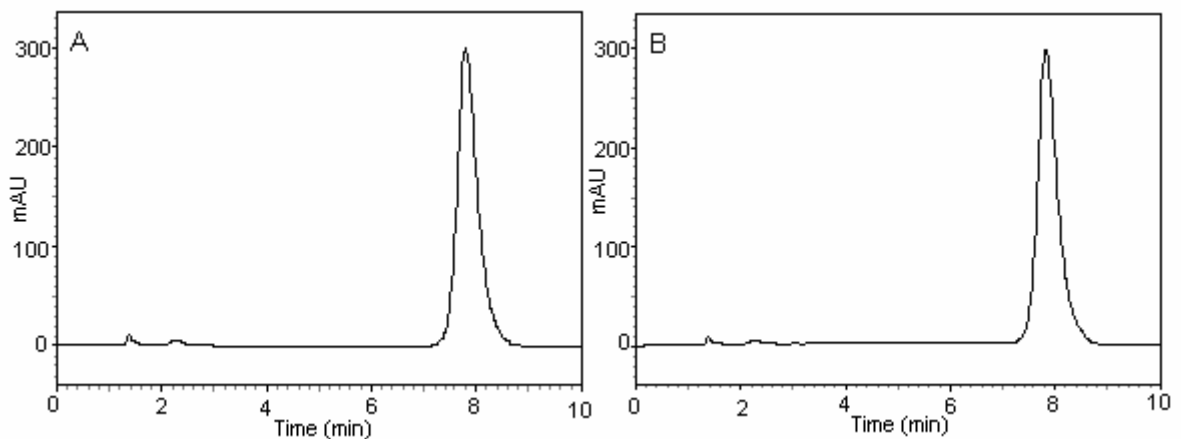


Figura 14 - Cromatogramas das soluções de ritonavir SQR (A) e cápsula (B) em metanol (200 µg/ml). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 µm), pré-coluna Phenomenex®, temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20µl.

5.1.4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Com a proposta de desenvolver um método alternativo simples e de menor custo, desenvolveu-se uma técnica de cromatografia em camada delgada acessível à rotina de qualquer laboratório. Os solventes utilizados, o preparo das soluções teste e as formas de revelação estão descritos no item 4.2.4.5.

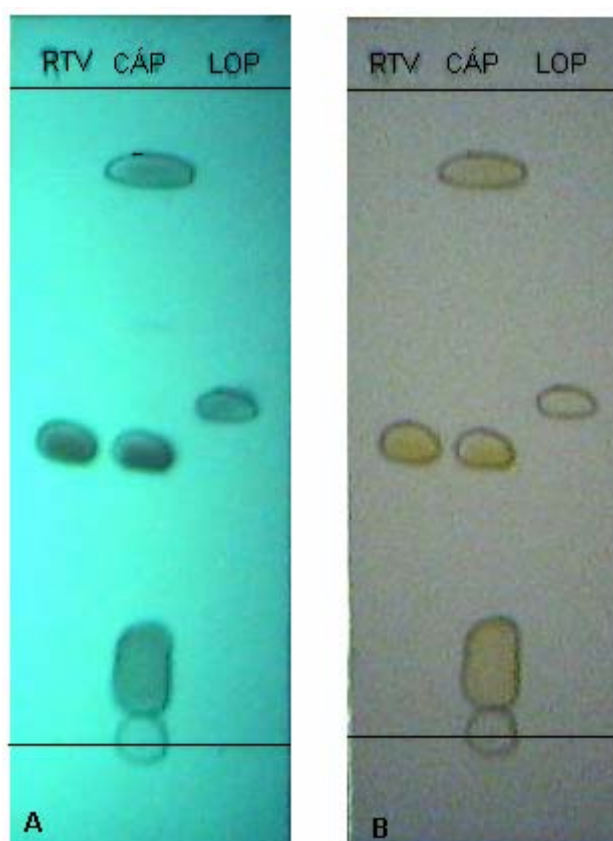


Figura 15 - CCD: (RTV) Ritonavir SQR, (CÁP) Cápsula de RTV, (LOP) Lopinavir SQR. Condições cromatográficas: placa de alumínio recoberta com gel de sílica 60 F₂₅₄ (MERCK), mistura de álcool isopropílico, hexano e hidróxido de amônio 6 M (5:3:2, V/V/V) como eluente, (A) revelação por UV (254 nm), (B) revelação por exposição a vapores de iodo.

O perfil cromatográfico do ritonavir SQR e da amostra do produto farmacêutico (Norvir[®]) está apresentado na Figura 15 de acordo com as condições especificadas. A semelhança das manchas e dos valores de Rf obtidos ($Rf_{RTV}=Rf_{Cáp.}=0,49$) indica a presença do fármaco na amostra e comprova a capacidade do método para identificação do ritonavir no produto acabado, visto que houve boa migração deste e adequada separação dos excipientes da cápsula, assim como, houve boa diferenciação do Rf para o lopinavir ($Rf_{LOP}=0,57$), anti-retroviral com estrutura semelhante ao ritonavir. Observou-se que tanto as revelações sob lâmpada UV (254 nm), quanto por exposição da placa aos vapores de iodo mostram-se eficientes.

5.1.5 Ensaio de pureza

5.1.5.1 Ponto de fusão, DSC e Rotação específica.

Os valores especificados para a fusão e rotação óptica específica de determinado fármaco servem como indicadores de pureza da amostra avaliada, assim como os métodos térmicos diferenciais têm encontrado larga aplicação na indústria farmacêutica para teste de pureza de amostras de fármacos (SKOOG *et al.*, 2002).

Ritonavir SQR mostrou-se de acordo com as especificações de pureza, conforme resultados obtidos para *Constantes físico-químicas* em 5.1.3.1, 5.1.3.2 e 5.1.3.3 respectivamente.

5.1.5.2 CLAE e CCD

O perfil cromatográfico apresentado em CLAE ou CCD para determinado fármaco serve como indicador de pureza da amostra avaliada.

A amostra analisada (solução de ritonavir cápsula) mostrou-se de acordo com as especificações de pureza conforme resultados obtidos para *Identificação* em 5.1.4.4, por análise da pureza do pico através do detector com arranjo de fotodiodos (DAD). No entanto, o resultado obtido em CCD, item 5.1.4.5 de *Identificação*, não pode, neste caso, ser considerado método indicador de pureza, pois, para isso, a mancha correspondente ao ritonavir na solução amostra deve ser isolada e submetida à avaliação mais específica em CLAE (DAD) para garantir que o sistema desenvolvido por CCD separa efetivamente o fármaco de todo e qualquer excipiente da formulação.

5.1.5.3 Determinação de umidade

A matéria-prima foi submetida ao ensaio de acordo com o item 4.2.5.3. A determinação gravimétrica avalia a quantidade de substância volátil presente na amostra. O resultado obtido (0,07%) encontra-se dentro da especificação (0,5%) no texto final para a monografia do fármaco inscrita na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).

5.1.5.4 Avaliação da forma cristalina

Polimorfismo é a capacidade de uma substância química específica em apresentar diferentes estruturas cristalinas devido a diferentes disposições de suas células unitárias. Estas formas cristalinas individuais ou polimorfos podem exibir diferenças em suas propriedades físicas como consequência de seu retículo cristalino. Diferenças na solubilidade entre as formas cristalinas de um fármaco podem levar a diferenças de biodisponibilidade da forma farmacêutica (BAUER *et al.*, 2001; VIPPAGUNTA *et al.*, 2001).

Diferentes métodos analíticos são utilizados atualmente para caracterizar a forma cristalina do fármaco durante as várias etapas do desenvolvimento.

Depois que a existência de polimorfismo é definitivamente estabelecida por difração de raios X do pó ou de monocristais, métodos espectrofotométricos (infravermelho, Raman, ressonância magnética nuclear no estado sólido, ultravioleta e visível e ou espectroscopia de fluorescência), métodos térmicos (calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica) e métodos de microscopia podem ser empregados para incrementar a caracterização (VIPPAGUNTA *et al.*, 2001).

O presente trabalho utilizou métodos de microscopia e a difração de raios X do pó da amostra. Diferenças nas formas cristalinas I e II do ritonavir podem ser observadas através do exame microscópico dos cristais, no entanto, a comprovação da existência de polimorfismo só é possível com a difração de raios X.

5.1.5.4.1 Microscopia

Apesar da microscopia óptica ser o método clássico para obter informação detalhada a respeito da natureza física da superfície dos sólidos, sua resolução é limitada por efeitos de difração à ordem de grandeza do comprimento de onda da luz. Atualmente, informações sobre superfícies com resolução consideravelmente melhor são obtidas por três técnicas, a microscopia eletrônica de varredura (SEM – *scanning electron microscopy*), a microscopia de tunelamento (STM – *scanning tunneling microscopy*) e a microscopia de força atômica (AFM – *atomic force microscopy*). Os dois últimos métodos são às vezes designados como microscopia de sonda (SPM – *scanning probe microscopy*) (SKOOG *et al.*, 2002).

A maioria dos fármacos puros consiste de microcristais agregados em estruturas muito maiores. As microscopias óptica e eletrônica são os melhores métodos para o estudo de tais espécies agregadas e ambas são utilizadas para tal trabalho. As microscopias óptica e eletrônica fornecem informações a

respeito da morfologia dos cristais em estudo, o que é interessante, pois os hábitos de diferentes estruturas cristalinas são diferentes. Em alguns casos, o método pode ser usado também para diferenciar entre o material amorfo e o cristalino. Uma vantagem característica do método de microscopia é a utilização de quantidades extremamente pequenas de amostra, logo, é uma técnica valiosa nos estágios adiantados de desenvolvimento (BRITTAIN *et al.*, 1991).

A caracterização da superfície das formas I e II do ritonavir foi realizada através da microscopia óptica (MO) e da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os exames de MO e MEV foram realizados conforme descrito no item 4.2.5.4.1.

As formas de cristalização dos polimorfos I e II foram identificadas através de MO como mostra a Figura 16.

Verificou-se diferença na forma de cristalização dos polimorfos. A forma II ficou bem caracterizada por apresentar cristais na forma de agulhas finas, entretanto, não foi possível visualizar a forma I como cristais largos em forma de bastão como consta na literatura (CHEMBURKAR *et al.*, 2000; BAUER *et al.*, 2001).

Apesar da visualização com maior aproximação e aumento, a caracterização da matéria-prima analisada por MO tornou-se difícil, pois não foi possível distinguir a forma dos cristais (Figura 17).

A MEV permite observação muito mais detalhada dos cristais dos polimorfos e da matéria-prima (ritonavir SQR) analisados anteriormente através da MO. As Figuras 18 e 19 ilustram a forma como os cristais dos polimorfos I e II e da matéria-prima encontram-se arranjados respectivamente.

Com análise por MEV foi possível visualizar cristais mais alargados no polimorfo I e cristais mais afilados no polimorfo II, de acordo com a literatura. A

matéria-prima apresenta uma tendência ao arranjo cristalino na forma de agulhas. Formas amorfas parecem estar presentes em todas as amostras.

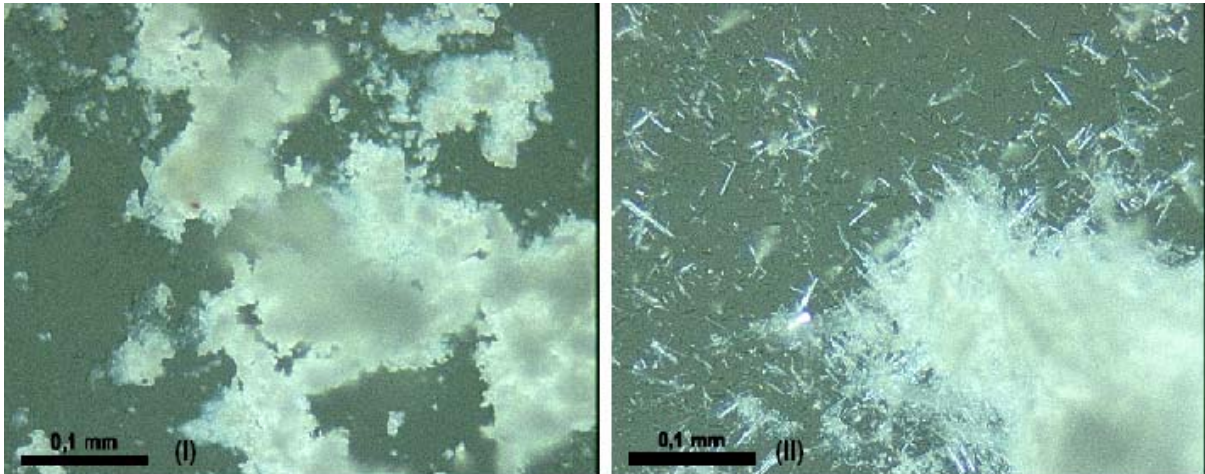


Figura 16 - Microscopia óptica (MO) das formas I e II do ritonavir.

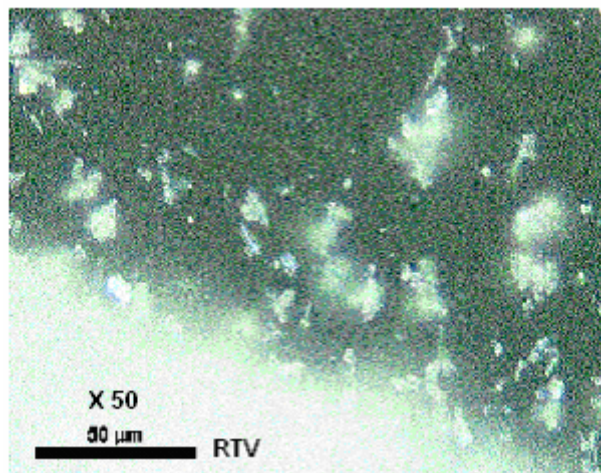


Figura 17 - Microscopia óptica (MO) da matéria-prima do RTV.

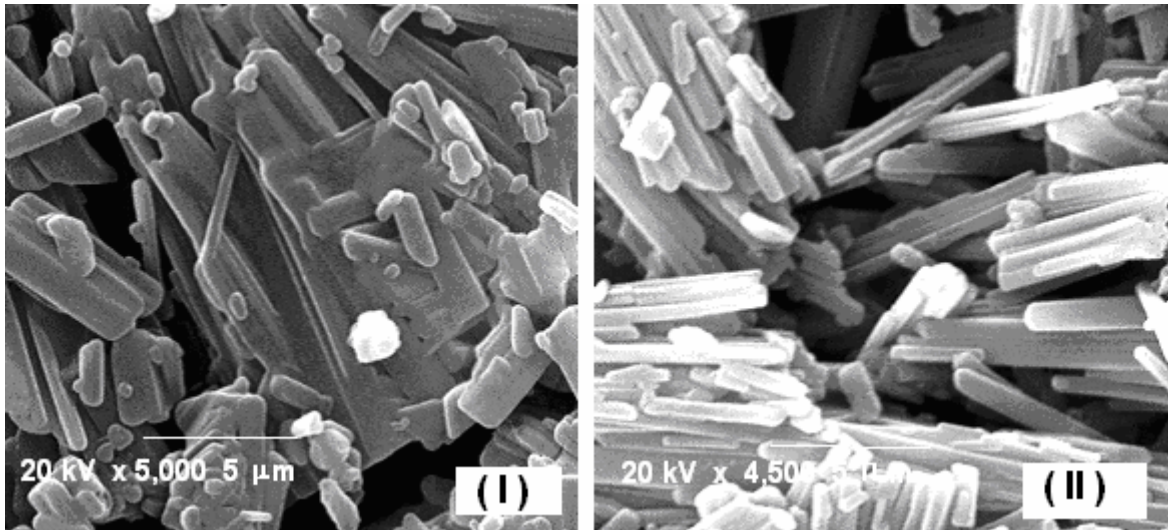


Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos polimorfos I (20kV x 5,000 5μm) e II (20kV x 4,500 5μm) do ritonavir.

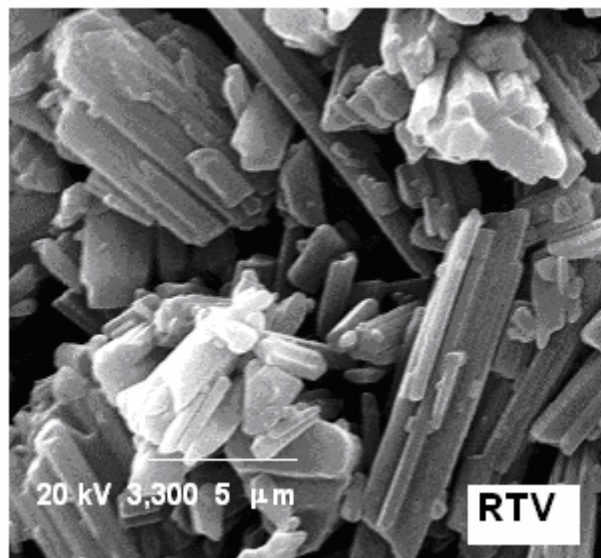


Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cristais da matéria-prima do RTV (20kV x 3,300 5μm).

5.1.5.4.2 Difração de raios X

Identificação de substâncias cristalinas, diferenciação de polimorfos, determinação do grau de cristalinidade e a determinação da porcentagem de polimorfos numa mistura de substâncias cristalinas diferentes são algumas das aplicações da difração de raios X (VIPAGUNTA *et al.*, 2001).

Para estudos analíticos por difração, a amostra cristalina é pulverizada na forma de um pó fino e homogêneo. Dessa forma, um grande número de pequenos cristais estarão orientados em todas as direções possíveis; assim quando o feixe de raios x atravessa o material, um número significativo de partículas deve estar orientado de forma a cumprir a condição de Bragg para a reflexão para todos os espaçamentos interplanares possíveis. A identificação de uma espécie a partir de seu difratograma de pó está baseada na posição das linhas (em termos de θ ou 2θ) e suas intensidades relativas. O ângulo de difração 2θ é função do espaçamento de um conjunto particular de planos; com a ajuda da equação de Bragg, esta distância d é calculada usando o comprimento de onda da fonte e da medida do ângulo. A intensidade das linhas depende do número e do tipo de átomos em cada conjunto de planos (BRITAIN *et al.*, 1991; SKOOG *et al.*, 2002). Pode-se dizer, então, que todas as reflexões de raios x de um cristal dependem somente das dimensões da célula unitária.

A literatura apresenta os difratogramas das formas I e II do ritonavir, assim como os dados da difração de raios X de monocristal (Figura 37 e Tabela 29 do ANEXO). Segundo BAUER e colaboradores (2001), o ritonavir exhibe polimorfismo conformacional “*cis*” (forma II) e “*trans*” (forma I) ao redor da ligação carbamato, direcionando para formação de dois sistemas cristalinos únicos com diferenças significativas de solubilidade (Figura 38 do ANEXO). O número total de ligações de hidrogênio é o mesmo para as duas formas, no entanto a rede de ligações de hidrogênio formada entre as moléculas é diferente, o que explica a diferença de solubilidade entre as duas formas

polimórficas. As Figuras 39 e 40 do ANEXO ilustram as ligações de hidrogênio para as formas I e II do ritonavir.

Diversos trabalhos apresentam dados referentes à caracterização dos polimorfos do ritonavir, combinando diferentes técnicas de análise com a difração de raios X (CHEMBURKAR *et al.*, 2000; BAUER *et al.*, 2001; MORISSETTE *et al.*, 2003). LAW e colaboradores (2001) utilizaram a difração de raios X na análise físico-química de dispersões sólidas de ritonavir amorfo contendo PEG 8000.

Os resultados da difração de raios X de policristais da amostra do ritonavir SQR e das formas I e II, realizados conforme descrito no item 4.2.5.4.2, estão ilustrados nos respectivos difratogramas da Figura 20.

De acordo com os resultados, pode-se observar que os difratogramas das amostras de ritonavir SQR e do polimorfo II apresentam-se exatamente sobrepostos em todos os picos, diferindo apenas na intensidade, enquanto o difratograma do polimorfo I apresenta um padrão bastante diferente dos demais, o que permite comprovar a identidade cristalina até aqui investigada.

As Tabelas 30, 31 e 32 do ANEXO apresentam os valores das distâncias interplanares (d), do ângulo 2θ e as intensidades dos picos (%) dos difratogramas apresentados respectivamente.

A presença de formas amorfas pode ser confirmada através da observação da linha de base dos difratogramas que não se encontra perfeitamente alinhada, o que é característico para amostras não cristalinas (LIEBERMAN & BARBE, 1988).

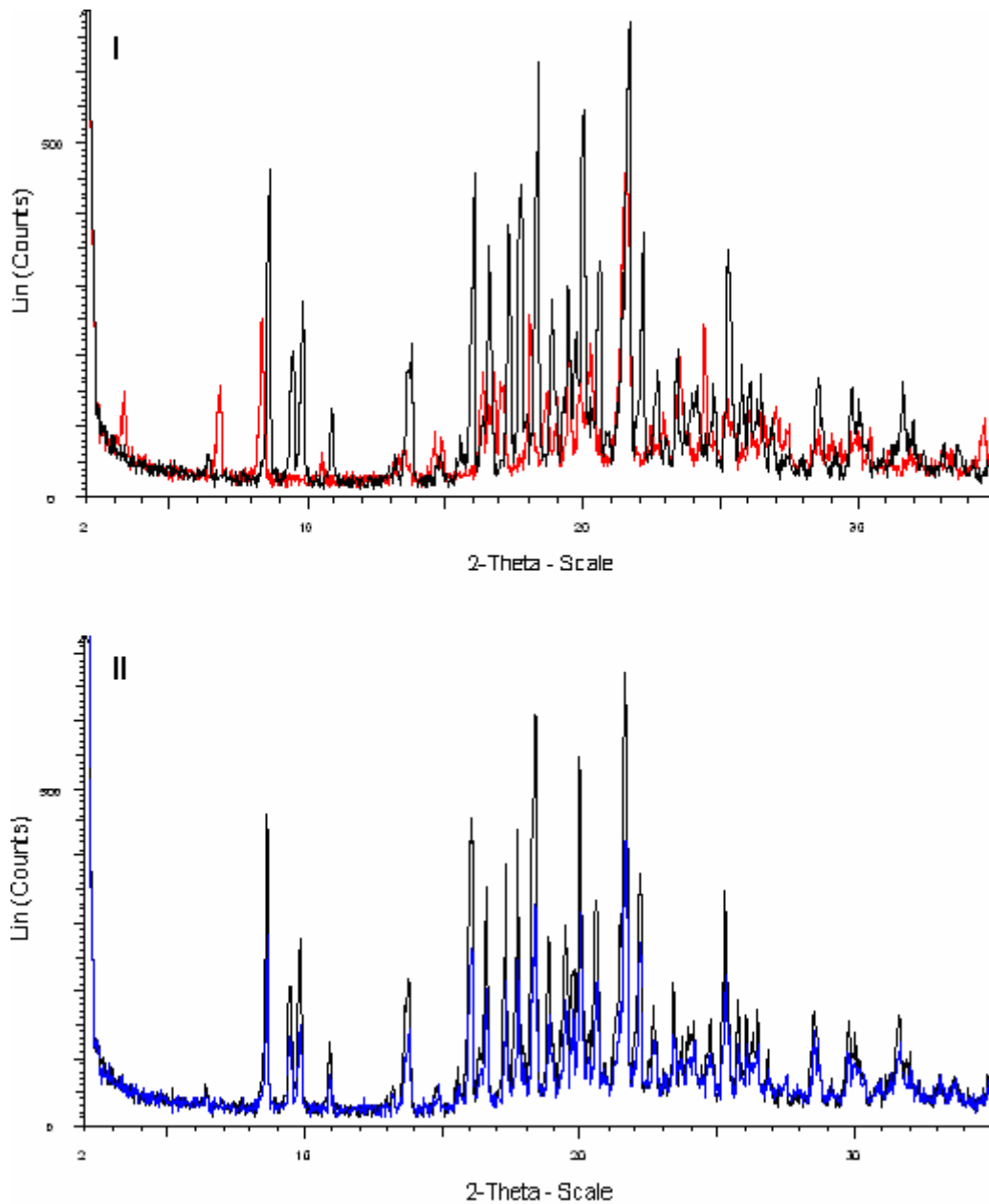


Figura 20 - Sobreposição dos difratogramas dos polimorfos I (vermelho) e II (azul) ao difratograma da matéria-prima do RTV (preto) obtidos através de um difratômetro de raios x modelo D 5000 SIEMENS com tubo de cobre, condições de varredura 2-72° (2 θ), 0,02 °/s, temp. 25 °C.

A difração de raios X apresenta-se como a técnica mais útil para o estudo do polimorfismo de uma amostra, pois os padrões de difração dos diferentes polimorfos sempre apresentam notáveis diferenças. Ainda que a microscopia tenha sido utilizada no presente trabalho para visualizar diferentes formas de cristalização, a descrição estrutural detalhada dos diferentes polimorfos deve ser realizada através da difração de raios X.

A maior parte do que é conhecido sobre espaçamento e arranjo dos átomos em materiais cristalinos foi determinada diretamente por estudos de difração. A difração de raios X também fornece um meio conveniente e prático para a identificação qualitativa de compostos cristalinos. O método de difração de raios X usando amostra policristalina, ou método de pó, é único, porque somente este método analítico é capaz de fornecer informação qualitativa e quantitativa sobre compostos presentes em uma amostra sólida (SKOOG *et al.*, 2002).

O controle da forma cristalina do fármaco é muito importante durante todos os estágios de desenvolvimento e produção da forma farmacêutica, pois qualquer alteração devido à interconversão polimórfica, dessolvatação de solvatos, formação de hidratos e alteração no grau de cristalinidade pode alterar a biodisponibilidade do fármaco. Um fármaco no estado sólido, em transição de fase, pode sofrer mudanças em suas propriedades termodinâmicas com conseqüentes alterações em suas características de dissolução e transporte. Exposição às alterações de temperatura, pressão, umidade relativa e cominuição são encontrados em processos tais como secagem, granulação, moagem e compressão. O estresse aplicado aos cristais durante o processamento do fármaco pode causar defeitos em seu retículo cristalino, desordenando-o e afetando as propriedades físicas do pó resultante (VIPAGUNTA *et al.*, 2001).

A caracterização das propriedades físicas deve ser sistemática e deve seguir protocolos racionalmente desenhados para obtenção das informações necessárias. As propriedades físicas podem ser classificadas em nível

molecular, de partículas ou de conjunto das partículas. A caracterização total do material deve requerer estudo em cada estágio (BRITTAİN *et al.*, 1991).

5.2 Análise quantitativa da matéria-prima

5.2.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do ultravioleta aplica-se na identificação e quantificação de fármacos, apesar de apresentar algumas limitações, pois depende da existência de grupamentos cromóforos na estrutura do composto a ser analisado, o que compromete também sua especificidade. Entretanto, apresenta-se como método de doseamento alternativo na ausência de equipamentos mais sofisticados como o cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

5.2.1.1 Validação do método UV para a matéria-prima

5.2.1.1.1 Linearidade

5.2.1.1.1.1 Curva padrão

A partir de soluções de ritonavir SQR nas concentrações de 10,0 a 30,0 µg/ml em metanol foram construídas três curvas padrão de acordo com o item 4.3.1.1.1.1.

A Tabela 7 apresenta os valores de absorvância obtidos para cada concentração da curva padrão.

Tabela 7 - Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do RTV por UV.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância*	Absorvância média \pm	
		e.p.m.	DPR
10,0	0,121	0,122 \pm 0,001	1,42
	0,121		
	0,124		
15,0	0,180	0,183 \pm 0,001	1,38
	0,183		
	0,185		
20,0	0,250	0,249 \pm 0,001	0,40
	0,249		
	0,248		
25,0	0,310	0,311 \pm 0,001	0,37
	0,310		
	0,312		
30,0	0,377	0,375 \pm 0,001	0,55
	0,373		
	0,376		

* Resultado de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

A curva padrão para o método UV foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 21 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV (Tabela 8) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ($r = 0,9999$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as absorvâncias e a concentração do fármaco.

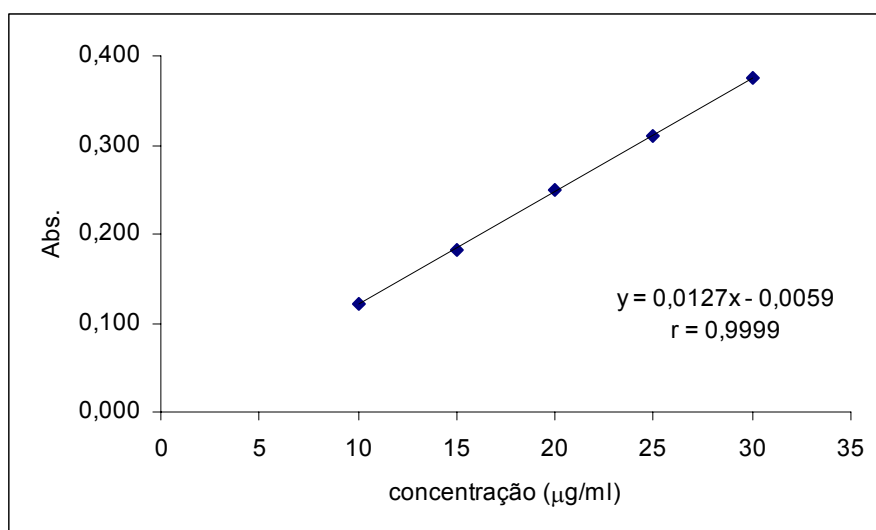


Figura 21 - Representação gráfica da curva padrão média do RTV para UV.

Tabela 8 - ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do RTV por UV.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,12086	0,03021	9442,10*	3,48
regressão linear	1	0,12084	0,12084	37762,67*	4,96
desvio da linearidade	3	0,00002	0,00001	1,92	3,71
DENTRO (resíduo)	10	0,00003	0,00000		
Total	14				

* Significativo para $p < 0,05$.

5.2.1.1.2 Precisão

A determinação do teor de ritonavir matéria-prima através da espectrofotometria UV foi realizada conforme descrito no item 4.3.1.1.2. Os resultados encontram-se na Tabela 9 e os valores dos DPR para a precisão intra e interdias indicam que o método é preciso.

Tabela 9 - Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de RTV matéria-prima por espectrofotometria UV para avaliação da precisão intra e interdias.

	Teor (%) das soluções de RTV (20 µg/ml)*						Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
dia I	102,64	102,80	102,25	102,53	101,38	102,53	102,36 ± 0,2083	0,50
dia II	102,46	102,02	102,52	104,03	102,33	101,79	102,52 ± 0,3216	0,76
dia III	99,83	100,47	101,84	101,12	104,38	101,60	101,54 ± 0,6430	1,55
Teor médio interdias (%)							102,14	
DPR							1,07	

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.2.1.1.3 Exatidão

A exatidão do método espectrofotométrico na região do UV para determinação quantitativa do teor da matéria-prima do ritonavir, na faixa específica onde o procedimento é empregado, pode ser inferida a partir da comparação de seus resultados com os de um segundo método bem caracterizado, neste caso o método por CLAE, de acordo com as normas estabelecidas no ICH Q2B (1996).

A comparação estatística entre os métodos de doseamento propostos é apresentada no item 5.3.

5.2.1.1.4 Especificidade

A avaliação do método UV quanto a sua especificidade para a matéria-prima do ritonavir foi realizada frente aos potenciais produtos de degradação térmica, fotólise, hidrólise ácida, alcalina e oxidação. O procedimento utilizado está descrito no item 4.3.1.1.4.

Os resultados obtidos através do método UV não diferenciaram as soluções submetidas às degradações da solução de ritonavir não degradada.

5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Variações no procedimento analítico foram testadas. Fases móveis com diferentes proporções de solventes (acetonitrila ou metanol) foram avaliadas e a mistura de metanol e água mostrou-se adequada e simples. Analisaram-se diferentes proporções desta mistura (metanol:água) com o objetivo de melhorar o tempo de análise. O pH da fase móvel foi avaliado sob ampla faixa (pH 2,5 a 7,0). O pH da fase aquosa foi ajustado com ácido fosfórico 20% (V/V) ou trietilamina antes da mistura com o solvente orgânico (metanol). A corrida cromatográfica foi avaliada com o uso de coluna analítica de fase reversa C₁₈ (125x4,0 mm; 5 µm) com base desativada (Merck) e coluna analítica de fase reversa C₈ (125x4,0 mm; 5 µm) (Merck) desativada com trietilamina na fase móvel. Colunas analíticas sob temperaturas de 50 °C também foram testadas, mas os parâmetros cromatográficos (assimetria, resolução, pratos teóricos) obtidos para o pico do fármaco permaneceram similares.

Após selecionar as melhores condições cromatográficas, com base no desempenho da coluna analítica, o tempo de corrida proposto foi de 10 minutos com eluição isocrática da fase móvel. A detecção do ritonavir a 240 nm está bem documentada na literatura, mas decidiu-se trabalhar a 210 nm, pois este é o comprimento de onda de máxima absorção do ritonavir na fase móvel.

O tempo de retenção obtido para o ritonavir foi, aproximadamente, de 7,8 minutos. Os cromatogramas obtidos das soluções de ritonavir SQR e amostra da matéria-prima a 200 µg/ml em metanol, de acordo com as condições descritas em *Material e Métodos* no item 4.3.2, são apresentados em *Identificação* no item 5.1.4.4 (Figura 13).

5.2.2.1 Validação do método CLAE para a matéria-prima

5.2.2.1.1 Especificidade

A avaliação do método por CLAE quanto a sua especificidade para a matéria-prima do ritonavir foi realizada frente aos potenciais produtos de degradação térmica, fotólise, hidrólise ácida, alcalina e oxidação. O procedimento utilizado está descrito no item 4.3.2.1.1.

Observou-se o aparecimento de um pico secundário na solução submetida à degradação térmica (80 °C). Este produto apresentou tempo de retenção de, aproximadamente, 3,25 minutos (Figura 22-A). O estresse sob condição oxidante (H₂O₂ 30%, V/V) mostrou, pelo menos, um potencial produto de degradação com tempo de retenção de 3,52 minutos. O cromatograma apresentou dois picos extras, possivelmente devidos ao conservante do peróxido de hidrogênio, a 0,88 e 1,38 minutos (Figura 22-B). A hidrólise alcalina (NaOH 1 M) apresentou apenas um pico para potencial produto de degradação com tempo de retenção aproximado de 1,46 minutos (Figura 23-E), enquanto o teste de fotólise (352 nm) e a hidrólise ácida (HCl 1 M) não geraram potenciais produtos de degradação para a matéria-prima do ritonavir (Figuras 22-C e 23-D).

O DAD comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do ritonavir após os testes de degradação acelerada. Este resultado indica que o método por CLAE é específico para o fármaco.

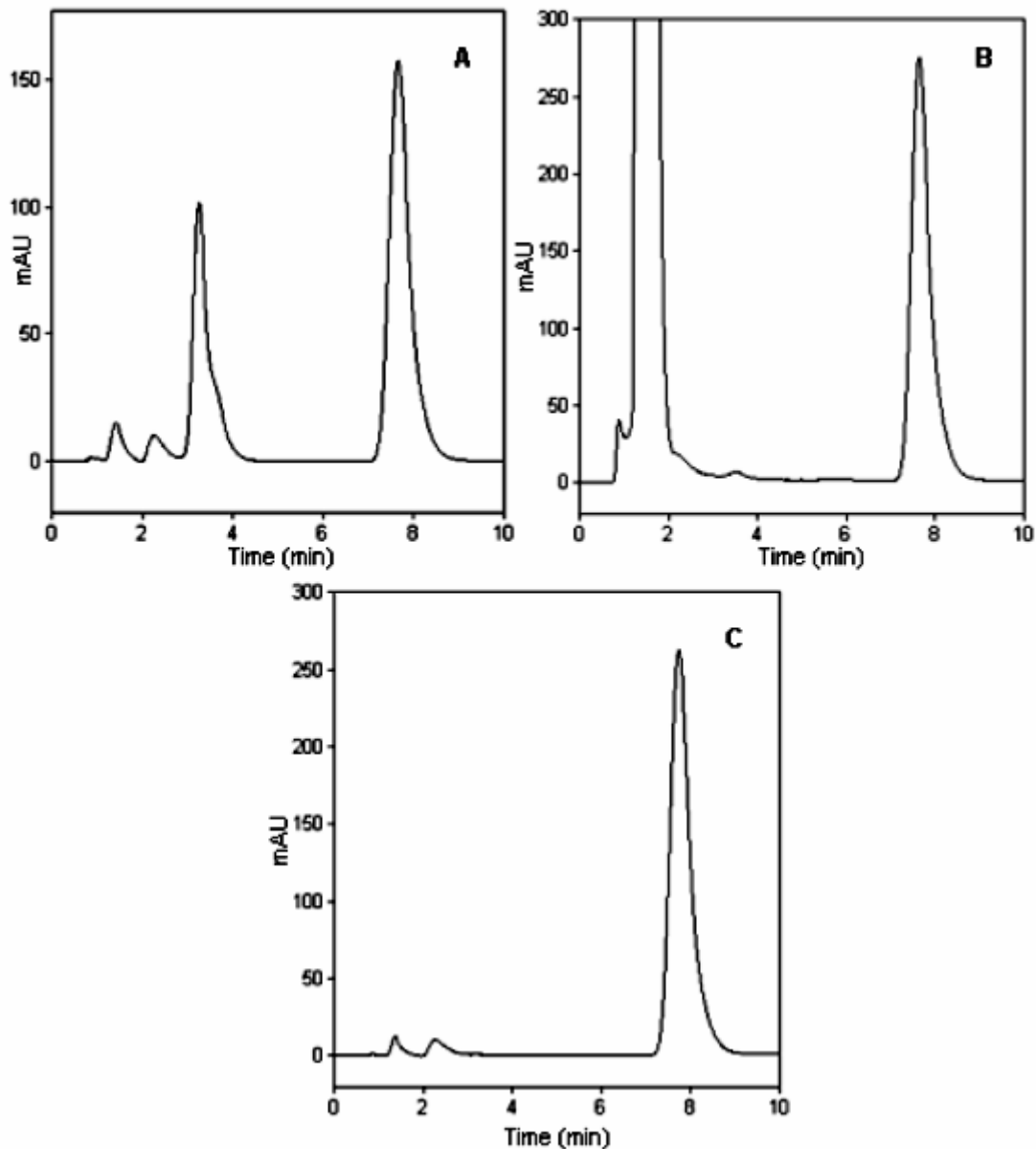


Figura 22 - Especificidade do método CLAE para o RTV matéria-prima: cromatogramas dos potenciais produtos de degradação. (A) degradação térmica (80 °C), (B) teste de oxidação (H₂O₂ 30%, V/V) e (C) fotólise (UV $\lambda=352$ nm) por 24 horas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 μ m), pré-coluna Phenomenex[®], temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20 μ l.

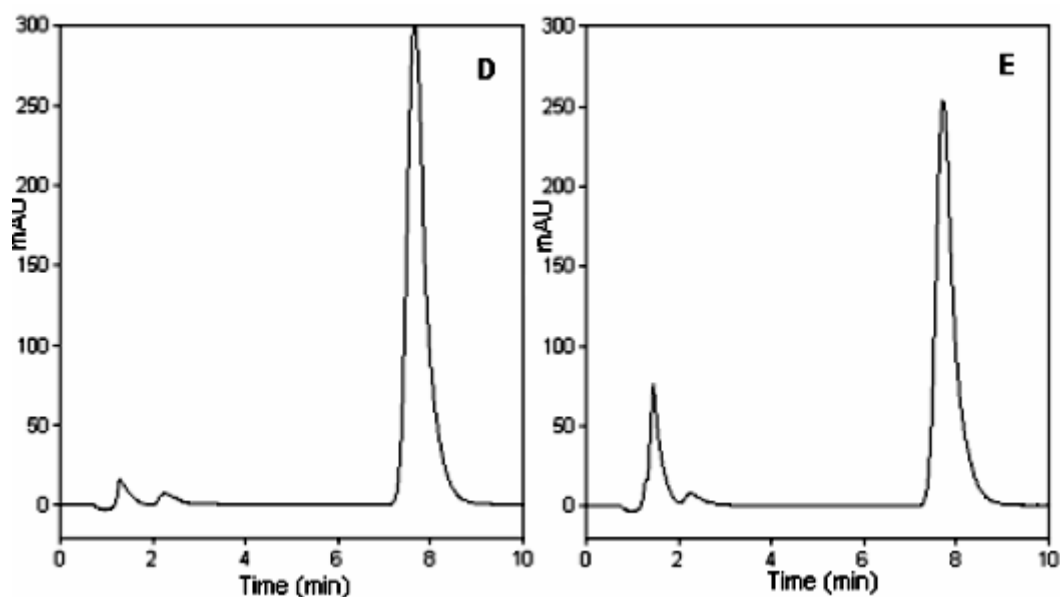


Figura 23 - Especificidade do método CLAE para o RTV matéria-prima: cromatogramas dos potenciais produtos de degradação. (D) hidrólise ácida (HCl 1 M), (E) hidrólise alcalina (NaOH 1 M) por 24 horas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 µm), pré-coluna Phenomenex[®], temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20µl.

5.2.2.1.2 Linearidade

5.2.2.1.2.1 Curva padrão

A partir de soluções de ritonavir SQR nas concentrações de 100,0 a 300,0 µg/ml em metanol, foram construídas três curvas padrão de acordo com o item 4.3.2.1.2.1.

A Tabela 10 apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão.

A curva padrão para o método CLAE foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 24 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Tabela 10 - Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do RTV por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Área*	Média das Áreas \pm e.p.m.	DPR
100,0	4274354	4317293 \pm 23058,3	0,92
	4353331		
	4324193		
150,0	6449758	6460730 \pm 21976,1	0,59
	6503075		
	6429358		
200,0	8598825	8612932 \pm 29019,5	0,58
	8668741		
	8571229		
250,0	10694910	10715939 \pm 53770,9	0,87
	10817789		
	10635117		
300,0	12910922	12871088 \pm 38146,0	0,51
	12907520		
	12794821		

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

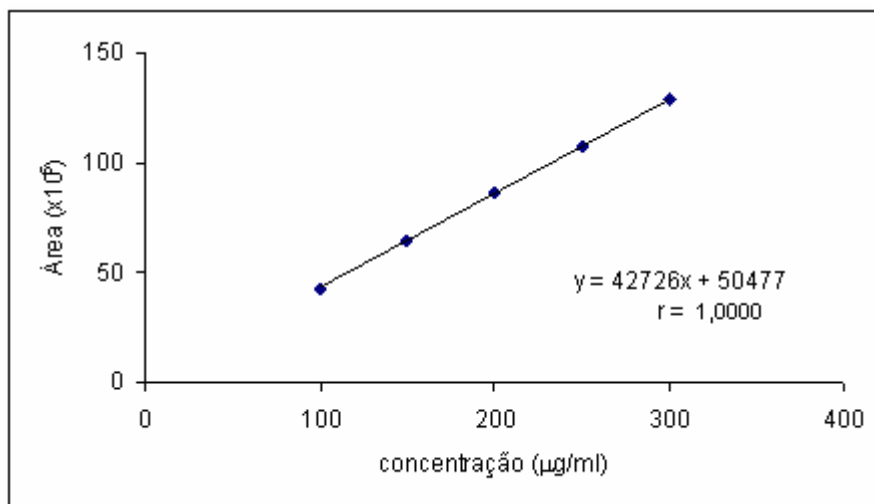
**Figura 24** - Representação gráfica da curva padrão média do RTV para CLAE.

Tabela 11 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do RTV por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	136912540103655	34228135025914	9196,39*	3,48
regressão linear	1	136910745789201	136910745789201	36785,06*	4,96
desvio da linearidade	3	1794314454	598104818	0,16	3,71
DENTRO (resíduo)	10	37219113990	3721911399		
Total	14				

* Significativo para $p < 0,05$.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por CLAE (Tabela 11) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ($r = 1,0000$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do fármaco.

5.2.2.1.3 Precisão

Tabela 12 - Resultados obtidos em três diferentes dias na quantificação das amostras de RTV por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias.

	Teor (%) das soluções de RTV (200 µg/ml)*						Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
dia I	103,46	101,58	101,52	101,43	101,74	102,34	102,01 ± 0,32	0,76
dia II	101,17	100,86	101,06	100,70	100,45	101,77	101,00 ± 0,19	0,45
dia III	102,37	102,24	102,34	101,33	101,58	101,77	101,94 ± 0,18	0,43
Teor médio interdias (%)							101,65	
DPR							0,71	

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

A determinação do teor da matéria-prima do ritonavir através de CLAE foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.1.3. Os resultados encontram-se na Tabela 12 e os valores dos DPR para a precisão intra e interdias indicam que o método é preciso.

5.2.2.1.4 Exatidão

A exatidão do método CLAE para a determinação quantitativa do teor da matéria-prima do ritonavir foi inferida dentro da faixa específica onde o procedimento será empregado (100,0 a 300,0 µg/ml), a partir do estabelecimento da precisão, linearidade e especificidade do mesmo, de acordo com as normas estabelecidas pelo ICH Q2B (1996).

5.3 Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do ritonavir

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos na determinação do ritonavir matéria-prima através dos métodos desenvolvidos por UV e CLAE.

Tabela 13 - Resultados obtidos na determinação do RTV por UV e CLAE

	UV (n = 18)	CLAE (n = 18)
Teor médio (%)	102,1	101,7
DPR	1,07	0,71

A avaliação estatística, através do Teste t de *Student*, das determinações do ritonavir matéria-prima através dos métodos desenvolvidos por UV e CLAE está demonstrada na Tabela 14.

O Teste t de *Student* foi o tratamento estatístico aplicado para a comparação entre os resultados apresentados pelos métodos analíticos quantitativos de espectrofotometria na região do UV e CLAE, utilizando-se os valores obtidos nos respectivos testes de precisão, apresentados nos itens 5.2.1.1.2 (Tabela 9) e 5.2.2.1.3 (Tabela 12).

Tabela 14 - Teste t de *Student* (Microsoft Excel 2003), presumindo variâncias equivalentes, para os valores obtidos na determinação do RTV por UV e CLAE.

	Variável 1	Variável 2
Média	101,65	102,14
Variância	0,519	1,185
Observações	18	18
Variância agrupada	0,85235	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	-1,5888	
P(T<=t) bi-caudal	0,12135	
t crítico bi-caudal	2,03224	

O resultado do Teste t de *Student* demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos desenvolvidos ($|t| = 1,5888$). Deste modo, os métodos UV e CLAE podem ser considerados equivalentes na determinação quantitativa do teor da matéria-prima do ritonavir, considerando-se que a amostra seja íntegra, visto que, o método UV não apresentou especificidade adequada para o fármaco em amostras submetidas à degradação forçada.

5.4 Análise quantitativa do produto acabado

5.4.1 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)

Este método apresenta propriedades e características que o tornam muito útil na análise de fármacos em produtos farmacêuticos como comprimidos, pastilhas, cremes, entre outros, sem a necessidade de separações prévias. Trata-se de um método alternativo menos dispendioso e também eficiente se comparado ao método por CLAE, mostrando-se preciso, sensível, seletivo, reprodutivo e de baixo custo (PASCHOAL *et al.*, 2003).

A diferenciação não aumenta o conteúdo de informação do espectro original, mas, geralmente, proporciona perfil característico, em que mudanças sutis de inclinação e curvatura se tornam mais evidentes. A supressão de bandas largas, o realce das bandas estreitas ou a resolução de um “ombro” para uma banda, facilitam a caracterização de um composto e eliminam a deformação da curva causada pela presença de substâncias interferentes. Desta forma, ocorre a individualização dos constituintes de misturas complexas e a eliminação da interferência de excipientes e de produtos de degradação (TALSKY *et al.*, 1978; HACKMANN *et al.*, 1991; PASCHOAL *et al.*, 2003).

A espectrofotometria derivada consiste na representação das derivadas da absorvância em relação ao comprimento de onda, em função do comprimento de onda. A diferenciação da Lei de Lambert-Beer permite obter as equações I, II e III, que mostram que as derivadas $d^n A/d\lambda^n$ são sempre proporcionais às concentrações do analito, sendo as aplicações analíticas baseadas neste fato (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

$$dA/d\lambda = c \cdot b \cdot (d\varepsilon/d\lambda) \quad (I)$$

$$d^2A/d\lambda^2 = c \cdot b \cdot (d^2\varepsilon/d\lambda^2) \quad (II)$$

$$d^n A/d\lambda^n = c \cdot b \cdot (d^n \varepsilon/d\lambda^n) \quad (III)$$

A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que, usualmente, verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem da derivação (O'HAVER e BEGLEY, 1981; ROJAS *et al.*, 1988; ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

A sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos fatores instrumentais e da forma de medida do sinal (método da tangente, pico-pico ou zero-pico), como também das características do espectro de absorção original (ordem zero). No presente trabalho utilizou-se o método do ponto de anulação (*zero crossing*), implícito ao método zero-pico, em que a medição do valor absoluto da amplitude da derivada de uma curva composta (soma da absorção de mais de uma substância), ocorre em comprimento de onda correspondente ao ponto de anulação da derivada do interferente (TALSKY *et al.*, 1978; HACKMANN *et al.*, 1991; PASCHOAL *et al.*, 2003).

De acordo com a literatura (LÓPEZ DE ALDA *et al.*, 1996; OUANÊS *et al.*, 1998; VEGA e SOLÁ, 2001; HASAN *et al.*, 2002; TORAL *et al.*, 2002; TRABELSI *et al.*, 2002; MORELLI, 2003; MABROUK *et al.*, 2003; ERK, 2003; SHEHATA *et al.*, 2004; KARPINSKA e SZOSTAK, 2005; AFKHAMI e BAHRAM, 2005 e BUSARANON *et al.*, 2005) o método espectrofotométrico derivativo (UV-D) é apresentado para determinação simultânea de fármacos em medicamentos, visando à eliminação da interferência de excipientes da formulação ou dos produtos de degradação.

5.4.1.1 Validação do método UV-D para a forma farmacêutica cápsula

5.4.1.1.1 Especificidade

Testes preliminares, utilizando soluções de ritonavir SQR (20 µg/ml) e mistura dos excipientes das cápsulas, foram realizados para selecionar a

ordem de derivação (UV-Dⁿ) mais conveniente, o comprimento de onda analítico (λ) mais adequado, o delta lambda ($\Delta\lambda$) com a melhor relação sinal/ruído e o fator de escala em que seriam registradas as derivadas. A linha de base foi corrigida para o solvente utilizado e os espectros da derivada segunda foram calculados e visualizados a partir de seus espectros de ordem zero utilizando-se o programa do equipamento.

A partir da avaliação dos espectros ilustrados (Figura 25) foi confirmada a especificidade para o fármaco frente aos excipientes, o que tornou possível a quantificação do ritonavir na forma farmacêutica cápsula.

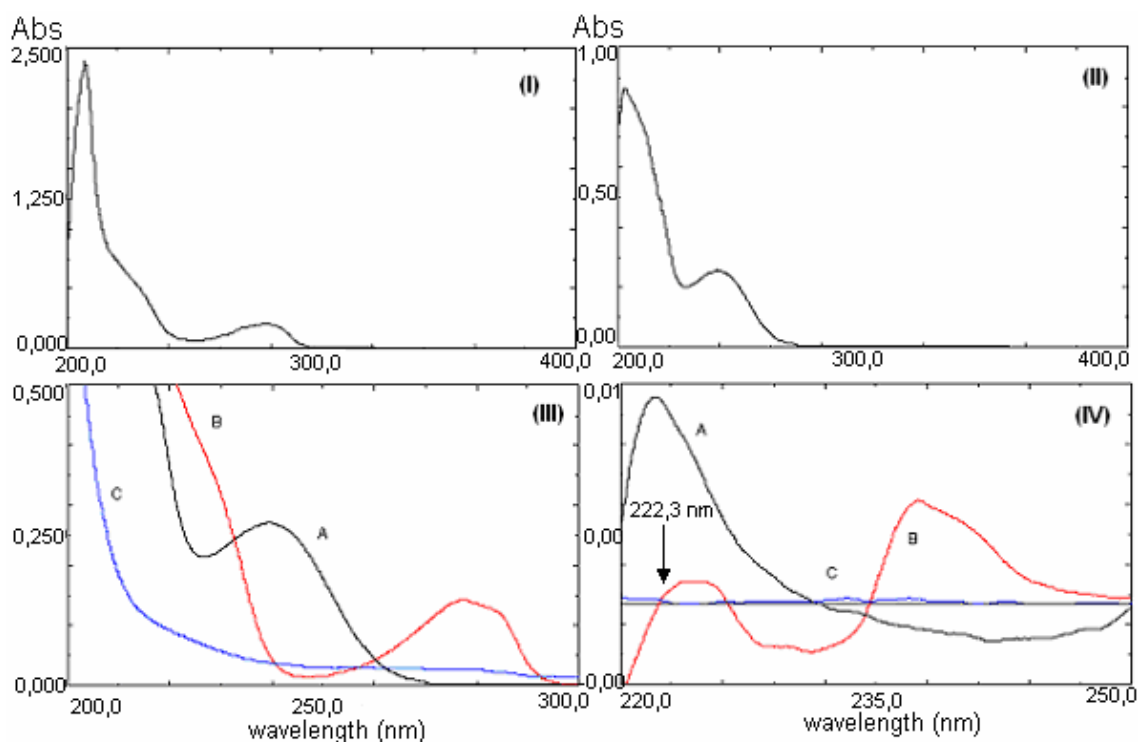


Figura 25 - Espectros na região do UV: ordem zero (I, II e III), 2ª derivada (IV). I: solução de excipientes (BHT, óleo de rícino, ácido oléico e etanol) em metanol. II: solução de ritonavir SQR em metanol (20µg/ml). III e IV: (A) ritonavir SQR, (B) BHT, (C) óleo de rícino.

O perfil do espectro da mistura de excipientes mostra que a interferência das cápsulas ocorre principalmente devido à intensa absorção do BHT, apesar de sua baixa concentração na formulação. A solução isolada do ácido oléico não foi testada devido à sua estrutura química (sem grupo cromóforo) não apresentar absorção significativa na região do UV. Na derivada segunda, em 222,3 nm, o espectro do BHT e do óleo de rícino têm absorvância praticamente nula, o que permite a determinação quantitativa do ritonavir na presença destes excipientes.

O método desenvolvido foi testado na determinação quantitativa do ritonavir em misturas com diferentes proporções de excipientes (Tabela 15).

Tabela 15 -. Resultado do teste de especificidade do método UV-D²_{λ=222,3 nm} para determinação do ritonavir SQR na presença dos excipientes.

RTV (µg/ml)	excipientes (µg/ml)**	Absorvância Média*	DPR	RTV Recup. (µg/ml)	Erro Relativo (%)
20,0	0	0,3374	0,2	22,24	
20,0	10,0	0,3365	0,6	22,18	-0,3
20,0	15,0	0,3395	1,6	22,38	0,6
20,0	20,0	0,3359	1,4	22,15	-0,4
20,0	25,0	0,3367	1,7	22,20	-0,2
20,0	30,0	0,3382	1,5	22,29	0,2
	Média total	0,3374			
	DPR	0,4			

* Média de três determinações para cada proporção de excipientes testada.

** Concentração de excipientes proporcional a soluções da cápsula contendo de 0 a 30 µg/ml de ritonavir.

DPR – desvio padrão relativo

A derivação à segunda ordem do espectro UV das soluções de ritonavir SQR, das cápsulas e de sua mistura, confirma a eliminação da influência da absorção dos excipientes da formulação a 222,3 nm (Figura 26).

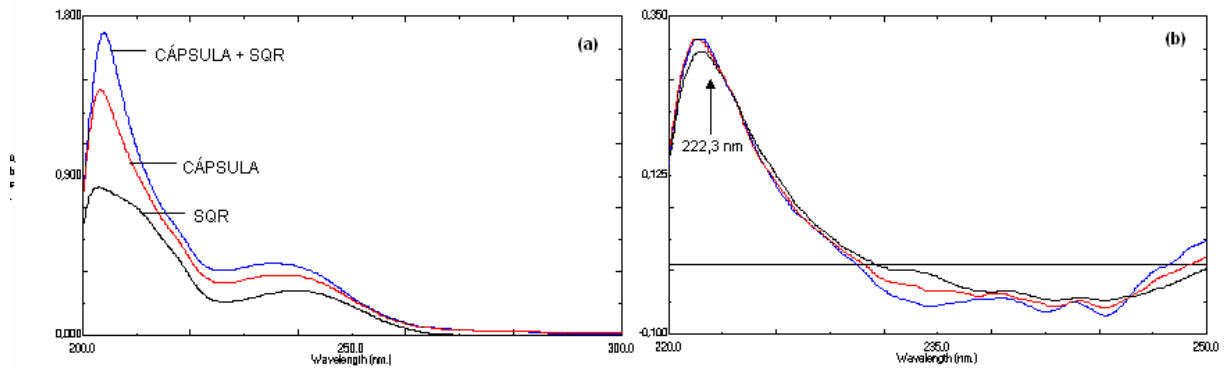


Figura 26 - (a) Espectro UV-Ordem Zero. (b) Espectro UV-D².

5.4.1.1.2 Linearidade

5.4.1.1.2.1 Curva padrão

A partir de soluções de ritonavir SQR nas concentrações de 10,0 a 30,0 µg/ml em metanol (Figura 27), foram construídas três curvas padrão de acordo com o item 4.4.1.1.2.1.

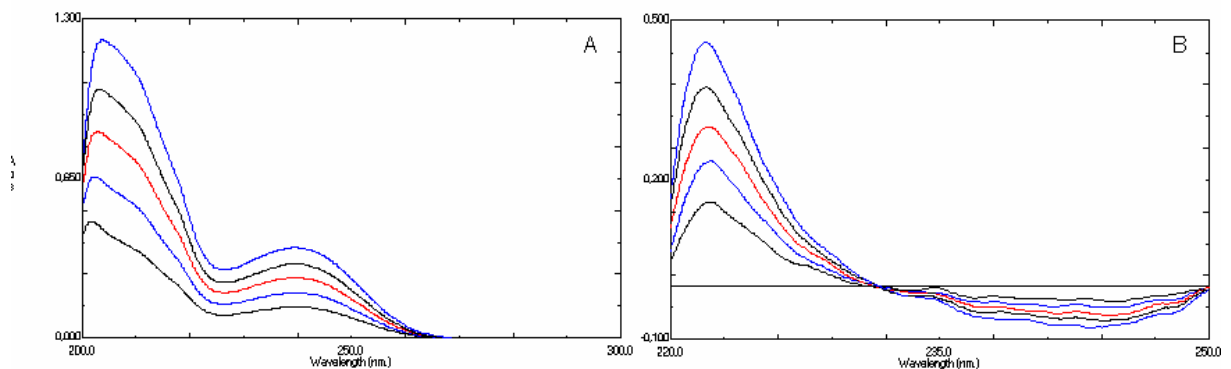


Figura 27 - (A) Espectro UV-Ordem Zero / (B) Espectro UV-D² para soluções de ritonavir SQR de 10 a 30 µg/ml em metanol.

A Tabela 16 apresenta os valores de absorvância obtidos para cada concentração da curva padrão. A curva padrão para o método UV-D² a 222,3 nm foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 28 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Tabela 16 - Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do ritonavir SQR por UV-D²_{λ=222,3 nm}.

Concentração (µg/ml)	Absorvância*	Absorvância média ±	
		e.p.m.	DPR
10,0	0,1498	0,1508 ± 0,0008	0,9
	0,1502		
	0,1524		
15,0	0,2222	0,2204 ± 0,0016	1,2
	0,2173		
	0,2218		
20,0	0,2878	0,2926 ± 0,0034	2,0
	0,2992		
	0,2908		
25,0	0,3664	0,3673 ± 0,0012	0,6
	0,3658		
	0,3696		
30,0	0,4483	0,4483 ± 0,0045	1,7
	0,4405		
	0,4560		

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV-D² a 222,3 nm (Tabela 17) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ($r = 0,9995$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as absorvâncias e a concentração do fármaco.

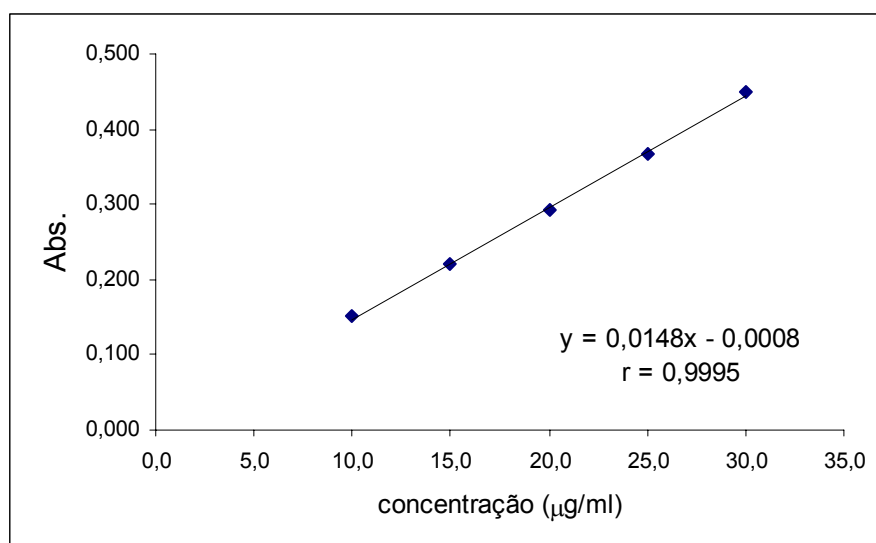


Figura 28 - Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir SQR (UV-D²).

Tabela 17 - ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do ritonavir por UV-D²_{λ=222,3 nm}.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,16521	0,04130	1902,95*	3,48
regressão linear	1	0,16507	0,16507	7605,30*	4,96
desvio da linearidade	3	0,00014	0,00005	2,17	3,71
DENTRO (resíduo)	10	0,00022	0,00002		
Total	14				

* Significativo para $p < 0,05$.

5.4.1.1.3 Precisão

A determinação do teor de ritonavir nas cápsulas através da espectrofotometria UV-D² a 222,3 nm foi realizada conforme descrito em *Material e Métodos* no item 4.4.1.1.3. Os resultados encontram-se na Tabela 18 e os valores dos DPR para a precisão intra e interdias indicam que o método é preciso.

Tabela 18 - Resultados obtidos em quatro diferentes dias na quantificação das amostras de ritonavir cápsulas por espectrofotometria UV-D²_{λ=222,3 nm} para avaliação da precisão intra e interdias.

	Teor (%) das soluções de ritonavir cápsulas (20 µg/ml)*						Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
dia I	100,9	100,5	101,4	99,9	100,9	100,6	100,7 ± 0,21	0,50
dia II	103,3	101,0	99,9	102,1	100,3	102,3	101,5 ± 0,53	1,29
dia III	101,6	101,2	97,2	99,6	100,9	101,7	100,4 ± 0,70	1,72
dia IV	102,7	102,1	98,8	99,4	98,8	101,5	100,6 ± 0,71	1,74
Teor médio interdias (%)							100,8	
DPR							1,38	

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.4.1.1.4 Exatidão

5.4.1.1.4.1 Teste de recuperação

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do ritonavir SQR de acordo com a descrição do item 4.4.1.1.4.1. A recuperação média foi de 99,8% e os resultados encontram-se na Tabela 19.

O método espectrofotométrico derivativo UV-D² validado para análise do ritonavir em cápsulas mostrou-se simples e rápido, tornando-se uma alternativa quando métodos instrumentais mais avançados (ex.: CLAE) não estão à disposição na rotina de análises do laboratório ou no controle de qualidade em processo (lote a lote) na indústria farmacêutica.

Tabela 19 -. Resultados obtidos para o teste de recuperação do ritonavir SQR por espectrofotometria UV-D²_{λ=222,3 nm}.

	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)	Recuperação (%)	Média (%)
SAF ₁	5,0	5,35	100,7	100,2
		5,54	99,5	
		5,07	98,8	
SAF ₂	10,0	10,47	98,7	99,2
		10,91	98,0	
		10,38	101,1	
SAF ₃	15,0	16,09	101,1	100,1
		16,68	99,9	
		15,44	100,3	
Recuperação média (%) = 99,8 (98,0 - 101,1), DPR = 0,55				

5.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A escolha dos parâmetros utilizados para a determinação do ritonavir em cápsulas foram os mesmos utilizados na determinação da matéria-prima do fármaco conforme descrito no item 5.2.2.

O tempo de retenção obtido para o ritonavir foi, aproximadamente, de 7,8 minutos. Os cromatogramas obtidos das soluções de ritonavir SQR e das cápsulas (Norvir[®]) a 200 µg/ml em metanol, de acordo com as condições descritas em *Material e Métodos* no item 4.4.2 são apresentados em *Identificação* no item 5.1.4.4 (Figura 14).

5.4.2.1 Validação do método CLAE para a forma farmacêutica cápsula

5.4.2.1.1 Especificidade

A avaliação do método de CLAE quanto a sua especificidade para o ritonavir foi realizada frente aos excipientes da formulação e aos potenciais

produtos de degradação térmica, fotólise, hidrólise ácida, alcalina e oxidação. O procedimento utilizado está descrito no item 4.4.2.1.1.

A Figura 29 apresenta os cromatogramas das soluções de ritonavir SQR e da mistura de excipientes (placebo). O resultado comprova ausência de qualquer pico interferente no tempo de retenção do fármaco analisado.

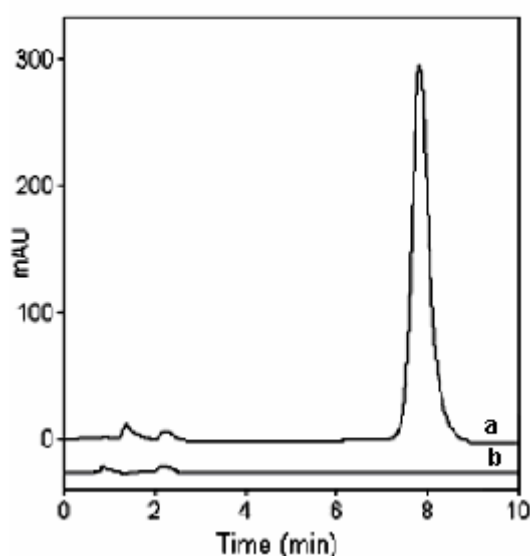


Figura 29 - Especificidade: (a) cromatograma da solução de ritonavir SQR (200 µg/ml), (b) cromatograma da solução de excipientes (placebo). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 µm), pré-coluna Phenomenex[®], temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20µl.

Dois potenciais produtos de degradação foram observados na solução submetida à degradação térmica (80 °C). Estes produtos apresentaram tempo de retenção de 3,33 e 3,75 minutos (Figura 30-A). O estresse sob condição oxidante (H₂O₂ 30%, V/V) mostrou, pelo menos, um potencial produto de degradação com tempo de retenção de 3,62 minutos. O cromatograma apresentou dois picos extras, possivelmente devidos ao conservante do peróxido de hidrogênio, a 0,88 e 1,38 minutos (Figura 30-B).

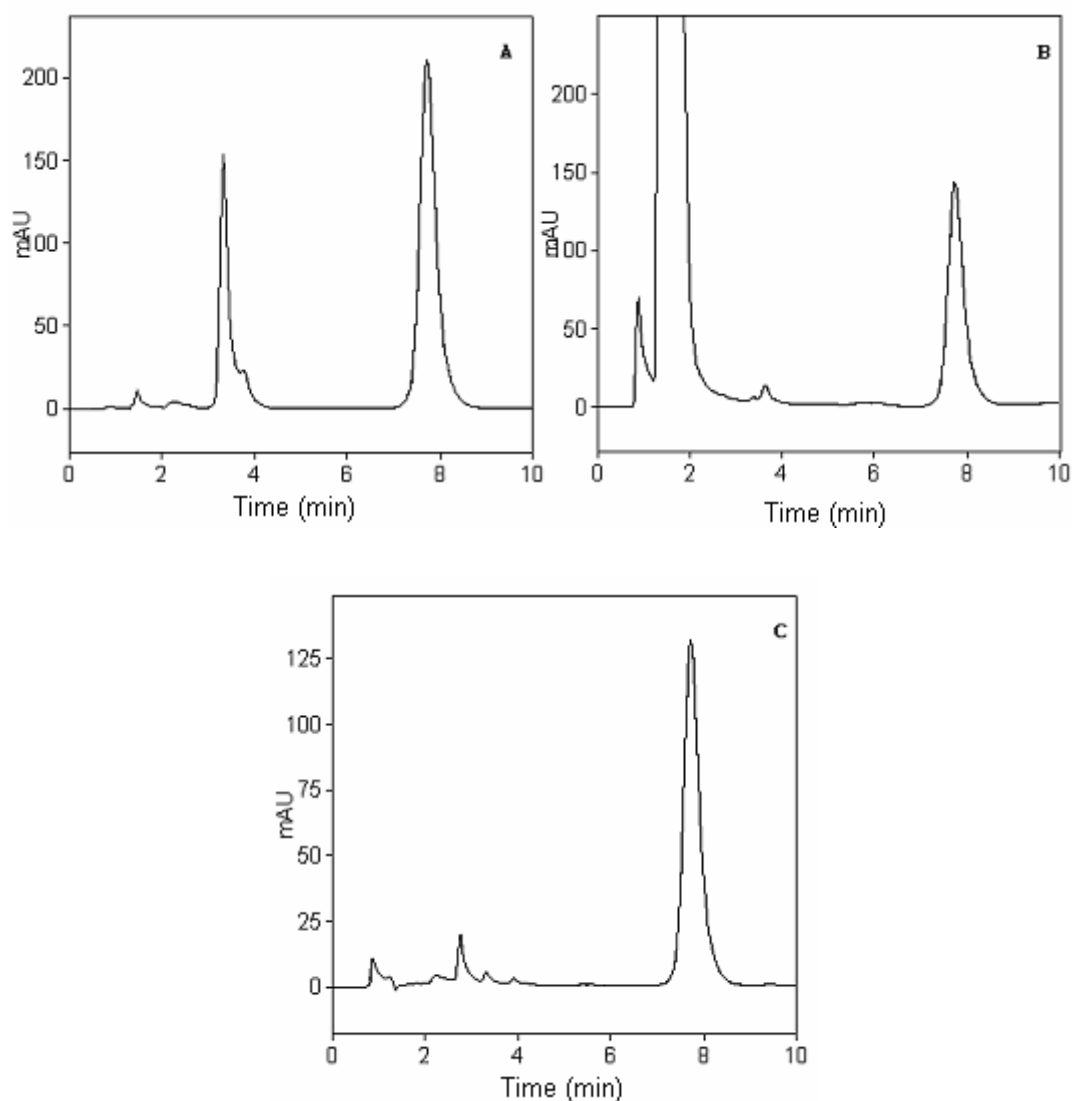


Figura 30 - Especificidade: cromatogramas dos potenciais produtos de degradação. (A) degradação térmica (80 °C), (B) teste de oxidação (H₂O₂ 30%, V/V) e (C) fotólise (UV λ =352 nm) por 24 horas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 μ m), pré-coluna Phenomenex[®], temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20 μ l.

O teste de fotólise (352 nm) gerou três potenciais produtos de degradação a 2,76; 3,31 e 3,90 minutos (Figura 30-C). As hidrólises ácida (HCl 1 M) e alcalina (NaOH 1 M) apresentaram picos de degradação com o mesmo tempo de retenção a 1,46 minutos (Figura 31).

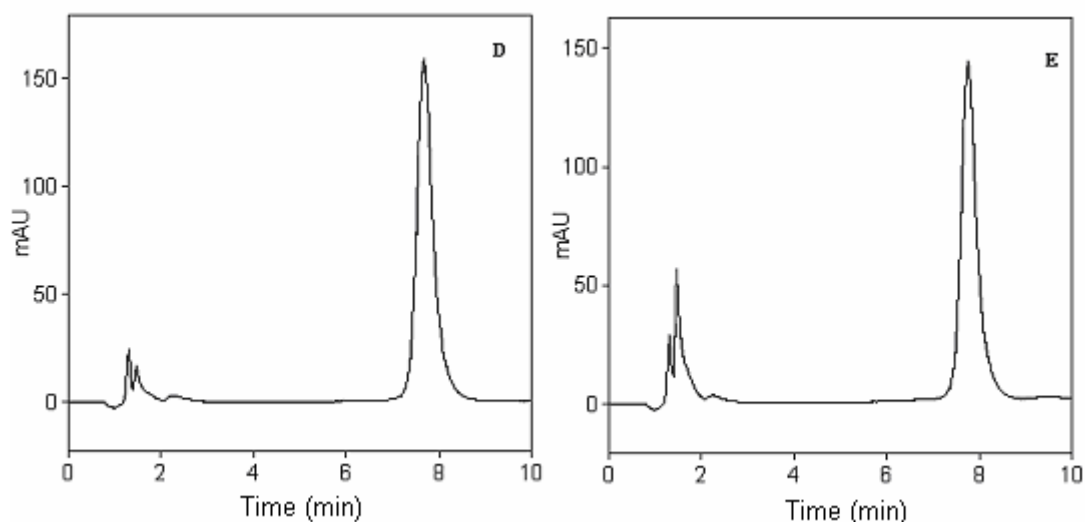


Figura 31 - Especificidade: cromatogramas dos potenciais produtos de degradação. (D) hidrólise ácida (HCl 1 M), (E) hidrólise alcalina (NaOH 1 M) por 24 horas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 µm), pré-coluna Phenomenex®, temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20 µl.

O DAD comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do ritonavir após os testes de degradação acelerada. Este resultado indica que o método por CLAE é seletivo para o fármaco a ser determinado na forma farmacêutica cápsula.

5.4.2.1.2 Linearidade

5.4.2.1.2.1 Curva padrão

A partir de soluções de ritonavir SQR nas concentrações de 100,0 a 300,0 µg/ml em fase-móvel, foram construídas três curvas padrão de acordo com o item 4.4.2.1.2.1.

A Tabela 20 apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão.

A curva padrão para o método CLAE foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 32 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Tabela 20 - Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do ritonavir SQR por CLAE.

Concentração (µg/ml)	Área*	Média das Áreas ± e.p.m.	DPR
100,0	4065914,33 3997202,67 4100549,33	4054555,44 ± 30369,4	1,3
150,0	6011823,33 6064030,67 6109921,00	6061925,00 ± 28337,9	0,8
200,0	8084315,67 8083235,33 7949126,67	8038892,56 ± 44884,0	1,0
250,0	9996282,00 9984775,33 9744199,67	9908419,00 ± 82176,8	1,4
300,0	12030827,67 11998648,00 11831593,00	11953689,56 ± 61751,0	0,9

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por CLAE (Tabela 21) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ($r = 0,9999$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do fármaco.

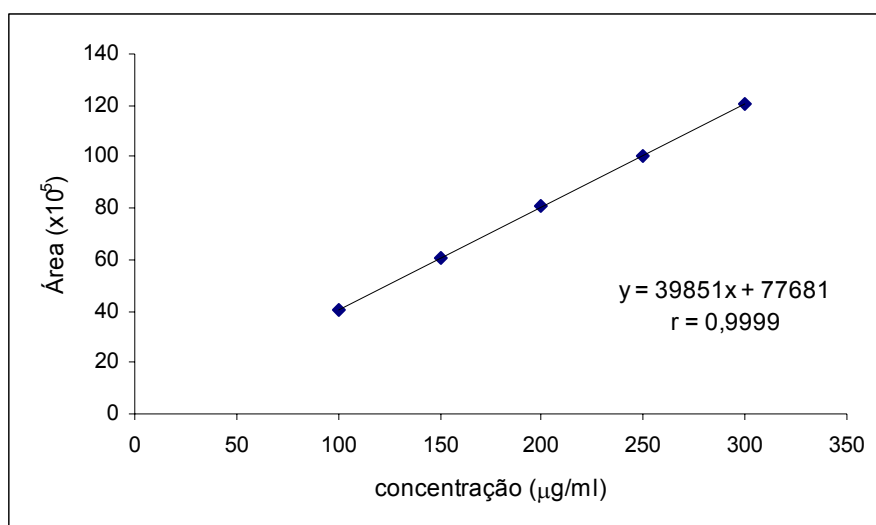


Figura 32 - Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir SQR (CLAE).

Tabela 21 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do ritonavir por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE regressão linear	1	119109302956731	119109302956731	33723,41*	4,96
dentro da linearidade	3	6474375852	2158125284	0,61	3,71
DENTRO (resíduo)	10	35319468071	3531946807		
Total	14				

* Significativo para $p < 0,05$.

5.4.2.1.3 Precisão

A determinação do teor de ritonavir nas cápsulas através de CLAE foi realizada conforme descrito em *Material e Métodos* no item 4.4.2.1.3. Os resultados encontram-se nas Tabela 22 e os valores dos DPR para a precisão intra e interdias indicam que o método é preciso.

Tabela 22 - Resultados obtidos em quatro diferentes dias na quantificação das amostras de ritonavir cápsulas por CLAE para avaliação da precisão intra e interdias.

	Teor (%) das soluções de ritonavir cápsulas (200 µg/ml)*						Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
dia I	100,7	100,4	100,8	99,9	99,7	100,1	100,3 ± 0,19	0,45
dia II	100,6	100,6	100,5	101,5	99,9	99,6	100,4 ± 0,26	0,64
dia III	100,7	100,4	100,8	99,9	99,7	100,1	100,3 ± 0,18	0,45
dia IV	100,4	99,5	99,7	99,7	101,5	100,9	100,3 ± 0,32	0,80
Teor médio interdias (%)							100,3	
DPR							0,57	

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.4.2.1.4 Exatidão

5.4.2.1.4.1 Teste de recuperação

Tabela 23 - Resultados obtidos para o teste de recuperação do ritonavir SQR por CLAE.

	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)	Recuperação (%)	Média (%)
SAF ₁	20,0	21,8	101,5	101,1
		20,1	100,0	
		22,0	102,0	
SAF ₂	40,0	43,0	100,2	99,4
		39,9	99,0	
		42,7	98,9	
SAF ₃	60,0	64,4	99,9	99,8
		60,7	100,6	
		64,0	98,8	
Recuperação média (%) = 100,1 (98,8 – 102,0), DPR = 0,89				

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do ritonavir SQR de acordo com a descrição do item 4.4.2.1.4.1. A recuperação média foi de 100,1% e os resultados encontram-se na Tabela 23.

5.4.2.1.5 Robustez

A avaliação da robustez do método de CLAE foi realizada de acordo com o item 4.4.2.1.5. Variações típicas nas condições analíticas foram testadas. A proporção da fase móvel foi modificada com o acréscimo de solvente orgânico (70% metanol) mantendo-se os demais parâmetros do método. Coluna analítica Shim-Pack[®] CLC-C₈ (M) - Shimadzu (150x4,6 mm, 5 µm) foi testada utilizando-se a fase móvel original. A influência da variação de pH da fase móvel não foi avaliada na robustez do método por ter sido anteriormente testada em ampla faixa de pH durante a seleção das condições cromatográficas com resultados similares para os parâmetros do pico do fármaco.

A análise cromatográfica das diferentes condições analíticas foi realizada separadamente. Os parâmetros cromatográficos do pico do ritonavir apresentaram poucas alterações. O aumento na proporção de metanol reduziu o tempo de retenção, mas, como consequência, a assimetria aumentou e o número de pratos teóricos apresentou pequena redução (Figura 33). A coluna analítica Shimadzu aumentou a assimetria e o tempo de retenção, embora o número de pratos teóricos tenha aumentado, mostrando melhor eficiência da coluna (Figura 34). A avaliação da robustez do método é dada na Tabela 24 e garante a validade do procedimento analítico sempre que utilizado, pois as alterações na fase móvel e na coluna analítica não influenciaram a determinação quantitativa do ritonavir.

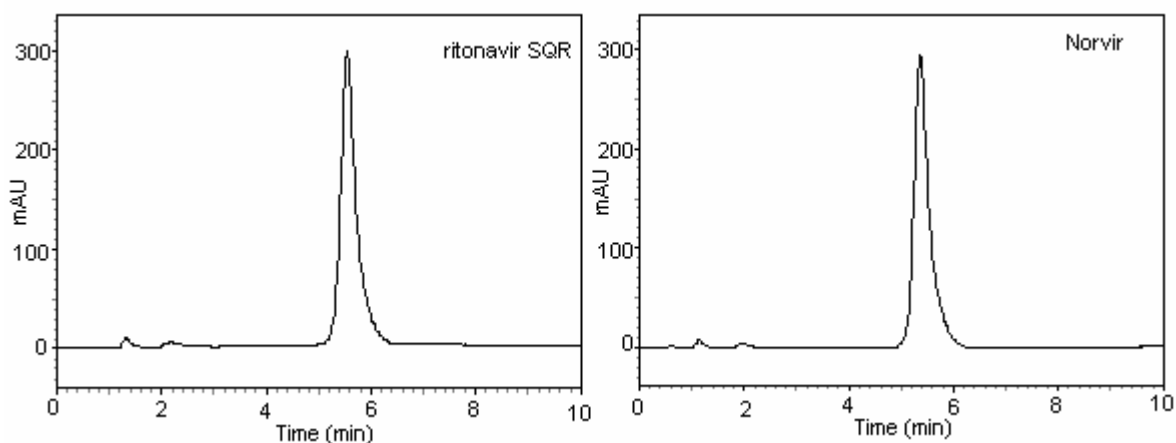


Figura 33 - Avaliação da robustez do método CLAE para determinação do ritonavir. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₈ Merck (125x4,0 mm, 5 μm), pré-coluna Phenomenex[®], temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20 μl.

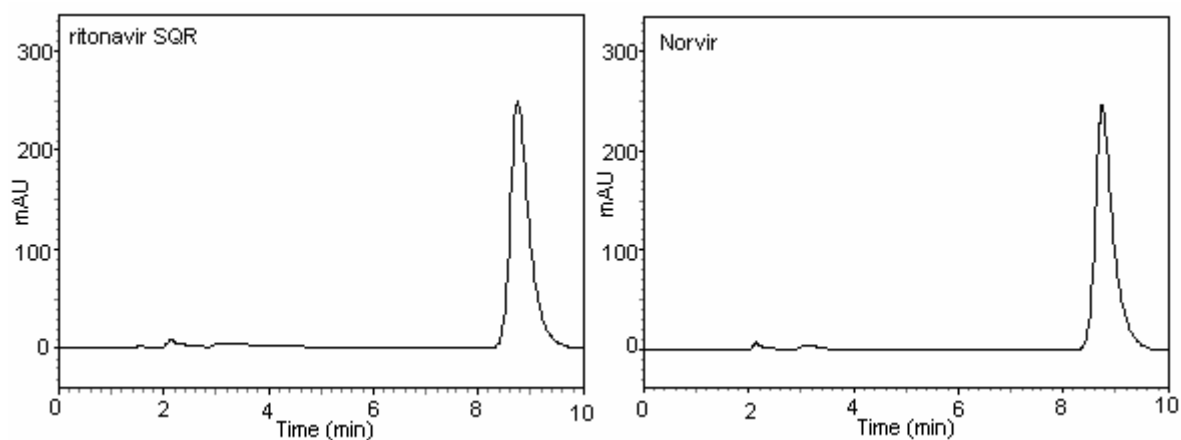


Figura 34 - Avaliação da robustez do método CLAE para determinação do ritonavir. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (67:33, V/V), fluxo de 1 ml/minuto, coluna Shim-Pack[®] CLC-C₈ (M) (150x4,6 mm, 5 μm) Shimadzu, pré-coluna Phenomenex[®], temperatura de análise 20-25 °C, detecção em 210 nm, volume de injeção 20 μl.

Tabela 24 - Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do ritonavir em solução metanólica a 200 µg/ml.

	Tempo de retenção (min)	Número de pratos teóricos ($N > 2000$) ^b	Assimetria ($T \leq 2$) ^b	Área Absoluta	Concentração média (µg/ml)
Método Proposto ^a	7,83	2101	1,31	8309130	196,0
	7,83	2094	1,31	8315366	
	7,82	2099	1,31	8335159	
Fase móvel: metanol/água (70:30, V/V)	5,58	1962	1,48	8327971	197,0
	5,57	1964	1,49	8309764	
	5,58	1967	1,48	8319495	
Coluna Analítica Shimadzu c8 (150X4,6 mm; 5 µm)	8,65	3329	1,49	8332537	196,7
	8,62	3335	1,49	8332997	
	8,64	3284	1,49	8334968	

^aFase móvel: metanol/água (67:33, V/V) e pH 6,0, coluna analítica C8 (125X4,6 mm; 5 µm) Merck

^bRecomendações CDER (1994)

5.5 Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do ritonavir em cápsulas

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas através dos métodos desenvolvidos por UV-D² e CLAE.

Tabela 25 - Resultados obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas por UV-D² e CLAE

	UV-D ² (n = 24)	CLAE (n = 24)
Teor médio (%)	100,8	100,3
DPR	1,38	0,57

A avaliação estatística, através do Teste t de *Student*, das determinações do ritonavir em cápsulas através dos métodos desenvolvidos por UV-D² e CLAE está demonstrada na Tabela 26.

O Teste t de *Student* foi o tratamento estatístico aplicado para a comparação entre os resultados apresentados pelos métodos analíticos

quantitativos de espectrofotometria na região do UV-D² e CLAE, utilizando-se os valores obtidos nos respectivos testes de precisão, apresentados nos itens 5.4.1.1.3 (Tabela 18) e 5.4.2.1.3 (Tabela 22).

Tabela 26 - Teste t de *Student* (Microsoft Excel 2003), presumindo variâncias equivalentes, para os valores obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas por UV-D² e CLAE.

	Variável 1	Variável 2
Média	100,7757	100,3164
Variância	1,953197	0,327543
Observações	24	24
Variância agrupada	1,14037	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	46	
Stat t	1,489676	
P(T<=t) bi-caudal	0,143135	
t crítico bi-caudal	2,012896	

O resultado do Teste t de *Student* demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos desenvolvidos ($t = 1,4897$). Deste modo, os métodos UV-D² e CLAE podem ser considerados equivalentes na determinação quantitativa do ritonavir em cápsulas.

5.6 Estudos preliminares de estabilidade para o ritonavir matéria-prima

Os medicamentos devem manter suas características de identidade, eficácia, potência, pureza e segurança desde sua produção e período em que se encontram no mercado até o momento de seu uso (NUDELMAN, 1975). A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes

farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005b).

Teste de estabilidade é o conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005b). O protocolo do estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas, quando for o caso. Deve-se avaliar, também, a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação, utilizando-se metodologia adequada e validada.

Estudos preliminares de estabilidade têm o objetivo de determinar quais os principais fatores que interferem no teor do fármaco, na toxicidade, na eficácia e nas características farmacotécnicas e organolépticas. Nestes testes submete-se o fármaco ou o produto farmacêutico a condições extremas de degradação, pois se pretende determinar os parâmetros que os degradam de forma eficaz (NUDELMAN, 1975). Os testes de estresse fornecem informações úteis sobre os potenciais mecanismos e produtos de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula do fármaco, assim como para validar métodos analíticos indicadores de estabilidade (ICH Q1A, 2003; BAKSHI e SINGH, 2002; KLICK *et al.*, 2005). No entanto, as condições experimentais devem ser realistas e conduzir à formação de produtos de degradação relevantes, não havendo necessidade de exceder a exposição do fármaco pelo período de três meses e/ou não os degradando mais que 5 a 15% (KLICK *et al.*, 2005).

A capacidade de separação e detecção do fármaco de seus potenciais produtos de degradação, mesmo em baixas concentrações, faz da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o método analítico indicador de estabilidade mais amplamente empregado, pois apresenta alta capacidade de resolução, sensibilidade e especificidade se comparado aos métodos convencionais de análise (BAKSHI e SINGH, 2002).

Não foram encontrados dados publicados relativos à estabilidade do ritonavir. Devido a isto, o estudo preliminar realizado neste trabalho procurou avaliar a estabilidade da matéria-prima no estado sólido submetendo-a a temperatura de 60 °C por 30 dias e sob lâmpada branca fluorescente fria por até 15 dias, condições extremas de processos como armazenamento e transporte.

5.6.1 Degradação térmica

Os resultados obtidos na determinação por CLAE após degradação térmica a 60 °C em tempo de zero a 30 dias encontram-se na Tabela 27. Os cromatogramas não apresentaram picos referentes a potenciais produtos de degradação nas condições estabelecidas para a avaliação da estabilidade térmica.

Tabela 27 - Valores experimentais obtidos na determinação do teor de ritonavir matéria-prima por CLAE para avaliação da estabilidade térmica a 60 °C.

Tempo (dias)	Teor (%) *	DPR
0	100,0	0,710
1	100,2	0,001
8	99,4	0,009
15	100,4	0,015
22	100,4	0,004
30	100,0	0,000

* Valor médio de soluções em duplicata, com duas determinações para cada solução.

A matéria-prima do ritonavir, após exposição à temperatura de 60 °C por período de até 30 dias, mostrou-se estável sem redução significativa do teor do fármaco na determinação por CLAE.

5.6.2 Fotólise

Os resultados obtidos na determinação por CLAE após exposição da matéria-prima à luz em tempo de zero a 15 dias encontram-se na Tabela 28. Os cromatogramas não apresentaram picos referentes a potenciais produtos de degradação nas condições estabelecidas para a avaliação da fotoestabilidade.

Tabela 28 - Valores experimentais obtidos na determinação do teor de ritonavir matéria-prima por CLAE para avaliação da fotoestabilidade.

Tempo (dias)	Teor (%) *	DPR
0	100,0	1,258
1	99,2	0,016
8	100,0	0,013
15	99,9	0,012

* Valor médio de soluções em duplicata, com duas determinações para cada solução.

A matéria-prima do ritonavir, após exposição à luz por período de até 15 dias, mostrou-se estável sem redução significativa do teor do fármaco na determinação por CLAE.

Os resultados do estudo preliminar de estabilidade indicam que a matéria-prima do ritonavir apresenta-se estável frente às condições estabelecidas neste trabalho e serve como orientação para avaliações complementares para a estabilidade da matéria-prima e do produto acabado.

6. CONCLUSÕES

-
- ✓ A avaliação dos caracteres físicos e da solubilidade da matéria-prima, assim como a determinação do ponto de fusão, a termoanálise e o poder rotatório específico permitiram a caracterização do fármaco.
 - ✓ A identificação da matéria-prima do ritonavir foi possível através das análises espectrofotométricas na região do IV e UV, e cromatográficas por CCD e CLAE.
 - ✓ A presença do fármaco na forma farmacêutica cápsula foi assegurada através da identificação do ritonavir pelos métodos desenvolvidos por CCD, CLAE e UV-D².
 - ✓ O método espectrofotométrico na região do IV permitiu caracterizar os polimorfos I e II do ritonavir, que apresentaram espectros diferenciados.
 - ✓ A perda por dessecação da matéria-prima analisada está de acordo com o preconizado no texto final da monografia do fármaco para inclusão na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005).
 - ✓ As fotomicrografias por MO e MEV tornaram possível a observação dos diferentes arranjos cristalinos para o ritonavir. Apesar dos cristais largos da forma I não terem se apresentado nitidamente, foi possível visualizar a diferença morfológica entre os polimorfos estudados, já que a forma II mostrou-se perfeitamente caracterizada com seus cristais afilados como agulhas.
 - ✓ Os difratogramas de raios X da matéria-prima e dos polimorfos I e II confirmaram a identidade da amostra de ritonavir, que apresenta padrão de difração idêntico ao polimorfo II, e comprovaram a presença de formas amorfas em todas as amostras analisadas.
 - ✓ O método desenvolvido por espectrofotometria na região do UV foi validado, demonstrando ser linear, preciso e exato para a análise quantitativa do ritonavir matéria-prima.

-
- ✓ O método espectrofotométrico na região do UV não apresentou especificidade na determinação do ritonavir na presença de seus potenciais produtos de degradação.
 - ✓ O método desenvolvido por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D²) foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, específico, preciso e exato para a análise quantitativa do ritonavir na forma farmacêutica cápsula.
 - ✓ O método desenvolvido por CLAE para a determinação quantitativa do ritonavir matéria-prima e na forma farmacêutica cápsula foi validado, demonstrando ser linear, específico, preciso, exato e robusto.
 - ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos CLAE / UV não demonstrou haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa da matéria-prima do ritonavir, nas condições estabelecidas.
 - ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos CLAE / UV-D² não demonstrou haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa do ritonavir nas cápsulas, nas condições estabelecidas.
 - ✓ O estudo preliminar de estabilidade térmica para a matéria-prima demonstrou que o ritonavir, exposto à temperatura e condições estabelecidas, permaneceu estável, de acordo com os resultados obtidos por CLAE, sem redução significativa no teor do fármaco e ausência de potenciais produtos de degradação.
 - ✓ O estudo preliminar de fotoestabilidade para a matéria-prima demonstrou que o ritonavir, exposto à lâmpada fluorescente fria e nas condições estabelecidas, permaneceu estável, de acordo com os resultados obtidos por CLAE, sem redução significativa no teor do fármaco e ausência de potenciais produtos de degradação.

7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT Laboratories. *NORVIR® (ritonavir capsules) Soft Gelatin (ritonavir oral solution)*. North Chicago. September, 2001. Disponível em <<http://www.norvir.com/pdf/norpi2a.PDF#patient>> Acesso em março de 2004.
- AFKHAMI, A.; BAHRAM, M. Mean centering of ratio spectra as a new spectrophotometric method for the analysis of binary and ternary mixtures. *Talanta*, v. 66, p. 712-720, 2005.
- ALTFELD, M.; WALKER, B.D. Acontecimentos imunológicos e virológicos durante uma infecção aguda pelo HIV. Setembro/2004. Disponível em <<http://hivmedicine.aidsportugal.com/acuteinf.htm>> Acesso em agosto de 2004.
- 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.
- BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: An extraordinary example of conformacional polymorphism. *Pharmaceutical Research*, v. 18(6), p. 859-866, 2001.
- BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.
- BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 agosto de 2005 (b).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Disponível em <<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD94061BAPTBRIE.htm>> Acesso em dezembro de 2005 (a).
- BRITAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharmaceutical Thechnology*. v. 2, p. 4-9, junho1998.
- BRITAIN, H.G.; BOGDANOWICH, S.J.; BUGAY, D.E.; DEVICENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A.W. Physical characterization of pharmaceutical solids. *Pharmaceutical Research*, v. 8(8), p. 963-973, 1991.
- BUDAVARI, S. *The Merck Index*. 12 ed. Rahway: Merck Research Laboratories, 1996. p. 1418-1419.
- BUSARANON, K.; SUNTORNSUK, W.; SUNTORNSUK, L. Comparison of UV spectrophotometric method and high performance liquid chromatography for the analysis of flunarizine and its application for the dissolution test. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 158-164, 2005.

CDER. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance>> Acesso em julho de 2004.

CHEMBURKAR, S.R.; BAUER, J.; DEMING, K.; SPIWEK, H.; PATEL, K.; MORRIS, J.; HENRY, R.; SPANTON, S.; DZIKI, W.; PORTER, W.; QUICK, J.; BAUER, P.; DONAUBAUER, J.; NARAYANAN, B.A.; SOLDANI, M.; RILEY, D.; McFARLAND, K. Dealing with Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development. *Organic Process Research & Development*. V. 4, p. 413-417, 2000.

CHEN, X.; KEMPF, D.J.; LI, L.; SHAM, H.L.; VASAVANONDA, S.; WIDEBURG, N.E.; SALDIVAR, A.; MARSH, K.C.; McDONALD, E.; NORBECK, D.W. Synthesis and SAR Studies of Potent HIV Protease Inhibitors Containing Novel Dimethylphenoxy Acetates as P₂ Ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. V. 13, p. 3657-3660, 2003.

CHI J.D.; JAYEWARDENE, A.L.; STONE, J.A.; MOTOYA, T.; AWEEKKA, F.T. Simultaneous determination of five HIV protease inhibitors nelfinavir, indinavir, ritonavir, saquinavir and amprenavir in human plasma by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 30, p. 675-684, 2002.

CITATEC/EURACHEM. *Guia para Qualidade em Química Analítica*. UNESCO/ANVISA. edição 2002.

CLAS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 2(8), p. 311-320, 1999.

CLURCZAK, E.W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. *Pharmaceutical Thechnology*. V. 2, p. 22-28, 1998.

COMCIÊNCIA SBPC/Labjor. *Medicamentos Anti-Aids e a Quebra de Patentes*. Disponível em <<http://www.comciencia.br/especial/pataids/pataids05.htm>> Acesso em julho de 2001.

COOPER, C.L.; VAN HEESWIJK, R.P.G.; GALLICANO, K.; CAMERON, D.W. A Review of Low-Dose Ritonavir in Protease Inhibitor Combination Therapy. *HIV / AIDS Clinical Infectious Diseases*. v.36, p.1585-92, 2003.

DAILLY, E.; THOMAS, L.; KERGUERIS, M.F.; JOLLIET, P.; BOURIN, M. High-performance liquid chromatographic assay to determine the plasma levels of HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir) and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (nevirapine) after liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B*, v. 758, p. 129-135, 2001.

DROSTE, J.A.H.; VERWEIJ-VAN WISSEN, C.P.W.G.M.; BURGER, D.M. Simultaneous determination of the HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nelfinavir, the nelfinavir hydroxymetabolite M8, and nevirapine in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 25, p. 393-9, 2003.

ERK, N. Rapid and simple methods for quantitative analysis of some antidepressant in pharmaceutical formulations by using first derivative spectrophotometry and HPLC. *II Farmaco*, v. 58, p. 1209-1216, 2003.

F. Bras. IV. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FDA. HIV/AIDS Timeline Chronology of Significant Events. Disponível em: <<http://www.fda.gov/oashi/aids/miles.html>> Setembro de 2004.

FRAPPIER, S.; BREILH, D.; DIARTE, E.; BA, B.; DUCINT, D.; PELLEGRIN, J.L.; SAUX, M.C. Simultaneous determination of ritonavir and saquinavir, two human immunodeficiency virus protease inhibitors, in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 714, p. 384-389, 1998.

FRERICHS, V.A.; DIFRANCESCO, R.; MORSE, G.D. Determination of protease inhibitors using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 787, p. 393-403, 2003.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. XLI (1), p. 7-13, 1991.

HASAN, N.Y.; ELKAWY, M.A.; ELZEANY, B.E.; WAGIEH, N.E. Stability indicating methods for the determination of clozapine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 35-47, 2002.

HOETELMANS, R.M.W.; ESSENBERG, M.V.; PROFIJIT, M.; MEENHORST, P.L.; MULDER, J.W.; BEIJNEN J.H. High-performance liquid chromatographic determination of ritonavir in human plasma, cerebrospinal fluid and saliva. *Journal of Chromatography B*, v.705 p.119-126, 1998.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2). In: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 2003.

ICH - Harmonised Tripartite Guideline. Text on Validation of Analytical Procedures, Q2A. In: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 1994.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B. In: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 1996.

JANOLY, A.; BLEYZAC, N.; FAVETTA, P.; GAGNEU, M.C.; BOURHIS, Y.; COUDRAY, S.; OGER, I.; AULAGNER, G. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for nelfinavir, M8 nelfinavir metabolite, ritonavir and saquinavir assay in plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 780, p.155-160, 2002.

JUSTESEN, U.S.; PEDERSEN, C.; KLITGAARD, N.A. Simultaneous quantitative determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and the nelfinavir active metabolite M8 in plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 783, p.491-500, 2003.

KARPINSKA, J.; SZOSTAK, J. Determination of chlorprothixene and amitriptyline hydrochlorides by UV-derivative spectrophotometry and UV-solid-phase spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 61, p. 975-981, 2005.

KIBBE, A.H.; WADE, A.; WELLER, P.J. (eds) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed, Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2000, 665p.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; SÄNGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. *Pharmaceutical Technology*, p. 48-66, 2005.

KOROLKOVAS, Andrejus. *Análise Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984. p.1662-166

KOROLKOVAS, Andrejus. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Edição 2003/2004. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LAW, D.; KRILL, S.L.; SCHMITT, E.A.; FORT, J.J.; QIU, Y.; WANG, W.; PORTER, W.R. Physicochemical considerations in the preparation of amorphous ritonavir – poly (ethylene glycol) 8000 solid dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90(8), p. 1015-1025, 2001.

LEIBENGUTH, P.; LE GUELLEC, C.; BESNIER, J.M.; BASTIDES, F.; MACÉ, M.; GAUDET, M.L.; AUTRET-LECA, E.; PAINAUD, G. Therapeutic drug monitoring of HIV protease inhibitors using high-performance liquid chromatography with ultraviolet or photodiode array detection. *Therapeutic Drug Monitoring*. v. 23, p. 679-688, 2001.

LIEBERMAN, R.; BARBÉ, P.C. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons, 1988, v. 4, p. 494-505.

LÓPEZ DE ALDA, M.J.; PASEIRO, P.; GOICOECHEA, A.G. Rapid zero-order and second-derivative UV spectrophotometric determination of cyanocobalamin in pharmaceutical formulations containing dextran and preservatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, p. 363-365, 1996.

MABROUK, M.M.; EL-FATATRY, H.M.; HAMMAD, S.; WAHBI, A.A.M. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceutical formulation by RP-LC and derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 597-604, 2003.

MACHADO, A.R.L. Antivirais. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. *Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional*. 2^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.34. p.293-305.

MARSH, K.C.; EIDEN, E.; MCDONALD, E. Determination of ritonavir, a new HIV protease inhibitor, in biological samples using reversed-phased high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.704, p.307-313, 1997.

MARTIN, A.R. Antiviral Agents. In: WILSON e GISVOLD'S. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 10^o ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1998.

MARZOLINI, C.; BÉGUIN, A.; TELENTI, A.; SCHREYER, A.; BUCLIN, T.; BIOLLAZ, J.; DECOSTERD, L.A. Determination of lopinavir and nevirapine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction: application for the assessment of their transplacental passage at delivery. *Journal of Chromatography B*, v.774 p.127-140, 2002.

MARZOLINI, C.; TELENTI, A.; BUCLIN, T.; BIOLLAZ, J.; DECOSTERD, L.A. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, v.740 p.43-58, 2000.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. (eds), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3rd edition. Pharmaceutical Press. Electronic version, 2004.

MORELLI, B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 423-433, 2003.

MORISSETTE, S.L.; SOUKASENE, S.; LEVINSON, D.; CIMA, M.J.; ALMARSSON, Ö. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease

inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.100, p.2180-2184, 2003.

MURPHY, R.L. Reviving Protease Inhibitors: New Data and More Options. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. v.33, p.S43-S56, 2003.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared absorption spectroscopy*. 2nd ed. San Francisco: Holden-Day, 1977, Cap. 2, p.10-57.

NUDELMAN, N.S. *Estabilidad de medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneu, 1975.

O'HAVER, T.C. & BEGLEY, T. Signal-to-noise ratio in higher order derivative spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 53(12), p. 1876-1878, 1981.

OUANÊS, S.; KALLEL, M.; TRABELSI, H.; SAFTA, F.; BOUZOUITA, K. Zero-crossing derivative spectrophotometry for the determination of haloperidol in presence of parabéns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 17, p. 361-364, 1998.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39(1), p. 105-113, 2003.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3rd ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001, Cap.2, p. 13-101.

POIRIER J.M.; ROBIDOU, P.; JAILLON, P. Simultaneous determination of the six HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir) plus M8 nelfinavir metabolite and nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma by solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*. v. 24, p. 302-309, 2002.

RAFFANTI, S.; HAAS, D.W. Antimicrobianos: Agentes Anti-Retrovirais In: GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10^o ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, cap.51, p.1011, 2001.

RAY, J.; PANG, E.; CAREY, D. Simultaneous determination of indinavir, ritonavir and lopinavir (ABT 378) in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.775 p.225-230, 2002.

RENTSCH, K.M. Sensitive and specific determination of eight antiretroviral agents in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.788 p.339-350, 2003.

- ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, v. 27(5), p. 807-812, 2004.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; CANO PAVON, J.M. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, v. 35(10), p. 753-761, 1988.
- SARASA-NACENTA, M.; LÓPEZ-PÚA, Y.; MALLOLAS, J.; BLANCO, J.L.; GATELL, J.M.; CARNÉ, X. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, ritonavir, saquinavir and nelfinavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 757, p. 325-332, 2001.
- SETHI, M.L. Antiviral Agents and Protease Inhibitors. In: FOYE'S. *Principles of Medicinal Chemistry*. 5° ed. Philadelphia, 2002.
- SHEHATA, M.A.; HASSAN, N.Y.; FAYED, A.S.; EL-ZEANY, B.A. Derivative spectrophotometric and fluorimetric methods for determination of rofecoxib in tablets and in human plasma in presence of its photo-degradation product. *// Farmaco*, v. 59, p. 139-145, 2004.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, Cap. 3, p. 67-135.
- SIMON, V.A.; THIAM, M.D.; LIPFORD, L.C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-suppressing drugs by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 913 p.447-453, 2001.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.. *Princípios de Análise Instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 836 p.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*. v. 2, p. 12-20, 1998.
- TAKAHASHI, M.; YOSHIDA, M.; OKI, T.; OKUMURA, N.; SUZUKI, T.; KANEDA, T. Conventional HPLC method used for simultaneous determination of the seven HIV protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28(7), p. 1286-1290, 2005.
- TALSKY, G.; MAYRING, L.; KREUZER, H. High-resolution, higher-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 17(11), p. 785-874, 1978.
- TAVARES, Walter. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. 2° ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

- TITIER, K.; LAGRANGE, F.; PEHOURECQ, F.; EDNO-MCHEIK, L.; MOORE, N.; MOLIMARD, M. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the six HIV-protease inhibitors and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*. V. 24, p. 417-424, 2002.
- TORAL, M.I.; POPE, S.; QUINTANILLA, S.; RICHTER, P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, p. 117-126, 2002.
- TRABELSI, H.; RAOUAFI, F.; LIMAM, M.; BOUZOUITA, K. Derivative spectrophotometric determination of droperidol in presence of parabens. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 29, p. 239-245, 2002.
- TRIBUT, O.; ARVIEUX, C.; MICHELET, C.; CHAPPLAIN, J.M.; ALLAIN, H.; BENTUE-FERRER, D. Simultaneous quantitative assay of six HIV protease inhibitors, one metabolite, and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma by isocratic reversed-phase liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*. v. 24, p. 554-562, 2002.
- TURNER, M.L.; REED-WALKER, K.; KING, J.R.; ACOSTA, E.P. Simultaneous determination of the nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 784, p. 331-341, 2003.
- USP 29. The United States Pharmacopoeia. 29th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2006.
- VEGA, E.; SOLÁ, N. Quantitative analysis of metronidazole in intravenous admixture with ciprofloxacin by first derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 25, p. 523-530, 2001.
- VILLANI, P.; FEROGGIO, M.; GIANELLI, L.; BARTOLI, A.; MONTAGNA, M.; MASERATI, R.; REGAZZI, M.B. Antiretrovirals: Simultaneous determination of five protease inhibitors and three non-nucleoside transcriptase inhibitors in human plasma by a rapid high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay. *Therapeutic Drug Monitoring*. v. 23, p. 380-388, 2001.
- VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.
- VOLOSOV, A.; NAPOLI, K.L.; SOLDIN, S.J. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry. *Clinical Biochemistry*. v. 34, p. 285-290, 2001.
- WALSON, P.D.; COX, S.; UTKIN, I.; GERBER, N.; CRIM, L.; BRADY, M.; KORANYI, K. Clinical use of a simultaneous HPLC assay for indinavir,

saquinavir, ritonavir, and nelfinavir in children and adults. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 25, p. 588-592, 2003.

WHO. World Health Organization. Regional Office for South-East Ásia. Disponível em: <http://w3.whosea.org/en/Section10/Section18/Section351_10658.htm> Acesso em dezembro de 2005 (a).

WHO. World Health Organization. RITONAVIR Final text for inclusion in *The International Pharmacopoeia*. Document QAS/04.111/FINAL. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/IntPh_Ritonavir.pdf> Acesso em fevereiro de 2005 (b).

YAMADA, H.; KOTAKI, H.; NAKAMURA, T.; IWAMOTO, A. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, ritonavir and nelfinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 755, p. 85-89, 2001.

ZHOU, D.; ZHANG, G.G.Z.; LAW, D.; GRANT, D.J.W.; SCHMITT, E.A. Physical stability of amorphous pharmaceuticals: Importance of configurational thermodynamic quantities and molecular mobility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91(8), p. 1863-1872, 2002.

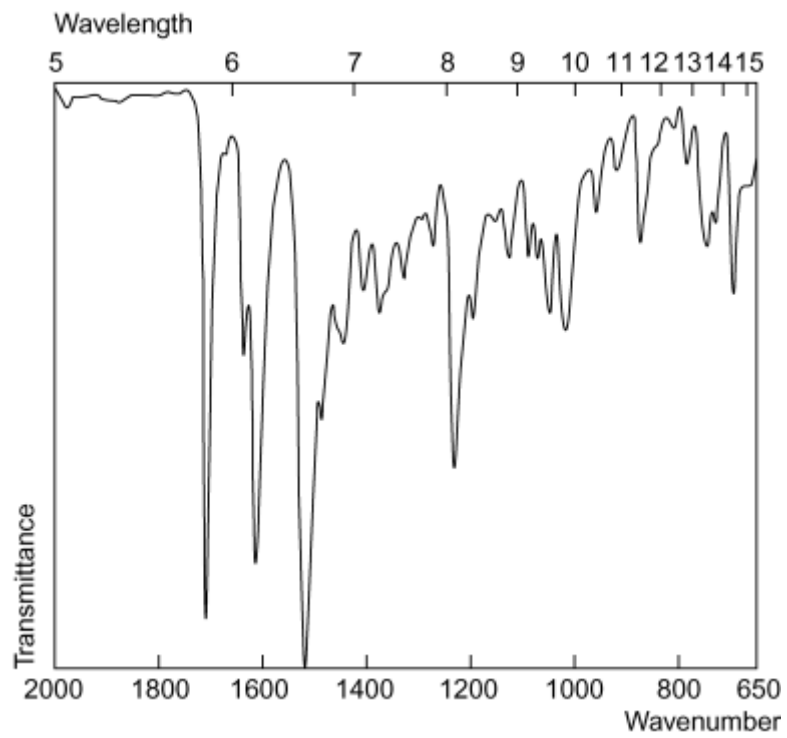


Figura 35 - Espectro na região do IV para o ritonavir (MOFFAT *et al.*, 2004).

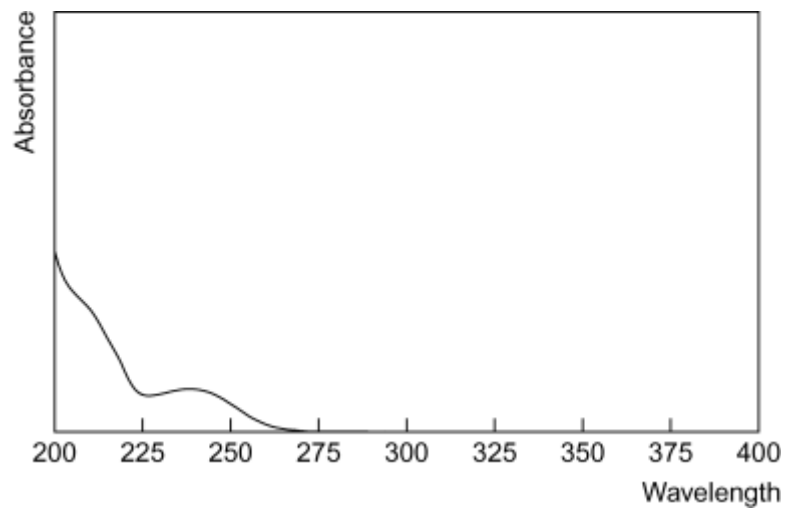


Figura 36 - Espectro de absorção na região do UV para o ritonavir (MOFFAT *et al.*, 2004).

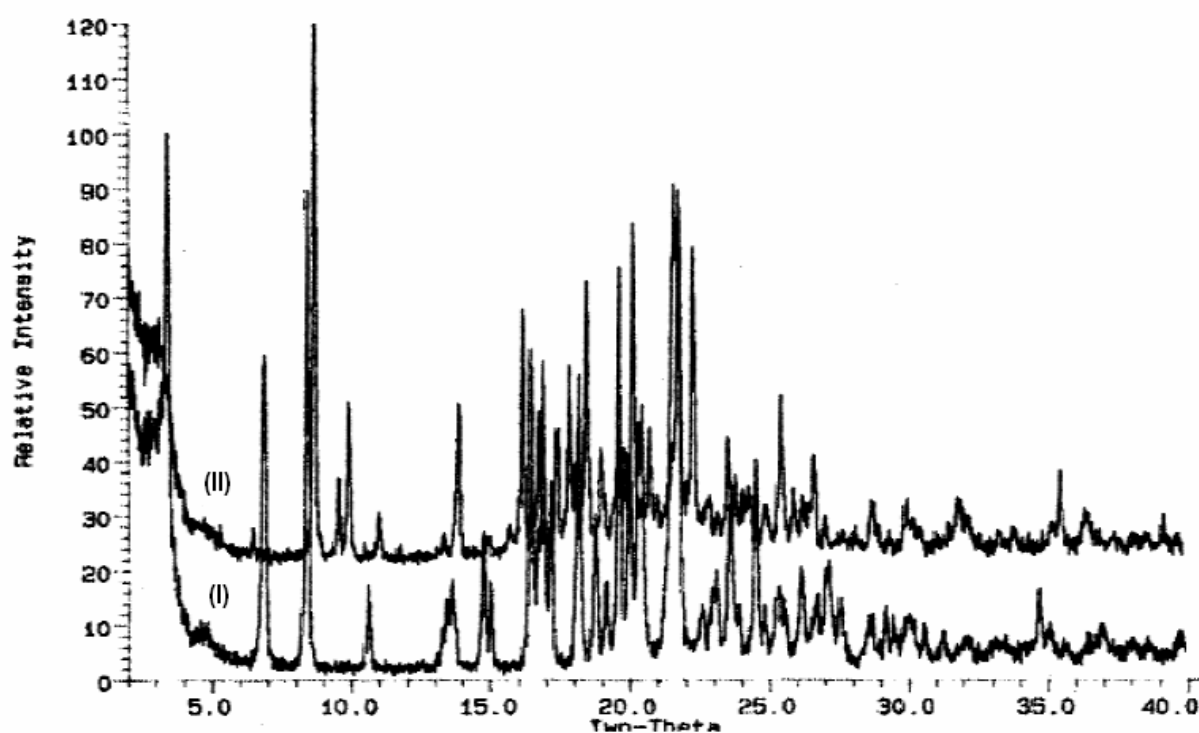


Figura 37 - Difratoformas das formas polimórficas I e II do ritonavir (BAUER *et al.*, 2001).

Tabela 29 - Dados de difração de raio x de monocristal (BAUER *et al.*, 2001).

A: Comparison of Torsion Angles in Ritonavir Forms		
Torsion Angle	Form I	Form II
A (N-Methyl Urea)	-5 (cis)	-179 (trans)
B	72	-77
C (carbamate)	-178 (trans)	-8 (cis)
B: Single Crystal X-ray Data for Form I and Form II Ritonavir		
Parameter	Form I	Form II
Crystal system	monoclinic	orthorhombic
Space Group	P2 ₁ (#4)	P2 ₁ P2 ₁ P2 ₁ (#19)
Z value	2	4
Dcalc	1.28 g/cm ³	1.25 g/cm ³
Lattice Parameters	a = 13.433 (1) Å	a = 10.0236 (3) Å
	b = 5.293 (2) Å	b = 18.6744 (4) Å
	c = 27.092 (4) Å	c = 20.4692 (7) Å
	β = 103.102 (9) Å	
	V = 1876.0 (8) Å ³	V = 3831.5 (2) Å ³

Tabela 30 Dados da difração de raio x para o ritonavir SQR obtidos através de um difratômetro de raios x modelo D 5000 SÍMENS com tubo de cobre, condições de varredura 2-72° (2 θ), 0,02 °/s, emp. 25 °C.

d value Angstrom	2-Theta °	Intensity %
d=4.315	20.568	49.5
d=4.255	20.866	13.6
d=4.142	21.440	46.9
d=4.104	21.643	100.0
d=4.008	22.164	55.6
d=3.916	22.695	26.5
d=3.859	23.034	12.2
d=3.797	23.412	31.3
d=3.759	23.657	19.4
d=3.714	23.944	21.5
d=3.685	24.140	23.2
d=3.597	24.734	23.5
d=3.517	25.308	51.9
d=3.465	25.769	27.6
d=3.416	26.066	24.3
d=3.364	26.476	25.6
d=3.317	26.865	14.2
d=3.242	27.500	10.0
d=3.187	27.975	8.8
d=3.124	28.551	24.7
d=3.057	29.199	10.3
d=2.997	29.791	22.8
d=2.974	30.032	20.6
d=2.944	30.340	11.5
d=2.891	30.912	10.0
d=2.854	31.320	10.4
d=2.827	31.628	24.3
d=2.794	32.010	16.1
d=2.765	32.399	9.7
d=2.702	33.131	11.2
d=2.660	33.677	10.4
d=2.621	34.189	7.7
d=2.590	35.026	12.4
d=2.542	35.289	15.4
d=2.481	36.188	14.5
d=2.412	37.249	7.9
d=2.370	37.940	8.0
d=2.340	38.464	8.8
d=2.308	39.010	11.0
d=2.248	40.080	7.7
d=2.225	40.510	13.6
d=2.125	42.507	6.7
d=2.092	43.221	7.6
d=2.039	44.394	9.4
d=1.950	46.554	8.6
d=1.881	48.356	7.0
d=1.798	50.744	6.6
d=1.743	52.480	6.3
d=1.331	70.717	3.7

Tabela 31 Dados de difração de raio x para o polímero I do ritonavir obtido através de um difratômetro de raios x modelo D 5000 SIEMENS com tubo de cobre, condições de varredura 2-72°(2 θ), 0,02 °s, temp. 25 °C.

d value Angstrom	2-Theta °	Intensity %
d=26.597	3.320	32.3
d=13.036	6.776	34.1
d=10.597	8.339	54.4
d=8.419	10.501	10.3
d=6.538	13.534	14.2
d=6.047	14.641	19.2
d=5.948	14.886	18.1
d=5.417	16.355	38.6
d=5.294	16.736	34.3
d=5.192	17.066	35.2
d=4.910	18.056	56.3
d=4.758	18.638	31.7
d=4.662	19.023	30.6
d=4.540	19.501	47.4
d=4.468	19.903	47.4
d=4.378	20.273	47.2
d=4.123	21.541	100.0
d=3.950	22.469	21.4
d=3.875	22.937	26.0
d=3.785	23.490	43.0
d=3.640	24.397	52.0
d=3.520	25.220	27.3
d=3.418	26.052	26.6
d=3.355	26.551	22.3
d=3.300	27.004	27.7
d=3.240	27.431	20.7
d=3.126	28.533	20.5
d=2.979	29.979	18.8
d=2.935	30.437	21.0
d=2.873	31.107	13.8
d=2.686	33.339	14.2
d=2.594	34.556	24.0
d=2.437	36.857	16.2
d=2.237	40.292	13.5
d=2.162	41.748	13.1
d=2.050	44.162	10.9
d=2.011	45.043	12.4
d=1.911	47.545	11.1

Tabela 32 Dados de difração de raio x para o polimorfo II do ritonavir obtido através de um difratômetro de raios x modelo D 5000 SIEMENS com tubo de cobre, condições de varredura 2-72° (2 θ), 0,02 %s, temp. 25 °C.

d value Angstrom	2-Theta °	Intensity %
d=13.854	6.376	10.7
d=10.267	8.608	69.2
d=9.356	9.447	31.0
d=9.004	9.817	35.6
d=8.112	10.899	17.9
d=6.683	13.240	10.0
d=6.440	13.741	30.1
d=5.962	14.849	11.0
d=5.671	15.615	13.8
d=5.517	16.054	63.0
d=5.331	16.620	48.2
d=5.125	17.293	50.4
d=4.999	17.732	62.5
d=4.838	18.328	78.3
d=4.693	18.896	38.4
d=4.558	19.462	43.4
d=4.432	20.021	75.4
d=4.314	20.577	50.4
d=4.104	21.642	100.0
d=4.009	22.160	64.2
d=3.912	22.720	29.1
d=3.799	23.400	33.9
d=3.682	24.156	30.3
d=3.595	24.747	25.5
d=3.515	25.325	53.2
d=3.465	25.770	28.4
d=3.369	26.441	28.9
d=3.315	26.880	19.3
d=3.121	28.583	33.2
d=2.995	29.810	25.3
d=2.894	30.883	15.0
d=2.826	31.646	27.0
d=2.700	33.155	17.7
d=2.660	33.673	14.8
d=2.542	35.290	20.5
d=2.476	36.255	19.1
d=2.413	37.234	10.3
d=2.367	37.994	12.6
d=2.343	38.401	11.9
d=2.306	39.045	16.9
d=2.221	40.596	18.6
d=2.121	42.601	11.0
d=2.037	44.440	11.9
d=1.948	46.596	12.4
d=1.743	52.458	10.3

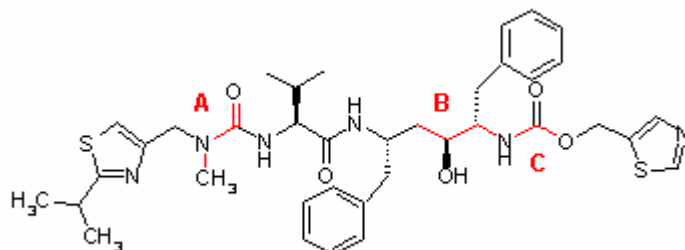


Figura 38 - Ângulos de torção (A,B e C) indicam áreas com diferenças significativas entre os dois polimorfos (BAUER *et al.*, 2001).

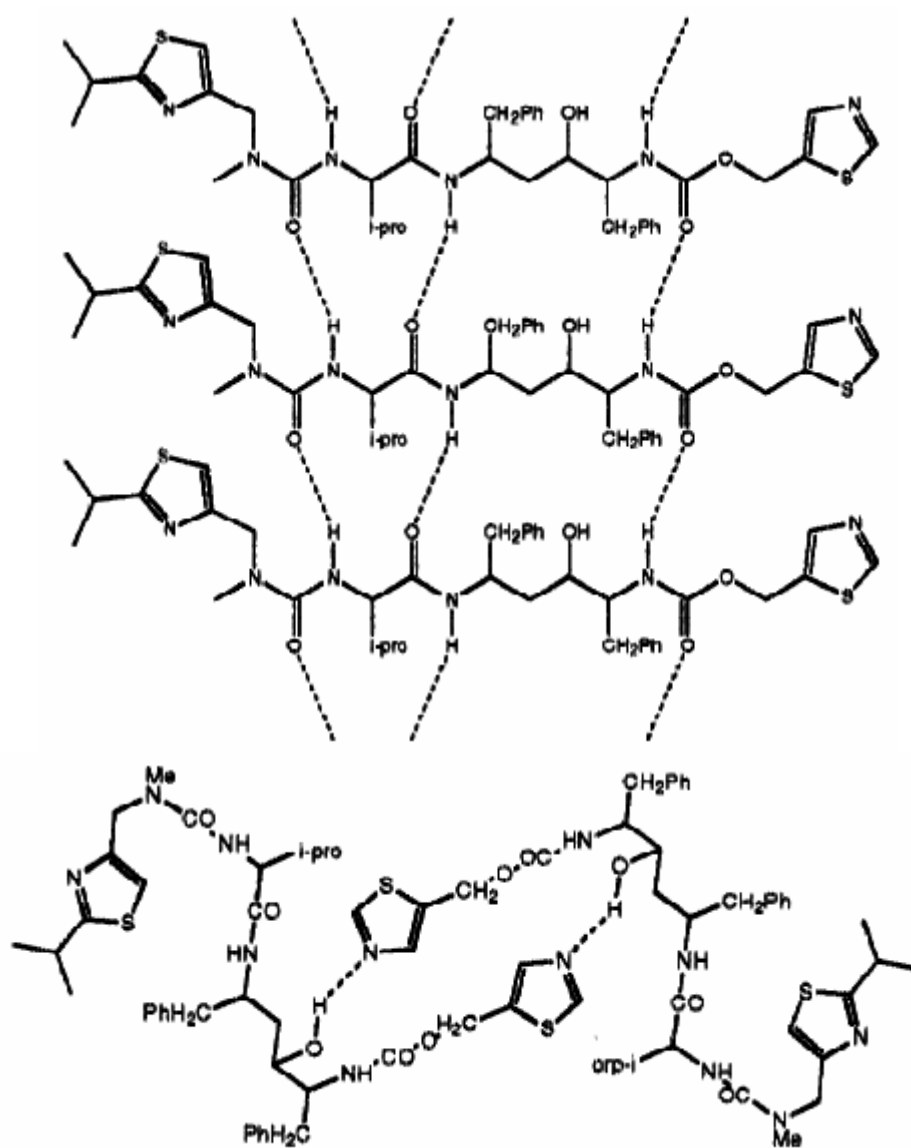


Figura 39 - Redes de ligações de hidrogênio para a forma I do ritonavir (BAUER *et al.*, 2001).

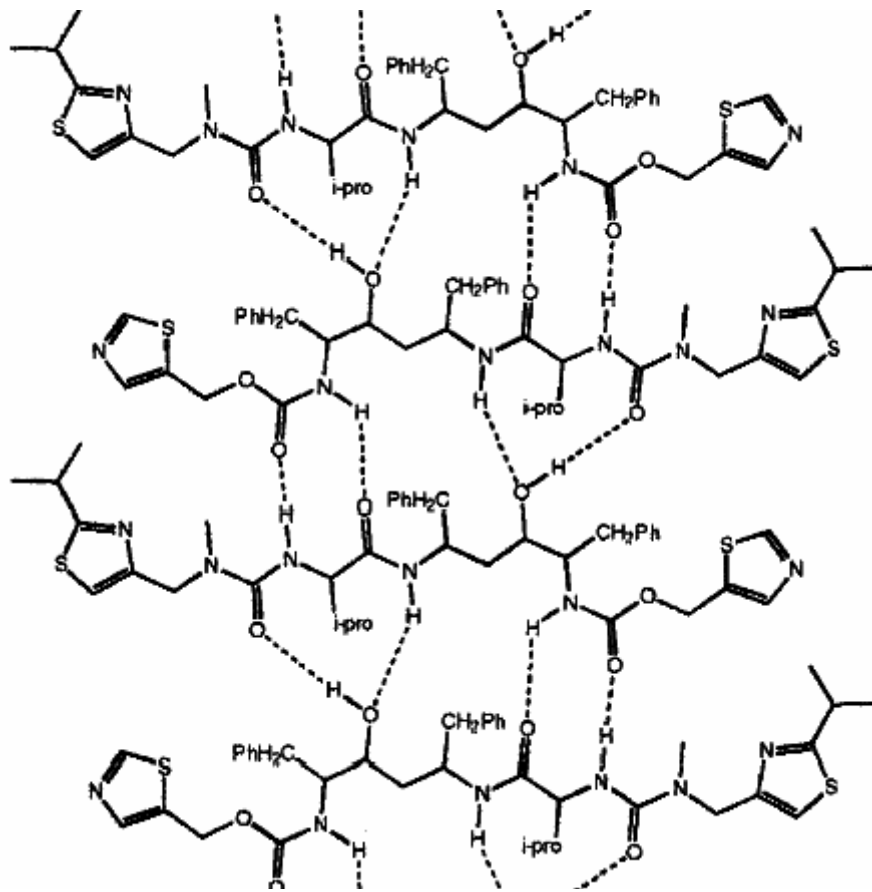


Figura 40 - Redes de ligações de hidrogênio para a forma II do ritonavir (BAUER *et al.*, 2001).

Formação Acadêmica

✓ 1996 / 2000

Graduação em Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS

✓ 2000 / 2002

Farmacêutica responsável pelo serviço de farmácia hospitalar, atuando na dispensação interna de medicamentos e insumos médico-hospitalares.

Clínica Psiquiátrica São José, Porto Alegre – RS

✓ 2000 / 2003

Ênfase em Farmácia Industrial

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS

✓ 2002 / 2006

Farmacêutica colaboradora da Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira - CPRFB, atuando na elaboração de monografias e no desenvolvimento de Substâncias Químicas de Referência.

Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre – RS

✓ 2004 / 2006

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Título: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas

Orientação: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre – RS