

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

**LOPINAVIR / RITONAVIR CÁPSULAS:  
PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* BASEADO NOS DADOS *IN VIVO*,  
ESTUDOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA E METODOLOGIA ANALÍTICA**

Eliane Maria Donato

Porto Alegre, 2008



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

**LOPINAVIR / RITONAVIR CÁPSULAS:  
PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* BASEADO NOS DADOS *IN VIVO*,  
ESTUDOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA E METODOLOGIA ANALÍTICA**

Tese apresentada por Eliane Maria Donato  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bergold  
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2008

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26 de novembro de 2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Clarice Bueno Rolim  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

D6771 Donato, Eliane Maria  
Lopinavir/Ritonavir cápsulas: perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica / Eliane Maria Donato – Porto Alegre : UFRGS, 2008. xxvi, 260 p.: il.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Lopinavir. 2. Ritonavir. 3. Dissolução. 4. Estabilidade térmica. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Validação: métodos de análise de fármacos. I. Bergold, Ana Maria. II. Fröhlich, Pedro Eduardo. III. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Impressão realizada pela gráfica da UFRGS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica  
do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Faculdade de Farmácia da UFRGS  
com suporte financeiro e bolsa de pesquisa concedida pela CAPES.



*Aos meus pais, Elda e Manuel  
e aos meus irmãos, Cirlei, Ironi e Ivan,  
por nunca desistirem...*

*Ao Pellegrini, meu marido,  
pela torcida....*





## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ana Maria Bergold pela disponibilidade e apoio constante prestados na orientação deste trabalho, pelo convívio, amizade e companheirismo durante mais esta etapa de minha formação.

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich pela orientação oportuna, convívio e amizade.

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

Ao Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela disponibilização dos equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos à CAPES, entidade financiadora da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

À Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, representada pelo colega e amigo Roberto Debom Moreira, pelo fornecimento das substâncias químicas de referência.

À Seção Estadual de Controle das DST/AIDS da Secretaria Estadual de Saúde pela doação das amostras e à Secretária Municipal de Saúde/Vila Cruzeiro por facilitar a obtenção das mesmas.

Ao Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela liofilização e análise de DSC.

Ao Prof. Dr. Vítor Pereira do Instituto de Geociências da UFRGS pelo auxílio e esclarecimentos prestados na difração por Raios-X e microscopia e ao Laboratório de Difractometria de Raios X deste Instituto pela execução das análises de Raios-X.

Ao Prof. Dr. César Petzhold do Instituto de Química da UFRGS pelos esclarecimentos prestados na DSC e à colega Ana Paula Cappra do CDTF da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pelo auxílio na execução das análises.

Ao Prof. Dr. Paulo Schneider pelos esclarecimentos prestados na RMN e ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UFRGS, pela execução das análises de RMN.

Ao Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFRGS pelo auxílio no preparo das amostras para a RMN. À Luciana Dalla Vechia, deste laboratório, pelo auxílio prestado durante o isolamento e identificação dos produtos de degradação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Carolina, Rochele, Lisiane, Sirlei, Marinês, Laura, Danieli, Deise, Leonardo, Marquinhos e Luís, por tornarem o local de trabalho aprazível. À Natalia, bolsista de iniciação científica, por ter auxiliado na execução das análises.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxi
RESUMO .....	xxiii
ABSTRACT .....	xxv
1 <b>Introdução</b> .....	1
2 <b>Objetivos</b> .....	5
3 <b>Revisão geral</b> .....	9
3.1     Síndrome da imunodeficiência adquirida .....	11
3.1.1   Estrutura e ciclo do HIV .....	12
3.1.2   Fármacos anti-retrovirais .....	13
3.2     Lopinavir e ritonavir .....	15
3.2.1   Atividade anti-retroviral .....	16
3.2.2   Mecanismo de ação .....	17
3.2.3   Farmacocinética .....	17
3.2.4   Efeitos adversos – toxicidade .....	19
3.2.5   Usos e preparações farmacêuticas .....	19
3.2.6   Doses e administração .....	20
3.2.7   Contra-indicações .....	20
3.2.8   Interações medicamentosas .....	20
3.2.9   Armazenamento .....	21
4 <b>Referências</b> .....	22
<b>Capítulo 1 ANÁLISE QUALITATIVA DO LOPINAVIR</b> .....	25
1.1 <b>Introdução</b> .....	27
1.2 <b>Material e métodos</b> .....	28
1.2.1   Amostras e SQRs .....	28
1.2.2   Identificação do lopinavir SQR .....	28
1.2.2.1 Poder rotatório específico .....	28
1.2.2.2 Espectroscopia no UV .....	29
1.2.2.3 Espectroscopia no IV .....	29
1.2.2.4 Ponto de fusão .....	29
1.2.2.5 Calorimetria exploratória diferencial .....	29

1.2.2.6	Difração por RX .....	30
1.2.2.7	Microscopia eletrônica de varredura .....	30
1.2.2.8	Cromatografia em camada delgada .....	31
1.3	<b>Resultados e discussão</b> .....	32
1.3.1	Rotação específica .....	32
1.3.2	Espectroscopia na região do UV .....	32
1.3.3	Espectroscopia no IV .....	34
1.3.4	Calorimetria exploratória diferencial e ponto de fusão .....	36
1.3.5	Difração por Raios-X .....	37
1.3.6	Microscopia eletrônica de varredura .....	40
1.3.7	Cromatografia em camada delgada .....	40
1.4	<b>Conclusões</b> .....	42
1.5	<b>Referências</b> .....	43
<b>Capítulo 2</b>	<b>MÉTODO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DO LOPINAVIR E DO RITONAVIR EM CÁPSULAS DE GELATINA</b> .....	45
2.1	<b>Introdução</b> .....	47
2.2	<b>Revisão</b> .....	48
2.2.1	Determinações quantitativas .....	48
2.3	<b>Material e métodos</b> .....	50
2.3.1	Amostra e SQR .....	50
2.3.2	Reagentes .....	50
2.3.3	Equipamento e condições cromatográficas .....	50
2.3.4	Solução amostra .....	51
2.3.5	Solução das SQRs .....	51
2.3.6	Estudos de validação .....	51
2.3.6.1	Adequabilidade do sistema cromatográfico .....	52
2.3.6.2	Especificidade - estudos de degradação forçada .....	53
2.3.6.2.1	Estudos hidrolíticos .....	53
2.3.6.2.2	Estudos oxidativos .....	53
2.3.6.2.3	Estudos fotolíticos .....	54
2.3.6.2.4	Estabilidade térmica .....	54
2.3.6.2.5	Umidade .....	54
2.3.6.3	Linearidade .....	54
2.3.6.4	Precisão .....	54
2.3.6.5	Exatidão .....	55
2.3.6.6	Robustez .....	56
2.4	<b>Resultados e discussão</b> .....	57
2.4.1	Validação do método por CLAE .....	60
2.4.1.1	Especificidade .....	60
2.4.1.1.1	Comportamento do LPV frente aos testes de estresse .....	61
2.4.1.1.2	Comportamento do RTV frente aos testes de estresse .....	63
2.4.1.1.3	Considerações sobre os estudos de degradação forçada .....	65
2.4.1.2	Linearidade .....	67

2.4.1.3	Exatidão e precisão .....	67
2.4.1.4	Robustez .....	69
2.5	<b>Conclusões</b> .....	70
2.6	<b>Referências</b> .....	71
<b>Capítulo 3</b>	<b>ESPECTROSCOPIA DERIVADA PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DA ASSOCIAÇÃO LOPINAVIR/RITONAVIR, CÁPSULAS MOLES DE GELATINA</b> .....	75
3.1	<b>Introdução</b> .....	77
3.2	<b>Revisão</b> .....	78
3.2.1	Espectroscopia de absorção no UV .....	78
3.2.2	Espectroscopia derivada .....	79
3.2.2.1	Aspectos instrumentais e principais parâmetros da UVD .....	79
3.2.2.1.1	Ordem da derivada .....	80
3.2.2.1.2	Delta lambda .....	81
3.2.2.1.3	Fator de escala .....	82
3.2.2.1.4	Atenuação .....	82
3.2.2.1.5	Velocidade de varredura .....	83
3.2.2.2	Técnicas derivativas .....	83
3.2.2.3	Usos da UVD .....	84
3.3	<b>Material e métodos</b> .....	86
3.3.1	Equipamento .....	86
3.3.2	SQRs e excipientes .....	86
3.3.3	Amostra .....	86
3.3.4	Técnicas e parâmetros UVD .....	87
3.3.5	Linearidade .....	87
3.3.6	Determinação do ritonavir e do lopinavir no Kaletra® .....	88
3.3.7	Avaliação do método UVD .....	88
3.4	<b>Resultados e discussão</b> .....	89
3.4.1	Definição dos parâmetros .....	89
3.4.2	Linearidade .....	93
3.4.3	Comparação dos métodos CLAE e UVD .....	95
3.4.4	Considerações finais sobre a UVD .....	97
3.5	<b>Conclusões</b> .....	98
3.6	<b>Referências</b> .....	99
<b>Capítulo 4</b>	<b>PERFIL DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> BASEADO NOS DADOS <i>IN VIVO</i> PARA O LOPINAVIR CÁPSULAS</b> .....	103
4.1	<b>Introdução</b> .....	105
4.2	<b>Revisão</b> .....	106
4.2.1	Dissolução e absorção de fármacos .....	106
4.2.2	Teoria da dissolução .....	106
4.2.3	Fatores que afetam a dissolução de fármacos <i>in vitro</i> .....	108
4.2.3.1	Tamanho de partícula .....	108

4.2.3.2	Propriedades físico-químicas .....	108
4.2.3.3	Tensoativos .....	109
4.2.3.4	Forma farmacêutica e tecnologia de fabricação .....	109
4.2.3.5	Velocidade de agitação .....	110
4.2.4	Sistema de classificação biofarmacêutica .....	110
4.2.4.1	Classe I: alta solubilidade e alta permeabilidade .....	111
4.2.4.2	Classe II: baixa solubilidade e alta permeabilidade .....	111
4.2.4.3	Classe III: alta solubilidade e baixa permeabilidade .....	112
4.2.4.4	Classe IV: baixa solubilidade e baixa permeabilidade .....	112
4.2.5	Correlação <i>in vitro in vivo</i> .....	113
4.2.5.1	Níveis de correlação .....	114
4.2.5.1.1	Correlação nível A .....	114
4.2.5.1.2	Correlação nível B .....	115
4.2.5.1.3	Correlação nível C .....	115
4.2.5.1.4	Correlação nível C múltiplo .....	115
4.3	<b>Material e métodos</b> .....	116
4.3.1	Obtenção dos dados <i>in vivo</i> .....	116
4.3.1.1	Fração absorvida da dose .....	117
4.3.2	Estudos <i>in vitro</i> .....	117
4.3.2.1	Amostra e reagentes .....	117
4.3.2.2	Determinação da solubilidade .....	118
4.3.2.2.1	Lopinavir – substância ativa .....	118
4.3.2.2.2	Lopinavir/ritonavir – substâncias ativas .....	118
4.3.2.2.3	Lopinavir/ritonavir - cápsulas .....	118
4.3.2.3	Perfil de dissolução .....	119
4.3.2.4	Determinação da fração dissolvida .....	119
4.3.3	Correlação com a curva de absorção .....	120
4.3.4	Validação do teste de dissolução <i>in vitro</i> .....	120
4.3.4.1	Adequabilidade do sistema cromatográfico .....	120
4.3.4.2	Especificidade/interferência do placebo .....	121
4.3.4.3	Estabilidade da amostra frente às condições do teste .....	121
4.3.4.4	Linearidade .....	121
4.3.4.5	Exatidão e precisão .....	122
4.4	<b>Resultados e discussão</b> .....	123
4.4.1	Estudos <i>in vivo</i> .....	123
4.4.1.1	Perfil plasmático do lopinavir .....	124
4.4.1.2	Fração da dose absorvida .....	125
4.4.2	Estudos <i>in vitro</i> .....	126
4.4.2.1	Solubilidade do lopinavir e do ritonavir .....	126
4.4.2.2	Perfil de dissolução <i>in vitro</i> baseado nos dados <i>in vivo</i> .....	128
4.4.2.2.1	Perfil de dissolução do lopinavir – agitação por cestas .....	128
4.4.2.2.2	Perfil de dissolução do lopinavir – agitação por pás .....	131
4.4.3	Comportamento do ritonavir frente às condições do teste .....	137

4.4.4	Determinação das frações dissolvidas por CLAE .....	138
4.4.5	Validação do teste de dissolução <i>in vitro</i> por CLAE .....	138
4.4.5.1	Especificidade/interferência do placebo .....	139
4.4.5.2	Adequabilidade do sistema cromatográfico .....	139
4.4.5.3	Linearidade .....	140
4.4.5.4	Exatidão e precisão .....	141
4.4.5.5	Estabilidade da amostra frente às condições do teste .....	142
4.5	<b>Conclusões</b> .....	144
4.6	<b>Referências</b> .....	145
<b>Capítulo 5</b>	<b>ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA</b> .....	151
5.1	<b>Introdução</b> .....	153
5.2	<b>Revisão</b> .....	154
5.2.1	Estabilidade de fármacos .....	154
5.2.2	Velocidade e ordem de reação .....	155
5.2.2.1	Reação de ordem zero .....	155
5.2.2.2	Reação de primeira ordem .....	156
5.2.2.3	Reações de pseudo primeira ordem e pseudo-ordem zero .....	156
5.2.2.4	Reação de segunda ordem .....	157
5.2.3	Estudos de estabilidade .....	157
5.2.3.1	Estudos de estabilidade acelerada .....	158
5.2.3.2	Método de Arrhenius .....	158
5.2.4	Normas para os estudos de estabilidade .....	159
5.2.5	Estabilidade de inibidores da protease do HIV .....	160
5.3	<b>Material e métodos</b> .....	161
5.3.1	Estudos de estabilidade acelerada .....	161
5.3.1.1	Condições .....	161
5.3.1.2	Procedimentos com o Kaletra <sup>®</sup> .....	162
5.3.1.3	Determinação da ordem de reação .....	162
5.3.1.4	Determinação do prazo de validade: Arrhenius.....	162
5.3.2	Desenvolvimento do método por CLAE .....	163
5.3.2.1	Equipamento e condições cromatográficas .....	163
5.3.2.2	Solução amostra e SQRs .....	163
5.3.3	Validação do método por CLAE .....	164
5.5	<b>Resultados e discussão</b> .....	165
5.4.1	Estudos de estabilidade acelerada .....	165
5.4.1.1	Determinação da ordem de reação .....	166
5.4.1.2	Estimativa da estabilidade do Kaletra <sup>®</sup> a 25 °C: Arrhenius .....	170
5.4.2	Método por CLAE .....	171
5.4.3	Validação método por CLAE .....	173
5.4.3.1	Especificidade .....	173
5.4.3.2	Linearidade .....	176
5.4.3.3	Precisão e exatidão .....	177

5.4.3.4	Robustez .....	177
5.5	<b>Conclusões</b> .....	179
5.6	<b>Referências</b> .....	180
<b>Capítulo 6</b>	<b>ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO</b> .....	183
6.1	<b>Introdução</b> .....	185
6.2	<b>Revisão bibliográfica</b> .....	186
6.3	<b>Material e métodos</b> .....	189
6.3.1	Degradação do ritonavir .....	189
6.3.2	Isolamento dos produtos de degradação do ritonavir .....	189
6.3.3	Tratamento das frações isoladas .....	190
6.3.4	Elucidação estrutural dos produtos de degradação do ritonavir .....	190
6.4	<b>Resultados e discussão</b> .....	191
6.4.1	Isolamento dos produtos de degradação do ritonavir: DRG1 e DGR2 ...	191
6.4.2	Avaliação das frações isoladas . .....	192
6.4.3	Liofilização das frações isoladas .....	193
6.4.4	Elucidação do DGR1 e do DGR2 .....	193
6.4.4.1	CLAE-UV-DAD .....	194
6.4.4.2	Espectroscopia no IV .....	195
6.4.4.3	RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e de HMQC do DGR2 .....	197
6.4.4.4	RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e de HMQC do DGR1 .....	202
6.5	<b>Conclusões</b> .....	209
6.6	<b>Referências</b> .....	210
	<b>Discussão geral</b> .....	213
	<b>Conclusões gerais</b> .....	217
	<b>Anexo</b> .....	223
	<b>Anexo 1</b> .....	233
	<b>Anexo 2</b> .....	249
	<b>Biografia</b> .....	257



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura e organização do HIV .....	12
Figura 2	Estrutura química do ritonavir .....	16
Figura 3	Estrutura química do lopinavir .....	16
Figura 4	Concentrações plasmáticas de IPs, em ratos .....	18
Figura 1.1	Espectro de UV do lopinavir e do ritonavir em metanol .....	33
Figura 1.2	Espectro de UV do lopinavir e do ritonavir em diferentes solventes .....	33
Figura 1.3	Espectro de IV do lopinavir .....	35
Figura 1.4	Termograma do lopinavir .....	37
Figura 1.5	Difratograma do lopinavir .....	39
Figura 1.6	Difratograma do lopinavir Tipo I mais hidratado .....	39
Figura 1.7	Imagem do lopinavir obtida pela MEV .....	40
Figura 1.8	CCD do lopinavir e de ritonavir .....	41
Figura 2.1	Cromatograma do Kaletra <sup>®</sup> .....	57
Figura 2.2	Cromatograma das SQRs em diferentes pHs da fase móvel .....	58
Figura 2.3	Cromatogramas das SQRs em diferentes diluentes .....	59
Figura 2.4	Cromatograma para a amostra de Kaletra <sup>®</sup> e placebo .....	61
Figura 2.5	Cromatogramas do lopinavir obtidos nos estudos de especificidade .....	62
Figura 2.6	Cromatogramas do ritonavir obtidos nos estudos de especificidade .....	64
Figura 2.7	Espectro de UV do ritonavir e seus produtos de degradação .....	65
Figura 2.8	Cromatograma do lopinavir e produtos de degradação do ritonavir .....	66

Figura 3.1	Bandas de absorção Gaussiana das diferentes ordens de derivadas .....	81
Figura 3.2	Efeitos no espectro UVD <sup>2</sup> com diferentes $\Delta\lambda$ e fator de escala .....	82
Figura 3.3	Espectro de UV para as SQRs, cápsulas e excipientes .....	89
Figura 3.4	Espectros de absorção de UVD <sup>1</sup> do lopinavir e do ritonavir .....	90
Figura 3.5	Espectros de absorção de UVD <sup>2</sup> do lopinavir e do ritonavir .....	91
Figura 3.6	Espectros de absorção de UVD <sup>3</sup> do lopinavir e ritonavir .....	92
Figura 3.7	Espectros de UV e UVD da curva-padrão das SQRs .....	93
Figura 3.8	Espectros de UVD <sup>3</sup> da curva-padrão das SQRs .....	95
Figura 4.1	Requerimentos do FDA para formas farmacêuticas de liberação imediata de uso oral .....	114
Figura 4.2	Curva de concentração plasmática para Kaletra <sup>®</sup> cápsulas .....	123
Figura 4.3	Perfil plasmático médio do lopinavir cápsulas modelado para um compartimento aberto .....	125
Figura 4.4	FA do lopinavir cápsulas pelo método de Wagner-Nelson .....	126
Figura 4.5	Curva de solubilidade do lopinavir em diferentes solventes .....	127
Figura 4.6	FA do lopinavir cápsulas comparada à FD obtida com cestas em diferentes velocidades de agitação .....	129
Figura 4.7	Perfil médio de dissolução do lopinavir cápsulas obtido com cestas em diferentes velocidades de agitação .....	130
Figura 4.8	FA do lopinavir cápsulas versus FD obtida por cestas em diferentes velocidades de agitação .....	131
Figura 4.9	FA do lopinavir cápsulas e FD obtida com diferentes concentrações de LSS .....	131
Figura 4.10	FA do lopinavir cápsulas e FD obtida com 0,9% de LSS e agitação por pás a 50 rpm .....	132
Figura 4.11	Curva média da FA versus FD do lopinavir cápsulas, agitação por pás a 50 rpm em diferentes concentrações de LSS .....	133

Figura 4.12	FA do lopinavir cápsulas e FD obtida com diferentes concentrações de LSS e agitação por pás a 25 rpm .....	134
Figura 4.13	Curva média da FA versus FD do lopinavir cápsulas, agitação por pás a 25 rpm em diferentes concentrações de LSS .....	135
Figura 4.14	Perfil de dissolução do lopinavir e do ritonavir cápsulas obtido com 2,3 % de LSS e agitação por pás a 25 rpm .....	138
Figura 4.15	Cromatograma das soluções de Kaletra <sup>®</sup> e dos excipientes .....	139
Figura 4.16	Curvas-padrão do lopinavir e do ritonavir .....	140
Figura 5.1	Acondicionamento das cápsulas para os estudos de estabilidade .....	165
Figura 5.2	Representação gráfica da degradação do ritonavir cápsulas .....	169
Figura 5.3	Gráfico de Arrhenius para o ritonavir cápsulas .....	170
Figura 5.4	Cromatograma do lopinavir e do ritonavir submetido à hidrólise .....	172
Figura 5.5	Cromatograma da amostra no tempo zero e a 50° C durante 100 dias ....	173
Figura 5.6	Cromatogramas do lopinavir obtidos durante os estudos de especificidade .....	174
Figura 5.7	Cromatogramas do ritonavir obtidos durante os estudos de especificidade .....	175
Figura 5.8	Gráficos das curvas-padrão do lopinavir e do ritonavir .....	177
Figura 6.1	Padrão de fragmentação do ritonavir por MS e prováveis metabólitos obtido da literatura .....	186
Figura 6.2	Metabólitos do ritonavir e do indinavir por MS , obtido da literatura .....	187
Figura 6.3	Padrão de fragmentação do lopinavir por MS, obtido da literatura .....	188
Figura 6.4	Cromatograma da solução de ritonavir submetida à hidrólise .....	191
Figura 6.5	Cromatograma das frações isoladas por CLAE preparativa .....	192
Figura 6.6	DGR1 e DGR2 liofilizados .....	193
Figura 6.7	Estrutura química do ritonavir .....	194
Figura 6.8	Espectro de UV-DAD do RTV, DGR1 e DGR2 .....	195

Figura 6.9	Espectro de IV do DGR2 .....	196
Figura 6.10	Espectro de IV do DGR1 .....	197
Figura 6.11	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do DGR2 .....	198
Figura 6.12	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do DGR2 .....	198
Figura 6.13	Espectro de HMQC do DGR2.....	200
Figura 6.14	Estrutura química DGR2 .....	202
Figura 6.15	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do DGR1 .....	203
Figura 6.16	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do DGR1 .....	203
Figura 6.17	Espectro de HMQC para o DGR1 .....	205
Figura 6.18	Espectro de COSY para o DGR1 .....	206
Figura 6.19	Estrutura química DGR1 .....	208

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Fármacos anti-retrovirais .....	14
Quadro 1.1	Atribuições das bandas características no IV para o lopinavir .....	35
Quadro 1.2	Dados obtidos por DSC para o lopinavir .....	37
Quadro 2.1	Métodos por CLAE para a determinação de anti-retrovirais .....	48
Quadro 2.2	Concentrações das soluções para o estudo de exatidão .....	55
Quadro 3.1	Aplicações da UVD na análise de fármacos .....	85
Quadro 3.2	Concentrações das soluções das SQRs para a linearidade do método por UVD .....	87
Quadro 3.3	Condições utilizadas para determinação do RTV e LPV por UVD .....	92
Quadro 4.1	Condições para o estabelecimento da CIVIV para o lopinavir cápsulas .....	137
Quadro 5.1	Condições utilizadas para os estudos de estabilidade das cápsulas .....	161
Quadro 6.1	Atribuições dos carbonos do espectro de RMN <sup>13</sup> C do DGR2 .....	201
Quadro 6.2	Atribuições dos hidrogênios do espectro de RMN <sup>1</sup> H do DGR2 .....	201
Quadro 6.3	Atribuições dos carbonos do espectro de RMN <sup>13</sup> C do DGR1 .....	207
Quadro 6.4	Atribuições dos hidrogênios do espectro de RMN <sup>1</sup> H do DGR1 .....	207
Tabela 2.1	Resultados dos testes de adequabilidade do sistema cromatográfico ...	60
Tabela 2.2	Resultados dos estudos de especificidade do método por CLAE .....	66
Tabela 2.3	Resultados da linearidade do método por CLAE .....	68
Tabela 2.4	Resultados dos estudos de exatidão do método por CLAE .....	68
Tabela 2.5	Resultados dos estudos da precisão do método por CLAE .....	69

Tabela 2.6	Resultados da robustez do método por CLAE .....	69
Tabela 3.1	Análise estatística da linearidade do ritonavir e do lopinavir .....	94
Tabela 3.2	Comparação dos métodos UVD versus CLAE através do teste <i>t</i> .....	96
Tabela 3.3	Avaliação estatística da curva padrão do ritonavir .....	97
Tabela 4.1	Dados farmacocinéticos do lopinavir .....	124
Tabela 4.2	Solubilidade das SQRs e da amostra em diferentes meios .....	128
Tabela 4.3	Preditivo da FA utilizando a equação da CIVIV .....	136
Tabela 4.4	Resultados dos testes de adequabilidade do sistema para os estudos de estabilidade .....	140
Tabela 4.5	Resultados da exatidão do método de dissolução obtidos por CLAE ..	141
Tabela 4.6	Resultados da precisão do método de dissolução obtidos por CLAE ..	142
Tabela 4.7	Estabilidade das soluções das SQRs e das cápsulas .....	142
Tabela 5.1	Resultados dos estudos de estabilidade térmica para o lopinavir cápsulas na diferentes temperaturas .....	166
Tabela 5.2	Resultados dos estudos de estabilidade térmica a 40 °C para o ritonavir cápsulas .....	167
Tabela 5.3	Resultados dos estudos de estabilidade térmica a 50 °C para o ritonavir cápsulas .....	167
Tabela 5.4	Resultados dos estudos de estabilidade térmica a 60 °C para o ritonavir cápsulas .....	168
Tabela 5.5	Percentuais de degradação do lopinavir e do ritonavir obtidos nos testes de estresse .....	176
Tabela 5.6	Dados de precisão do método por CLAE para os estudos de estabilidade .....	178
Tabela 5.7	Dados da robustez do método por CLAE para os estudos de estabilidade .....	178

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$	deslocamento químico
ANOVA	análise de variância
APT	teste de próton anexado
ARV	anti-retroviral
CCD	cromatografia em camada delgada
CD <sub>3</sub> OD	metanol deuterado
CIVIV	correlação <i>in vitro-in vivo</i>
COSY	espectro bidimensional de correlação homonuclear
d	dubleto
DAD	detector de arranjo de diodos
DGR1	produto de degradação 1 do ritonavir
DGR2	produto de degradação 2 do ritonavir
DPR	desvio padrão relativo
DRX	difração por raios-X
DSC	calorimetria exploratória diferencial
FDA	Food and Drug Administration
Hz	Hertz
HMQC	espectro bidimensional de correlação heteronuclear
IE	inibidores de entrada
II	inibidores da integrase
INNTR	inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa
INTR	inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa
<i>k</i>	constante de velocidade de reação
°K	Kelvin
IP	Inibidores da protease

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IP	inibidor da protease
<i>J</i>	constante de acoplamento
LPV	lopinavir
LPV/r	lopinavir + ritonavir
LSS	lauril sulfato de sódio
m	múltiplo
MeOH	metanol
MEV	microscopia eletrônica de varredura
<i>r</i>	coeficiente de correlação
RMN- <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN- <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RTV	ritonavir
s	singleto
<i>t</i>	tempo
T	temperatura
SCB	sistema de classificação biofarmacêutica
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
SQR	substância química de referência
TGI	trato gastrintestinal
<i>Tr</i>	tempo de retenção
UR	umidade relativa
UVD	espectroscopia derivada no ultravioleta
HIV	vírus da imunodeficiência humana



## RESUMO

### LOPINAVID/RITONAVIR CÁPSULAS

#### Perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica

Kaletra<sup>®</sup> (lopinavir e ritonavir) é uma combinação fixa de dois inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (VIH) indicada para o tratamento da infecção pelo VIH em associação com outros anti-retrovirais. Esta classe de fármacos inibe a protease do VIH evitando a clivagem da poliproteína *gag-pol*, levando à produção de vírus imaturos, incapazes de infectar outras células. Este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, avaliar a estabilidade térmica do lopinavir e do ritonavir cápsulas, determinar a cinética de reação, isolar e identificar os principais produtos de degradação do ritonavir. Método por CLAE indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado para a quantificação do lopinavir e do ritonavir cápsulas. Método alternativo por espectrometria derivada também foi desenvolvido. Os resultados demonstraram uma correlação nível A entre o perfil de dissolução *in vitro* e a absorção *in vivo* nas condições propostas. O método por CLAE para a quantificação desta associação demonstrou ser específico, linear exato, preciso e robusto. O teste *t* demonstrou que houve diferença significativa entre o método CLAE e UV derivada. Os estudos de estabilidade térmica demonstraram que o lopinavir foi estável nas condições testadas enquanto que o ritonavir foi sensível ao calor, seguindo uma cinética de degradação de primeira ordem. De acordo com os resultados da RMN os principais produtos de degradação do ritonavir são os compostos de fórmula molecular  $C_{33}H_{45}N_5O_5S$  e  $C_{25}H_{33}N_3O_6$ .

**Palavras-chaves:** correlação *in vitro-in vivo*, estabilidade térmica, lopinavir, ritonavir, validação, dissolução, cromatografia líquida.



## ABSTRACT

### LOPINAVIR/RITONAVIR CAPSULES

#### Profile of *in vitro* dissolution based on *data in vivo*, studies of thermal stability and analytical methodology

Kaletra<sup>®</sup> (lopinavir and ritonavir) is a combination of two human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors indicated as part of a multi drug therapy along with other antiretroviral agents. This class of drugs inhibits the HIV protease preventing cleavage of the gag-pol polyprotein, reducing the probability of viral particles reaching a mature, infectious state. The objective of this work was: to establish the *in vitro* dissolution profile based on *in vivo* data; to determine their thermal stability in the dosage form; to determine their kinetics of degradation and to isolate and identify their major products of degradation. A stability indicating method was developed and validated for simultaneous quantitation of both drugs in Kaletra<sup>®</sup>, using liquid chromatography. An alternative method using UV-derivative spectrometry was also proposed. The result showed a level A correlation between the *in vitro* dissolution profile and *in vivo* absorption under the proposed conditions. The LC method was fully validated and have shown to be stability indicating. The UV-derivative method showed not to be equivalent (t-test) to the LC method. Thermal stability studies have shown that lopinavir was very stable under the conditions tested while ritonavir was sensitive to heat, following a first order degradation kinetic. According to NMR results ritonavir the main degradation products have the molecular formula  $C_{33}H_{45}N_5O_5S$  and  $C_{25}H_{33}N_3O_6$ .

**Keywords:** *in vitro-in vivo* correlation, thermal stability, lopinavir, ritonavir, validation, dissolution, liquid chromatograph.



## 1. INTRODUÇÃO

---



A síndrome da imunodeficiência adquirida causada pelo vírus da imunodeficiência humana (SIDA/HIV) já matou mais de 25 milhões de pessoas em todo o mundo desde 1981, quando a doença foi identificada. Atualmente, mais de 33 milhões de pessoas no mundo vivem com o HIV, embora boa parte delas não saiba que é portadora. No mundo pobre e em desenvolvimento, apenas 1,3 milhões dos quase sete milhões de indivíduos que necessitam de tratamento, tiveram acesso a ele em 2007. No Brasil, 161 mil pacientes fazem uso de anti-retrovirais (ARVs) e estima-se que existem 620 mil pessoas infectadas (GRANGEIRO *et al.*, 2006; OMS, 2006; UNAIDS, 2007)

Com a evolução da pandemia e o desenvolvimento de resistência por parte do HIV, as indústrias farmacêuticas vêm desenvolvendo novos ARVs para o combate da SIDA. O primeiro ARV utilizado no tratamento foi a zidovudina, lançada em 1987 e conhecida como AZT; sua produção no Brasil teve início em 1993. Atualmente são mais de 20 diferentes substâncias ativas utilizadas no tratamento da SIDA. Segundo GRANGEIRO e colaboradores (2006) o Brasil distribui 16 medicamentos ARVs na rede pública de saúde, dos quais oito são fabricados pelos laboratórios do governo. Se por um lado o Programa Nacional DST/AIDS (doenças sexualmente transmitidas/síndrome da imunodeficiência adquirida) do Ministério da Saúde garantiu o acesso universal aos ARVs, por outro, fez com que os gastos com internações e outros procedimentos terapêuticos fossem reduzidos.

Para o tratamento da SIDA são comumente utilizadas três classes de fármacos: inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa, inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa e inibidores da protease do HIV. Os inibidores da protease (IPs) são componentes essenciais da terapia anti-retroviral potente, especialmente em doentes com tratamentos anteriores (HOFFMANN e KAMPS, 2006). O lopinavir faz parte dos novos IPs e está indicado para o tratamento da infecção pelo HIV, em combinação com outros ARVs.

O lopinavir é co-formulado com uma pequena quantidade de ritonavir (proporção 4:1), um IP já conhecido e registrado como medicamento. Na associação, o ritonavir não contribui diretamente para a atividade anti-retroviral; ele inibe a isoenzima CYP3A com conseqüente aumento e manutenção dos níveis plasmáticos do lopinavir (RAFFANTI e HASS, 2003).

O lopivanir+ritonavir (LPV/r), demonstrou ser eficaz no tratamento de infecção pelo HIV, em combinação com outros ARVs. Os regimes terapêuticos contendo LPV/r conferiram resposta anti-retroviral durável e foram bem tolerados durante quatro anos de tratamento (HICKS *et al.*, 2004). Vários estudos demonstraram a eficácia e a segurança do LPV/r no tratamento de HIV-positivos submetidos e não submetidos previamente ao tratamento com ARVs (CORBETT *et al.*, 2002; ERON *et al.*, 2004).

O LPV/r obteve a aprovação do FDA em setembro de 2000; na Europa, foi aprovado pela Comissão Européia, em 2001. No Brasil, obteve registro junto à ANVISA em 2002. É fabricado pela Abbott, sob o nome de Kaletra<sup>®</sup> e é comercializado na forma de cápsulas moles de gelatina, solução oral e recentemente, na forma de comprimidos revestidos. Atualmente, as substâncias ativas estão sendo sintetizadas no país, por laboratório nacional, porém, a associação encontra-se ainda sob proteção da patente (BRASIL, 2002; FDA, 2005; EMEA, 2005a).

No momento da elaboração deste projeto não havia metodologia analítica para avaliar a qualidade das substâncias ativas e do produto acabado, não havia trabalhos publicados sobre o perfil de dissolução *in vitro* nem dados sobre a estabilidade do fármaco e ou das formas farmacêuticas que os contêm. Atualmente, nesta área e com estes fármacos, existem basicamente, trabalhos publicados pelo grupo (DIAS *et al.*, 2005; DONATO, *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2007; DONATO *et al.*, 2008). Neste contexto e considerando que as substâncias ativas estão sendo sintetizadas no país, por laboratório nacional, este trabalho pretende deixar uma contribuição para o controle de qualidades destes fármacos associados, disponibilizando informações importantes como a elucidação dos principais produtos de degradação.



## **2. OBJETIVOS**

---



O objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver e validar metodologia para controlar a qualidade, simular o perfil de dissolução do lopinavir *in vitro* baseado nos dados *in vivo* e realizar estudos de estabilidade térmica, na forma farmacêutica cápsulas de gelatina mole. Para atingí-lo, o presente trabalho encontra-se distribuído em seis capítulos, que têm como objetivos específicos:

1. Caracterizar a substância química de referência lopinavir.
2. Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o controle de qualidade do lopinavir e do ritonavir na forma farmacêutica cápsulas moles.
3. Desenvolver e validar método por espectrofotometria derivada para o controle de qualidade do lopinavir e do ritonavir na forma farmacêutica cápsulas moles.
4. Estabelecer o perfil de dissolução *in vitro* do lopinavir cápsulas baseado nos dados *in vivo*.
5. Realizar estudos de estabilidade acelerada no produto acabado e determinar a cinética de reação.
6. Isolar e identificar os principais produtos de degradação.



### **3. REVISÃO GERAL**

---



### 3.1 Síndrome da imunodeficiência adquirida

A epidemia da SIDA, causada pelo HIV, é um dos maiores desafios já enfrentados pelos profissionais da saúde. Caracteriza-se pela intensa replicação viral, depleção de linfócitos T CD4 e imunodeficiência profunda. O estágio inicial da doença pode passar despercebido, pois aproximadamente metade dos infectados pelo HIV não desenvolvem sintomas durante a fase aguda, e estes são semelhantes aos sintomas da gripe. Duas a seis semanas após o contágio é desencadeada a resposta imunológica contra o vírus, a qual controla a proliferação inicial do mesmo, mas não o elimina por completo do organismo. Desta forma, desenvolve-se a infecção latente, com destruição progressiva das células de defesa (principalmente dos linfócitos T CD4) do organismo. Esse período é, na maior parte das vezes, assintomático. Com a progressão da infecção, a pessoa fica mais suscetível às doenças relacionadas à queda de imunidade <sup>1,2</sup> (RAFFANTI e HASS, 2003).

Quando o número de linfócitos T CD4 situa-se abaixo de 200 células por mm<sup>3</sup>, considera-se que o indivíduo tem SIDA. Nesses pacientes, várias doenças podem se manifestar, incluindo as "oportunistas" e outras relacionadas à SIDA. A descoberta da doença normalmente ocorre quando o paciente consulta um médico devido a uma patologia relacionada à SIDA<sup>1</sup>. O tempo médio desde a infecção pelo HIV até o desenvolvimento da SIDA é de 10 anos. Aproximadamente 10% dos infectados progridem para a doença entre dois a três anos após a infecção, enquanto que aproximadamente 10% apresentam números estáveis de células T CD4 e nenhum sintoma após 12 anos ou mais <sup>1,2</sup>.

---

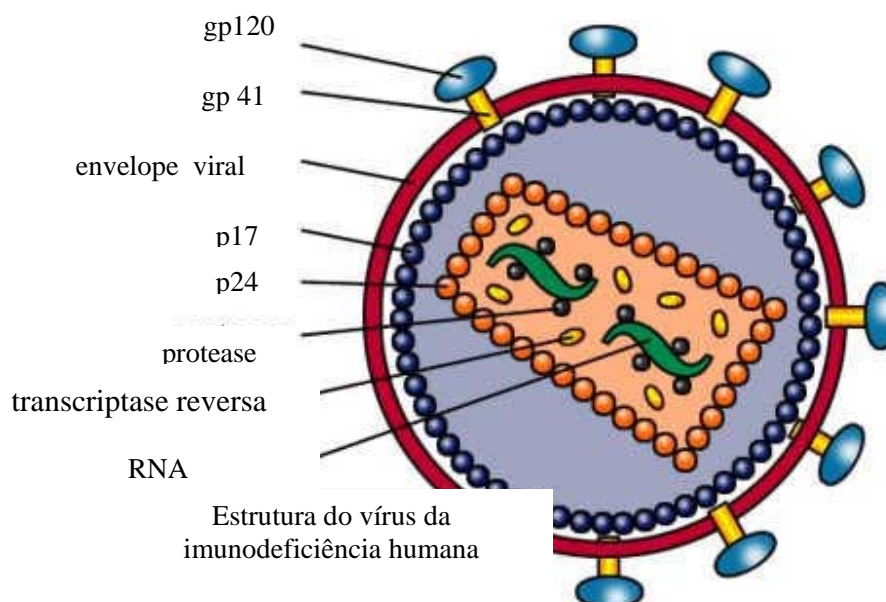
<sup>1</sup>[http://www.msd-brazil.com/content/patients/sua\\_saude/aids/informacao/doenca/html](http://www.msd-brazil.com/content/patients/sua_saude/aids/informacao/doenca/html). Acesso em 29/02/2007.

<sup>2</sup><http://www.hivmedicine.com>. Acesso em 29/07/2006.

O diagnóstico do HIV é realizado através da pesquisa de anticorpos, detecção do antígeno viral p24, técnicas de cultivo viral e testes de amplificação do genoma viral (PCR). As principais vias de transmissão são as relações sexuais, transfusões de sangue e hemoderivados, transmissão vertical (da mãe para o filho durante a gestação, parto ou aleitamento), uso de seringas contaminadas, principalmente em usuários de drogas injetáveis e acidentes de trabalho<sup>3</sup>.

### 3.1.1 Estrutura e ciclo do HIV

O HIV (Figura 1) é um vírus envelopado, possui duas moléculas de RNA e as enzimas protease e transcriptase reversa dispostas no interior do capsídeo o qual é envolto por uma camada protéica. O envelope é composto por uma dupla camada de fosfolipídios. A maioria dos retrovírus, caso do HIV, dependem dos três genes para se replicarem: grupo-antigênico, polimerase e envelope (gag, pol e env)<sup>3</sup>.



**Figura 1** Estrutura e organização do HIV (adaptado do HIV/AIDS Information and Prevention)<sup>4</sup>.

<sup>3</sup><http://hivmedicine.aidsportugal.com/r.htm>. Acesso em 22/02/2007

<sup>4</sup><http://www.aids-india.org/hivbasic2.htm>. Acesso em 28/05/2006



O HIV infecta linfócitos CD4+, macrófagos e células dendríticas e através da sua enzima transcriptase reversa, produz uma cópia de DNA, o qual é incorporado no material genético do hospedeiro pela integrase. Ocorre transcrição do RNA e a síntese protéica, formando novos vírus, os quais sob a ação da protease, tornam-se infectantes. Seu ciclo de vida celular sugere a existência de alvos potenciais para fármacos. Assim os fármacos são dirigidos basicamente contra as enzimas transcriptase reversa e protease. Apesar da importância dos fármacos inibidores destas enzimas para a sobrevivência dos soropositivos, novos inibidores que atuam em diversas etapas do ciclo de replicação viral são urgentemente necessários devido ao rápido desenvolvimento de resistência do HIV atribuído à sua extensa diversidade genética. Atualmente, fármacos com diferentes alvos estão sendo desenvolvidos visando a inibir diferentes pontos da replicação viral (RAFFANTI e HASS, 2003; SOUZA e ALMEIDA, 2003; GUBERT, 2004).

Segundo ADAMSON e FREED (2008), o foco para o desenvolvimento dos anti-retrovirais está nos novos inibidores de três fases de replicação viral: entrada do vírus na célula, integração do DNA viral no genoma celular e a maturação da partícula viral.

### **3.1.2 Fármacos anti-retrovirais**

Os fármacos utilizados no tratamento do HIV/SIDA, encontram-se no Quadro 1 distribuídos de acordo com a sua classificação: inibidores nucleosídico e nucleotídico da transcriptase reversa (INTR), inibidores não nucleosídico da transcriptase reversa (INNTR), inibidores da protease (IP), inibidores da integrase (II) e os inibidores de entrada ou de fusão (IE). Atualmente 12 novos fármacos estão em estudos clínicos de fase II<sup>1,2,3</sup>.

---

<sup>1</sup><http://www.emea.europa.eu/>, <sup>2</sup><http://www.minsaude.gov/> e <sup>3</sup>[http://en.wikipedia.org/wiki/antiretroviral\\_drug](http://en.wikipedia.org/wiki/antiretroviral_drug). Acesso em 22.07.2008.

**Quadro 1.** Fármacos anti-retrovirais. Adaptado de <http://www.emea.europa.eu/>; <http://www.minsaude.gov/> e [http://en.wikipedia.org/wiki/antiretroviral\\_drug](http://en.wikipedia.org/wiki/antiretroviral_drug), acessados em 22.07.2008.

Substância ativa	Abrev.	Nome comercial	Forma farmacêutica	Classe
Delavirdina <sup>a</sup>	DLV	Rescriptor <sup>®</sup>	comp.	
Efavirenzo	EFZ	Sustiva <sup>®</sup> , Stocrin <sup>®</sup>	comp., cáps., sol. oral	
Etravirina	TMC	Intelence <sup>®</sup>	comp.	<b>INNTR</b>
Nevirapina <sup>1</sup>	NVP	Viramune <sup>®</sup>	comp., susp. oral	
Abacavir	ABC	Ziagen <sup>®</sup>	comp., sol. oral	
Didanosina <sup>1</sup>	ddI	Videx <sup>®</sup> , Didax <sup>®</sup>	comp., pó para sol. oral	
Emtrecitabina	FTC	Emtriva <sup>®</sup>	cáps., sol. oral	
Estavudina <sup>1,a</sup>	D4T	Zerit <sup>®</sup>	cáps., pó para sol. oral.	
Lamivudina <sup>1</sup>	3TC	Epivir <sup>®</sup> Vudirax <sup>®</sup>	comp., sol. oral	<b>INTR</b>
Tenofovir	TDF	Viread <sup>®</sup>	comp.	
Zalcitabina <sup>a</sup>	ddC	Hivid <sup>®</sup>	comp.	
Zidovudina <sup>1</sup>	AZT	Retrovir <sup>®</sup> , Zidix <sup>®</sup>	comp., cáps., inj., sol. oral	
AZT+3TC		Combivir <sup>®</sup>	comp.	
AZT+3TC+ABC		Trizivir <sup>®</sup>	comp.	
EVF+FTC+TDF		Atripla <sup>®</sup>	comp., cáps.	
ABC+3TC		Kivexa <sup>®</sup>	comp.	
FTC+TDF		Truvada <sup>®</sup>	comp., cáps.	
Atazanavir	ATV	Reyataz <sup>®</sup>	cáps., pó para sol. oral	
Fosamprenavir	FPV	Telzir <sup>®</sup>	comp., susp oral	
Indinavir <sup>1,a</sup>	IDV	Crixivan <sup>®</sup>	cáps.	
Lopinavir+ r	LPV/r	Kaletra <sup>®</sup>	comp., cáps., sol. oral	<b>IP</b>
Nelfinavir	NFV	Viracept <sup>®</sup>	comp., pó para sol. oral	
Ritonavir <sup>1</sup>	RTV	Norvir <sup>®</sup>	cáps., sol. oral	
Saquinavir <sup>1</sup>	SQV	Invirase <sup>®</sup> , Fortovase <sup>®</sup>	comp, cáps.	
Tipranavir	TPV	Aptivus <sup>®</sup>	cáps.	
Darunavir	DRV	Prezista <sup>®</sup>	comp.	
Enfuvirtida	T-20	Fuzeon <sup>®</sup>	inj.	
Maraviroc		Celsentri <sup>®</sup>	comp.	<b>IE</b>
Raltegravir		Isentress <sup>®</sup>	comp.	<b>II</b>

comp. = comprimidos; cáps. = cápsulas; sol. oral = solução oral; susp. oral = suspensão oral

<sup>1</sup>Fabricado no Brasil pelos laboratórios estatais, <sup>a</sup>Raramente utilizado.

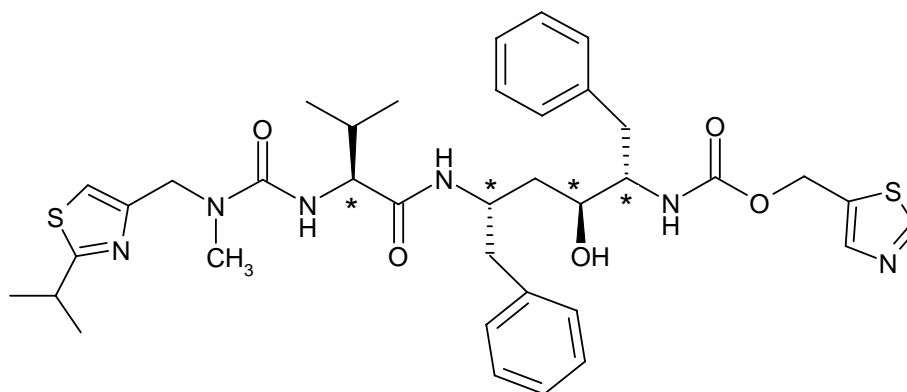
### 3.2 Lopinavir e ritonavir (Kaletra<sup>®</sup>)

O ritonavir é denominado quimicamente de 5-[tiazolilmetil] [1*S*,2*S*,4*S*) -1-benzil-2-hidróxi-4-[[*(2S)*-3-metil-2-[[metil[[2-(1-metiletil)tiazol-4-il]metil] carbamoil] amino] butanoil] amino]-5-fenilpentil carbamato, tem massa molecular de 720,95, fórmula molecular  $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$  e registro CAS 155213-67-5. É facilmente solúvel em metanol e etanol, solúvel em isopropanol e praticamente insolúvel em água. A estrutura química é mostrada na Figura 2 identificando os quatro centros assimétricos; é obtido por síntese estereoespecífica levando à formação do enantiômero de configuração *S,S,S,S*. Alguns polimorfos do ritonavir são conhecidos, e são referenciados como Tipo I e II. O Tipo II é termodinamicamente mais estável que o Tipo I (EMEA, 2005). Segundo LAW e colaboradores (2004) o ritonavir têm valores de  $pK_a$  de 1,8 e 2,6 atribuídos aos nitrogênios fracamente básicos dos anéis tiazólicos.

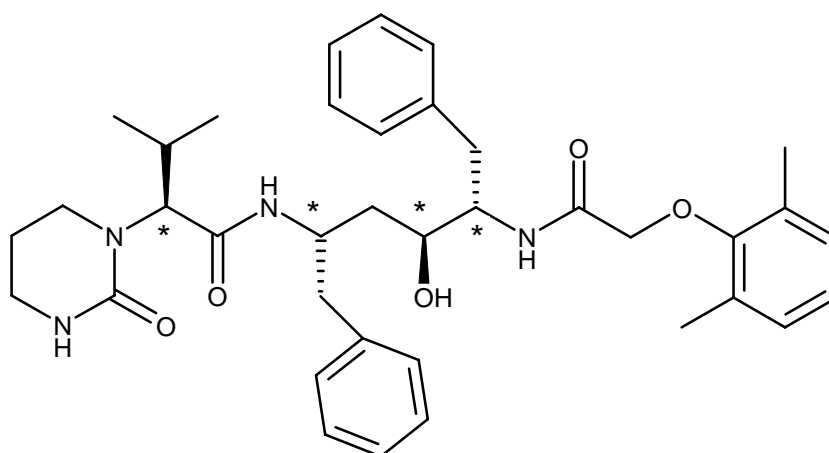
O lopinavir é denominado [(1*S*, 3*S*, 4*S*)-4-[[*(2,6* dimetilfenóxi) acetil] amino] -3-hidróxi-5-fenil-1- (fenilmetil) pentil] tetraidro- $\alpha$ - (1-metiletil) 2-oxo-1 (2*H*) pirimidino acetamida, tem registro CAS 192725-17-0, fórmula molecular  $C_{37}H_{48}N_4O_5$  e massa 628,82. É facilmente solúvel em metanol e etanol, solúvel em isopropanol e praticamente insolúvel em água. Possui quatro centros de assimetria e é também produzido por síntese estereoespecífica levando à formação do enantiômero de configuração *S,S,S,S*. A estrutura química é mostrada na Figura 3.

O fármaco existe na forma amorfa e quatro diferentes formas cristalinas denominadas Tipo I, Tipo II, Tipo III e Tipo IV. Os cristais do Tipo I caracterizam as formas cristalinas hidratadas do lopinavir e subdivide-se em Tipo I hidratado que contém aproximadamente 0,5 moléculas de água por molécula de lopinavir e Tipo I mais hidratado que contém entre 1 a 1,8 molécula de água por molécula de lopinavir. O cristal do Tipo II é uma forma solvatada do fármaco. O Tipo III compreende uma forma cristalina solvatada e uma forma cristalina dessolvatada enquanto que o Tipo IV caracteriza a forma cristalina não-solvatada do lopinavir (ABBOTT, 2001b). O Kaletra<sup>®</sup> cápsulas moles de gelatina, contém a forma amorfa e cristais do Tipo I

(EMEA, 2005). Segundo LAWNAY e colaboradores (2004), o lopinavir é um ácido fraco.



**Figura 2** Estrutura química do ritonavir



**Figura 3** Estrutura química do lopinavir

### 3.2.1 Atividade anti-retroviral

O lopinavir é um inibidor da protease do HIV, estruturalmente semelhante ao ritonavir. Estudos *in vitro* mostram que o lopinavir é 10 vezes mais potente contra o

HIV na presença de soro humano quando comparado ao ritonavir. Na ausência de plasma humano a concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) do lopinavir foi de 0,017  $\mu\text{M}$  e do ritonavir 0,068  $\mu\text{M}$  (RAFFANTI e HASS, 2003; ABBOTT, 2001a).

Combinação terapêutica de anti-retrovirais que inclui o lopinavir+ritonavir produz adequada e durável supressão da carga viral e aumento de células  $CD4+$ , conforme demonstrado em ensaio aleatório, realizado em crianças e adultos não submetidos e previamente submetidos ao tratamento com anti-retrovirais (CVETKOVIC e GOA, 2003).

A pequena quantidade de ritonavir presente na dose clínica padrão (400/100 mg lopinavir/ritonavir duas vezes ao dia) da formulação, não contribui diretamente para a atividade anti-retroviral. O lopinavir é intensamente metabolizado pelo CYP3A, produzindo baixas concentrações sistêmicas quando utilizado isoladamente. O ritonavir é um potente inibidor do CYP3A. Assim, o componente da associação, ritonavir, está presente unicamente para elevar e manter os níveis plasmáticos do lopinavir (CORBETT *et al.*, 2002; RAFFANTI e HASS, 2003; ABBOTT, 2001a).

### **3.2.2 Mecanismo de ação**

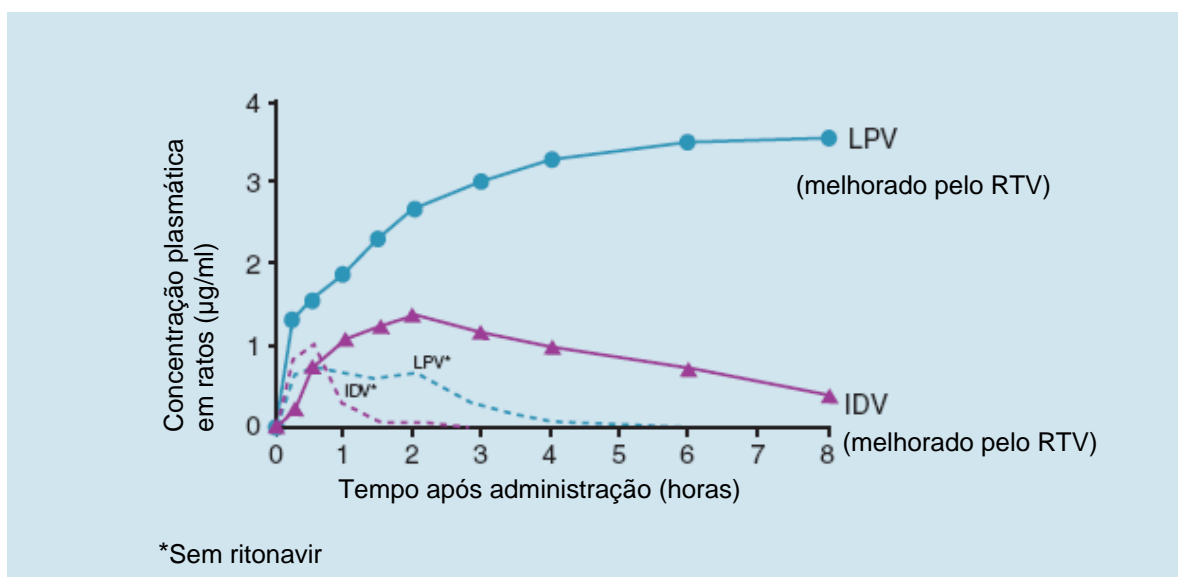
O lopinavir liga-se reversivelmente no sítio ativo da protease do HIV, inibindo o processamento de polipeptídeos e a subsequente maturação do vírus. Esta inibição evita a clivagem da poliproteína *gag-pol* produzindo vírus imaturos, incapazes de infectar outras células (RAFFANTI e HASS, 2003).

### **3.2.3 Farmacocinética**

Pesquisas evidenciam que ritonavir em quantidades significativamente abaixo da dose terapêutica é comumente utilizado na prática clínica para aumentar a concentração mínima ( $C_{\min}$ ) e prolongar o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de outros IPs. O

aumento da  $C_{\min}$  reduz as chances do desenvolvimento da resistência ao fármaco, enquanto que o aumento do tempo de meia-vida reduz a frequência entre as doses, o que pode melhorar a adesão do paciente ao tratamento (DHHS, 2006).

Estudos com lopinavir em modelos animais demonstraram que baixas concentrações plasmáticas foram obtidas após sua administração oral; contudo, quando co-administrado com ritonavir, as concentrações plasmáticas aumentaram substancialmente (Figura 4). Vários estudos farmacocinéticos em humanos apresentaram comportamento semelhante ao dos modelos animais (ABBOTT, 2001a).



**Figura 4** Concentrações plasmáticas obtidas após administração do lopinavir (LPV) e indinavir (IDV) administrados isoladamente e quando co-administrados com ritonavir (RTV), em ratos (Adaptado do modelo da Abbott, 2001a).

Na fase de equilíbrio, o lopinavir tem uma ligação às proteínas plasmáticas de 99%; liga-se principalmente à glicoproteína  $\alpha 1$ -ácida. Sofre biotransformação hepática via CYP3A, formando cerca de 13 metabólitos. O ritonavir é um inibidor desta isoenzima, interferindo na biotransformação do lopinavir e aumentando sua concentração. *In vitro*, produz inibição da CYP2D6, num grau menor que da CYP3A.

O tempo de meia-vida é de 5 a 6 horas e a depuração é de 6 a 7 l/h (ABBOTT, 2001a; FRANÇA, 2008).

### **3.2.4 Efeitos adversos – toxicidade**

Os efeitos adversos mais freqüentemente reportados ao lopinavir+ritonavir incluem dor abdominal, astenia, diarreia, flatulência, dor de cabeça, insônia, náuseas e vômitos. As anormalidades laboratoriais mais comuns consistem em elevações dos níveis de colesterol e de triglicérides (RAFFANTI e HASS, 2003).

Lipodistrofia, hipertrigliceridemia, hipocolesterolemia, resistência à insulina e diabetes melito têm sido amplamente reportados em pacientes tratados com regimes anti-retrovirais contendo IPs. A dislipidemia ocorre em mais de 70-80% dos pacientes HIV - positivos submetidos à terapia ARV potente, e pode estar associada a todos os IPs disponíveis, apesar da hipertrigliceridemia aparecer mais freqüentemente em pacientes tratados com ritonavir e saquinavir ou lopinavir+ritonavir (CALZA *et al.*, 2004).

### **3.2.5 Usos e preparações farmacêuticas**

A combinação lopinavir+ritonavir está indicada para o tratamento das infecções pelo HIV em combinação com outros anti-retrovirais em adultos e crianças (RAFFANTI e HASS, 2003; FRANÇA, 2008). A associação lopinavir+ritonavir encontra-se disponível em cápsulas de gelatina mole, solução oral e, em 2005, foi aprovada a forma farmacêutica comprimidos revestidos, todas sob o nome de Kaletra<sup>®</sup>.

Cada cápsula contém 133,3 mg de lopinavir e 33,3 mg de ritonavir, tendo como excipientes gelatina, glicerina, ácido oléico, óleo de rícino polietoxilado (polioxil 35), propilenoglicol, sorbitol, dióxido de titânio, corante amarelo crepúsculo e água. Esta formulação é um exemplo de sistema auto-emulsionante para liberação de fármacos; apresenta-se em frascos contendo 180 cápsulas. Cada mililitro da solução oral contém

80 mg de lopinavir e 20 mg de ritonavir e cada comprimido revestido contém 200 mg de lopinavir e 50 mg de ritonavir (EMEA, 2005; EMEA, 2006).

### **3.2.6 Doses e administração**

A dose recomendada para adultos é de 400/100 mg de lopinavir/ritonavir, correspondente a três cápsulas ou 5,0 ml da solução oral ou a 2 comprimidos revestidos duas vezes ao dia. As formas farmacêuticas cápsulas de gelatina e solução oral devem ser ingeridas com alimentos. O aumento da dose para 533/133 mg (4 cápsulas ou 6,5 ml) duas vezes ao dia deve ser considerada quando for administrada com efavirenzo ou nevirapina. Para crianças com mais de seis meses e menos de 12 anos e com peso entre 7 e menos de 15 Kg, a dose recomendada é de 12/3 mg de lopinavir/ritonavir, duas vezes ao dia; para crianças de 15 a 40 Kg, 10/2,5 mg. A dose máxima recomendada é de 400/100 mg, duas vezes ao dia (EMEA, 2006; FRANÇA, 2008).

### **3.2.7 Contra-indicações**

É contra-indicado em pacientes com hipersensibilidade à associação lopinavir+ritonavir, períodos de gestação e lactação, e em crianças menores de seis meses de idade. Não deve ser administrado concomitantemente com fármacos biotransformados preferencialmente pelo sistema enzimático CYP3A e CYP2D6, como flecainida, propafenona, astemizol, terfenadina, diidroergotamina e derivados, cisaprida, pimozida, midazolam, triazolam, lovastatina, sinvastatina e *Hypericum perforatum* (FRANÇA, 2008).

### **3.2.8 Interações medicamentosas**

O uso concomitante de fármacos biotransformados pelo sistema isoenzimático CYP3A com lopinavir+ritonavir poderá elevar as concentrações plasmáticas daqueles.



Indutores da CYP3A podem aumentar a depuração do lopinavir com a conseqüente diminuição da sua concentração plasmática (FRANÇA, 2008).

Lopinavir+ritonavir causa significativa redução da área sob a curva (ASC) do etinilestradiol (43%). Pacientes em tratamento com lopinavir+ritonavir e que fazem uso de contraceptivos orais devem buscar métodos contraceptivos adicionais ou alternativos. Os inibidores da HMG-CoA redutase não têm efeito farmacocinético significativo no lopinavir. Contudo LPV/r aumenta aproximadamente 5 a 6 vezes o  $C_{max}$  e a ASC da atorvastatina, a qual é metabolizada pela CYP3A (ABBOTT, 2001a; FRANÇA, 2008).

### **3.2.9 Armazenamento**

Cápsulas de gelatina mole e solução oral devem ser armazenadas em geladeira (2 a 8 °C) até a dispensação. Após dispensação, podem ser mantidas à temperatura ambiente até 25 °C, se forem consumidas dentro de dois meses. Deve-se evitar a exposição ao calor excessivo. Os comprimidos revestidos não requerem refrigeração (EMEA, 2005; EMEA, 2006).

#### 4 REFERÊNCIAS

ABBOTT. Kaletra<sup>®</sup> (lopinavir/ritonavir) *Product Monograph*, 2001a, p. 1-74. Disponível em: <<http://www.rxabbott.com>>, acessado em abr/2002.

ABBOTT. DICKMAN, D. A.; CHEMBURKAR, S.; FORT, J. J.; HENRY, R. F.; LECHUGA-BALLESTEROS, D.; NIU, Y.; PORTER, W. CRYSTALLINE PHARMACEUTICAL. IPC: C07D 239/10. US, WO/2001/074787, 11 nov, 2001b. *World Intellectual Property Organization*. Disponível em <<http://www.wipo.int/pctdb/images4/PATENTSCOPE/9/15/69/001569.pdf>>, acessado em jan/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1277. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 31. set. 2002.

ADAMSON, C. S.; FREED, E. O. Recent progress in antiretrovirals – lessons from resistance. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 9-10, p. 424-432, 2008.

CALZA, L.; MANFREDI, R.; CHIODO, F. Dyslipidaemia associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, n. 1, p. 10-4, 2004.

CORBETT, A.H.; LIM, M.L.; KASHUBA, A.D.M. Kaletra (lopinavir/ritonavir). *The Annals Pharmacotherapy*, v. 36, n. 7-8, p. 1193-203, 2002.

CVETKOVIC R. S. e GOA, K. L. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*, v. 63, n. 8, p. 769-802, 2003.

DHHS: *Department of Health and Human Services*. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. Developed by the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection, 2006.

DIAS, C. L.; ROSSI, R. C.; DONATO, E. M.; BERGOLD, A. M.; FRÖEHLICH, P. E. LC determination of ritonavir, a HIV protease inhibitor, in soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 62, p. 589-593, 2005.

DONATO, E.M.; DIAS, C. L.; ROSSI, R. C., VALENTE, R. S.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A. M. LC Method of studies on the stability of lopinavir and ritonavir soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 63, p. 437-443, 2006.

DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on *in vivo* data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 547–552, 2008.

EMA. Kaletra:Scientific Discussion. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2005, p.1-24. Disponível em <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/kaletra/kaletra.htm>> acessado em mar/2006.

EMA. Background Information of Procedure. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2005a, p.1/1. Disponível em <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/kaletra/kaletra.htm>> acessado em mar/2006.

EMA. Kaletra:Scientific Discussion. Procedure No. EMEA/H/C/368/X/27. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2006, p.1-20. Disponível em <<http://www.emea.eu.int>>, acessado em ago/2007.

ERON, J.J.; FEINBERG, J.; KESSLER, H.A.; HOROWITZ H. W.; WITT, M. D.; CARPIO, F.F.; WHEELER, D.A.; RUANE, P.; MILDVAN, D.; YANGCO, B. G.; BERTZ, R.; BERNSTEIN, B.; KING, M. S.; SUN, E. Once-daily versus twice-daily lopinavir/ritonavir in antiretroviral-naïve HIV-positive patients: a 48-week randomized clinical trial. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n. 2, p. 265-72, 2004.

FDA. Approved Drug Products (NDA) 021906. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 2005. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov>>, acessado em abr/2006.

FRANÇA, F. F. A. C. *Andrejus Korolkovas: Dicionário Terapêutico Guanabara*, ed. 2008/2009, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 18.41-18.60.

GRANGEIRO, A.; TEIXEIRA, L.; BASTOS, F.; TEIXEIRA, P. Sustentabilidade da política de acesso a medicamentos anti-retrovirais no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, n. 40 (supl.), p. 60-69, 2006.

GUBERT, I. C. *Farmacologia Integrada*. 2 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 104-108.  
HACKMANN, E. R. M.; BENETON, S. A.; SANTORO, M. I. R. M.

HICKS, C.; KING, M.S.; GULICK, R. M.; WHITE, A.C.; ERON J.J.;KESSLER, H.A.; BENSON, C.; KING, K. R.; MURPHY, R. L., BRUN, S. C. Long-term safety and durable antiretroviral activity of lopinavir/ritonavir in treatment-naïve patients: 4 year follow-up study. *AIDS*, v. 18, n. 5, p. 775-779, 2004.

HOFFMANN, C. e KAMPS, B. S. (Ed). *HIV Medicine*, 2006. Disponível em <<http://www.hivmedicine.com>>, acessado em jan/2006.

LAWNAY, O.; TOD, M.; LOUCHAHI, K.; BELARBI, L.; BOUCHAUD, O.; MÉNAIM, N.; PETITJEAN, O.; ROBINEAU, M.; GUILLEVIN, L.; LORTHOLARY, O. Differential diffusions of indinavir and lopinavir in genital secretions of human immunodeficiency virus infected women. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 2, p. 632-634, 2004.

LAW, D.; SCHMITT, E. A.; MARSH, K. C.; EVERITT, E. A.; WANG, W. L, FORT, J. J. KRILL, S. L.; QIU, Y. H. Ritonavir-PEG 8000 amorphous solid dispersions: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 93, n.3, p. 563-570, 2004.

OMS: *Organización mundial de la salud. Situación de la epidemia de Sida*, 2006. Disponível em: <[http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/12\\_aps\\_2006](http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/12_aps_2006)>, acessado em nov/2007.

RAFFANTI, S.e HASS, D. W. Antimicrobianos, Agentes anti-retrovirais In: HARDMAN, J. G. e LIMBIRD, L. E. (Ed). *Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. Cap. 51. p.1212-1033.

ROSSI, R.C.; DIAS, C. L.; DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on *in vivo* data. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 63, p. 437-443, 2007.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova*, v. 26, n.3, p.366-372, 2003.

UNAIDS. *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization*. AIDS epidemic update: December 2007. Disponível em <<http://www.unaids.org/en/>>, acessado em ago/2008.





## **1.1 INTRODUÇÃO**

Os testes de identificação e caracterização fazem parte das farmacopéias, visando a assegurar a identidade e a qualidade da substância ativa e do produto acabado. Os principais métodos de identificação preconizados pelas farmacopéias, baseados nas características intrínsecas de cada fármaco, são a cromatografia em camada delgada, espectro de absorção no ultravioleta, espectro de absorção no infravermelho, determinação do poder rotatório e determinação do ponto de fusão.

Considerando que não foram encontrados dados publicados sobre o controle de qualidade da substância ativa lopinavir, este capítulo objetiva desenvolver métodos de análise qualitativos para o controle de qualidade desta substância ativa. Métodos qualitativos para o controle de qualidade da substância ativa ritonavir foram previamente desenvolvidos por DIAS (2006).

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Amostras e substâncias químicas de referência (SQRs)

Cápsulas de gelatina mole contendo 133,3 mg de lopinavir e 33,3 mg de ritonavir, nome comercial Kaletra<sup>®</sup>, apresentadas em frascos contendo 180 unidades, produzidas pelo laboratório Abbott foram utilizadas como amostra. O Kaletra<sup>®</sup> lote n° 155282E21, com vencimento em março de 2006 e lote 330962E21 com vencimento em outubro/2007 foram obtidos junto à Secretaria Estadual de Saúde/RS – Seção Estadual de Controle das DST/AIDS e foram utilizados em todos os experimentos realizados. As SQRs do ritonavir, lote 1022/03, com pureza de 99,5% e do lopinavir, lote 1348/03 com pureza de 98,7%, foram gentilmente cedidas pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

### 1.2.2 Caracterização e identificação do lopinavir SQR

#### 1.2.2.1 Poder rotatório específico

A determinação do poder rotatório específico,  $|\alpha|_D^{20}$ , do lopinavir foi efetuada em polarímetro PERKIN Elmer 341, no comprimento de onda da raia D de sódio,  $\lambda = 489,3$  nm, a  $20 \pm 0,5$  °C, utilizando cubeta de 1 dm de caminho óptico. Cinco leituras foram efetuadas em solução metanólica de lopinavir a 2,0% (p/V), com o equipamento previamente zerado com metanol. O poder rotatório específico foi determinado pela Equação 1.1 (F. BRAS. IV),

$$|\alpha|_D^{20} = \frac{100\alpha}{lc} \quad (1.1)$$



onde  $l$  e  $c$  são respectivamente, o comprimento da cubeta do polarímetro, em decímetro e a concentração da substância em percentagem p/V.

#### **1.2.2.2 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)**

Os máximos de absorção na região do UV foram determinados em soluções metanólicas das SQRs de lopinavir e de ritonavir, separadamente, cada uma contendo  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Os espectros foram traçados em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV-1601 PC, microprocessado. Foram obtidos, também, espectros das SQRs de lopinavir e ritonavir, em diferentes solventes: HCl 1 M, NaOH 0,01 M e 0,1 M.

#### **1.2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)**

O espectro de infravermelho foi obtido em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System, Spectrum V5.3, através da dispersão de 1,6 mg da SQR de lopinavir em 150 mg de brometo de potássio e posterior obtenção da pastilha.

#### **1.2.2.4 Ponto de fusão**

O ponto de fusão do lopinavir foi determinado pelo método do capilar, em equipamento Mettler Toledo, FP 90. A amostra foi compactada em tubo capilar com diâmetro de 1 mm e 6 cm de comprimento. Aproximadamente 5 mm do capilar foram preenchidos com a amostra. O equipamento foi previamente calibrado com a SQR benzil, com ponto de fusão de  $96 \text{ }^\circ\text{C}$ . Entre  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  o incremento de temperatura foi de  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  por minuto. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### **1.2.2.5 Calorimetria exploratória diferencial**

A SQR do lopinavir foi submetida à calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizando equipamento SHIMADZU DSC-60 com integrador THERMAL

ANALYZER TA-60WS e controlador de fluxo FC-60A. A curva de DSC foi obtida sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 ml min<sup>-1</sup>, razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 0 a 120 °C, empregando cápsula de alumínio fechada contendo 1,20 mg de lopinavir. Este ensaio foi realizado no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

#### 1.2.2.6 Difração por Raios-X

Este ensaio foi realizado no Instituto de Geociências da UFRGS. A difração por raios X da SQR do lopinavir foi realizada em Difratorômetro D5000, Siemens, ânodo de cobre, 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 e foi utilizado 1 g de lopinavir SQR. A obtenção e análise dos dados foram efetuadas pelo programa Diffrac Plus Evaluation, Bruker-axs, versão 7.0.

Os valores de  $d$  foram calculados com base no ângulo  $2\theta$ , utilizando a Equação 1.2, de Bragg, onde  $n$  é a ordem de difração,  $d$ , a distância entre os planos atômicos,  $\theta$  o ângulo onde há interferência coerente e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação por Raios-X ( $\text{CuK}\alpha = 1,54 \text{ \AA}$ ) utilizado (SURYANARAYANAN, 1995; ABDOL, 2000).

$$n\lambda = 2d\text{sen}\theta \quad (1.2)$$

#### 1.2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

A SQR do lopinavir foi submetida à microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na MEV uma pequena quantidade de lopinavir foi uniformemente pulverizada sobre fita condutora de carbono dupla face, presa a suporte metálico de aproximadamente 8 mm de diâmetro. A amostra foi metalizada com ouro 18 quilates, 24 horas antes da análise. A imagem topográfica dos cristais foi obtida utilizando

equipamento MEV JEOL, modelo JSM 6060, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

#### **1.2.2.8 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 F254, Merck. Com auxílio de um capilar aferido, 6 µl de cada solução metanólica, ritonavir e lopinavir, ambas na concentração de 4 mg ml<sup>-1</sup>, foram separadamente aplicadas. A cromatoplasma foi transferida para a cuba cromatográfica previamente saturada com a fase eluente. Após o desenvolvimento do cromatograma a cromatoplasma foi deixada à temperatura ambiente para a evaporação do solvente e revelada com lâmpada de raios ultravioleta, no comprimento de onda de 254 nm. Foram calculados, para cada substância, o valor do fator de retenção, R<sub>f</sub>, através da Equação 1.3, onde, d<sub>s</sub> é a distância percorrida pela substância e d<sub>m</sub> é a distância percorrida pela fase móvel.

$$R_f = \frac{d_s}{d_m} \quad 1.3$$

## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1 Rotação específica

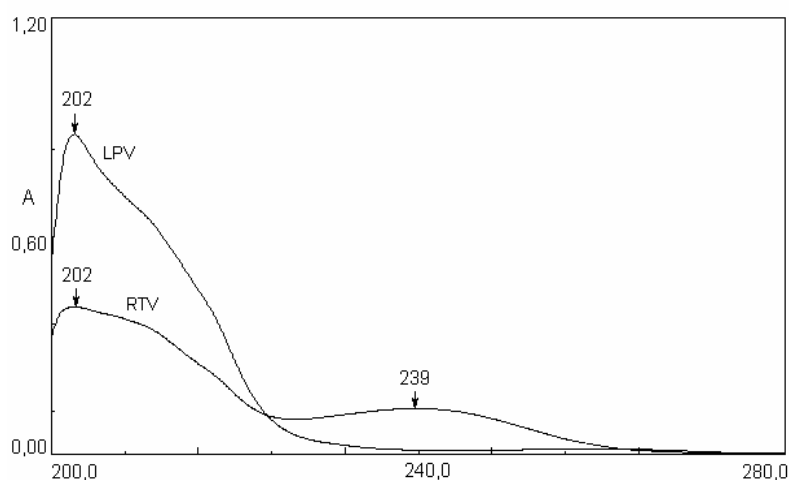
A atividade óptica é uma função da estrutura química do composto. A estrutura do lopinavir apresenta quatro centros assimétricos, apresentando, portanto, atividade óptica, ou seja, têm a propriedade de desviar o plano da luz polarizada quando esta passa através da solução que o contém. É utilizada para estabelecer a pureza e a identidade do composto. A rotação específica média da SQR do lopinavir foi de  $-22,2 \pm 0,7$  (DPR), em metanol.

### 1.3.2 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

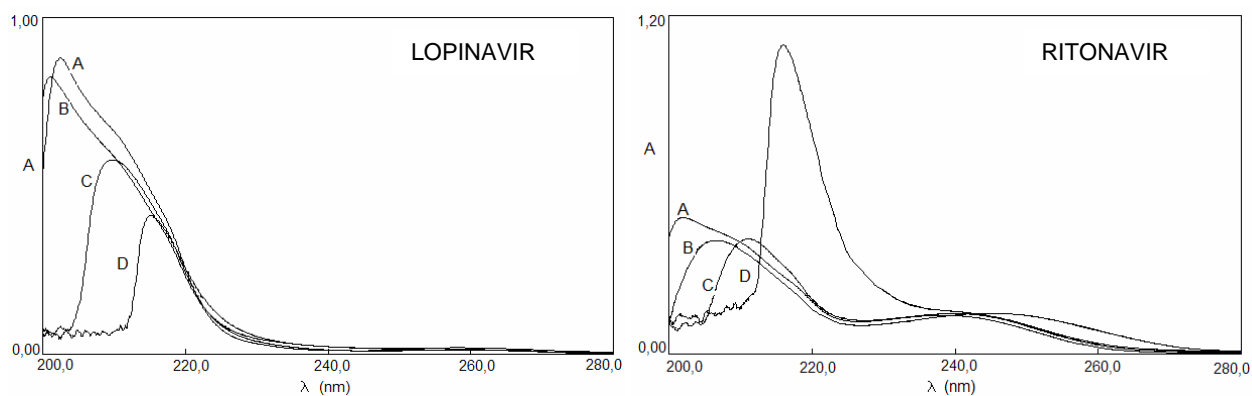
Lopinavir e ritonavir, em metanol, mostram máximos no comprimento de onda de 202 nm, atribuídos às transições eletrônicas do anel aromático. Em ambos os fármacos, não foram observadas as transições características do aromático na região de 254 nm. O ritonavir apresentou ainda, dois máximos de absorção, um em 226 e outro em 239 nm. A Figura 1.1 mostra os espectros das soluções metanólicas das SQRs do lopinavir e do ritonavir, ambas na concentração de  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

O efeito de diferentes solventes tanto no deslocamento quanto na intensidade da absorção, foi avaliado, separadamente, em soluções das SQRs do lopinavir e do ritonavir. Em solução de HCl 0,1 M o lopinavir apresentou um leve deslocamento hipsocrômico e um leve efeito hipocrômico, quando comparado com o espectro da solução metanólica. Soluções de hidróxido de sódio deslocam o espectro de absorção para a região do vermelho e provocam efeito hipocrômico. Esses efeitos são acentuados pelo aumento da concentração do NaOH, conforme ilustrado na Figura 1.2,

podendo ser os mesmos atribuídos à ionização do (s) grupos amídicos do lopinavir, em pH básico.



**Figura 1.1** Espectro de absorção no UV referentes às soluções metanólicas das SQRs de LPV  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  e de RTV  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ , com seus máximos de absorção.



**Figura 1.2** Espectros de absorção na região do UV das soluções das SQRs de lopinavir e ritonavir, ambos na concentração de  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  em (A) metanol, (B) HCl 0,1 M, (C) NaOH 0,01 M e (D) NaOH 0,1 M.

Os espectros de absorção do ritonavir, em solução de HCl 0,1 M e NaOH 0,01 M apresentaram um pequeno deslocamento batocrômico e um pequeno efeito hipsocrômico, quando comparada com o espectro obtido com a solução metanólica. Esses efeitos são um pouco mais acentuados na solução de NaOH 0,01 M. Em solução

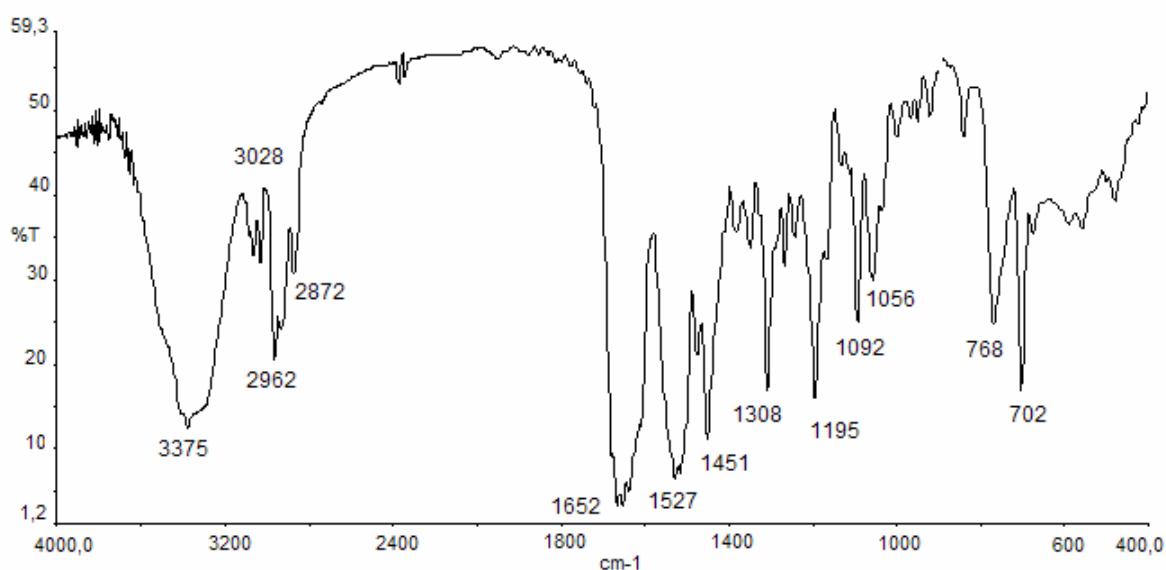
de NaOH 0,1 M o espectro de absorção do ritonavir apresenta um acentuado deslocamento para o vermelho e um acentuado aumento da intensidade de absorção. Nos estudos de degradação forçada, realizados por CLAE, este máximo de absorção corresponde a um produto de degradação do ritonavir.

### 1.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Método de identificação dos compostos orgânicos por excelência, tem a capacidade de diferenciar substâncias com pequenas diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos. Assim, fatores como polimorfos, hidratos e solvatos podem originar diferenças no espectro de infravermelho (F.BRAS. IV; STUART, 2004; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000 ).

O espectro de infravermelho da SQR do lopinavir pode ser visualizado na Figura 1.3 e as bandas de absorção características e suas possíveis atribuições (NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001; STUART, 2004), encontram-se no Quadro 1.1. Na Figura 1.9 do Anexo, encontra-se o espectro de infravermelho para o cristal Tipo I mais hidratado do lopinavir, obtido da literatura (ABBOTT, 2001).

Considerando-se que a correlação entre as bandas de absorção de uma amostra desconhecida com as de uma amostra padrão constitui uma prova de identificação, e o resultados obtidos pelos outros métodos de identificação do lopinavir em estudo, podemos inferir que a SQR do lopinavir estudada é do Tipo I mais hidratado. Segundo a ABBOTT (2001) e em concordância com a literatura, o espectro de infravermelho do lopinavir no estado sólido é um método de caracterização e diferenciação das diferentes formas cristalinas. A principal característica que os diferencia é a posição da banda da carbonila da amida.



**Figura 1.3** Espectro na região do infravermelho para a SQR de lopinavir em KBr, obtido utilizando espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System.

**Quadro 1.1** Freqüências de absorção das bandas características no infravermelho para o lopinavir e suas respectivas atribuições.

Freqüência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições*
3375	Estiramento N-H de amida sobreposta ao estiramento O-H
3028	Estiramento C-H de anel aromático
2962	Estiramento assimétrico de C-H de alceno
2872	Estiramento simétrico de C-H de alceno
1652	Deformação axial C=O da amida (Amida banda I)
1527	Deformação N-H misturado com estiramento C-N da amida (Amida banda II)
1451	Estiramento C=C do anel aromático
1308	Estiramento C-N misturado com deformação N-H da amida (Amida banda III)
1195	Estiramento assimétrico Ar-O-R
1092	Estiramento C-O de álcool secundário
1056	Estiramento simétrico Ar-O-R
702-768	Deformação C-H do anel aromático

\*NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001; STUART, 2004.

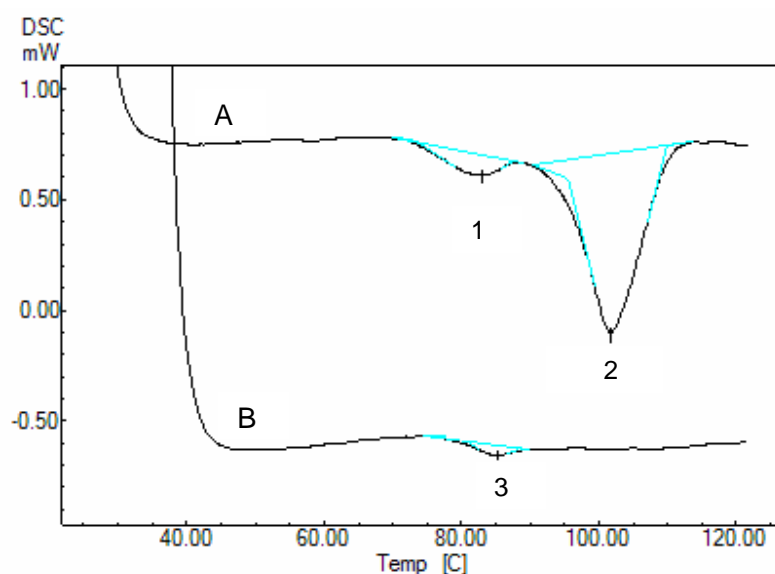
### 1.3.4 Calorimetria exploratória diferencial e ponto de fusão

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede a diferença entre os fluxos de calor de uma amostra e de uma célula de referência que estão sujeitas a esquema de temperatura controlada, possibilitando avaliar os efeitos térmicos caracterizados por mudanças na entalpia, como ponto de fusão, cristalização, transições sólido-sólido e degradação química (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002; SKOOG *et al*, 2002).

Considerando que muitos compostos podem cristalizar em mais de uma forma cristalina, a DSC é uma ferramenta útil para identificação dessas espécies, em algumas situações, pelo simples estudo do ponto de fusão. Por outro lado, em muitos casos, esta técnica não é capaz de diferenciar polimorfo do ruído de repetidas medições, indicando que a ausência de diferença no ponto de fusão não indica necessariamente a ausência de efeitos polimórficos. Nos estudos de polimorfismo, métodos térmicos, em particular a DSC, têm sido utilizados como método suporte na identificação e caracterização destas formas cristalinas (CRAIG, 2006).

Os termogramas da Figura 1.4 caracterizam o comportamento térmico do lopinavir submetido ao aquecimento (A) e resfriado e submetido novamente ao aquecimento (B). No primeiro aquecimento, a endoterma com temperatura de *onset* de 73,04 °C refere-se a perda de água e a próxima endoterma representa o ponto de fusão do lopinavir, caracterizado pela temperatura de *onset* em 95,46 °C com um consumo de 38,80 J/g de energia. No segundo aquecimento, a curva de DSC mostra a transição vítrea do lopinavir, endoterma referente à entalpia de relaxação. Nenhum evento de degradação da amostra foi verificado nos termogramas, na faixa de temperatura do experimento. Não foi encontrado na literatura o termograma para esta forma cristalina do lopinavir. Os dados obtidos pela DSC são apresentados no Quadro 1.2. O ponto de fusão médio do lopinavir ( $\pm$  DPR), obtido por método capilar, foi de 95,7 °C ( $\pm$  0,56), em conformidade ao obtido pela DSC. Oportuno aqui ressaltar a importância da DSC considerando que ela permite verificar os demais eventos térmicos que ocorrem na amostra durante o experimento.





**Figura 1.4** Termogramas do lopinavir SQR referentes ao primeiro aquecimento (**A**) e ao segundo aquecimento (**B**), obtidos com equipamento SHIMADZU DSC-60, atmosfera inerte de nitrogênio e velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

**Quadro 1.2** - Dados obtidos por DSC para o lopinavir.

Termograma	Endoterma	<sup>1</sup> Onset ( $^{\circ}\text{C}$ )	Peak ( $^{\circ}\text{C}$ )	<sup>2</sup> Endset ( $^{\circ}\text{C}$ )	<sup>3</sup> Heat (J/g)
<b>A</b>	1	73,04	82,93	87,58	4,26
	2	95,46	101,80	109,91	38,80
<b>B</b>	3	temperatura de transição vítrea: $85,19\text{ }^{\circ}\text{C}$			

A: primeiro aquecimento; B: segundo aquecimento; <sup>1</sup> início da fusão; <sup>2</sup> final da fusão; <sup>3</sup> valor de entalpia ( $\Delta H$ ).

### 1.3.5 Difração por Raios-X (DRX)

O difratograma de um cristal permite a identificação da espécie baseado nas posições ( $2\theta$ ) e nas intensidades dos picos, quando comparado com um padrão. As intensidades dos picos dependem do ordenamento das moléculas e os ângulos dependem dos espaços interplanares da rede cristalina; os valores de  $d$ , calculados pela equação de Bragg, dependem das dimensões da estrutura. Neste contexto, todas as reflexões de raios X de um cristal dependem apenas das dimensões da célula unitária,

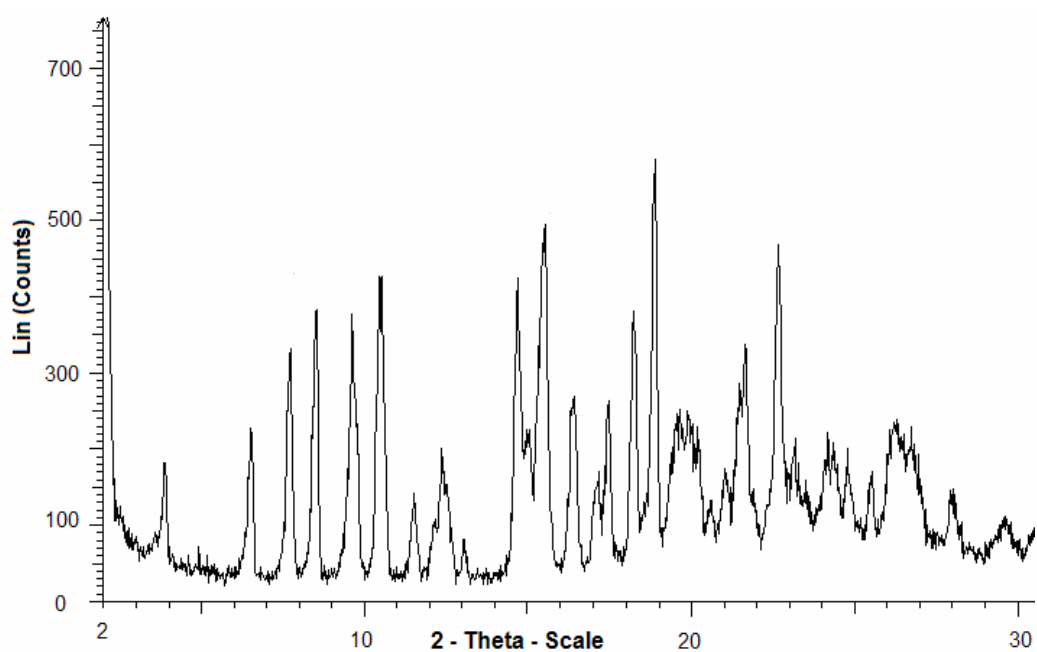
menor porção do cristal (LIEN e KENNON, 2000; BLEICHER e SASAKI, 2000; NEWMAN e STAHLY, 2002).

Analisando os difratogramas apresentados nas Figuras 1.5 e 1.6, respectivamente para a SQR de lopinavir estudada e para o cristal Tipo I mais hidratado do lopinavir obtido da literatura (ABBOTT 2001), infere-se que a SQR analisada é do Tipo I mais hidratado baseado nas posições dos ângulos 2-Theta dos respectivos difratogramas, cujos valores são apresentados no Quadro 1.2 do Anexo. Cabe salientar que os difratogramas visualizados na literatura, para as quatro diferentes formas cristalinas são distintos, inclusive para o Tipo I hidratado e Tipo I mais hidratado do lopinavir, fazendo da DRX o método de escolha para caracterizar polimorfos, solvatos e hidratos.

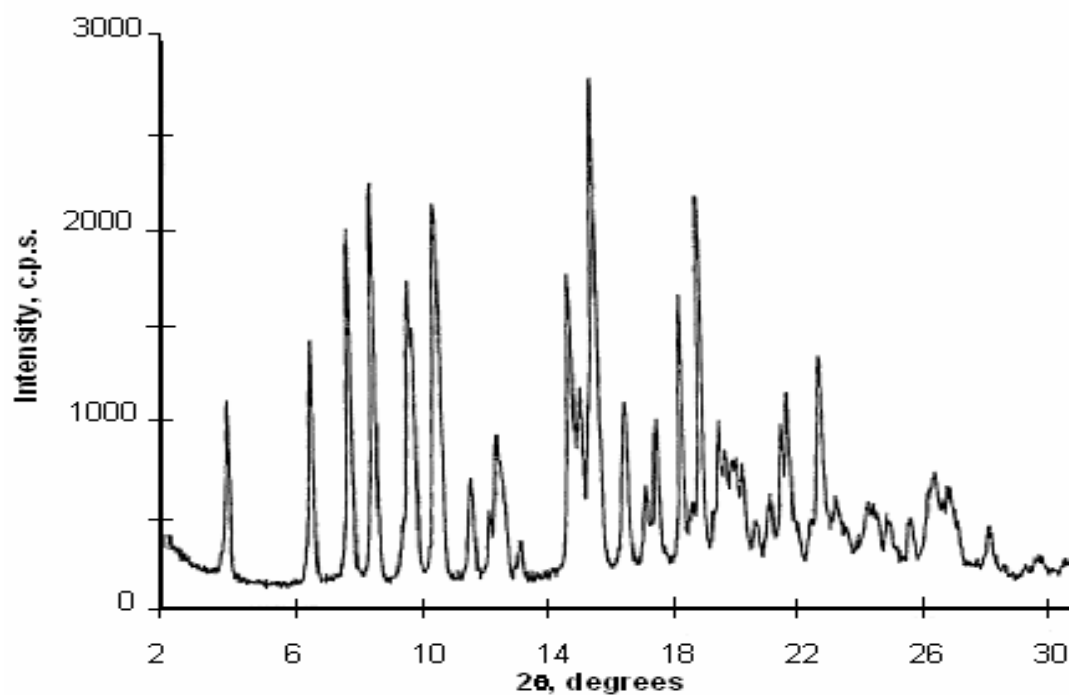
O cristal Tipo I mais hidratado do lopinavir apresenta sistema cristalino monoclinico (ABBOTT 2001). O que diferencia este tipo de célula dos demais sistemas cristalinos (cúbico, tetragonal, ortorrômbico, hexagonal, romboédrico, triclinico) é a relação entre os parâmetros de rede, que compreendem o comprimento dos três eixos cristalográficos (a, b, c) e seus ângulos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). O conhecimento dos parâmetros de rede, determinam a estrutura do cristal, pois o mesmo é composto do “empacotamento” dessas células. (SURYANARAYANAN, 1995; BRITAIN, 2001; NEWMAN e STAHLY, 2002).

No caso do sistema cristalino monoclinico,  $a \neq b \neq c$ ;  $\alpha = \gamma = 90^\circ \text{C}$ ,  $\beta > 90^\circ \text{C}$ ; cristais de faces assimétricas são mais solúveis quando comparados aos simétricos, de mesmo tamanho. Segundo SURYANARAYANAN (1995), na área farmacêutica, são comumente encontrados os sistemas triclinico, monoclinico e ortorrômbico.

Alterações como interconversão de polimorfos, dessolvatação de solvatos, desidratação de hidratos e ou a formação de hidratos, são possíveis de ocorrer nestas formas cristalinas. Estas alterações podem modificar as propriedades físico-químicas podendo conseqüentemente alterar a biodisponibilidade do fármaco (VIPPAGUNTA, 2001) sólido se a solubilidade for o fator limitante da velocidade de absorção.



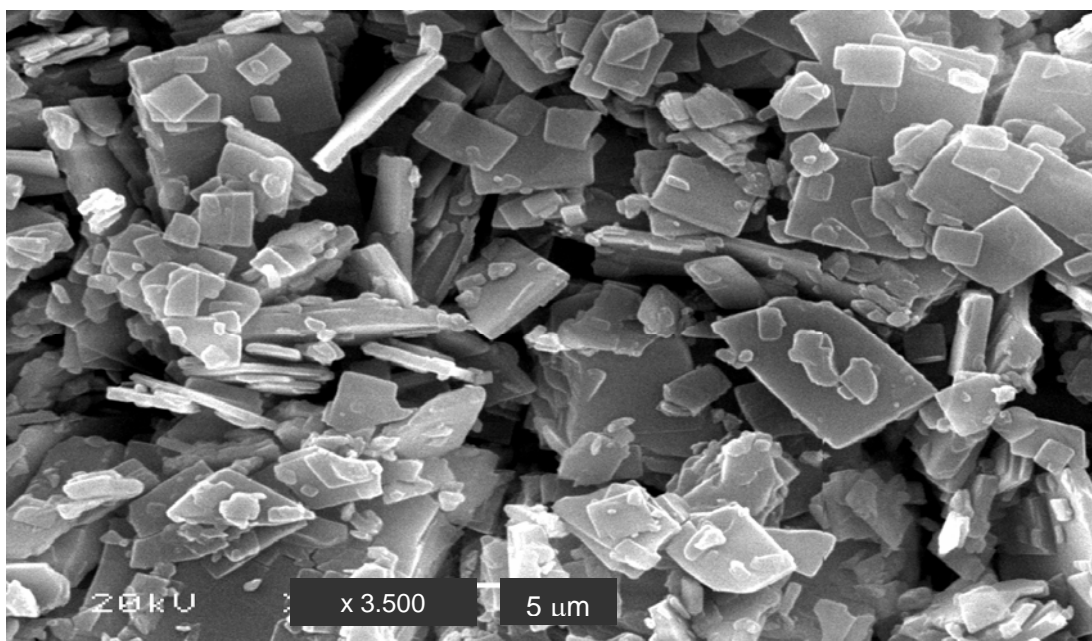
**Figura 1.5** Difratograma da SQR lopinavir obtido utilizando difratômetro D5000, Siemens, ânodo de cobre, energia de 25 mA e 40 Kv, intervalo de varredura de 2° a 72° 2θ, com passo de 0,02° 2θ por segundo.



**Figura 1.6** Difratograma da forma cristalina Tipo I mais hidratada do lopinavir obtido em Difratômetro Bruker SMART (ABBOTT, 2001).

### 1.3.6 Microscopia eletrônica de varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) encontra grande aplicabilidade no desenvolvimento de novos materiais ou substâncias em diversas áreas, pois tem a capacidade de fornecer detalhes das características microestruturais. A imagem dos cristais do lopinavir SQR obtida pela MEV é mostrada na Figura 1.7.



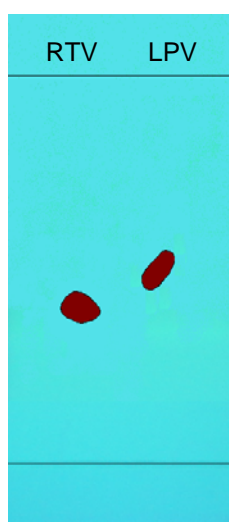
**Figura 1.7** Imagem da SQR do lopinavir, obtida pela MEV, marca JEOL, modelo JSM 6060.

Observa-se basicamente a presença de cristais menores de formato irregular e de cristais retangulares de tamanho maior com formato regular. O tamanho e a forma do cristal são fatores importantes a serem considerados, em virtude da solubilidade, considerando que o aumento da área superficial aumenta a velocidade de dissolução do fármaco.

### 1.3.7 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A comparação dos valores de Rf da amostra com os do padrão é um método qualitativo, visto que sob as mesmas condições cromatográficas, um dado composto

percorre uma distância fixa em relação à distância percorrida pelo solvente. Assim, a CCD pode auxiliar na identificação de substâncias (WATSON, 2005). A Figura 1.8 mostra a cromatoplaça das SQRs. O valor de Rx (Rf do lopinavir/Rf do ritonavir) obtido foi de 1,1 utilizando fase móvel constituída de diclorometano:éter:metanol:água:triethylamina (75:15:8:1:0,1 V/V/V/V). A revelação foi efetuada com lâmpada de UV em 254 nm. O sistema eluente utilizado é semelhante ao utilizado por WATSON (2005) para a identificação de hormônios esteróides.



**Figura 1.8** CCD do ritonavir e lopinavir SQRs, obtida utilizando placa de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> e fase móvel constituída de diclorometano:éter:metanol:água:triethylamina (75:15:8:1: 0,1 V/V/V/V) e revelação com lâmpada de UV 254 nm.

## **1.4 CONCLUSÕES**

- A SQR do lopinavir estudada é compatível com o cristal Tipo I mais hidratado com sistema cristalino monoclinico.
- O espectro de IV da SQR do lopinavir estudado é compatível com o cristal Tipo I mais hidratado.
- A SQR do lopinavir funde a 95,5 °C e não apresenta evento de degradação química nas condições utilizadas na DSC. No método capilar, a SQR funde a 95,7 °C.
- A CCD desenvolvida pode ser utilizada para identificação do lopinavir e do ritonavir SQRs.

## 1.5 REFERÊNCIAS

ABBOTT, DICKMAN, D. A.; CHEMBURKAR, S.; FORT, J. J.; HENRY, R. F.; LECHUGA-BALLESTEROS, D.; NIU, Y.; PORTER, W. CRYSTALLINE PHARMACEUTICAL. IPC: C07D 239/10. US, WO/2001/074787, 11 Nov, 2001. *World Intellectual Property Organization*. Disponível em <<http://www.wipo.int/pctdb/images4/PATENTSCOPE/9/15/69/001569.pdf>>, acessado em jan/08.

ABDOU, H. M. Instrumental Methods of Analysis. In: GENNARO, A.R. (Ed.). *Remington's Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*. 20<sup>th</sup>. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap. 34, p. 614- 633.

BLEICHER L. e SASAKI, J.M. *Introdução à difração de raios-X em cristais*. Universidade Federal do Ceará, 2000.

BRITTAIN, H. G. Solid-State Analysis. In: AHUJA, S.; SCYPINSKI, S. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. San Diego: Academic Press, 2001. Cap. 3, p. 57-65.

CRAIG, D. Q. M. Characterization of Polymorphic Systems Using Thermal Analysis. In: HILFIKER, R. (Ed.). *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Germany: Wiley-VCH, 2006. Cap. 3, p. 43-76.

DIAS, C. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas. *Trabalho de dissertação de mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

F. BRAS. FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

LIEN, E. J.; KENNON, L. Molecular Structure, properties, and States of Matter. In: GENNARO, A.R. (Ed.). *Remington's Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*. 20<sup>th</sup>. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.13, p. 159-182.

MALISKA, A. M. *Microscopia eletrônica de varredura e microanálise*. Departamento de engenharia mecânica – Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. Disponível em <[http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_index.htm](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm)>, acessado em set/2006.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. *Análise Térmica de Materiais*. São Paulo: iEditora, 2002. 300 p.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P. H. *Infrared absorption spectroscopy*. 2<sup>th</sup>. ed., San Francisco: Holden-Day, 1977. 287 p.

NEWMAN, A. W.; STAHLY, G. P. Form Selection of Pharmaceutical Compound. In OHANNESIAN, L; STREETER, A. J. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. New York: Marcel Dekker, 2002. Cap 1.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2000, Cap. 3, p. 67-135.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A; CARACELLI, I. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed., Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2000. 460 p.

STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1<sup>th</sup>. ed., England: John Wiley & Sons, 2004, Cap. 4, p. 71-94.

SURYANARAYANAN, R. X-Ray Powder Diffractometry. In BRITAIN, H. G. *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. New York: Marcel Dekker, 1995. Cap 7, p. 188-216.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H. G. ; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.

WATSON, D. G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 2<sup>th</sup>. ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.



## **CAPÍTULO 2**

Método por CLAE para determinação do lopinavir e do ritonavir em cápsulas de gelatina

---



## **2.1 INTRODUÇÃO**

O uso da CLAE permite a análise quantitativa de misturas e possibilita verificar possíveis produtos de degradação, sendo, portanto, amplamente utilizado no controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Segundo WATSON (2005), a combinação CLAE monitorada pela detecção ultravioleta origina métodos precisos, exatos e específicos, sendo o método de escolha para este propósito. Na indústria farmacêutica, constitui a principal ferramenta analítica nos estágios de descobrimento, desenvolvimento e produção de medicamentos (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

O uso de detector de arranjo de fotodiodos (DAD) permite calcular a pureza dos picos cromatográficos, fator importante a ser considerado, pois um pico cromatográfico, aparentemente de apenas um componente, pode ser devido a mais de um composto. Assim, o uso do DAD, é de fundamental importância na validação de métodos por CLAE, pois permite inferir que um determinado pico cromatográfico refere-se àquela substância, sem interferentes (WATSON, 2005).

Vários métodos por CLAE para a determinação do lopinavir+ritonavir em plasma, em associação com outros anti-retrovirais, foram publicados (Quadro 2.1). Contudo, a maioria desses métodos não é prática para a rotina de análises. DIAS e colaboradores (2005) desenvolveram um método simples e indicativo de estabilidade para a determinação do ritonavir na forma farmacêutica, contudo, o método não inclui o lopinavir. Assim, o objetivo deste Capítulo é desenvolver e validar um método simples, rápido e indicativo de estabilidade, por CLAE, para a determinação da associação LPV/RTV em cápsulas de gelatina mole, na presença de seus produtos de degradação, visando a utilizá-lo no controle de qualidade, nos estudos de dissolução *in vitro* e nos estudos de degradação acelerada.

## 2.2 REVISÃO

### 2.2.1 Determinações quantitativas

Os métodos encontrados na literatura, para a quantificação do lopinavir+ritonavir, referem-se basicamente a métodos utilizados em estudos farmacocinéticos os quais determinam o lopinavir e o ritonavir em associação com outros ARVs, em plasma humano, por CLAE. O Quadro 2.1 mostra alguns exemplos da cromatografia em fase reversa, utilizada na determinação de anti-retrovirais.

**Quadro 2.1** – Métodos utilizados para a determinação simultânea de anti-retrovirais, por cromatografia a líquido de alta eficiência, em plasma humano e na forma farmacêutica.

ANTI-RETROVIRAIS	COLUNA / TEMPERATURA	FASE MOVEL / VAZÃO	$\lambda$ (nm)	AUTORES
APV, IDV, LPV, NFV, RTV, SQV, EFV, NPV	C18	acetoneitrila: tampão fosfato 50 mM pH 5, 65 sistema gradiente 1,0 ml min <sup>-1</sup>	215 240 260	TITIER <i>et al.</i> , 2002
IDV, RTV, LPV	Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm D.I.) 40 °C	acetoneitrila: tampão fosfato de potássio 10 mM (50:50) 1,0 ml min <sup>-1</sup>	210	RAY <i>et al.</i> , 2002
IDV, APV, RTV, LPV, SQV, NFV e M8	Nova-Pak C18 (150 mm x 3,9 mm D.I.)	140 ml acetoneitrila 75 µl de trietilamina 160 ml de tampão fosfato de sódio 5 mM pH 5,0. 1 ml min <sup>-1</sup>	210 239	JUSTESEN <i>et al.</i> , 2003
APV, IDV, LPV, NFV, RTV, SQV, EFV, NVP	Xterra® C18 (150 mm x 3,9 mm D.I., 5 µm)	acetoneitrila: 3-cicloexilamino-1-ácido propanossulfônico pH 10,5 (37: 63) 1,5 ml min <sup>-1</sup>	210 320	FAUX <i>et al.</i> , 2003

Quadro 2.1 Continuação

ANTI-RETROVIRAIS	COLUNA / TEMPERATURA	FASE MOVEL / VAZÃO	$\lambda$ (nm)	AUTORES
APV, RTV, IDV, SQV, NFV, EFV, DLV, LPV, M8	Discovery® C8 (250 mm x 4,6 mm D.I., 5 $\mu$ m) 27 °C	tampão fosfato de potássio 25 mm pH 3,1: acetonitrila: metanol sistema gradiente 1,5 ml min <sup>-1</sup>	210	TURNER <i>et al.</i> , 2003
EMC, TVF	Varian C18 (250 mm x 4,6 mm D.I., 5 $\mu$ m)	tampão fosfato pH 5,7 metanol sistema gradiente 1,0 ml min <sup>-1</sup>	280 259	REZK <i>et al.</i> , 2005
IDV*	LiChrospher® 100 (250 mm x 4,0 mm D.I., 5 $\mu$ m, Merck.) 40 °C	tampão de dibutilamônio pH 6,5 e acetonitrila (55:45)	260	SILVA <i>et al.</i> , 2005
RTV	C8 (125 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, Merck)	água:metanol (67:33) pH 6,0	210	DIAS <i>et al.</i> , 2005
RTV*	C18 (150 x 4,6, 5 $\mu$ m, Phenomenex®)	acetonitrila:água:metanol (53: 40:7)	210	ROSSI <i>et al.</i> , 2007

APV, amprenavir; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; RTV, ritonavir; NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir; EFV, evafirenzo; EMC, emtricitabina; TVF, tenofovir; M8, metabólito do nelfinavir.

\*estudos de dissolução

Recentemente SESHACHALAM e colaboradores (2007) publicaram método por CLAE para determinação da associação lopinavir/ritonavir na matéria-prima e produto acabado, na presença de impurezas e produtos de degradação. O método utiliza coluna C8 (Symmetry Shield RP8, 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) e fase móvel constituída de tampão fosfato 50 mM, acetonitrila e metanol (40:50:10).

## **2.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.3.1 Amostra e substâncias químicas de referência (SQR)**

As amostras de Kaletra<sup>®</sup> e SQRs utilizadas encontram-se descritas no Capítulo 1, item 1.2.1.

### **2.3.2 Reagentes**

Foram utilizados acetonitrila e metanol grau CLAE (Scientific). Ácido oléico, óleo de rícino e propilenoglicol, foram obtidos da Alfa Química. Os demais reagentes foram de grau analítico (Vetec). A água ultra pura foi obtida por sistema Milli-Q Plus, Millipore<sup>®</sup>.

### **2.3.3 Equipamento e condições cromatográficas**

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo em fase líquida Shimadzu constituído de bomba LC-10AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10ADVP, controladora do sistema SLA-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor manual Rheodyne com alça dosadora de 20 µl. A aquisição e a análise dos dados foram efetuadas pelo programa CLASS-VP, versão 6.1. Foi utilizado também cromatógrafo Shimadzu composto de bomba LC-20AT, controladora CBM-20A, detector SPD-10AV VP e injetor automático SIL-20A, para os estudos de robustez, denominado de CLAE 2.

As análises cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando coluna LiChrospher C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) e pré-coluna C18 (4 x 3,0 mm, Phenomenex<sup>®</sup>). A fase móvel foi constituída de acetonitrila-água-metanol (53:37:10,

V/V/V), sem ajuste de pH e eluída em sistema isocrático. A vazão foi de  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$  e o detector de DAD foi ajustado em 210 nm. Para o estudo de robustez do método foi utilizada também uma coluna RP-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>).

#### **2.3.4 Solução amostra**

Determinou-se o peso médio de 20 cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>. Com auxílio de metanol, o conteúdo das cápsulas foi coletado em balão volumétrico de 200 ml e levado ao volume com o mesmo solvente. Esta solução estoque de Kaletra<sup>®</sup> contendo supostamente 3,3 e 13,3  $\text{mg ml}^{-1}$  de ritonavir e lopinavir, respectivamente, foi utilizada no desenvolvimento e validação do método. Soluções trabalho foram preparadas pela diluição de volumes apropriados da solução estoque, em mistura de metanol e fase móvel (50:50, V/V), denominada solução de diluição (SD), antes da injeção.

#### **2.3.5 Solução das SQRs**

Soluções estoques de lopinavir e ritonavir foram preparadas, individualmente, pela dissolução de quantidade apropriada de cada SQR em metanol de forma a obter solução contendo 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente. Soluções-estoque metanólicas para cada matéria-prima também foram preparadas, na concentração de 8,0  $\text{mg ml}^{-1}$  para o lopinavir e 2,0  $\text{mg ml}^{-1}$  para o ritonavir.

#### **2.3.6 Estudos de validação**

O método desenvolvido foi validado nos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez de acordo com as normas vigentes (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2007).

### **2.3.6.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico**

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada através da injeção em hexaplicata da mistura das SQRs, preparadas na SD a partir da solução estoque, na concentração de 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente para o lopinavir e o ritonavir. Foram avaliados os parâmetros de resolução, eficiência da coluna, assimetria fator de retenção e o desvio padrão relativo entre os tempos de retenção e a repetibilidade das injeções (FDA, 1994; SNYDER, 1997; USP, 2007).

### **2.3.6.2 Especificidade/estudos de degradação forçada**

A especificidade do método foi estabelecida pela determinação da pureza dos picos cromatográficos utilizando detector de arranjo de diodos, injeção de amostras do placebo e testes de degradação forçada. As amostras de placebo foram constituídas de todos os excipientes do Kaletra<sup>®</sup> (ácido oléico, propilenoglicol e óleo de rícino), cujas concentrações foram baseadas na literatura (GURSOY e BENITA, 2004).

Os estudos de degradação forçada do lopinavir e do ritonavir foram realizados separadamente, a partir das soluções metanólicas das matérias-primas de lopinavir contendo 8000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e de ritonavir 2000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Alíquotas de 2,0 ml dessas soluções, separadamente, foram diluídas com soluções de ácido, base, oxidante ou mistura de solventes de forma a obter soluções contendo 1600  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir e 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir. Todas as soluções, com exceção da exposta à luz, foram mantidas ao abrigo da luz. Após o período de estresse as soluções foram neutralizadas, quando necessário, diluídas com a SD até a concentração de 320  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir e 80  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir e analisadas pelo método proposto. Para cada condição e para cada fármaco, foram preparadas três amostras e um branco, o qual consistiu de todos os reagentes, menos a amostra. Amostras não degradadas de ambos os fármacos também foram preparadas na SD a partir das soluções-estoque nas concentrações de 80  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir e 320  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir. Nestes estudos de especificidade,



temperatura ambiente significa temperatura entre 20 e 28 °C. As condições de estresse utilizadas foram as descritas a seguir.

#### **2.3.6.2.1 Estudos hidrolíticos**

Soluções de lopinavir e ritonavir em HCl 1 M foram expostas à temperatura ambiente durante 72 horas. Soluções de lopinavir em HCl 1 M foram também expostas à temperatura de 80 °C durante 90 minutos. Os estudos em condições alcalinas foram realizados à temperatura ambiente em NaOH 1 M durante 72 horas para o lopinavir e em NaOH 0,25 M para o ritonavir (análise imediata). Soluções de lopinavir em NaOH 1 M também foram submetidas a 80 °C durante 14 horas. Para os estudos em condições neutras, soluções das substâncias ativas em água e metanol foram expostas à temperatura de 80 °C durante 48 e 72 horas, respectivamente, para o ritonavir e o lopinavir.

#### **2.3.6.2.2 Estudos oxidativos**

Soluções de lopinavir e ritonavir em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, foram estocadas à temperatura ambiente durante 72 horas.

#### **2.3.6.2.3 Estudos fotolíticos**

Esses estudos foram realizados em câmara de UV espelhada internamente (1,0 × 0,17 × 0,17 m) e equipada com lâmpada blacklight blue UV-A 352 nm (ORION, 30W, 130V, 1,26 × 10<sup>-3</sup> Watts cm<sup>-2</sup>). Soluções metanólicas de lopinavir e ritonavir em cubetas UltraVette<sup>®</sup> foram colocadas na câmara para exposição à luz UV, a uma distância de 15 cm da lâmpada, durante 10 dias. Cubetas contendo as amostras e protegidas da luz foram também colocadas na câmara para avaliar os efeitos da temperatura sobre as mesmas. A temperatura da câmara foi monitorada durante os estudos com termômetro de máxima e mínima.

#### **2.3.6.2.4 Estabilidade térmica**

A suscetibilidade ao calor foi estudada pela exposição das substâncias ativas no estado sólido, a 60 °C durante 10 dias, em estufa de ar seco (Biomatic).

#### **2.3.6.2.5 Umidade**

O comportamento do lopinavir e do ritonavir frente à umidade foi avaliado pela exposição dos fármacos a 75% de umidade relativa do ar (UR) durante 20 dias. As substâncias ativas foram colocadas em um dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio. A UR foi controlada durante todo o período de exposição, através de um termo-higrômetro e o dessecador foi mantido ao abrigo da luz.

#### **2.3.6.3 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada através de curvas padrão com cinco diferentes concentrações. Para o lopinavir, a linearidade foi avaliada no intervalo de 40 a 360  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e para o ritonavir, no intervalo de 10 a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Cada ponto da curva foi injetado em triplicata e a curva padrão de cada inibidor foi realizada em três diferentes dias. Com as áreas médias dos cromatogramas obtidos nos diferentes dias, foi construído um gráfico para cada inibidor da protease, plotando-se os resultados das áreas versus concentração. Foram calculados, para cada fármaco, o coeficiente de correlação e a equação da reta. A linearidade do método foi verificada pela análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95%.

#### **2.3.6.4 Precisão**

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e pela precisão intermediária nas amostras do Kaletra<sup>®</sup>. A repetibilidade foi testada pela análise de seis amostras contendo 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir e 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir preparadas a partir da solução estoque (3,3 e 13,3 e  $\text{mg ml}^{-1}$ ) com a SD e injetadas em triplicata no

mesmo dia (n = 6). A precisão intermediária foi testada pela repetição deste estudo em três diferentes dias (n = 18). Os resultados dos estudos de precisão foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR).

### 2.3.6.5 Exatidão

Utilizou-se o teste de recuperação para avaliar a exatidão do método. Assim, soluções contendo amostras de Kaletra<sup>®</sup> foram adicionadas de quantidades conhecidas das SQRs, em três diferentes concentrações, no intervalo de 70 a 130% da concentração trabalho. Foram preparadas quatro amostras de Kaletra<sup>®</sup> contendo 25 µg ml<sup>-1</sup> de ritonavir e 100 µg ml<sup>-1</sup> de lopinavir e a estas soluções, com exceção de uma denominada amostra não adicionada, foram adicionadas diferentes quantidades da mistura das SQRs, conforme Quadro 2.2 abaixo:

**Quadro 2.2** Concentrações das soluções para o estudo de exatidão.

Fármaco	Concentração da amostra (µg ml <sup>-1</sup> )	Concentração das SQRs adicionadas (µg ml <sup>-1</sup> )	Concentração final obtida (µg ml <sup>-1</sup> )	Concentração da amostra* (%)
Ritonavir	25	10	35	70
	25	25	50	100
	25	40	65	130
Lopinavir	100	40	140	70
	100	100	200	100
	100	160	260	130

\*em relação à concentração trabalho

A exatidão do método foi avaliada em 3 diferentes dias e a percentagem de recuperação (R%) para cada inibidor da protease foi calculada pela Equação 2.1 da AOAC, (1990).

$$R\% = \frac{[(C_A - C_{NA})]}{C_{SQR}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

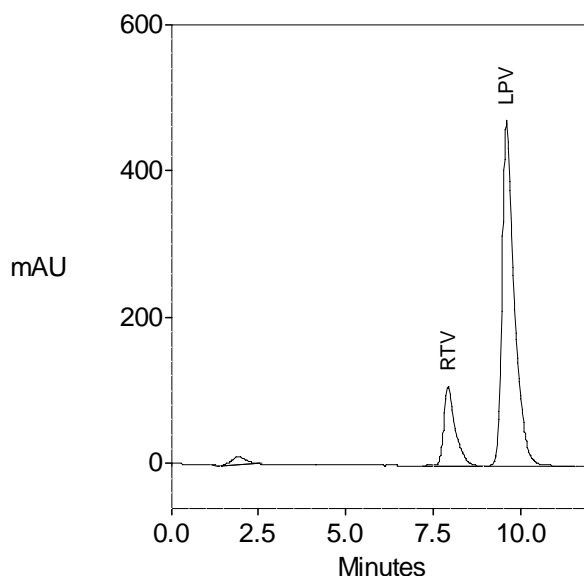
Onde  $C_A$  é a concentração do inibidor da protease de interesse encontrado na amostra adicionada da SQR em  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $C_{NA}$  a concentração do IP de interesse encontrado na amostra não adicionada da SQR em  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e  $C_{SQR}$  a concentração da SQR adicionada à amostra em  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

### **2.3.6.6 Robustez**

Para avaliar a robustez do método proposto, condições experimentais foram modificadas e os parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, eficiência da coluna, fator de retenção e resolução) e os DPR das determinações quantitativas, para ambos os fármacos, foram calculados. As condições incluíram diferentes fabricantes de colunas C18 (Merck e Phenomenex<sup>®</sup>), dois diferentes equipamentos e diferente composição da fase móvel (% de acetonitrila). Cada fator foi alterado separadamente para avaliar seu efeito. Em cada condição, amostras foram injetadas em triplicata ( $n = 3$ ) e analisadas frente a uma solução padrão de trabalho.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes fases móveis e colunas (C8 e C18) foram testadas a fim de desenvolver um método cromatográfico indicativo de estabilidade para análise da associação lopinavir + ritonavir nas cápsulas de gelatina mole do Kaletra<sup>®</sup>. As melhores condições de separação para esses fármacos, na presença de seus produtos de degradação e combinadas com um curto tempo de análise, foram obtidos pelo uso de uma coluna LiChrospher C18 (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Merck) e fase móvel composta por acetonitrila, água e metanol (53:37:10, V/V/V) sem ajuste de pH. A vazão da fase móvel foi de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. A Figura 2.1 mostra o cromatograma obtido com a amostra de Kaletra<sup>®</sup>. Observa-se que os picos do RTV e LPV estão bem resolvidos com tempos de retenção de aproximadamente 8,0 e 9,8 minutos, respectivamente.

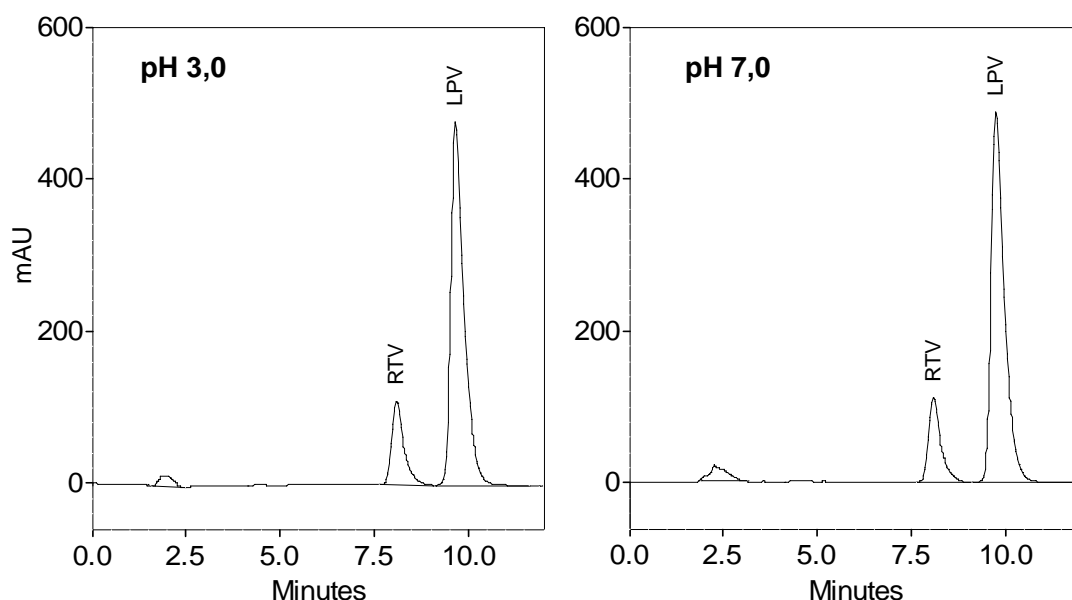


**Figura 2.1** Cromatograma da solução Kaletra<sup>®</sup> contendo 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de RTV e 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de LPV obtido com coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

Conforme mencionado no item 3.2 da revisão geral, o lopinavir é um ácido fraco enquanto que o ritonavir é uma base fraca com dois valores de  $pK_a$ : 1,8 e 2,6. Considerando a importância do pH da fase móvel em função do grau de ionização dos fármacos visando a suprimir o efeito do equilíbrio de ionização secundária no tempo de retenção, três diferentes pH da fase móvel foram avaliados: pH 3,0, sem ajuste de pH ( $\pm 5,0$ ) e fase móvel pH 7,0.

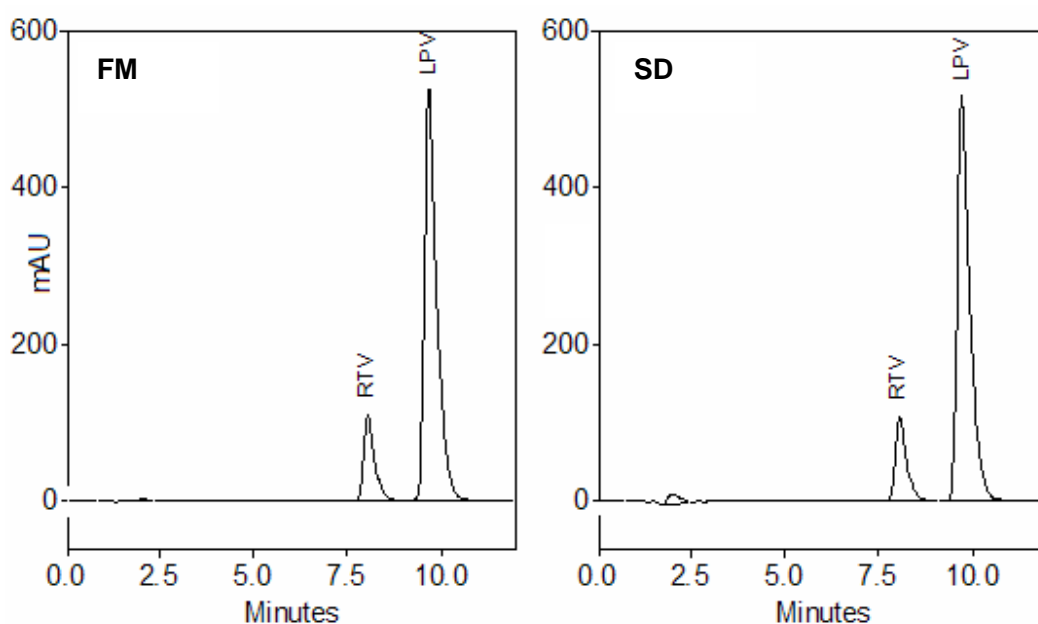
KAZAREVICH e LOBRUTO (2007) sugerem que a fase móvel tenha pH de duas unidades acima do valor do  $pK_a$  dos analitos, desta forma, eles estariam totalmente ionizados e evitaria o efeito do equilíbrio de ionização secundária, o qual pode afetar a robustez e a seletividade do método.

Entretanto, no caso do lopinavir e do ritonavir, o controle de pH da fase móvel não foi necessário, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros cromatográficos usando fase móvel sem ajuste de pH (Figura 2.1) e fase móvel com pH 3,0 e pH 7,0 (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Cromatogramas da solução das SQRs contendo  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de RTV e  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV diluídas na solução de diluição obtidos utilizando coluna C18 (250 mm x 4.6 mm,  $5 \mu\text{m}$ , Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção UV em 210 nm.

Considerando que o lopinavir e o ritonavir são praticamente insolúveis em água e que a fase móvel contém 37% de água, utilizou-se uma mistura de metanol/fase móvel 50/50 V/V (SD), como diluente final das soluções injetadas. Apesar de a SD ter maior poder de eluição quando comparada à fase móvel, não foram observadas diferenças importantes nos parâmetros cromatográficos, bem como no desenho dos picos, conforme pode ser visualizado na Figura 2.3 e na Tabela 2.1. Os valores dos DPRs das áreas dos picos cromatográficos de uma amostra das SQRs diluída na FM e na SD injetadas em triplicata, foram inferiores a 0,5% para ambos os fármacos. De acordo com SHABIR (2003), quando não é possível utilizar a fase móvel como diluente das amostras a serem injetadas, deve-se evitar o uso de solvente com elevado poder de eluição, quando comparado à fase móvel.



**Figura 2.3** Cromatogramas da solução das SQRs contendo  $50 \mu\text{g m}^{-1}$  de RTV e  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV diluídas na fase móvel (FM) e na solução de diluição (SD) obtidos utilizando coluna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10), sem ajuste de pH e detecção UV em 210 nm.

**Tabela 2.1** Valores médios dos parâmetros cromatográficos de uma solução das SQRs contendo 50 µg ml<sup>-1</sup> de RTV e 200 µg ml<sup>-1</sup> diluída na FM e na SD (n = 3).

Dilúente	LOPINAVIR					RITONAVIR					R <sup>c</sup>
	Tr <sup>a</sup> (±DPR)	N <sup>b</sup>	T <sup>c</sup>	k <sup>d</sup>	Área (±DPR)	Tr (±DPR)	N	T	k	Área (±DPR)	
FM	9,8 (±0,3)	4962	1,7	8,8	11984315 (±0,3)	8,0 (±0,3)	3842	1,8	7,0	2198694 (±0,242)	3,2
SD	9,8 (±0,3)	4862	1,7	8,8	12012222 (±0,3)	8,0 (±0,2)	3894	1,7	7,0	2201246 (±0,28)	3,2

<sup>a</sup> tempo de retenção; <sup>b</sup> eficiência da coluna; <sup>c</sup> assimetria, <sup>d</sup> fator de retenção; <sup>e</sup> resolução entre LPV e RTV .

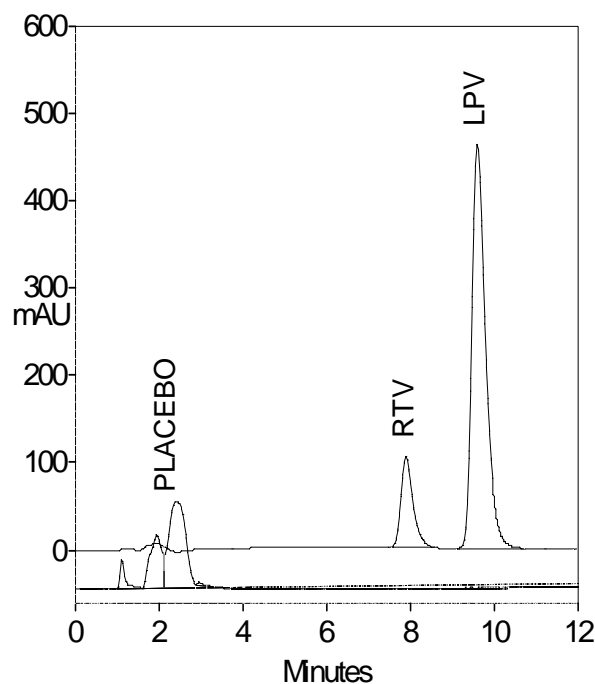
## 2.4.1 Validação do método por CLAE

### 2.4.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi demonstrada pela injeção de uma amostra placebo do Kaletra<sup>®</sup>, contendo todos os excipientes e pelos testes de degradação forçada. O placebo foi constituído de todos os excipientes e sua quantidade foi calculada com base na literatura (GURSOY e BENITA, 2004). Conforme visualizado na Figura 2.4, os excipientes não interferem na determinação do lopinavir e do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup>. A pureza dos picos cromatográficos, obtidos pelo detector de DAD, foi de 0,9999 e 1,0000 respectivamente para o RTV e LPV, demonstrando a homogeneidade dos picos.

Nos testes de degradação forçada, os cromatogramas obtidos das soluções de ritonavir e de lopinavir, submetidas a diferentes condições de estresse, foram comparados aos cromatogramas das mesmas soluções não submetidas à degradação e preparadas no momento do teste, e com o branco, preparado de forma similar à amostra, apenas omitindo-a. Os picos de degradação para ambos os fármacos foram identificados pelos seus tempos de retenção e espectros obtidos pelo DAD.





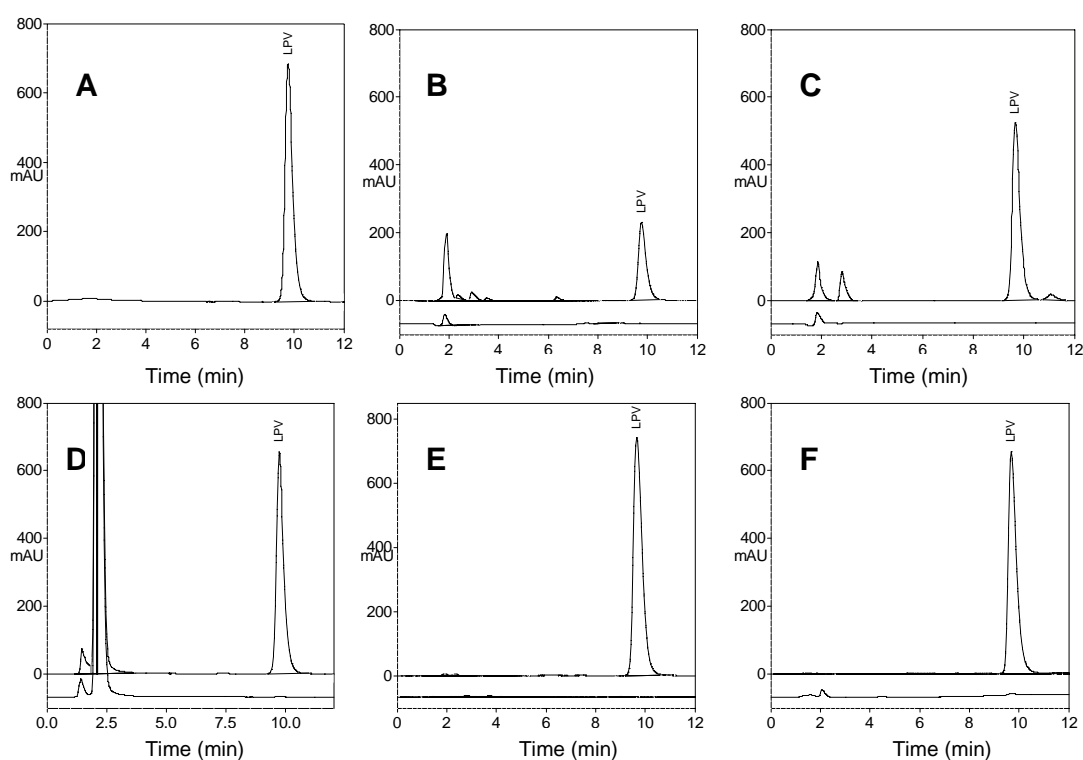
**Figura 2.4** Cromatograma da solução de Kaletra<sup>®</sup> contendo 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de RTV e 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV e da amostra do placebo, obtido utilizando coluna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção UV em 210 nm.

#### 2.4.1.1.1 Comportamento do lopinavir frente aos testes de estresse

O lopinavir, ao contrário do ritonavir, demonstrou ser estável em condições alcalinas, à temperatura ambiente (NaOH 1,0 M, 72h.). No estado sólido, o lopinavir não degradou frente ao calor e à umidade. Após exposição ao calor seco a 60 °C por 10 dias e 75% de umidade relativa do ar por 20 dias não foram observadas degradações.

O lopinavir também se mostrou estável quando exposto à luz UV (352 nm) por 10 dias (Figura 2.5E), à hidrólise neutra a 80 °C por 72 horas (Figura 2.5F) e em condições oxidativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%,) durante 72 horas à temperatura ambiente (Figura 2.5D). Nessas condições, o lopinavir não mostrou nenhuma mudança no cromatograma ou espectro obtido com o DAD, quando comparado com o fármaco não submetido à degradação forçada, indicando que esses fatores não afetam a estabilidade do lopinavir.

Apenas 14% do lopinavir degradaram em condições ácidas à temperatura ambiente (HCl 1 M, 72 h). Contudo, quando aquecido a 80 °C durante 90 minutos, observou-se que o fármaco degradou 68%. O maior produto de degradação foi detectado aos 2,0 minutos. Outros pequenos picos foram observados nos tempos de retenção de 3,0; 3,8 e 6,5 (Figura 2.5B). O fármaco degradou 26% após hidrólise alcalina (NaOH 1 M, 80 °C 14 h) onde o maior pico de degradação foi observado aos 2,0 minutos, no mesmo tempo de retenção do pico observado após hidrólise ácida. Observa-se também um pico no tempo de 3,0 minutos e um pequeno pico adicional, no tempo de retenção de 11 minutos, ou seja, após o tempo de eluição do lopinavir (Figura 2.5C).



**Figura 2.5** Cromatogramas do lopinavir (LPV) obtido através dos testes de estresse. (A) solução não submetida à degradação forçada; (B) hidrólise ácida (HCl 1 M, 80 °C, 90 min); (C) hidrólise alcalina (NaOH 1 M, 80 °C, 14 h); (D) degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 72 h); (E) degradação fotolítica (UV 352 nm, 10 d); (F) hidrólise neutra (H<sub>2</sub>O, 80 °C, 72 h). Condições cromatográficas: coluna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10), vazão 1,0 ml<sup>-1</sup> e detecção em 210 nm. Em B, C, D, E e F, os cromatogramas inferiores representam a solução do branco.

Os estudos de degradação forçada demonstraram que o lopinavir degradou em temperatura ambiente, apenas em condições ácidas. Foi estável também em solução neutra mantida a 80 °C durante três dias. Nas condições alcalinas e oxidativas utilizadas, ocorreu degradação apenas quando estas condições foram associadas à temperatura. O pico no *Tr* de 2,5 min, Figura 2.5D, refere-se ao conservante do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

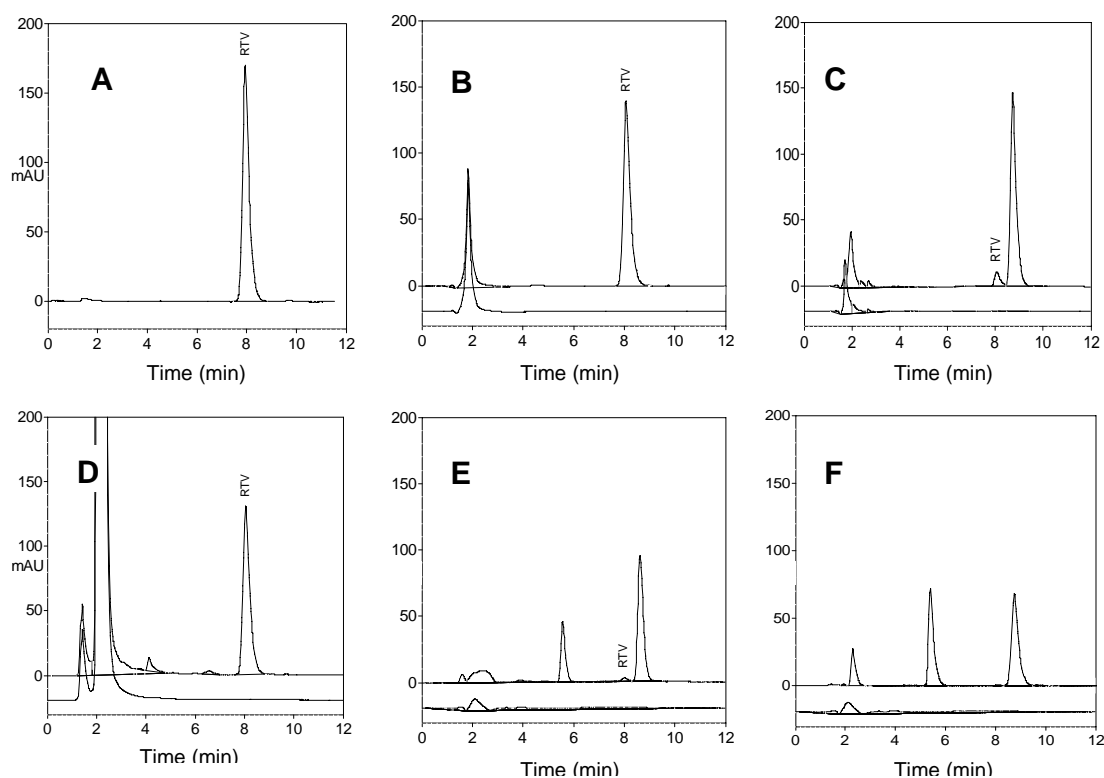
#### **2.4.1.1.2 Comportamento do ritonavir frente aos testes de estresse**

Em condições ácidas (HCl 1 M, 72 h) apenas 17% do fármaco degradaram. Contudo, nenhum pico adicional foi observado no cromatograma (Figura 2.6B) quando comparado com a solução não submetida à degradação forçada (Figura 2.6A) indicando que o ritonavir pode ter degradado em compostos não cromofóricos de baixa massa molecular. Por outro lado, os resultados da pureza do pico cromatográfico obtidos pelo DAD, confirmam que o pico em 1,8 minutos não é homogêneo, sugerindo que um produto de degradação pode estar eluindo neste tempo de retenção (*Tr*).

Em contraste, 67% de degradação foram observados em condições alcalinas (NaOH 0,25 M, análise imediata) com um potencial produto de degradação no tempo de retenção de 8,8 min (Figura 2.6C) e quase completa degradação ocorreu (97%) na hidrólise neutra (80 °C, 48 h) onde o cromatograma mostra três picos adicionais, nos tempos de retenção de 2,3; 5,4 e 8,8 minutos (Figura 2.6E). Foi observado que os valores das áreas de ambos os picos: RTV e o principal produto de degradação (*Tr* = 8,8) diminuíram no tempo de 72 h (Figura 2.6F) e esta observação foi seguida pelo acréscimo na concentração dos produtos de degradação que eluem em 2,3 e em 5,8 minutos, sugerindo que, com o passar do tempo, o principal produto de degradação é convertido naqueles produtos (*Tr* = 2,3 e 5,8 min).

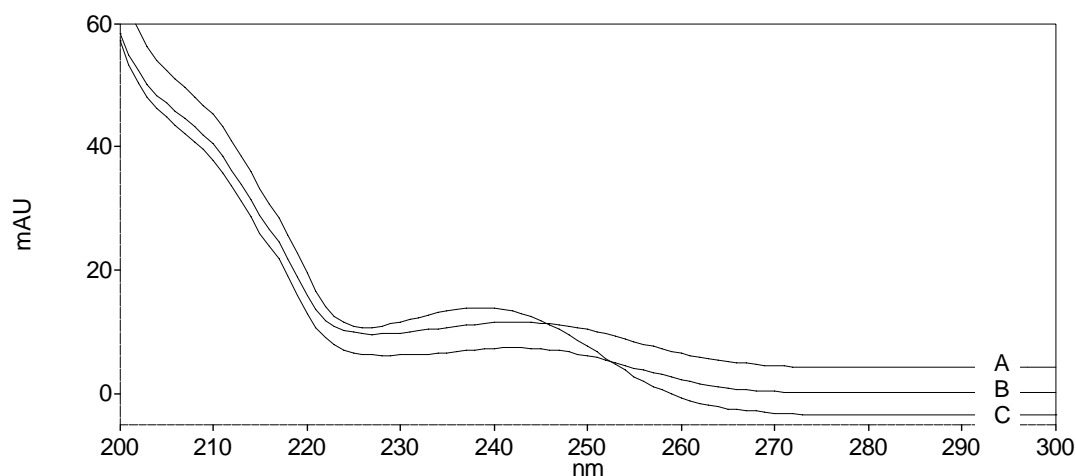
Em condições oxidativas, ao menos dois pequenos produtos de degradação foram detectados, com tempos de retenção de 4,1 e 6,6 minutos. Sob estas condições, RTV degradou 20% (Figura 2.6D). O fármaco se mostrou estável quando submetido ao

calor seco (60 °C 10 dias), à umidade relativa do ar (75%, 20 dias) e quando exposto à luz em 352 nm, em solução metanólica por 10 dias.



**Figura 2.6** Cromatogramas do RTV obtidos através dos estudos de degradação (A) solução não submetida à degradação; (B) hidrólise ácida (HCl 1,0 M, 72 h); (C) hidrólise alcalina (NaOH 0,25 M, análise imediata); (D) oxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 72 h); (E) e (F) hidrólise neutra (água, 80 °C, 48 h e 72 h, respectivamente), obtidos com coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10), vazão 1,0 ml min<sup>-1</sup> e detecção em 210 nm. Em B, C, D, E e F, o cromatograma inferior representa o branco.

Um espectro obtido pelo detector de arranjo de fotodiodos do pico no tempo de retenção de 8,8 min proveniente da hidrólise alcalina e da hidrólise neutra e do RTV substância química de referência é mostrado na Figura 2.7. O índice de similaridade dos picos provenientes das hidrólises alcalina e neutra foi 1,000. Então, presume-se que a hidrólise alcalina e a neutra levam à formação do mesmo produto majoritário de degradação com um pico aos 8,8 min. Por outro lado, os índices de similaridade dos espectros da degradação alcalina e neutra foram de 0,9865 e 0,9856, respectivamente, quando comparados com o espectro do RTV substância química de referência.

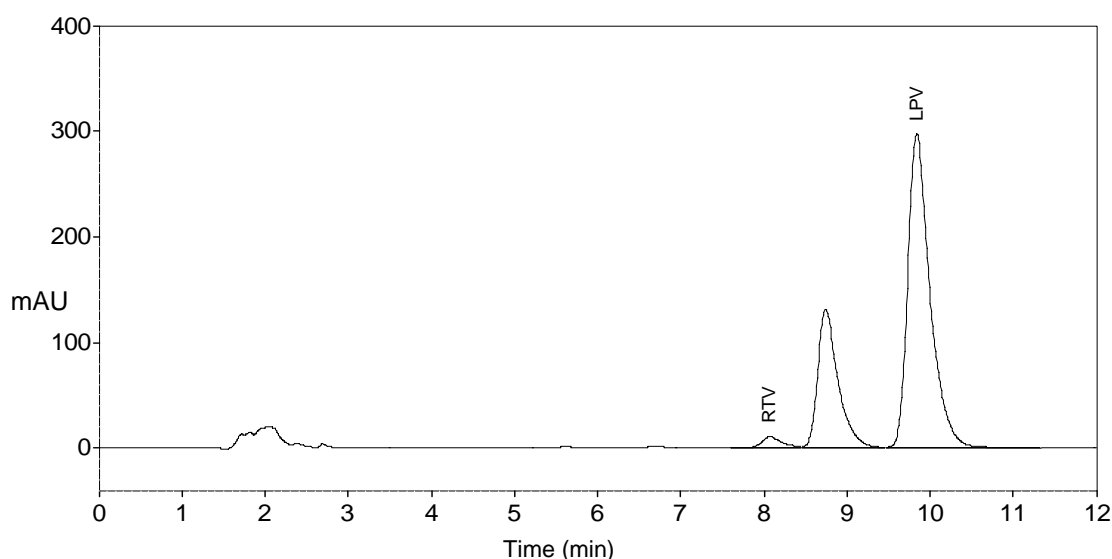


**Figura 2.7** Sobreposição dos espectros obtidos pelo DAD dos produtos de degradação do RTV no  $T_r$  8,8 min formados na (A) hidrólise alcalina (NaOH 0,25 M, análise imediata); (B) hidrólise neutra (água, 80 °C, 48 h); e (C) RTV substância química de referência. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10), vazão 1,0 ml min<sup>-1</sup> e detecção UV em 210 nm.

#### 2.4.1.1.3 Considerações sobre os estudos de degradação forçada

A presença dos produtos de degradação não interfere com a determinação do RTV e do LPV pelo método proposto. Todos os produtos de degradação eluem em diferentes tempos de retenção, e não co-eluem com os fármacos. A resolução entre o ritonavir, lopinavir e o produto de degradação formado a partir da hidrólise neutra do RTV (80°C, 48 h), que elui entre eles ( $T_r = 8,8$  min), foi satisfatória, conforme mostra a Figura 2.8, onde o LPV, substância química de referência, foi misturado à solução de RTV submetida à hidrólise neutra.

A Tabela 2.2 mostra os percentuais médios de degradação e a pureza dos picos cromatográficos do lopinavir e do ritonavir após terem sido submetidos aos testes de estresse. Os índices de pureza, obtidos pelo DAD, situaram-se no intervalo de 0,9999 a 1,0000, para ambos os fármacos, indicando a homogeneidade dos picos. Assim, o método desenvolvido pode ser utilizado para a determinação do lopinavir e do ritonavir na presença de seus produtos de degradação.



**Figure 2.8** Cromatograma da solução padrão do lopinavir misturada com a solução do ritonavir submetida à hidrólise neutra (80 °C, 48 h), mostrando o produto de degradação que elui entre o RTV e LPV. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol. (53:37:10), vazão 1,0 ml min<sup>-1</sup> e detecção em 210 nm.

**Tabela 2.2** Percentual médio de degradação e pureza dos picos cromatográficos do RTV e LPV obtidos durante os estudos de especificidade do método.

Condições de estresse	Tempo	RTV		LPV	
		Degradação (%)	Pureza do pico	Degradação (%)	Pureza do pico
HCl 1,0 M	72 horas	17	0.9999	14	0.9999
HCl 1,0 M 80 °C	90 min	ns	0.9999	68	0.9999
NaOH 0,25 M	0 min	67	1.0000	ns	-
NaOH 1,0 M	72 horas	ns	-	0	1.0000
NaOH 1,0 M 80 °C	14 horas	ns	-	26	1.0000
H <sub>2</sub> O 80 °C	48 horas	96	0.9999	ns	-
H <sub>2</sub> O 80 °C	72 horas	100	1,0000	0	1.0000
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	72 horas	20	0.9999	0	0.9999
UV 352 nm	10 dias	0	1.0000	0	1.0000
60 °C <sup>1</sup>	10 dias	0	0.9999	0	0.9999
75% de UR <sup>1*</sup>	20 dias	0	0.9999	0	0.9999

(n = 3). \* umidade relativa; ns = não submetido; <sup>1</sup> estado sólido

Considerando que o lopinavir, apesar de ser congênere do ritonavir, degradou à temperatura ambiente apenas em condições ácidas, algumas situações de estresse (hidrólise ácida e alcalina) foram associadas à temperatura. Nos estudos térmicos das substâncias ativas no estado sólido, a temperatura de 60 °C foi selecionada visando utilizá-la posteriormente, nos estudos de estabilidade acelerada da forma farmacêutica; a umidade relativa do ar de 75% foi escolhida visto ser preconizada pela ANVISA (BRASIL, 2003). A máxima e mínima de umidade relativa do ar durante esses estudos foi de 75 e 72%, respectivamente. A temperatura de máxima e mínima registradas durante as degradações frente à lâmpada de UV foi, respectivamente, de 29 e 27 C°.

#### **2.4.1.2 Linearidade**

Os valores dos picos cromatográficos no intervalo entre 40 a 360 µg ml<sup>-1</sup> demonstraram ser diretamente proporcionais à concentração do lopinavir na amostra. Os valores médios (±DPR) do intercepto, inclinação e coeficiente de correlação foram 319017 (± 6,80), 46309 (± 1,52) e 0,9998 (± 0,01), respectivamente. A resposta do ritonavir foi linear entre 10 e 90 µg ml<sup>-1</sup>. Os valores médios (±DPR) do intercepto, inclinação e coeficiente de correlação foram, respectivamente, 35660 (± 16,84), 39697 (± 1,05) e 0,9999 (± 0,010). A Tabela 2.3 mostra os dados obtidos durante a determinação da linearidade do método, enquanto que as Tabelas 2.7 e 2.8 do anexo, respectivamente, para o lopinavir e para o ritonavir, demonstraram pela análise de variância (p = 0,05), que não houve desvio de linearidade.

#### **2.4.1.3 Exatidão e precisão**

Os resultados obtidos no estudo de exatidão são apresentados na Tabela 2.4. Adequados resultados de recuperação (99,45 - 100,81%) foram obtidos nos três diferentes níveis de concentração das SQRs adicionadas à amostra para ambos os fármacos, indicando que o método desenvolvido foi exato.

A repetibilidade ou precisão intradia foi avaliada através do DPR obtido na determinação de seis amostras injetadas em triplicata, contendo 100% da concentração-trabalho. A precisão intermediária ou interdia foi obtida pela repetição do ensaio em três diferentes dias. Os valores dos DPRs em ambos os casos para ambos os fármacos, foram menores que 0,7%, confirmando que o método desenvolvido foi preciso, conforme exposto na Tabela 2.5.

**Tabela 2.3** Dados médios da curva padrão do lopinavir e do ritonavir obtidos durante os estudos de linearidade do método ( $n = 3$ ).

LOPINAVIR		RITONAVIR	
Concentração ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Área média dos picos $\pm$ DP; DPR	Concentração ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Área média dos picos $\pm$ DP; DPR
40	2061687 $\pm$ 24200; 1,2	10	426368 $\pm$ 2744; 0,6
120	5870210 $\pm$ 55799; 0,9	30	1220433 $\pm$ 13067; 1,1
200	9676429 $\pm$ 83548; 0,9	50	2013018 $\pm$ 25447; 1,3
280	13217882 $\pm$ 1228826; 0,9	70	2799870 $\pm$ 30200; 1,1
360	16911494 $\pm$ 236257; 1,4	90	3588543 $\pm$ 33336; 0,9

**Tabela 2.4** Exatidão do método para o lopinavir e o ritonavir.

Fármaco	Nível de concentração da amostra* (%)	SQRs adicionadas à amostra ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Concentração média ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) $\pm$ DPR ( $n=3$ )	Faixa de recuperação (%)
LPV	70	40	39,8 $\pm$ 0,8	98,5 – 100,0
	100	100	100,8 $\pm$ 1,4	99,2 – 101,7
	130	160	160,3 $\pm$ 1,3	98,6 – 101,1
RTV	70	10	9,9 $\pm$ 1,4	98,6 – 101,4
	100	25	24,9 $\pm$ 0,4	99,3 – 100,1
	130	40	39,9 $\pm$ 1,9	98,9 – 101,5

\* em relação à concentração de trabalho



**Tabela 2.5** Dados da repetibilidade e da precisão intermediária para o lopinavir e o ritonavir.

Fármaco	Concentração declarada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Concentração média encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) $\pm$ DPR	
		Intra dia ( $n = 6$ )	Interdia ( $n = 18$ )
LPV	200	214,9 $\pm$ 0,2	215,8 $\pm$ 0,7
RTV	50	49,6 $\pm$ 0,5	50,0 $\pm$ 0,4

#### 2.4.1.4 Robustez

Apesar do considerável aumento no tempo de retenção com o uso da coluna Phenomenex<sup>®</sup> e com a diminuição de acetonitrila (- 2%) na fase móvel, o DPR das determinações quantitativas, para ambos os fármacos, nas diferentes condições avaliadas, foi menor de 2,0%, demonstrando a robustez do método (Tabela 2.6).

**Tabela 2.6** Avaliação da robustez do método por CLAE para o lopinavir e ritonavir ( $n = 3$ ).

Parâmetro	LOPINAVIR				RITONAVIR				R <sup>e</sup>
	Tr <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	k <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	Tr	N	k	(%)	
Coluna Merck (vazão 1,0 ml min <sup>-1</sup> )	9,8	5220	4,7	107,9	8,01	4810	3,7	98,95	3,4
Coluna Merck (vazão 1,2 ml min <sup>-1</sup> )	7,6	3845	3,3	107,7	6,5	3358	3,3	98,75	2,5
Coluna Phenomenex <sup>®</sup> (vazão 1,0 ml min <sup>-1</sup> )	13,1	8407	5,8	108,5	10,8	7279	4,7	97,53	4,1
FM <sup>f</sup> (- 2% acetonitrila)	11,5	5580	5,7	108,6	9,3	4857	4,5	97,26	3,7
FM <sup>f</sup> (+2% acetonitrila)	7,5	3775	3,4	106,0	6,3	3475	2,7	97,90	2,6
CLAE 2	8,6	4365	4,1	106,1	6,3	3156	2,7	98,62	3,5
	Média $\pm$ DPR			107,5 $\pm$ 1,1				98,2 $\pm$ 0,7	

<sup>a</sup> tempo de retenção; <sup>b</sup> eficiência da coluna; <sup>c</sup> fator de retenção; <sup>d</sup> em relação ao teor rotulado, <sup>e</sup> resolução entre LPV e RTV e <sup>f</sup> fase móvel.

Este trabalho resultou no artigo LC Method of studies on the stability of lopinavir and ritonavir soft gelatin capsules, publicado no periódico *Chromatographia*, v. 63, p. 437-443, 2006.

## **2.5 CONCLUSÕES**

- O método por CLAE desenvolvido e validado para quantificar o LPV e o RTV associados, em cápsulas de gelatina mole, pode ser utilizado para análises de rotina de ambos quando associados nesta forma farmacêutica, bem como na presença de seus produtos de degradação.
- O lopinavir degrada em condições ácidas à temperatura ambiente. Degrada em condições oxidativas e básicas apenas quando esses fatores foram associados à temperatura. Demonstrou ser estável também frente à hidrólise neutra sob aquecimento e quando exposto à luz UV a 352 nm.
- O ritonavir degradou em meio ácido, alcalino e na presença de oxidante; demonstrou ser termolábil em solução e estável quando exposto à luz UV 352 nm, e quando exposto à temperatura e à umidade, não associadas, na forma sólida.

## 2.6 REFERÊNCIAS

AOAC. *Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis*. 15. ed., Arlington, 1990. v.1. p. xvii.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 20 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2. jun. 2003.

DIAS, C. L.; ROSSI, R. C.; DONATO, E. M.; BERGOLD, A. M.; FRÖEHLICH, P. E. LC determination of ritonavir, a HIV protease inhibitor, in soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 62, p. 589-593, 2005.

FAUX, J.; VENISSE, N.; MOAL, G.; DUPUIS, A.; BOUQUET, S. Simultaneous determination of six HIV protease inhibitors, one metabolite, and two non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in Human Plasma by Isocratic reversed-Phase liquid chromatography after solid-phase extraction. *Chromatographia*, v. 59, p. 421-426, 2003.

FDA. Reviewer Guidance. Validation for Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 1994.

GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 58, p. 73-182, 2004.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonised Tripartite Guideline. *International Conference on Harmonization*, 2005.

JUSTESEN, U. S.; PEDERSEN, C.; KLITGAARD, R. 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 Chromatography B*, v. 783, p. 491-500, 2002.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 1104 p.

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, n. 2, p. 225-230, 2002.

REZK, N. L.; CRUTCHLEY, R. D.; KASHUBA, A.D.M. Simultaneous quantification of emtricitabine e tenofovir in human plasma using high-performance liquid chromatography after solid phase extraction. *Journal Chromatography B*, v.822, n.1-2, p. 201-208, 2005.

ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on in vivo data. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 63, p. 437-443, 2007

SESHACHALAM, U.; HARIBABU, B.; CHANDRASEKHA, K. B. A novel validated LC method for quantitation of lopinavir in bulk drug and pharmaceutical formulation in the presence of its potential impurities and degradation products. *Biomedical Chromatography*, v. 21, n. 7, p. 716-723, 2007. (Resumo).

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods in pharmaceutical analysis. Understanding the difference and similarities between validation requirements of US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

SILVA, B. C.; CAMPOS, L. M. M.; NUNAN, E. A.; SOARES, SILVA, G. R.; RIBEIRO, J. A. A.; PIANETTI, G. A. Validation and statistical analysis of two high performance liquid chromatography methods for the determination of indinavir sulfate raw material and capsules. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 50-53, 2005.

SNYDER, L. G.; KIRLAND, J. J., GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. USA: John Willey & Sons, 1997. p. 21-57.

TITIER, K.; LAGRANGE, E.; PECHOURCQ, F.; EDNO-MCCEIK, 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, n. 3, p. 417-424, 2002.

TURNER, M.; WALKER, K.R.; KING, J. R.; ACOSTA, E. P. Simultaneous determination of nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 784, p. 331-341, 2003.

USP. Validation of Compendial Methods <1225>. *The United States Pharmacopoeia*. 30<sup>th</sup>. ed., Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, 2007.

WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. 2<sup>th</sup> ed., Edimburgo: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. p. 221-233.



### **CAPÍTULO 3**

Espectroscopia derivada para a análise quantitativa da associação lopinavir /  
ritonavir, cápsulas moles de gelatina

---





### **3.1 INTRODUÇÃO**

O uso da espectroscopia derivada (UVD) tornou-se mais prática com o aumento do poder de resolução dos equipamentos analíticos e o fácil acesso aos microcomputadores com programas adequados, os quais permitem a geração quase instantânea dos espectros derivados. Essas facilidades têm permitido a análise de substâncias ativas em misturas de multicomponentes, com sobreposição de bandas de transição eletrônica (EL-SAYED e EL-SALEM, 2005).

O método não requer a separação prévia dos componentes, está acessível à grande maioria dos laboratórios de análise e pesquisa, é de baixo custo, fácil execução e constitui uma alternativa menos dispendiosa se comparada ao método CLAE. OJEDA e ROJAS (2004) e EL-SAYED e EL-SALEM (2005) citam centenas de exemplos do uso da UVD na análise de misturas binárias de fármacos.

Além dessas vantagens, a UVD apresenta maior seletividade que a espectroscopia clássica, devido à separação das bandas espectrais sobrepostas e a melhor detectabilidade dos pequenos traços espectrais (OJEDA e ROJAS, 2004). Além disso, torna as bandas largas mais finas, individualizando melhor os constituintes da mistura e eliminando a interferência de produtos indesejáveis, como excipientes e produtos de degradação (HACKMANN *et al.*, 1991).

A espectroscopia derivada foi desenvolvida, como método alternativo ao CLAE, para a quantificação da associação lopinavir+ritonavir no Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas de gelatina mole, visando a utilizá-la no controle de qualidade desta forma farmacêutica e para simular o perfil de dissolução *in vitro* do lopinavir.

## **3.2 REVISÃO**

### **3. 2.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV)**

A absorção de radiação ultravioleta, entre 200-380 nm, na prática, é restrita às moléculas contendo sistemas conjugados. Quando a radiação passa por este tipo de molécula em solução, os elétrons da camada de valência passam do estado fundamental ao estado de maior energia e, neste processo, absorvem energia. A medida de absorção da luz pela solução de moléculas é então governada pela lei de Beer-Lambert:  $\log I_0 / I_t = A = \epsilon bc$ , onde  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente,  $I_t$  a intensidade da radiação transmitida,  $A$  é a quantidade de luz absorvida pela amostra, conhecido como absorvância,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar,  $b$  o caminho óptico em cm e  $c$  é a concentração da amostra em moles  $l^{-1}$  (WATSON, 2005).

A espectroscopia na região do UV apresenta uma série de vantagens, pois é de fácil implantação, fornece rápidos resultados e é de baixo custo. Assim, encontra vasta aplicabilidade na quantificação de fármacos quando não houver interferência dos excipientes. É utilizada também na determinação do valor de  $pK_a$  de alguns fármacos, na determinação do coeficiente de partição e da solubilidade de fármacos, para monitorar reações de cinética, nos testes de dissolução e como um dos métodos farmacopéicos de identificação. Por outro lado, apresenta como desvantagem, a moderada seletividade e não é diretamente aplicável à análise de misturas (WATSON, 2005).

O principal problema da espectroscopia convencional no UV na análise de associação de fármacos deve-se à sobreposição das bandas espectrais, impossibilitando a determinação destes, sem a prévia separação. Com o intuito de aumentar a área de

abrangência da espectroscopia no UV e contornar o problema da baixa seletividade tem-se utilizado a espectroscopia derivada.

### **3.2.2 Espectroscopia derivada (UVD)**

A espectroscopia derivada consiste na diferenciação ou transformação do espectro normal. Os espectros derivados são obtidos utilizando apenas as informações contidas no espectro clássico. Deste modo, a diferenciação não aumenta o conteúdo de informações, entretanto, ela individualiza melhor os constituintes devido a pequenas mudanças na inclinação e curvatura. Estas mudanças sutis, permitem a quantificação de um componente, pois eliminam a deformação da curva causada pela presença de substâncias indesejáveis. Além disso, a diferenciação remove as bandas largas de absorção e melhora a detectabilidade das pequenas características espectrais, como os “ombros” (HACKMANN *et al.*, 1991; OJEDA e ROJAS, 2004; WATSON, 2005).

A espectroscopia derivada aumenta a seletividade e a sensibilidade do método. O aumento da seletividade deve-se à separação das bandas sobrepostas enquanto que o aumento da sensibilidade é devida à amplificação do sinal da derivada e diminuição do ruído. O surgimento de espectrofotômetros capazes de operar no modo derivado de forma simples e rápida e a precisão e exatidão do método tem aumentado o interesse na UVD. Seu uso está baseado no fato de que o sinal obtido é proporcional à concentração da substância, ou seja, segue a lei de Beer-Lambert (OJEDA e ROJAS, 2005, WATSON, 2005).

#### **3.2.2.1 Aspectos instrumentais, teóricos e principais parâmetros da UVD**

Os espectros derivados podem ser obtidos por métodos ópticos, eletrônicos ou matemáticos. O método matemático, atualmente, é o mais utilizado pela sua versatilidade, pois permite que os espectros sejam facilmente calculados e recalculados utilizando diferentes parâmetros, além de técnicas de atenuação poderem ser utilizadas para melhorar a relação sinal ruído. O requisito instrumental na UVD é similar ao

utilizado na espectroscopia de absorção no UV convencional, mas a reprodutibilidade e a relação sinal ruído têm sua importância aumentada. O aumento da resolução no espectro derivado exige maior reprodutibilidade no comprimento de onda ( $\lambda$ ). Pequenos erros no  $\lambda$  podem resultar em erros muito maiores no modo derivado que no modo convencional e o efeito negativo da derivatização na relação sinal ruído também exige um equipamento de baixo ruído (OJEDA E ROJAS, 1995, 2004).

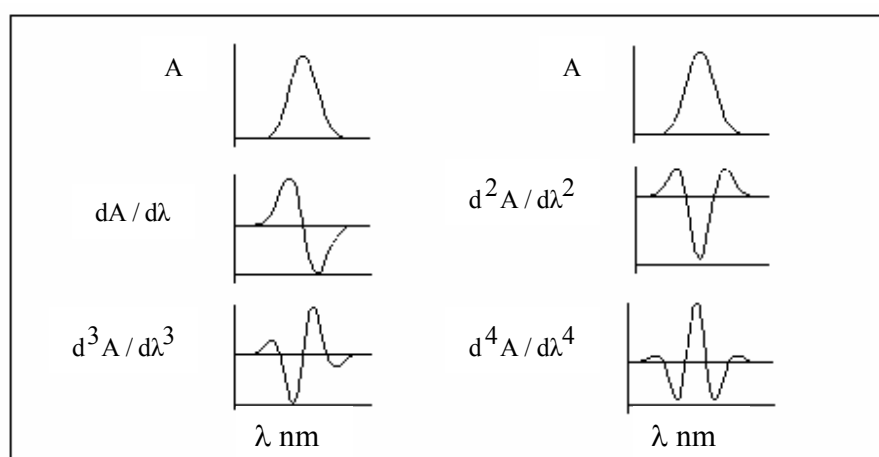
Como principais parâmetros instrumentais que afetam a forma do espectro derivado, podem-se citar: a ordem da derivada, o incremento do delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) na qual a derivada é obtida, a velocidade de varredura e a atenuação. Esses parâmetros precisam ser otimizados para uma boa resolução da banda espectral e uma boa seletividade e sensibilidade do método (EL-GINDY *et al.*, 2001).

#### **3.2.2.1.1 Ordem da derivada**

A escolha da ordem de derivada depende das características do espectro, ou seja, da intensidade no máximo de absorção, largura na meia altura do espectro e da distância que separa dois máximos. Entretanto, além do espectro derivado ser mais complexo que o convencional, a complexidade aumenta com o aumento da ordem da derivada (O'HAVER e BEGLEY; 1981; HACKMANN *et al.*, 1991; OJEDA e ROJAS, 2004).

A primeira derivada é a razão entre a variação da absorvância ( $\Delta A$ ) versus variação do comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ). Assim, plotando-se  $\Delta A/\Delta\lambda$  versus  $\lambda$  obtém-se o espectro de absorção de primeira derivada onde a inclinação é zero no máximo do pico (anulação) e a inclinação é máxima, na meia altura do pico. É negativa onde a absorção decresce e positiva onde a absorção aumenta (OJEDA e ROJAS; 2004 WATSON, 2005).

A principal característica do espectro de segunda derivada, ( $d^2A/d\lambda^2$ ) é uma banda com o máximo de valor negativo no mesmo comprimento de onda do máximo da banda de ordem zero. Apresenta também, duas pequenas bandas positivas uma em cada lado da banda principal, apresentando assim, dois pontos de anulação. Os espectros de ordens superiores são obtidos a partir da diferenciação do espectro de ordem zero (HACKMANN *et al.*, 1991; OJEDA e ROJAS, 2004). A Figura 3.1 mostra os espectros de primeira ( $dA/d\lambda$ ), segunda ( $d^2A/d\lambda^2$ ), terceira ( $d^3A/d\lambda^3$ ) e quarta derivada ( $d^4A/d\lambda^4$ ) de uma banda de absorção Gaussiana.



**Figura 3.1** Banda de absorção de forma Gaussiana para primeira ( $dA/d\lambda$ ), segunda ( $d^2A/d\lambda^2$ ), terceira ( $d^3A/d\lambda^3$ ) e quarta derivada ( $d^4A/d\lambda^4$ ). Adaptado de WATSON, (2005).

A presença da banda forte positiva ou negativa no mesmo comprimento de onda do espectro clássico é uma característica de todas as ordens de derivada e o número de bandas observadas é igual ao número da ordem da derivada mais um (OJEDA e ROJAS, 2004).

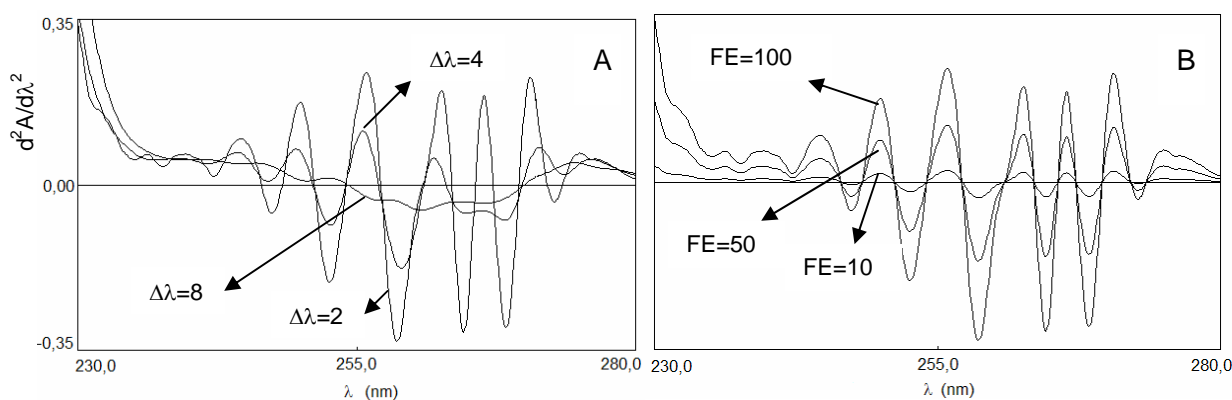
### 3.2.2.1.2 Delta lambda ( $\Delta\lambda$ )

A variação do comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ) é o principal parâmetro instrumental que afeta a forma do espectro da derivada. Este parâmetro precisa ser

experimentalmente otimizado para dar uma melhor seletividade, alta sensibilidade e adequada relação sinal ruído. O valor de  $\Delta\lambda$  dependerá da largura da banda espectral, da largura da banda instrumental e do equipamento utilizado para o processamento dos dados (OJEDA e ROJAS, 2004). Normalmente, o nível de ruído decresce com o aumento do valor de  $\Delta\lambda$ , entretanto, altos valores de  $\Delta\lambda$  podem levar a uma pobre resolução espectral (O'HAVER e BEGLEY, 1981; EL-GINDY *et al*, 2001; MORELLI, 2003; OJEDA e ROJAS, 2004). A Figura 3.2A mostra as alterações na forma do espectro de segunda derivada obtidas pelas variações dos valores de  $\Delta\lambda$ , para uma solução metanólica de lopinavir contendo  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### 3.2.2.1.3 Fator de escala

O fator de escala altera a amplitude da onda. A Figura 3.2B mostra o espectro de segunda derivada, para a solução metanólica de lopinavir contendo  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ , utilizando três diferentes valores de fator de escala e mantendo o  $\Delta\lambda$  constante.



**Figura 3.2** Diferenças na forma do espectro de segunda derivada para uma solução metanólica de lopinavir contendo  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ , utilizando fator de escala de 100 e três diferentes valores de  $\Delta\lambda$  (A) e três diferentes valores do fator de escala mantendo o  $\Delta\lambda=2$  (B).

### 3.2.2.1.4 Atenuação

Apresenta como efeito a redução tanto do sinal quanto do ruído. A importância deste parâmetro aumenta com o aumento da ordem da derivada, pois a diferenciação ou

transformação do espectro degrada a relação sinal/ruído e alguma técnica de atenuação às vezes, é necessária juntamente com a diferenciação, pois o uso de atenuação adequado pode tornar insignificante a degradação da relação sinal ruído quando comparado com o espectro de ordem zero.

### **3.2.2.1.5 Velocidade de varredura**

Baixa velocidade de varredura, tanto para o espectro normal como para o derivado, leva a um maior tempo de análise, entretanto, segundo O'HAVER e BEGLEY (1981), melhora a relação entre o sinal e o ruído do equipamento.

### **3.2.2.2 Técnicas derivativas**

Diversas técnicas ou métodos de derivadas são encontrados na literatura para determinação de fármacos associados: zero-pico, tangente, ponto de anulação, derivada da razão do espectro, calibração multivariada, dentre outras. A técnica do ponto de anulação ou *zero-crossing* é a técnica mais utilizada para a quantificação de misturas binárias de fármacos com sobreposição de espectros, encontrada na literatura (MORELLI, 2003).

Esta técnica mede o valor da amplitude de absorção de um componente da mistura no comprimento de onda do ponto de anulação do outro componente. A medida efetuada no ponto de anulação do espectro derivado de um dos dois componentes deve ser uma função apenas da concentração do outro componente, ou seja, deve seguir a lei de Beer-Lambert (OJEDA e ROJAS, 2004; WATSON, 2005).

O método *zero crossing* apresenta como desvantagem a necessidade de efetuar a leitura da absorvância em comprimentos de onda, muitas vezes críticos, causando considerável perda da sensibilidade e precisão do método. E, freqüentemente, o

método requer o uso de um comprimento de onda de baixa sensibilidade para a medida (MORELLI, 1988; PASCHOAL *et al*, 2003; EL-SAYED e EL-SALEM, 2005).

O método da derivada da razão do espectro proposto por SALINAS e colaboradores (1990), baseia-se no uso da derivada da razão do espectro, provavelmente, a técnica mais utilizada para resolver o problema de misturas ternárias de fármacos. Nesta, as amplitudes dos espectros de absorção da mistura, em cada comprimento de onda, são divididas pelas correspondentes amplitudes do espectro de absorção de uma solução padrão do componente A, para determinação de B e do componente B, para a determinação de A (SALINAS *et al.*, 1990; NEVADO e CABANILLAS, 1992). A razão do espectro derivado permite o uso do comprimento de onda correspondente ao máximo ou ao mínimo e também o uso da distância entre máximo e mínimo consecutivos, evitando o problema da baixa sensibilidade (EL-SAYED e EL-SALEM, 2005).

Segundo MORELLI (2003), quando possível, o método *zero crossing* é mais recomendável que a derivada da razão do espectro a qual é tediosa e necessita um controle rígido de vários parâmetros experimentais e um grande número de medidas. Entretanto, o método da derivada da razão do espectro apresenta uma maior sensibilidade, devida às possibilidades de medições não limitadas apenas ao ponto de anulação.

### **3.2.2.3 Usos da UVD**

O Quadro 3.1 mostra algumas aplicações da espectroscopia derivada na análise de fármacos. OJEDA e ROJAS (1995, 2004, 2005) e AL-SAYED e EL-SALEM (2005) mencionaram centenas de exemplos do uso da UVD na análise de fármacos e outros compostos.



**Quadro 3.1** Algumas aplicações da UVD na análise de fármacos.

FÁRMACO	DERIVADA	TÉCNICA	AUTORES
glibenclamida <sup>(1)</sup>	1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup>	<i>zero crossing</i>	MARTINS <i>et al.</i> , 2007
corantes: amarelo sol e amarelo tartarazina	1 <sup>a</sup>	<i>zero crossing</i>	VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2006
clorprotixeno e amitriptilina	2 <sup>a</sup>	<i>zero crossing</i>	KARPINSKA e SZOSTAK, 2005
vincamina na presença dos produtos de degradação	1 <sup>a</sup>	razão do espectro	SHEHATA <i>et al.</i> , 2005
cumarina	1 <sup>a</sup>	<i>zero-crossing</i>	OSÓRIO e MARTINS, 2004
montelukast e loratadina	2 <sup>a</sup> 2 <sup>a</sup>	tangente <i>zero crossing</i>	RADHAKRISHNA <i>et al.</i> , 2003
cefotaxima e cefadroxil	1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> 2 <sup>a</sup>	razão do espectro <i>zero crossing</i>	MORELLI, 2003
cetilpiridínio e benzocaina	1 <sup>a</sup>	<i>zero crossing</i>	PASCHOAL <i>et al.</i> , 2003
clozapina e produto de degradação ácida	2 e 3 <sup>a</sup> 1 <sup>a</sup>	zero crossing razão do espectro	HASAN, <i>et al.</i> , 2002
trifluorperazina e isopropamida	2 <sup>a</sup>	<i>zero crossing</i> razão do espectro	EL-GINDY, <i>et al.</i> , 2001
metronidazol e ciprofloxacino	1 <sup>a</sup>	<i>zero crossing</i>	VEGA e SOLÁ, 2001
perfil de dissolução <sup>(1)</sup>			

### **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.1 Equipamento**

Os espectros de ordem zero e suas respectivas derivadas foram obtidos na região do ultravioleta, entre 200 a 280 nm, utilizando espectrofotômetro de varredura Shimadzu modelo UV1601 PC, duplo feixe, banda espectral de 2 nm e cubetas de quartzo de um centímetro de caminho óptico. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39 o qual permite a escolha da ordem da derivada, o valor do fator de escala e a variação do delta lambda ( $\Delta\lambda$ ), bem como o uso da função atenuação.

#### **3.3.2 SQRs e excipientes**

As SQRs foram dissolvidas em metanol, separadamente, de forma a obter solução contendo 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente, de lopinavir e de ritonavir. Também foram preparadas soluções metanólicas dos excipientes (ácido oléico, óleo de rícino e propilenoglicol), separadamente, cujas quantidades foram baseadas na literatura (GURSOY e BENITA, 2004).

#### **3.3.3 Amostra**

Após determinação do peso médio de 20 cápsulas de Kaletra<sup>®</sup> (lote 330962E21), o conteúdo das mesmas foi transferido para balão volumétrico de 200 ml, com auxílio de metanol, obtendo solução contendo 13,33  $\text{mg ml}^{-1}$  e 3,33  $\text{mg ml}^{-1}$ , respectivamente, de lopinavir (LPV) e ritonavir (RTV). Foram efetuadas diluições de forma a obter soluções metanólicas contendo 60  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV e 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de RTV.

### 3.3.4 Técnica e parâmetros UVD

O lopinavir e o ritonavir no Kaletra<sup>®</sup> foram quantificados utilizando a técnica do ponto de anulação ou *zero crossing*. O ritonavir foi quantificado na primeira derivada, em diferentes comprimentos de onda, utilizando delta lambda de 1 ( $\Delta\lambda=1$ ) e fator de escala de 10. A determinação do lopinavir foi realizada em diferentes ordens de derivada, valores de  $\Delta\lambda$  e em diferentes comprimentos de onda. Os espectros derivados foram obtidos a partir do espectro de ordem zero. Os espectros de ordem zero do ritonavir foram obtidos utilizando a velocidade rápida de varredura, enquanto que os do lopinavir foram obtidos utilizando a velocidade média.

### 3.3.5 Linearidade

A partir das soluções metanólicas das SQRs (LPV 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e RTV 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), foram efetuadas diluições de forma a obter os pontos das curvas padrão do lopinavir, curva padrão do ritonavir, e curva-padrão do ritonavir contendo uma quantidade fixa de lopinavir. As concentrações de cada ponto das referidas curvas padrão são mostradas na Quadro 3.2. O ensaio para avaliar a linearidade do método foi realizado em triplicata.

**Quadro 3.2** Concentrações utilizadas para obtenção da curva padrão do lopinavir, ritonavir e ritonavir+lopinavir.

LPV ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	RTV ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	RTV+LPV ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
20,0	5,0	5,0 + 2,5
40,0	10,0	10,0 + 2,5
60,0	15,0	15,0 + 2,5
80,0	20,0	20,0 + 2,5
100,0	25,0	25,0 + 2,5

Foram traçados os espectros de ordem zero, para cada ponto da curva. Posteriormente esses espectros foram transformados em primeira derivada para a determinação do ritonavir e segunda e terceira derivadas para a determinação do lopinavir.

Com os valores médios de  $dA/d\lambda$  ou  $d^2A/d\lambda^2$  ou  $d^3A/d\lambda^3$ , obtidos nos diferentes dias, construiu-se um gráfico, para cada fármaco e comprimentos de onda avaliados, plotando-se os resultados de  $d^nA/d\lambda^n$  versus concentração. Foram calculados, para cada fármaco e condição, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e a equação da reta. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com confiabilidade de 95%, para avaliar a linearidade do método.

### **3.3.6 Determinação do ritonavir e do lopinavir no Kaletra<sup>®</sup>**

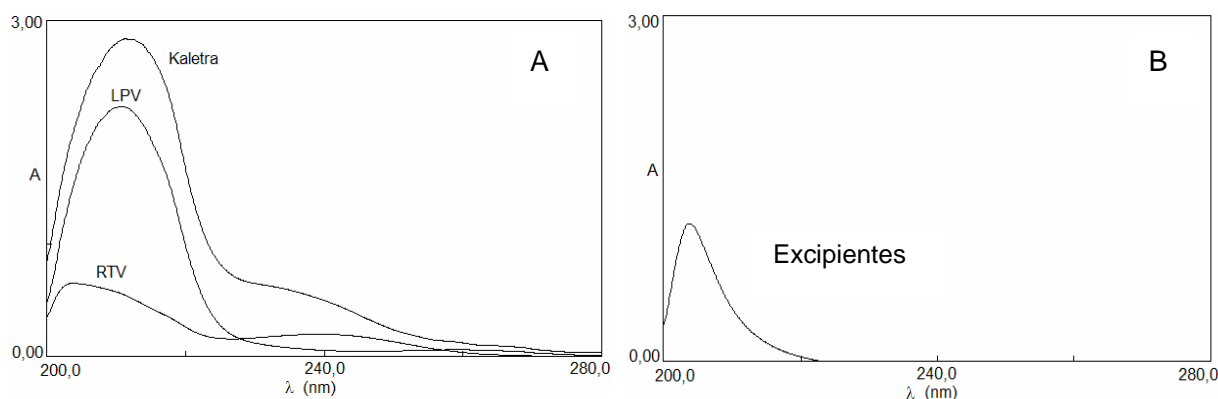
Foram preparadas seis amostras de Kaletra<sup>®</sup> contendo supostamente  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir e  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir. As quantificações foram efetuadas conforme descrito no item 3.3.4. A concentração de cada fármaco foi calculada pela equação da reta. O experimento foi realizado em três diferentes dias.

### **3.3.7 Avaliação do método UVD**

Os resultados obtidos na determinação do lopinavir e do ritonavir pelo método UVD foram comparados com os resultados obtidos na determinação desses fármacos, pelo método CLAE, previamente desenvolvido e validado. Foi utilizado o teste  $t$  de Student, com confiabilidade de 95%, para avaliar se existe diferença significativa entre os dois métodos.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de ordem zero do lopinavir e do ritonavir, Figura 3.3A, apresentam-se sobrepostos, impossibilitando a utilização da espectroscopia de UV clássica para a quantificação dos mesmos, sem a prévia separação dos componentes. Nestes casos, a UVD é uma ferramenta adequada para resolver o problema e tem sido aplicada com sucesso na análise farmacêutica de sistemas multicomponentes. Os excipientes do Kaletra<sup>®</sup> (óleo de rícino, ácido oleico, e propilenoglicol), não apresentaram absorção significativa na região do UV, nos comprimentos de onda utilizados para a determinação do lopinavir e do ritonavir, ou seja, acima dos 240 nm. Os espectros dos excipientes, sobrepostos, são mostrados na Figura 3.3B



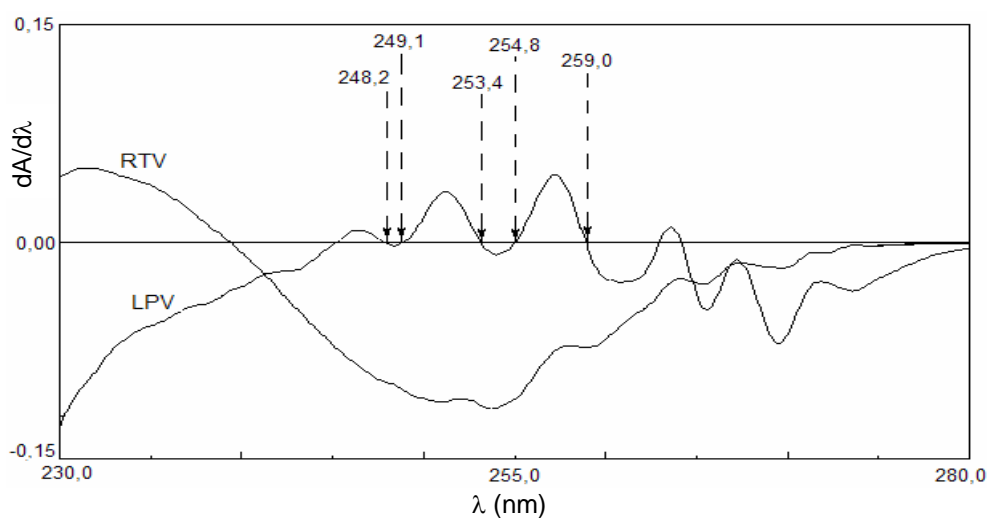
**Figura 3.3** Espectros de absorção de ordem zero do RTV  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ , LPV  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  e do Kaletra<sup>®</sup> ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  de RTV e  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV) em metanol (A) e dos excipientes do Kaletra<sup>®</sup> (ácido oléico, óleo de rícino e propilenoglicol), em metanol (B).

#### 3.4.1 Definição dos parâmetros

Inicialmente, os espectros de ordem zero das SQRs do lopinavir  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ritonavir  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  foram diferenciados. Utilizando o programa UVPC39 e diferentes

valores de delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) e de fator de escala, esses espectros foram transformados em espectros de primeira, segunda e terceira derivada, buscando definir as melhores condições para a quantificação desta associação no Kaletra<sup>®</sup>, através da técnica do ponto de anulação.

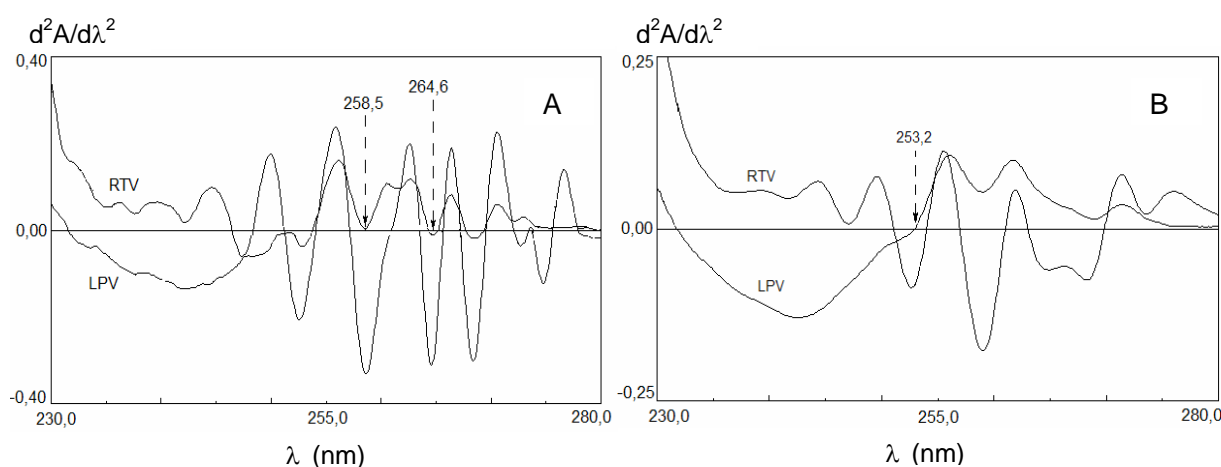
Os espectros de primeira derivada do lopinavir e do ritonavir são mostrados na Figura 3.4. Cinco comprimentos de onda que correspondem aos pontos de anulação do lopinavir (248,2, 249,1 253,4; 254,8 e 259,0 nm), foram inicialmente selecionados para a determinação do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup>. Teoricamente, nesses comprimentos de onda, o RTV pode ser determinado sem ou com um mínimo de interferência. Os espectros foram obtidos utilizando  $\Delta\lambda = 1$  nm e fator de escala de 10. Não houve diferença significativa na forma do espectro do ritonavir utilizando  $\Delta\lambda = 2$ .



**Figura 3.4** Espectros de absorção de primeira derivada do RTV  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ , LPV  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ , obtido utilizando  $\Delta\lambda = 1$  e fator de escala de 10, indicando os cinco comprimentos de onda referentes aos pontos de anulação do LPV, para a determinação do RTV.

No espectro de primeira derivada, nenhum ponto de anulação foi selecionado para a determinação do lopinavir. Então, utilizando um fator de escala de 100 e dois diferentes valores de  $\Delta\lambda$ , os espectros de ordem zero do lopinavir e do ritonavir foram transformados em espectros de segunda derivada, conforme mostra a Figura 3.5. Utilizando o valor de  $\Delta\lambda = 2$ , foram selecionados os  $\lambda$  de 258,5 e 264,6 para a

determinação do lopinavir. Buscando melhorar a relação sinal ruído, aumentou-se o valor de  $\Delta\lambda = 2$  para  $\Delta\lambda = 4$ . Com o aumento do valor de  $\Delta\lambda = 4$ , diminuiu a frequência de onda e conseqüentemente os pontos de anulação do ritonavir. Nesta condição, foi selecionado apenas o comprimento de onda 253,4 nm para a quantificação do lopinavir. Segundo O'HAVER e GREEN, (1976), utilizando baixos valores de  $\Delta\lambda$  é possível obter uma alta resolução dos espectros, entretanto, quanto menor o valor de  $\Delta\lambda$  maior é a relação entre o sinal e o ruído do equipamento.

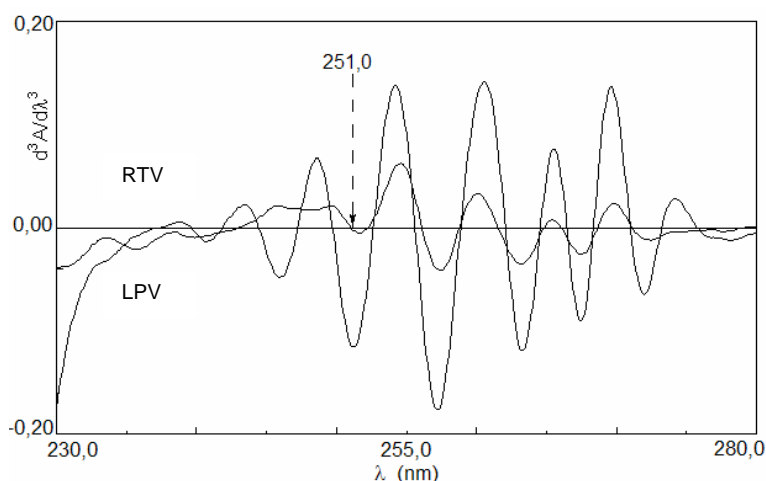


**Figura 3.5** Espectros de segunda derivada das SQRs do LPV  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  e RTV  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ , indicando os pontos de anulação do ritonavir, obtidos utilizando  $\Delta\lambda = 2$  e fator de escala de 100 (A) e  $\Delta\lambda = 4$  e fator de escala de 100 (B).

Os espectros de ordem zero dos dois inibidores da protease também foram transformados em espectros de terceira derivada, visando à determinação do lopinavir. Os espectros foram obtidos utilizando  $\Delta\lambda = 4$  e fator de escala de 100 e foi selecionado o  $\lambda$  de 251,0 para a determinação do lopinavir, correspondente ao *zero crossing* do ritonavir, conforme mostrado na Figura 3.6.

Importante ressaltar que os comprimentos de onda selecionados para a determinação do lopinavir na segunda e terceira derivadas (*zero crossing* do RTV) e os comprimentos de onda de primeira derivada selecionados para a determinação do ritonavir (*zero crossing* do LPV), foram melhor visualizados utilizando a curva-padrão sobreposta dos 2 fármacos na derivada selecionada para a determinação de cada um,

conforme mostrado em linearidade, item 3.4.2. Fator importante a ser considerado, pois segundo OJEDA e ROJAS (2004), pequenos erros no comprimento de onda podem resultar em erros muito maiores na derivada que no espectro normal.



**Figura 3.6** Espectros de terceira derivada das SQRs LPV  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  e RTV  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  obtidos utilizando fator de escala de 100 e  $\Delta\lambda = 4$

O Quadro 3.3 apresenta um resumo das condições empregadas para a quantificação dos dois inibidores da protease no Kaletra<sup>®</sup>. Os comprimentos de onda de 248,2 e 249,1 nm da primeira derivada para a determinação do ritonavir e o  $\lambda$  de 253,4 da segunda derivada e  $\Delta\lambda = 4$  para a determinação do lopinavir foram descartados nestes testes preliminares.

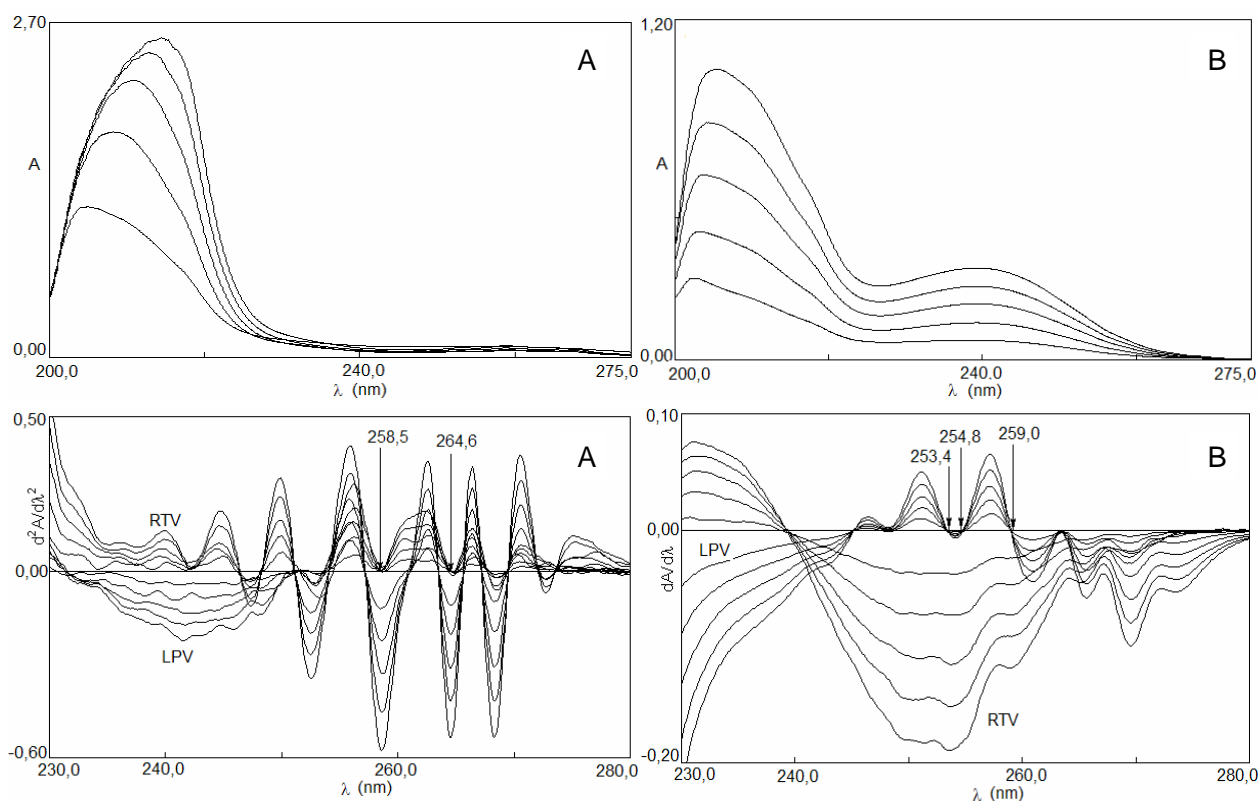
**Quadro 3.3** Condições utilizadas para a determinação do lopinavir e do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas de gelatina mole.

Fármaco	Ordem da derivada / $\lambda$	$\Delta\lambda$	FE	Velocidade de varredura
RTV	$D^1\lambda=253,4$	1	10	rápida
	$D^1\lambda=254,8$			
	$D^1\lambda=259,0$			
LPV	$D^2\lambda=258,5$	2	100	média
	$D^2\lambda=264,6$	2		
	$D^3\lambda=251,0$	4		



### 3.4.2 Linearidade

A resposta do ritonavir foi linear no intervalo de 5,0 a 25,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , na primeira derivada, nos diferentes comprimentos de onda avaliados: 253,4; 254,8 e 259,0, enquanto que a resposta do lopinavir foi proporcional à concentração, no intervalo de 20,0 a 100,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  na segunda derivada ( $\lambda = 258,5$  e  $264,6$ ). Os resultados foram analisados por meio da regressão linear, método dos mínimos quadrados, equação  $y = b \cdot x + a$ , onde  $y$  é a  $dA/d\lambda$ ,  $d^2A/d\lambda^2$ , respectivamente, para a primeira e segunda derivada,  $a$  é o intercepto e  $x$  é a concentração do lopinavir ou do ritonavir. A Figura 3.7 mostra os espectros de ordem zero da curva padrão, para ambos os fármacos e os espectros sobrepostos desses fármacos para a primeira e segunda derivada, indicando os comprimentos de onda onde a linearidade do método foi avaliada.



**Figura 3.7** Espectros da curva-padrão do LPV contendo 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ordem zero e de segunda ordem,  $\Delta\lambda = 2$  e fator de escala de 100, indicando os pontos de anulação do RTV (A); espectros da curva-padrão do RTV contendo 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ordem zero e de primeira derivada,  $\Delta\lambda = 1$  e fator de escala de 10, indicando os pontos de anulação do LPV (B).

A análise estatística da linearidade desses fármacos é mostrada na Tabela 3.1. Os coeficientes de correlação tanto para o lopinavir como para o ritonavir foram superiores a 0,999 indicando uma adequada correlação, entre concentração e a absorvância. A análise de variância (ANOVA), para ambos os fármacos e nestas condições, demonstrou que não houve desvio de linearidade e a regressão foi significativa, com confiabilidade de 95%, conforme mostrado nas Tabelas 3.4 a 3.8 do anexo.

**Tabela 3.1** Análise estatística da linearidade do ritonavir e do lopinavir (n=3)

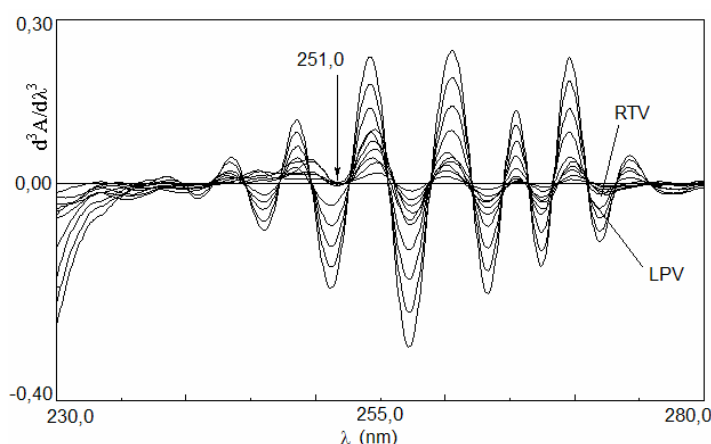
	RITONAVIR			LOPINAVIR	
	<sup>a</sup> D <sup>1</sup> λ=253,4	D <sup>1</sup> λ=254,8	D <sup>1</sup> λ=259,0	<sup>b</sup> D <sup>2</sup> λ=258,5	D <sup>2</sup> λ=264,6
Intervalo (µg ml <sup>-1</sup> )	5,0 – 25,0			20,0 – 100,0	
Inclinação (±DPR)	7,37 x 10 <sup>-3</sup> (± 1,5)	7,08 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,5)	4,58 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,5)	5,55 x 10 <sup>-3</sup> (±1,8)	5,24 x 10 <sup>-3</sup> (±0,9)
Intercepto	3,0 x 10 <sup>-4</sup>	2,4 x 10 <sup>-4</sup>	3,6 x 10 <sup>-4</sup>	3,0 x 10 <sup>-3</sup>	-4,1 x 10 <sup>-3</sup>
r	0,9996	0,9999	0,9998	0,9998	0,9998

r = coeficiente de correlação; <sup>a</sup>D<sup>1</sup> = primeira derivada; <sup>b</sup>D<sup>2</sup> = segunda derivada

Os DPRs médios das curvas padrão do ritonavir, ficaram abaixo dos 2,0% e os espectros foram obtidos na velocidade rápida de varredura. Contudo, para o lopinavir, onde foi selecionada a segunda derivada para determiná-lo, os espectros de ordem zero traçados na velocidade rápida, apresentaram DPRs aquém dos limites aceitáveis (± 3%). Assim, três novas curvas padrão foram feitas e as varreduras para obtenção de cada espectro foram efetuadas utilizando a velocidade média. Com isso, apenas um DPR médio (2,4%) ficou acima dos 2%. Segundo O'HAVER e BEGLEY (1981) menores velocidades de varredura melhoram a relação sinal ruído. Entretanto, a diminuição da velocidade de varredura do espectro aumentou significativamente o tempo de análise do lopinavir.

A terceira derivada foi descartada para a quantificação do lopinavir, devido aos altos valores dos DPRs médios da curva: 6,5; 3,7; 2,5, 2,2 e 2,5, respectivamente, para as concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg ml<sup>-1</sup>. Em conformidade com a literatura, a

complexidade do espectro aumenta com o aumento da ordem da derivada (O'HAVER e BEGLEY; 1981; OJEDA e ROJAS, 2004). Os espectros das curvas padrão de terceira derivada, obtidos utilizando  $\Delta\lambda = 4$  e fator de escala de 100 são mostrados na Figura 3.8. Numa tentativa de obter melhores resultados, experimentou-se então, aumentar o valor de  $\Delta\lambda = 4$  para  $\Delta\lambda = 8$ . Entretanto, com  $\Delta\lambda = 8$ , nenhum ponto de anulação pode ser selecionado para a determinação do lopinavir.



**Figura 3.8** Espectros de terceira derivada das curvas padrão do lopinavir contendo 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e do ritonavir nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , obtidos utilizando  $\Delta\lambda = 4$  e fator de escala de 100, indicando o  $\lambda$  para a determinação do lopinavir.

### 3.4.3 Comparação de métodos: CLAE e UVD

Seis amostras de Kaletra<sup>®</sup>, contendo 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir e 60  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir foram quantificadas, em três diferentes dias, utilizando as condições descritas no Quadro 3.3, excetuando a determinação do lopinavir na terceira derivada. As quantificações foram efetuadas, utilizando para cada comprimento de onda, a respectiva equação da reta.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.2, juntamente com os resultados obtidos por CLAE, método previamente desenvolvido e validado, bem como os resultados obtidos com o teste *t* de Student, utilizado para avaliar se existe diferença significativa entre os métodos.

**Tabela 3.2** Resultados obtidos nos estudos de precisão dos métodos UVD e CLAE para a determinação do lopinavir e do ritonavir e os resultados do teste *t*, presumindo variâncias equivalentes, para os valores obtidos na determinação do RTV por UVD<sup>1</sup> e CLAE e do LPV por UVD<sup>2</sup> e CLAE, calculados pelo Microsoft Excel 2003 (n = 18).

Fármaco	Método	Valor teórico (µg ml <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> Valor encontrado (µg ml <sup>-1</sup> ) ± DPR	Comparação UVD versus CLAE (teste <i>t</i> )
LPV	UVD <sup>2</sup> λ=258,5	60,0	61,1 ± 1,9 (101,2%)	<i>t</i> = 9,5099 (s)
	UVD <sup>2</sup> λ=264,6	60,0	56,4 ± 2,0 (93,9%)	<i>t</i> = 35,8367 (s)
	CLAE	133,3	140,3 ± 0,6 (105,3%)	
RTV	UVD <sup>1</sup> λ=253,4	15,0	20,4 ± 1,5 (136,0%)	<i>t</i> = 112,914 (s)
	UVD <sup>1</sup> λ=254,8	15,0	17,4 ± 1,2 (116,1%)	<i>t</i> = 38,721 (s)
	UVD <sup>1</sup> λ=259,0	15,0	18,2 ± 1,6 (121,2%)	<i>t</i> = 65,949 (s)
	CLAE	33,3	31,6 ± 0,5 (94,8%)	

<sup>a</sup>Média em µg ml<sup>-1</sup> ± DPR para 18 determinações com os valores percentuais nos parênteses. Valor teórico  $t_{(0,05,34)} = 2,0322$  (s) = significativo.

Os resultados dos testes *t* de Student para duas amostras presumindo variâncias equivalentes,  $t_{(0,05,34)} = 2,2283$ , demonstraram haver diferença significativa entre os métodos UVD<sup>1</sup> e CLAE, para a determinação do ritonavir e UVD<sup>2</sup> e CLAE para a determinação do lopinavir no Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas de gelatina mole, em todas as condições avaliadas. Esta comparação foi efetuada com os dados obtidos nos estudos de precisão de ambos os métodos.

Desta forma, o método por espectroscopia derivada não pode ser utilizado como método alternativo à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação destas substâncias ativas na forma farmacêutica de cápsulas moles. Os resultados do teste *t* de Student para cada condição utilizada e para fármaco encontram-se nas Tabelas 3.9 a 3.13 do anexo.

### 3.4.4 Considerações finais sobre a UVD

O teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ) demonstrou que não houve diferença significativa na equação da reta (inclinação e intercepto) da curva padrão do ritonavir quando comparada à curva padrão do ritonavir contendo quantidade fixa de lopinavir, nos comprimentos de onda de 253,4, 254,8 e 259,0 nm, conforme pode ser verificado na Tabela 3.3. Isso exclui a possibilidade da interferência do lopinavir, na determinação do ritonavir, nesses comprimentos de onda e, a absorção dos excipientes nesta região do UV foi desprezível, conforme Figura 3.3B. Entretanto, a diferença obtida entre os métodos UVD e CLAE para o ritonavir, foi de aproximadamente 20% sobre o valor rotulado, com DPRs médios menores de 2,0, para ambos os métodos. Assim, presume-se que possa estar ocorrendo outro tipo de interferência nesta região.

O lopinavir, ao contrário do ritonavir, tem baixa absorção na região que possibilitou sua determinação ( $\lambda$  258,5 e 264,6 nm), principal desvantagem da técnica do ponto de anulação *ou zero crossing*. Provavelmente, as diferenças entre os métodos de CLAE e UVD possam ser devidas à baixa absorvidade molar do LPV nestes comprimentos de onda.

**Tabela 3.3** Resultados obtidos na avaliação estatística da curva padrão do ritonavir (inclinação e intercepto), comparada à curva padrão do ritonavir contendo quantidade fixa de lopinavir (RTV+L), para os diferentes comprimentos de onda, utilizando o teste  $t$  de Student, ( $p = 0,05$ ), presumindo variâncias equivalentes, calculado pelo Microsoft Excel 2003.

$\lambda$ (nm)	Inclinação ( $\pm$ DPR)		teste $t$	intercepto		teste $t$
	RTV	RTV+L		RTV	RTV+L	
253,4	$7,366 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,2$ )	$7,298 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,5$ )	0,8599 ns	$3,0 \times 10^{-4}$	$6,6 \times 10^{-3}$	2,4291 ns
254,8	$7,078 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,1$ )	$7,207 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,2$ )	1,9105 ns	$2,4 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	1,8569 ns
259,0	$4,584 \times 10^{-3}$ ( $\pm 0,9$ )	$4,646 \times 10^{-3}$ ( $\pm 0,6$ )	2,1399 ns	$3,6 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$	2,1399 ns

$t_{(0,5, 4)} = 2,7764$ ; ns = não significativo;

### **3.5 CONCLUSÕES**

- Os resultados do teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ) demonstraram que houve diferença significativa no método de UVD proposto para a determinação do lopinavir e do ritonavir quando comparado ao método CLAE, nas condições empregadas. Portanto, o método por UVD proposto não pode ser considerado equivalente ao método CLAE para a determinação do lopinavir e do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas mole de gelatina.

### 3.6 REFERÊNCIAS

- EL-GINDY, A.; EL-ZEANY, B.; AWAD, T.; SHABANA, M. M. Spectrometric determination of trifluoroperazine HCl and isopropamide iodide in binary mixture using second derivative and second derivative of the ratio spectra methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 26, p. 203-210, 2001.
- EL-SAYED, A. A.; EL-SALEM, N. A. Recent development of derivative spectrophotometry and their analytical applications. *Analytical Sciences*, v. 21, p. 595-614, 2005.
- GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 58, p. 73-182, 2004.
- HACKMANN, E. R. M.; BENETON, S. A.; SANTORO, M. I. R. M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos e medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. XLI, n. 1, p. 7-13, 1991.
- HASAN. W.; 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.
- KARPINSKA, J.; SZOSTAK. Determination of chlorprothixene and amitriptyline hydrochlorides by UV-derivative spectrophotometry and UV-solid-phase spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 61, p. 975-978, 2005.
- MARTINS, J. D.; NERY, C. G. C.; PIANETTI, G. A.; VIANNA-JÚNIOR, N. S.; VIANNA-SOARES, C. D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 43, n. 1, p. 63-70, 2007.
- MORELLI, B. Zero-crossing derivative spectrophotometric determination of mixtures of cephapirin sodium and cefuroxime sodium in pure form and in injections. *Analyst*, v. 113, 1988.

MORELLI, B. Derivative spectrophotometry in the analysis of mixtures of cefotaxime sodium and cefadroxil monohydrate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 32, p. 257-267, 2003.

NEVADO J. J. B. CABANILLAS, C. G. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of salicylaldehyde, 3-hydroxybenzaldehyde and 4- hydroxybenzaldehyde by the derivative ratio spectrum-zero crossing method. *Talanta*, v. 39, n.5, p. 547-553, 1992.

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

O'HAVER, T. C.; GREEN, G. L. Numerical Error Analysis of Derivative Spectrometry for the Quantitative Analysis of Mixtures. *Analytical Chemistry*, v. 48, p. 312-318, 1976.

OJEDA, C. B.; ROJAS, S.; PAVON, J. M. C. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Talanta*, 42, p. 1195-1214, 1995.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 518, p. 1-24, 2004.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Determination of rhodium: Since the origins until today Spectrophotometric methods. *Talanta*, 67, p. 1-19, 2005.

OSÓRIO, A. C.; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 4, p. 481-486, 2004.

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

RADHAKRISHNA T. A.; NARASARAJU A, M; RAMAKRISHNA B, A. SATYANARAYANA, A. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, p. 359-368, 2003.

SALINAS, F.; NEVADO, B.J.J.; MANSILLA, A. E. A new spectrophotometric method for quantitative multicomponent analysis resolution of mixtures of salicylic and salicylurid acids. *Talanta*, v. 37, n.3, p. 347-351, 1990.



SHEHATA, M. A. M.; EL-SAYED, M. A.; EL-TARRAS, M. F.; EL-BARDICY, M. G. Stability-indicating methods for determination of vincamine in presence of its degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 72-78, 2005.

VEGA, E.; SOLÁ, N. Quantitative analysis of metronidazole in intravenous admixture with ciprofloxacin by first derivative spectrophotometry. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 25, p. 523-530, 2001.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERT, M. C. E. Espectrometria derivada: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 230-233, 2006.

WATSON, D. G.. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 2<sup>th</sup>. ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.



## **CAPÍTULO 4**

Perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo* para o lopinavir cápsulas de gelatina

---



#### 4.1 INTRODUÇÃO

O teste de dissolução *in vitro* faz parte das especificações farmacopéicas para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas ou semi-sólidas de uso oral. Entretanto, com normas bem definidas de bioequivalência, de biodisponibilidade e do sistema de classificação biofarmacêutica, o teste de dissolução passou do tradicional teste de controle de qualidade para teste substituto de estudos de bioequivalência *in vivo* (FDA, 1997a; DRESSMAN e KRÄMER, 2005).

O valor do teste de dissolução, como uma ferramenta para o controle de qualidade e como preditivo do comportamento *in vivo*, é significativamente maior se uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) for estabelecida. O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), proposto por AMIDON e colaboradores (1995), baseado na solubilidade e na permeabilidade através da membrana gastrintestinal, além de fornecer bases para ajustar as especificações de dissolução, pode prever quando uma CIVIV pode ser estabelecida.

Recentemente, ROSSI e colaboradores (2007) desenvolveram um método de dissolução para o ritonavir, fármaco inibidor da protease, muito pouco solúvel em água e componente do Kaletra<sup>®</sup>, baseado em dados *in vivo*.

Considerando que a dissolução é um fator limitante para absorção do lopinavir, este Capítulo tem como objetivo estabelecer o perfil de dissolução do lopinavir *in vitro*, a partir do Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas mole de gelatina, baseado nos dados *in vivo*. Os dados farmacocinéticos *in vivo* foram retirados de estudos previamente realizados por OKI e colaboradores (2004), após a administração da formulação a voluntários saudáveis.

## 4.2 REVISÃO

### 4.2.1 Dissolução e absorção de fármacos

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas de uso oral depende da liberação da substância ativa, da dissolução da mesma nas condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal (ANSEL *et al.*, 2000).

A permeabilidade é o segundo processo que inicia após o fármaco estar em solução e é definida como a habilidade do fármaco transpor membranas para atingir a circulação sistêmica. O grau de permeação e posterior absorção dependem também das propriedades físico-químicas do fármaco e da perfusão sanguínea (ANSEL *et al.*, 2000; SIRISUTH e EDDINGTON, 2004).

### 4.2.2 Teoria da dissolução e condições *sink*

A velocidade de dissolução de uma partícula de fármaco é determinada pela velocidade de difusão das moléculas do soluto através de uma fina camada de fármaco-solução que envolve a superfície da partícula, chamada camada de difusão. É a partir desta camada que as moléculas do fármaco passam através do líquido solvente e entram em contato com as membranas biológicas para serem absorvidas. Matematicamente, a velocidade de dissolução pode ser descrita pela Equação de Noyes-Whitney, modificada por Nernst:

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \frac{DS}{vh} (c_s - c_t) \quad (4.1)$$

onde,  $dc/dt$  é a velocidade de dissolução;  $k_2$  a constante de velocidade, característica intrínseca de cada substância química;  $D$  é o coeficiente de difusão do soluto em solução;  $S$  a área superficial do sólido;  $h$  a espessura da camada de difusão;  $v$ , o volume do meio de dissolução;  $C_s$  a solubilidade da substância no solvente e  $C_t$  a concentração do soluto no meio no tempo  $t$ . Entretanto, *in vivo*, acredita-se que não há interferência do gradiente de concentração sobre a velocidade de dissolução do fármaco segundo a equação 4.1, uma vez que no organismo existe a condição *sink* (ABDOU, 2000; ABRAHAMSSON, 2000).

Desta forma, os estudos de dissolução devem ser conduzidos de forma a satisfazer as condições *sink* que existem *in vivo*, ou seja, que  $C_t$  seja de no máximo 15% de  $C_s$ . Para tanto, são utilizados, recursos como o uso de grandes volumes de meio, adição de tensoativos, ajuste de pH, reposição de meio e uso de fase orgânica para funcionar como depósito. Nestas condições, o termo  $C_t$  da equação 4.1 pode ser desprezado, pois a velocidade de dissolução será independente da fração já dissolvida ( $c_s \gg c_t$ ) e a equação 4.1 então, segundo os autores acima mencionados, pode ser escrita:

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \frac{DS}{vh} c_s \quad (4.2)$$

considerando que  $c_s$  e  $D$  são constantes para cada substância química a equação 4.2, pode ser transformada em:

$$\frac{dc}{dt} = k_3 \frac{S}{vh} \quad (4.3)$$

e, como o volume do meio de dissolução e a superfície são mantidos constantes durante o teste dissolução, então,

$$\frac{dc}{dt} = K \quad (4.4)$$

Em condição *sink*, segundo esta equação, a velocidade de dissolução é constante e se aproxima das condições *in vivo*. Os testes de dissolução *in vitro* devem ser conduzidos de forma a assegurar esta condição (ABRAHAMSSON, 2000; ABDU, 2000).

### **4.2.3 Fatores que afetam a dissolução de fármacos *in vitro***

#### **4.2.3.1 Tamanho de partícula**

A redução do tamanho de partícula aumenta a área de contato do soluto com o solvente. No caso de fármacos muito pouco solúveis em água, segundo a equação 4.1 de Noyes-Whitney modificada, resulta em um aumento da velocidade de dissolução (ANSEL *et al.*, 2000).

#### **4.2.3.2 Propriedades físico-químicas**

As substâncias químicas podem apresentar-se nas formas cristalina ou amorfa, sendo que a forma amorfa é mais solúvel que a forma cristalina. Algumas substâncias na forma cristalina são capazes de formar diferentes tipos de cristais ou polimorfos. Apesar de serem quimicamente idênticos, possuem propriedades físico-químicas diferentes (ANSEL *et al.*, 2000; VIPPAGUNTA, 2001; HILFIKER, 2006.).

O lopinavir existe como forma amorfa e quatro diferentes formas cristalinas. O produto comercial é uma mistura da forma amorfa e cristais do tipo I (EMEA 2001a; EMEA, 2001b). Os polimorfos do ritonavir, em número de cinco, encontram-se bem documentados na literatura. Recentemente, duas dissertações de mestrado (DIAS, 2006; ROSSI, 2006), apresentadas neste Programa de Pós-Graduação, evidenciaram os polimorfos do ritonavir no Norvir®.



A maioria dos fármacos são ácidos ou bases fracas, portanto, ionizáveis. Nestes, a solubilidade pode ser explicada pelo grau de ionização do composto que é dependente do pH do meio e da constante de dissociação do fármaco (HÖRTER e DRESSMAN, 2001). Muitos outros fatores como o estado de hidratação, solvatação, complexação e propriedades físicas como densidade, viscosidade e molhabilidade afetam a velocidade de dissolução (ABDOU, 2000).

#### **4.2.3.3 Tensoativos**

O uso de tensoativos no meio de dissolução para fármacos escassamente solúveis em água é preconizado (USP 2007; FDA, 1994b). Segundo SHAH e colaboradores (1989), o uso de tensoativos no meio de dissolução é mais adequado do que o uso de veículos hidro-alcoólicos, tendo em vista a existência de tensoativos naturais como a lecitina, ácidos e sais biliares no trato gastrointestinal (TGI).

A velocidade e o grau de dissolução *in vitro*, aumentam com o aumento da concentração de lauril sulfato de sódio (LSS). Entretanto, altas concentrações do tensoativo podem ser menos discriminatórias para a formulação e podem causar problemas nos testes automatizados, devido à excessiva formação de espuma (SHAH *et al.*, 1995). Afora esses problemas, a simples combinação de tensoativos sintéticos não pode ser usada para simular ambas as condições (gástricas e intestinais) e não se pode afirmar que eles solubilizam o fármaco de forma semelhante aos componentes biliares (DRESSMAN, 2000).

#### **4.2.3.4 Forma farmacêutica e tecnologia de fabricação**

Quanto menor o número de etapas envolvidas no processo de fabricação, maior será a velocidade de dissolução. Assim, a solubilidade de um determinado fármaco é maior na forma farmacêutica de suspensão aquosa e menor na forma de comprimidos ou cápsulas duras de gelatina (HUTCHISON e FERDINANDO, 2005).

O lopinavir e o ritonavir, inibidores da protease e praticamente insolúveis em água, encontram-se dissolvidos ou dispersos em ácido oléico, propilenoglicol e óleo de rícino etoxilado, este último, um tensoativo não iônico. Segundo ASHFORD (2005), este sistema é denominado auto-emulsionante (SEDDS) e é uma estratégia utilizada para aumentar a velocidade de dissolução e consequentemente a biodisponibilidade.

O fenômeno *cross-linking* que ocorre nas cápsulas mole de gelatina pode alterar de forma significativa a velocidade de dissolução *in vitro*. Excipientes normalmente utilizados nesta forma farmacêutica, em condições de estresse, podem sofrer auto-oxidação e formar aldeídos os quais podem reagir com a gelatina e formar ligações cruzadas, resultando na diminuição da velocidade de dissolução *in vitro* (DIGENIS *et al.*, 1994; MEYER, *et al.*, 2000).

#### **4.2.3.5 Velocidade de agitação**

As condições empregadas no teste de dissolução, principalmente a velocidade de agitação, interferem na velocidade de dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica. Segundo BANAKAR (1992), a velocidade de dissolução é diretamente proporcional à velocidade de agitação e inversamente proporcional à espessura da camada de difusão.

#### **4.2.4 Sistema de classificação biofarmacêutica**

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), proposto por AMIDON e colaboradores (1995), classifica os fármacos segundo sua solubilidade aquosa na faixa de pH gastrintestinal e na sua permeabilidade através da membrana do TGI. Estes fatores, solubilidade e permeabilidade, associados à dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica são os principais fatores que regem a velocidade e a extensão da absorção do medicamento. Além de fornecer bases para ajustar as especificações de dissolução, o SCB pode prever quando uma correlação *in vitro-in vivo* pode ser obtida

com sucesso. Neste sistema, um fármaco é considerado altamente solúvel quando a dosagem mais alta se dissolve em até 250 ml de água na faixa de pH entre 1,0 e 6,8 e é altamente permeável quando a extensão da absorção é maior que 90% da dose administrada, na ausência de instabilidade do trato gastrointestinal. De acordo com o SCB, os fármacos são divididos em quatro classes (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997a; DRESSMAN *et al.*, 1998; DRESSMAN, 2000; DRESSMAN E KRÄMER, 2005):

#### **4.2.4.1 Classe I: alta solubilidade (AS) e alta permeabilidade (AP)**

O SCB sugere que para fármacos da classe I e para alguns fármacos da classe III, a biodisponibilidade não é limitada pela velocidade de dissolução. Nestes casos, o fator limitante poderá ser o esvaziamento gástrico e uma CIVIV dificilmente será obtida para formas de liberação imediata. Para estas classes, o teste de dissolução objetiva apenas constatar se o fármaco é liberado a partir da forma farmacêutica em meio aquoso moderado, dentro de um determinado tempo. O FDA recomenda o teste de dissolução de um único ponto onde  $\geq 85\%$  do fármaco deve dissolver dentro de 30 minutos. Fármacos pertencentes à classe I são dispensados dos testes de bioequivalência *in vivo* quando apresentam adequada dissolução *in vitro*.

#### **4.2.4.2 Classe II: baixa solubilidade (BS) e alta permeabilidade (AP)**

Nesta classe estão os fármacos muito pouco solúveis em meio aquoso, entretanto, são facilmente transportados através da mucosa do TGI devido a sua boa lipofilia. Para estes fármacos, a velocidade de dissolução pode ser o fator limitante da biodisponibilidade oral. A relação dose solubilidade (D/S) dada pela equação 4.5 indica se as condições do TGI solubilizam o fármaco. Valores de D/S até 250 ml, segundo o FDA, indicam uma boa solubilidade; valores maiores indicam que pode não

existir as condições *sink* no organismo e que a dissolução será o fator limitante da absorção. Neste caso, uma boa CIVIV pode ser esperada.

$$D/S = \frac{\text{dose (mg)}}{\text{solubilidade aquosa (mg ml}^{-1}\text{)}} \quad (4.5)$$

#### **4.2.4.3 Classe III: alta solubilidade (AS) e baixa permeabilidade (BP)**

A permeabilidade do fármaco às membranas é o fator que controla a absorção e uma CIVIV limitada pode ser possível, dependendo do trânsito intestinal e da velocidade relativa de dissolução. Aqui, a rápida dissolução é importante, pois aumenta o tempo de contato entre o fármaco dissolvido e a membrana, melhorando a biodisponibilidade.

#### **4.2.5.4 Classe IV: baixa solubilidade (BS) e baixa permeabilidade (BP)**

Os fármacos desta classe, normalmente, apresentam problemas significativos de absorção oral a partir da forma farmacêutica. A exemplo dos fármacos da classe III, uma CIVIV é pouco provável de ser obtida.

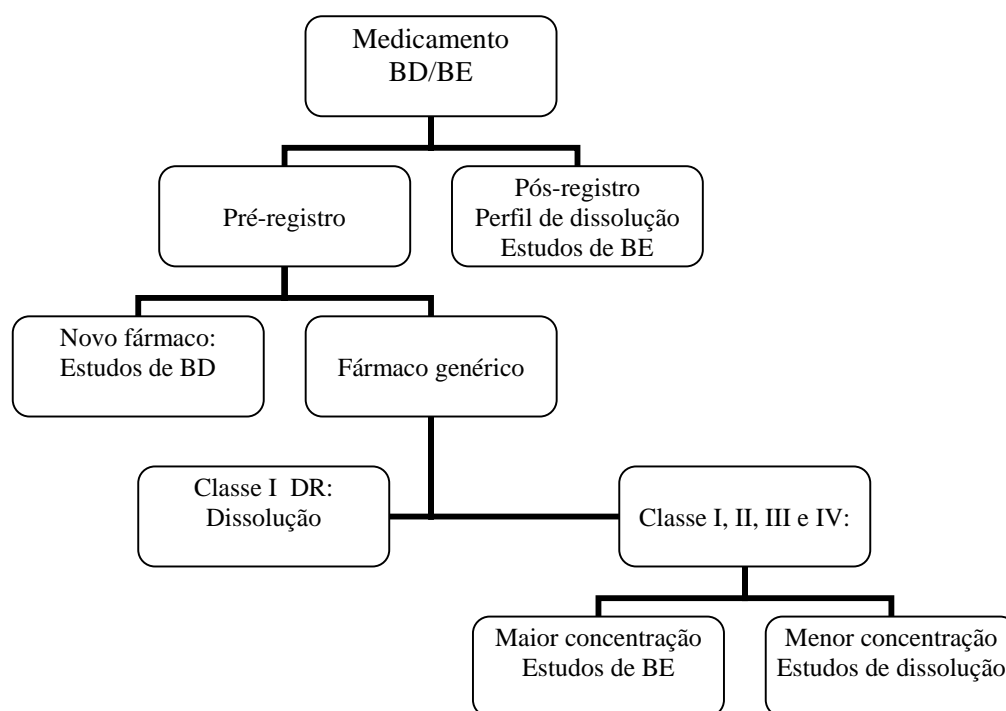
O SBC dá uma estimativa de qual dos dois processos cinéticos (solubilidade e permeabilidade) podem estar envolvidos no fator limitante da velocidade de absorção, entretanto ele não avalia a dissolução e a absorção diretamente, mas sim os parâmetros de solubilidade e de permeabilidade, que em termos cinéticos, são difíceis de interpretar. Apesar disso, o SCB fornece um ponto de partida útil para o reconhecimento de como e quando o teste de dissolução pode auxiliar no desenvolvimento e na avaliação da forma farmacêutica de uso oral, sustenta a solicitação de dispensa de estudos *in vivo* aos órgãos reguladores e pode prever quando uma CIVIV pode ser obtida (DRESSMAN *ECT al.*, 1998; KRÄMER, 2000; DRESSMAN e KRÄMER, 2005).

A comparação entre perfis de dissolução, segundo o FDA (2000), pode isentar os estudos *in vivos* nos casos de diferentes dosagens de uma mesma formulação e nos casos de pequenas modificações efetuadas no medicamento após aprovação do mesmo. A fim de uniformizar a comparação entre perfis, o FDA adotou o modelo matemático independente, o qual usa um fator de similaridade ( $f_2$ ) e um fator de diferença ( $f_1$ ) (FDA, 1997b; FDA, 2000; DRESSMAN E KRÄMER, 2005). A ANVISA utiliza basicamente os mesmos critérios do FDA para a dispensa dos estudos de bioequivalência e o mesmo modelo para comparação entre perfis de dissolução (BRASIL, 2004).

#### **4.2.6 Correlação *in vitro- in vivo* (CIVIV)**

O FDA (1997b) define CIVIV como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma propriedade *in vitro* e uma resposta *in vivo* da forma farmacêutica. A propriedade *in vitro* normalmente utilizada é o grau de dissolução a partir da forma farmacêutica, enquanto que a resposta *in vivo* é a quantidade do fármaco absorvida.

Para o estabelecimento de uma CIVIV são necessários estudos de absorção *in vivo* e dissolução *in vitro*, realizados com o mesmo lote da formulação e com três diferentes velocidades de liberação. Tais correlações têm como vantagem reduzir o número de dispendiosos estudos clínicos para avaliar a biodisponibilidade em humanos e a utilização de animais para avaliar a formulação. Entretanto, nem sempre uma CIVIV pode ser estabelecida. Normalmente, ela é obtida quando a dissolução é o fator limitante da velocidade de absorção (FDA, 1997b; ASHFORD, 2005; DRESSMAN E KRÄMER, 2005). A Figura 4.1 resume os requerimentos do FDA para formas farmacêuticas de liberação imediata de uso oral.



BD: biodisponibilidade; DR: dissolução rápida; BE: bioequivalência

**Figura 4.1** Requerimentos do FDA para formas farmacêuticas de liberação imediata, de uso oral, segundo DRESSMAN e KRÄMER (2005).

#### 4.2.5.1 Níveis de correlação

Quatro níveis de CIVIVs são descritos pelo FDA (1997b):

##### 4.2.5.1.1 Correlação nível A

Representa uma relação ponto a ponto entre a fração dissolvida, a partir da forma farmacêutica, e a velocidade de entrada do fármaco no organismo. É o nível de correlação mais alto. Normalmente, esta correlação é obtida pela deconvolução da curva de concentração plasmática *versus* tempo para obtenção da curva da fração absorvida *versus* tempo. Esta última é obtida pela modelagem matemática, utilizando modelos dependentes como Wagner-Nelson, para um compartimento, ou Loo-

Riegelman se o modelo se ajusta a dois compartimentos, ou ainda, utilizando modelos independentes. A correlação é obtida através da comparação entre a fração absorvida e dissolvida do fármaco, nos mesmos tempos. Normalmente esta correlação é linear, apresentando uma equação do tipo:

$$y = a.x + b \quad (4.6)$$

onde  $y$  é a fração do fármaco absorvida em diferentes tempos;  $x$  a fração do fármaco dissolvida em diferentes tempos;  $a$  é o coeficiente angular da inclinação da reta e  $b$  é o intercepto.

#### **4.2.5.1.2 Correlação nível B**

Este nível de correlação compara o tempo médio de dissolução *in vitro* com o tempo de dissolução médio ou o tempo de residência médio *in vivo*. Não representa uma correlação ponto a ponto, porque não reflete inteiramente a curva de nível plasmático.

#### **4.2.5.1.3 Correlação nível C**

Estabelece um simples ponto de relação entre um parâmetro de dissolução e um parâmetro farmacocinético, como ASC,  $T_{max}$  ou  $C_{max}$ . Não permite prever o real desempenho do fármaco *in vitro*.

#### **4.2.5.1.4 Correlação nível C múltiplo**

Relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos de interesse à fração de fármaco dissolvida em vários pontos do perfil de dissolução.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Obtenção dos dados *in vivo*

O perfil de dissolução *in vitro* para o lopinavir, (Kaletra<sup>®</sup>) cápsulas mole de gelatina, foi desenvolvido através do ajuste da curva de dissolução à curva de absorção. Os dados farmacocinéticos *in vivo* foram retirados dos estudos previamente realizados por OKI e colaboradores (2004), após a administração da forma farmacêutica a voluntários saudáveis.

O estudo farmacocinético foi realizado utilizando oito voluntários saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 28 e 52 anos e peso entre 51 e 70 quilos. O ensaio, com delineamento cruzado, foi realizado em ambas as condições: estado de jejum e pós-prandial, em diferentes períodos.

Cada voluntário recebeu uma dose oral de Kaletra<sup>®</sup> (400 mg de lopinavir e 100 mg de ritonavir). Os voluntários em estado pós-prandial receberam uma refeição contendo 530 kcal e 20 g de lipídios. Nestes, a administração ocorreu 30 minutos após o término da refeição. No estado de jejum os voluntários ficaram, 12 horas sem ingerir alimentos, antes da administração. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24 e 30 horas após a administração. Após a extração do lopinavir e do ritonavir do plasma, os mesmos foram quantificados por CLAE.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando o programa MULTI<sup>®</sup>. O *t*-teste foi utilizado para comparar os parâmetros, com confiabilidade de 95%.



### 4.3.1.1 Fração absorvida da dose

Os pontos médios da curva de concentração plasmática nos diferentes tempos foram obtidos pelo programa de regressão não linear Scientist<sup>®</sup> versão 2.0 (MicroMath<sup>®</sup>) a partir do dados de OKI e colaboradores (2004), utilizando modelo de um compartimento aberto, descrito pela Equação 4.7. A fração absorvida da dose do lopinavir foi calculada utilizando o modelo de Wagner-Nelson, conforme a Equação 4.8 onde, C é a concentração plasmática, F representa a biodisponibilidade, D é a dose,

$$C = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V_d \cdot (k_a - k_e)} \cdot (e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad (4.7)$$

$$FA = \frac{C + k_e \cdot [ASC]_0^t}{k_e \cdot [ASC]_0^\infty} \quad (4.8)$$

$k_a$  e  $k_e$  são as constantes, respectivamente, de absorção e de eliminação,  $V_d$  é o volume de distribuição e ASC representa a área sob a curva.

## 4.3.2 Estudos *in vitro*

### 4.3.2.1 Amostra e reagentes

Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas mole de gelatina, lote 330962E21 com vencimento em outubro/2007, do laboratório Abbott foi utilizado como amostra e os seguintes reagentes foram empregados: lauril sulfato de sódio (LSS) com pureza mínima de 90% (Synth), metanol e acetonitrila grau CLAE (T.J. Baker), água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore<sup>®</sup>), ácido fosfórico (Merck), ácido clorídrico (Merck), hidróxido de sódio (Vetec) acetato de sódio (Merck), acetato de amônio e ácido acético glacial (Nuclear), propilenoglicol (Delaware), ácido oleico e óleo de rícino (Alfa Química).

#### **4.3.2.2 Determinação da solubilidade**

##### **4.3.2.2.1 Lopinavir – substância ativa**

A solubilidade do lopinavir foi determinada, no intervalo de pH entre 1,0 e 8,0 e em três diferentes concentrações de LSS: 0,5; 1,0 e 1,5% p/V. As diferentes soluções foram obtidas pelo simples ajuste do pH da água ultrapura, com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e/ou pela dissolução do LSS na mesma. Para cada condição, preparou-se uma suspensão com 10 mg de lopinavir, substância ativa e 10 ml de meio, em tubo de ensaio. Os tubos foram agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, com agitação manual a cada 5 minutos. As amostras foram filtradas, neutralizadas e diluídas se necessário e o percentual dissolvido em cada condição foi determinado por CLAE.

##### **4.3.2.2.2 Lopinavir e ritonavir – substâncias ativas**

A solubilidade da mistura lopinavir/ritonavir, substância ativa, em quantidades proporcionais à amostra, foi determinada na temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , em diferentes meios: HCl 0,1 M, tampão acetato pH 4,4, e água contendo 2,3% p/V de LSS pH 6,0. Para cada condição, foram utilizados 66,7 mg de lopinavir e 16,7 mg de ritonavir e 125 ml de meio. As soluções foram mantidas nesta temperatura, com leve agitação, durante 2 horas. Alíquotas de cinco ml foram retiradas após uma e duas horas, filtradas, diluídas se necessário e o percentual dissolvido em cada tempo e condição, foi determinado por CLAE. O ensaio foi realizado em duplicata.

##### **4.3.2.2.3 Lopinavir/ritonavir – cápsulas de gelatina**

A solubilidade do lopinavir e do ritonavir, a partir da forma farmacêutica, foi determinada no meio contendo 2,3% p/V de LSS pH 6,0. Uma cápsula de Kaletra<sup>®</sup> foi adicionada em 250 ml deste meio, mantido a  $37^\circ\text{C}$ . As soluções foram mantidas nesta temperatura, com leve agitação, durante 2 horas. Alíquotas de cinco ml foram retiradas

após uma e duas horas, filtradas, diluídas e o percentual dissolvido em cada tempo foi determinado por CLAE. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### **4.3.2.3 Perfil de dissolução**

O perfil de dissolução do lopinavir cápsulas mole de gelatina foi obtido com Dissolutor Vankel VK 7010, equipado com oito cubas, amostrador automático VK 8000 e bomba peristáltica VK 750D. Os meios de dissolução foram preparados em água ultrapura e os testes foram efetuados na temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C.

A influência de diferentes concentrações de LSS no meio de dissolução: 0,5; 0,7; 0,9; 1,7 2,0; 2,3 e 2,5% p/V, diferentes equipamentos (1 e 2 USP) e diferentes velocidades de agitação foram avaliadas. O pH do meio de dissolução, em todos os ensaios, foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  com ácido fosfórico a 20% e o mesmo foi monitorado antes e depois da realização dos ensaios. O volume de meio utilizado foi de 900 e 1000 ml.

Alíquotas para análise foram automaticamente amostradas nos intervalos de 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Os volumes amostrados em cada tempo (4 e 8 ml), os quais se encontram especificados em cada ensaio, foram previamente filtrados com filtros de teflon com porosidade de 10  $\mu$ m acoplados no amostrador automático. Não houve reposição do volume amostrado. Foi efetuada a correção da concentração remanescente do lopinavir e do ritonavir nos diferentes tempos. O perfil de dissolução foi obtido com 12 cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>.

#### **4.3.2.4 Determinação da fração dissolvida**

A fração dissolvida em cada tempo foi analisada por CLAE, utilizando o método desenvolvido por DONATO e colaboradores (2006), descrito no Capítulo 2, com algumas alterações: vazão e equipamento. A vazão de fluxo foi aumentada para 1,2 ml  $\text{min}^{-1}$  e foi utilizado cromatógrafo em fase líquida Shimadzu com bomba LC-20AT,

controladora CBM-20A, detector SPD-10AV VP e injetor automático SIL-20A. Utilizou-se o detector de arranjo de diodos SPD-10AV VP para verificar a pureza dos picos cromatográficos. As alíquotas amostradas foram injetadas em duplicata e a fração dissolvida em cada tempo, para cada fármaco, foi calculada pela equação da reta, obtida a partir da curva-padrão.

#### **4.3.3 Correlação com a curva de absorção**

As curvas de dissolução obtidas foram avaliadas através da construção de um gráfico com os valores das frações absorvidas (FA) nos diferentes tempos, obtida pelo método de Wagner-Nelson (ordenadas) versus frações dissolvidas obtidas no perfil de dissolução *in vitro*, nos mesmos tempos da FA (abscissas). A correlação assim obtida foi avaliada pela análise de regressão linear e não linear.

#### **4.3.4 Validação do teste de dissolução *in vitro***

O método foi validado nos parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico, linearidade, precisão e exatidão. A interferência dos excipientes do conteúdo da cápsula, bem como da cápsula vazia, na determinação do lopinavir e do ritonavir foi avaliada. A estabilidade do lopinavir e do ritonavir foi avaliada no meio de dissolução, na temperatura utilizada e no período de duração do ensaio.

##### **4.3.4.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico**

A repetibilidade das injeções, tempo de retenção ( $T_r$ ), eficiência da coluna (N), resolução (R), fator de retenção ( $k'$ ) e assimetria (T) foram avaliados através de cinco injeções da solução do ponto médio da curva-padrão (80 e 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente, de lopinavir e ritonavir), utilizada para avaliar a linearidade do método.

#### 4.3.4.2 Especificidade/interferência do placebo

A interferência dos excipientes do conteúdo da cápsula e da cápsula vazia do Kaletra<sup>®</sup> foi avaliada, separadamente. Realizou-se um teste de dissolução, com seis cubas, cada uma contendo 1000 ml do meio de dissolução mantido a  $37 \pm 0,5$  °C. Três cubas receberam a mistura dos excipientes, em quantidades proporcionais à amostra (GURSOY e BENITA, 2004). Uma cápsula vazia do Kaletra<sup>®</sup>, previamente lavada, foi adicionada em cada uma das outras três cubas. Todas as cubas receberam também uma âncora. Efetuou-se o teste de dissolução com duração de uma hora e agitação através de pás a 150 rpm. Alíquotas das amostras após serem filtradas foram analisadas por CLAE.

#### 4.3.4.3 Estabilidade da amostra frente às condições do teste

A estabilidade da amostra e da mistura das SQRs foi avaliada frente às condições do teste de dissolução. Foram preparadas soluções contendo  $80 \mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir e  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir (amostra e SQRs), dissolvidas no meio de dissolução. Estas soluções foram colocadas em banho-maria mantido a 37 °C, durante 2 horas, sob agitação leve. Após este período as mesmas foram deixadas à temperatura ambiente durante 24 horas. Alíquotas das amostras foram filtradas, diluídas se necessário e analisadas por CLAE, nos tempos zero, duas e 24 horas, frente a uma solução padrão, recentemente preparada.

#### 4.3.4.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de três curvas padrão, com cinco diferentes concentrações, no intervalo de 8 a  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o lopinavir e no intervalo de 5 a  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o ritonavir. As diluições foram efetuadas com LSS 2,3% pH 6,0 a partir de uma solução metanólica contendo  $1.600 \mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir e  $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir. Com as áreas médias das três curvas, construiu-se um gráfico plotando-se os resultados das áreas dos picos cromatográficos *versus* concentração calculando-se o

coeficiente de correlação e a equação da reta, para cada fármaco. As equações da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e validadas pela ANOVA, com confiabilidade de 95% .

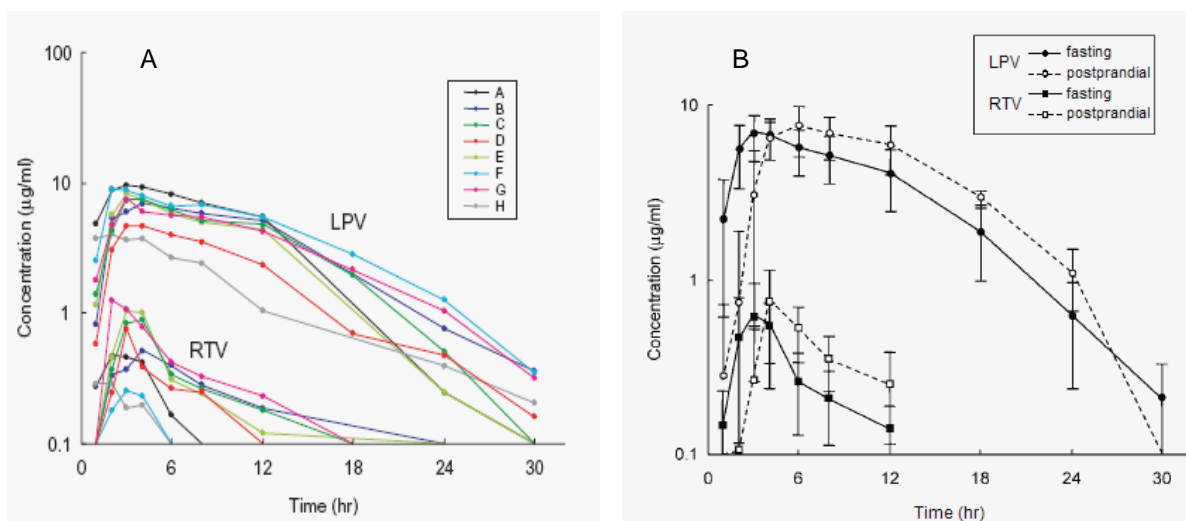
#### **4.3.4.5 Exatidão e precisão**

O estudo da exatidão foi realizado através da recuperação do lopinavir e do ritonavir adicionados ao meio de dissolução contendo a mistura dos excipientes do conteúdo da cápsula, em quantidades proporcionais à amostra. Preparou-se uma solução metanólica contendo 5 mg ml<sup>-1</sup> de lopinavir e 1,25 mg ml<sup>-1</sup> de ritonavir. Com auxílio de uma bureta foram transferidos para balões volumétricos de 500 ml, já contendo a mistura dos excipientes, 4,0; 8,0 e 16,0 ml da mistura das substâncias ativas. Completou-se o volume com o meio de dissolução e o conteúdo de cada balão foi transferido para as cubas do dissolutor. Foram obtidas as concentrações de 40, 80 e 160 µg ml<sup>-1</sup> para o lopinavir e 10, 20 e 40 µg ml<sup>-1</sup> para o ritonavir. Aguardou-se a temperatura atingir 37 ± 0,5 e então, efetuou-se o teste de dissolução, o qual teve duração de uma hora e agitação através de pás, na velocidade de 150 rpm. O ensaio foi realizado em triplicata e em três diferentes dias. As alíquotas de cada concentração foram filtradas, analisadas por CLAE e o percentual médio recuperado para cada fármaco nos três diferentes dias, calculado. A precisão do método foi avaliada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) intra e interdia, dos resultados obtidos nos estudos de exatidão.

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Estudos *in vivo*

Cabe ressaltar que este trabalho objetiva estabelecer o perfil de dissolução baseado nos dados *in vivo*, apenas para o lopinavir. Os parâmetros farmacocinéticos do lopinavir foram retirados dos estudos realizados por OKI e colaboradores (2004), após a administração de Kaletra<sup>®</sup> em dose única a oito voluntários saudáveis. As curvas de concentração plasmática versus tempo para o lopinavir (LPV), para cada voluntário, no estado de jejum, podem ser visualizadas na Figura 4.2A, a qual inclui também, as do ritonavir (RTV). O comportamento do lopinavir foi modelado utilizando modelo de um compartimento e absorção de primeira ordem, por apresentar, segundo os autores, melhor ajuste para os dados.



**Figura 4.2** Curva de concentração plasmática versus tempo do LPV e RTV após administração de dose única de Kaletra<sup>®</sup> (400 mg de LPV e 100 mg de RTV) aos oito voluntários saudáveis, no estado de jejum (A). Curva média da concentração plasmática versus tempo do LPV e do RTV no estado de jejum e pós-prandial (B). Gráficos extraídos dos estudos realizados por OKI e colaboradores (2004).

A curva média da concentração plasmática *versus* tempo do lopinavir e do ritonavir, no estado de jejum e pós-prandial pode ser visualizada na Figura 4.2B enquanto que os valores dos parâmetros farmacocinéticos individuais do lopinavir, no estado de jejum, podem ser visualizados Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** Dados dos parâmetros farmacocinéticos do lopinavir obtidos após administração de uma simples dose oral de Kaletra<sup>®</sup>, no estado de jejum, segundo OKI e colaboradores, (2004).

Voluntário	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{1/2}$ (h)	Lag time (h)	$ASC_{24h}$ ( $\mu\text{g.h/ml}$ )	$Vd/F$ (l)	$Cl/F$ (l/h)	$ke$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$ka$ ( $\text{h}^{-1}$ )
A	2,9	9,5	10,0	0,55	118,8	35,7	2,5	0,069	1,30
B	4,1	6,7	17,0	0,89	98,7	52,1	2,1	0,041	1,04
C	4,2	7,1	9,0	0,82	89,5	43,8	3,4	0,077	0,76
D	4,0	4,7	6,3	0,88	50,5	61,5	6,7	0,109	0,73
E	3,4	7,4	8,0	0,89	89,1	43,4	3,7	0,086	1,11
F	1,6	9,1	13,2	0,96	113,7	42,5	2,2	0,053	7,50
G	3,7	6,5	11,1	0,76	87,3	51,2	3,2	0,063	1,01
H	1,9	4,1	5,7	0,00	40,3	77,5	10,1	0,130	1,45
média	3,2	6,9	10,0	0,71	86,0	51,0	4,2	0,079	1,86
DP	1,0	1,9	3,7	0,32	27,7	12,4	2,6	0,028	2,14

$T_{max}$ : tempo de concentração máxima;  $C_{max}$ : concentração máxima;  $T_{1/2}$ : tempo de meia vida; Lag time: tempo de espera; ASC: área sob a curva;  $Vd/F$ : volume aparente de distribuição;  $Cl/F$ : clearance oral;  $Ke$ : constante da velocidade de eliminação;  $Ka$ : constante da velocidade de absorção.

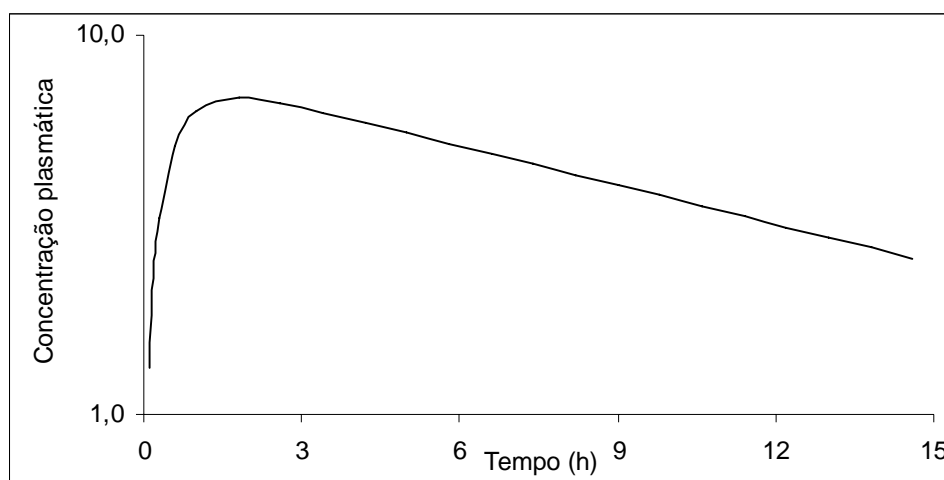
#### 4.4.1.1 Perfil plasmático do lopinavir

Modelos farmacocinéticos são utilizados para expressar a velocidade dos processos de absorção, distribuição e eliminação do fármaco do organismo. Estes modelos são equações que permitem descrever as concentrações do fármaco no organismo em função do tempo. Os modelos compartimentais são os mais utilizados em farmacocinética, sendo que o modelo de um compartimento aberto é o mais simples



e pode ser utilizado sempre que for possível obter uma adequada descrição dos dados *in vivo* (PROUDFOOT, 2005; SHARGEL *et al.*, 2005).

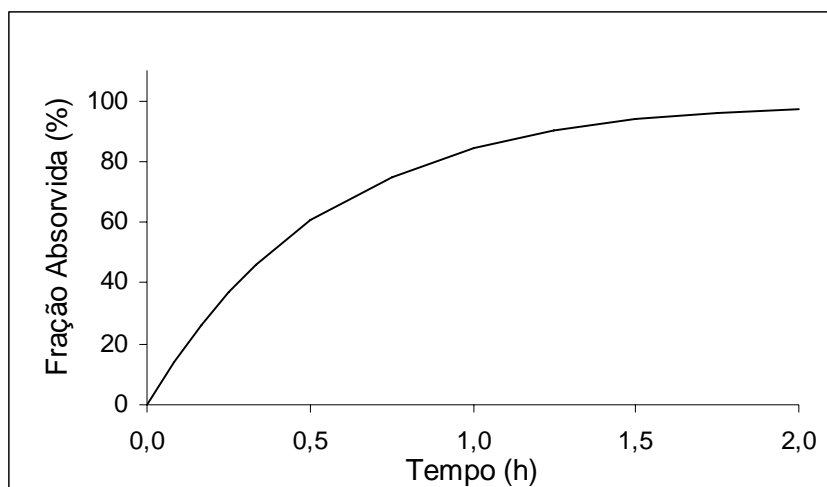
O perfil plasmático médio do lopinavir simulado para um compartimento aberto, conforme descrito na equação 4.7, pode ser visualizado na Figura 4.3. Este modelo farmacocinético foi escolhido de acordo com o melhor ajuste gráfico, utilizando o Critério de Seleção do Modelo (MSC) obtido pelo programa Scientist<sup>®</sup> versão 2.0 (Micromath), a partir dos dados plasmáticos médios relatados por OKI e colaboradores (2004).



**Figura 4.3** Perfil plasmático médio do lopinavir simulado para um compartimento aberto pelo programa Scientist<sup>®</sup> versão 2.0 (Micromath<sup>®</sup>).

#### 4.4.1.2 Fração da dose absorvida

Utilizando o método de Wagner-Nelson, os valores médios da concentração plasmática *versus* tempo foram transformados em fração da dose absorvida (FA). A curva da fração do lopinavir absorvida *versus* tempo (h) obtida após a administração do Kaletra<sup>®</sup> (400 mg de lopinavir e 100 mg de ritonavir), modelado conforme Wagner-Nelson pode ser visualizado na Figura 4.4.



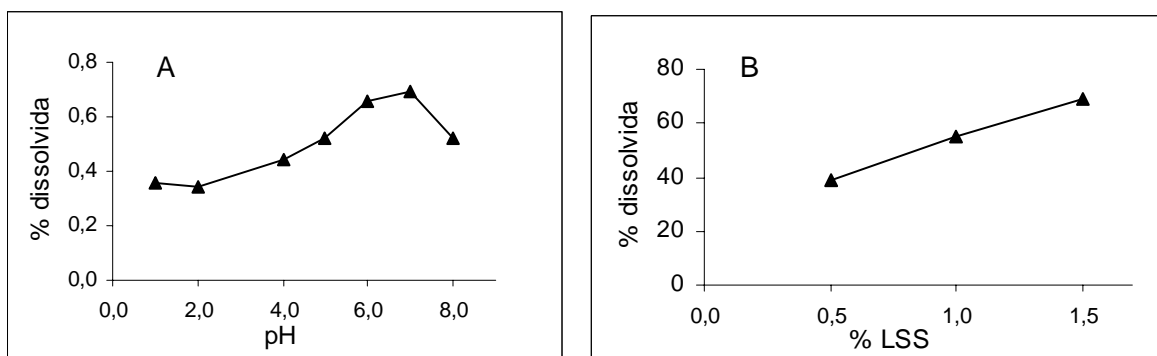
**Figura 4.4** Fração do lopinavir absorvida após administração do Kaletra<sup>®</sup> (400 mg de lopinavir e 100 mg de ritonavir) obtida pelo método de Wagner-Nelson.

#### 4.4.2 Estudos *in vitro*

##### 4.4.2.1 Solubilidade do lopinavir e do ritonavir

Os resultados referentes à solubilidade do lopinavir, em diferentes pHs e em diferentes concentrações de LSS, podem ser visualizados na Figura 4.5. O lopinavir mostrou-se mais solúvel na faixa de pH entre 6,0 e 7,0. Observa-se que, em relação à concentração de LSS, a percentagem de fármaco dissolvida, aumenta, com o aumento da concentração de LSS. Segundo MORAES e REZENDE (2004) o LSS atinge a concentração micelar crítica (CMC) na concentração de 8,1 mM. As concentrações utilizadas continham 0,5; 1,0 e 1,5% de LSS, respectivamente, 17,3; 34,7 e 52,0 mM, portanto, acima da CMC.

A velocidade de dissolução é proporcional à redução da tensão superficial da solução. Entretanto, após a CMC, a variação da tensão superficial praticamente não se altera com a adição de tensoativo. Neste caso, a solubilização é devida às micelas. Em solução, as moléculas do tensoativo separam as moléculas orgânicas formando micelas ao seu redor, dissolvendo gradualmente o composto orgânico no meio aquoso (SCHOTT, 2000; ABDU, 2000).



**Figura 4.5** Curva de solubilidade do lopinavir, substância ativa a 37 °C, em função do pH (A) e da concentração de LSS (B), obtidos por CLAE utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

A solubilidade da mistura lopinavir/ritonavir, em quantidades proporcionais a amostra e da cápsula de Kaletra<sup>®</sup> pode ser visualizada na Tabela 4.2. O lopinavir, um ácido fraco, ao contrário do ritonavir é praticamente insolúvel em ácido clorídrico 0,1 M. As velocidades de dissolução do lopinavir e do ritonavir, a partir da forma farmacêutica são significativamente maiores, quando comparada à das substâncias ativas. Naquela, as substâncias ativas encontram-se dissolvidas ou dispersas na mistura de solventes, que contêm entre eles, o óleo de rícino etoxilado, um tensoativo não iônico. O Kaletra<sup>®</sup> é um exemplo de formulação em sistema auto-emulsificante para liberação de fármacos (SEDDS). Este recurso é utilizado para melhorar a velocidade de dissolução e, conseqüentemente a biodisponibilidade oral do fármaco. Formulações SEDDS espalham-se rapidamente no TGI e a motilidade do estômago e do intestino fornece a agitação necessária para a sua auto-emulsificação (CRAIG *et al.*; 1993; SHAH *et al.*, 1994; PORTER e CHARMAN, 2001; LO, 2003).

Considerando o volume de meio de dissolução utilizado nos testes, o meio constituído de água contendo 2,3% de LSS e pH 6,0 satisfaz as condições *sink*, ou seja, acredita-se que a concentração de lopinavir no meio de dissolução não seja superior a 15% de sua concentração de saturação ( $C_t \leq 15\% C_s$ ). Segundo AMIDON e colaboradores (1995) para fármacos da classe II, condições *sink* devem ocorrer *in vivo*, portanto, essas condições devem ser mantidas *in vitro*.

**Tabela 4.2** Solubilidade da mistura lopinavir/ritonavir, substância ativa, em quantidades proporcionais à amostra, em diferentes meios e da cápsula do Kaletra® em água contendo 2,3% p/V de LSS e pH 6,0, obtidos por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

MEIO	AMOSTRA	% DISSOLVIDA			
		LPV		RTV	
		1 hora	2 horas	1 hora	2 horas
HCl 0,1 M	sa	1,0	2,6	99,1	100,0
Tampão acetato pH 4,4	sa	12,1	14,4	15,7	34,2
H <sub>2</sub> O + 2,3% LSS pH 6,0	sa	87,0	90,5	74,6	84,2
H <sub>2</sub> O + 2,3% LSS pH 6,0	cápsula	99,9	100,0	96,7	100,0

sa =substância ativa

#### 4.4.2.2 Perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*

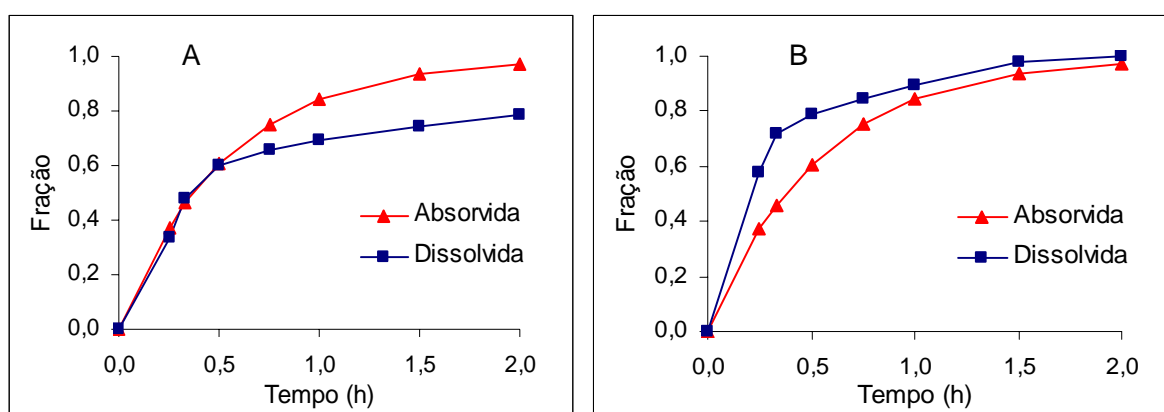
O conhecimento da solubilidade do lopinavir em função do pH e da concentração de LSS foram fatores importantes para a escolha do meio de dissolução. Nas condições utilizadas, foi necessário trabalhar na faixa de pH de maior solubilidade do lopinavir. Assim, o pH do meio de dissolução, em todos os ensaios, foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  e a temperatura em todos os testes de dissolução foi ajustada para  $37 \pm 0,5$  °C.

##### 4.4.2.2.1 Perfil de dissolução do lopinavir - agitação por cestas

Os estudos de dissolução empregando a agitação através de cestas foram realizados utilizando 900 ml meio de dissolução contendo 2,5% de LSS pH 6,0 e diferentes velocidades de agitação: 50, 75 e 100 rpm. O volume amostrado em cada tempo foi de 8 ml e cada ensaio foi realizado com oito cápsulas de Kaletra®.

Utilizando a agitação de 50 rpm, a velocidade de dissolução do lopinavir foi muito lenta quando comparada com os dados *in vivo*. Apenas uma fração de 0,55 de lopinavir foi dissolvida em duas horas, contra 0,97 da fração absorvida. Baseado nestes resultados aumentou-se a velocidade de agitação para 75 rpm. Nestas condições, as

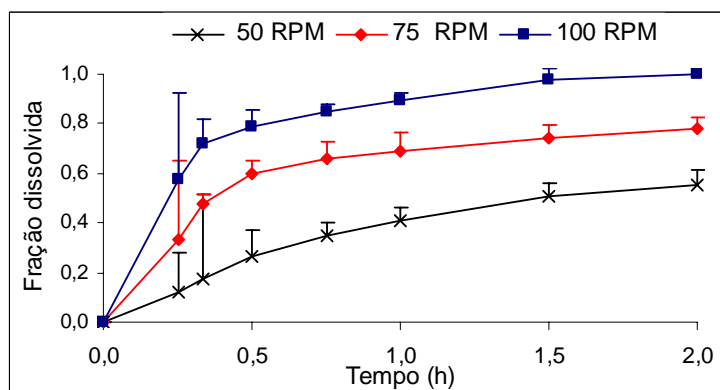
frações do lopinavir dissolvidas nos primeiros tempos de amostragem, assemelham-se aos do estudo *in vivo*, entretanto, a partir dos 30 minutos, a dissolução do lopinavir foi menor quando comparada com a fração da dose absorvida, conforme pode ser visualizado na Figura 4.6A.



**Figura 4.6** Fração absorvida do lopinavir obtida pelo método de Wagner-Nelson, comparado à fração dissolvida obtida utilizando agitação por cestas na velocidade de 75 rpm (A) e na velocidade de 100 rpm (B).

Aumentando a velocidade para 100 rpm, ao contrário do que ocorreu com 75 rpm, o lopinavir se dissolveu muito rapidamente, principalmente nos primeiros pontos de amostragem onde a fração do fármaco dissolvida foi maior que a fração absorvida. Após uma hora de teste, a fração do fármaco dissolvida foi semelhante à fração absorvida, conforme pode ser visualizado na Figura 4.6B, onde são apresentadas as curvas da fração absorvida e a curva da fração dissolvida, na velocidade de agitação de 100 rpm. Na Figura 4.7 podem ser visualizados as frações dissolvidas obtidas com as diferentes velocidades de agitação, com seus respectivos DPRs.

Os valores dos DPRs, para o primeiro ponto de amostragem, ou segundo, no caso da velocidade de 50 rpm, estão acima dos 20% (entre 32 e 35%), utilizando oito cápsulas. Nos demais pontos de amostragem, os DPRs foram iguais ou menores de 10%. O alto valor de DPR naqueles pontos, provavelmente, deve-se aos diferentes tempos em que ocorrem à abertura das cápsulas

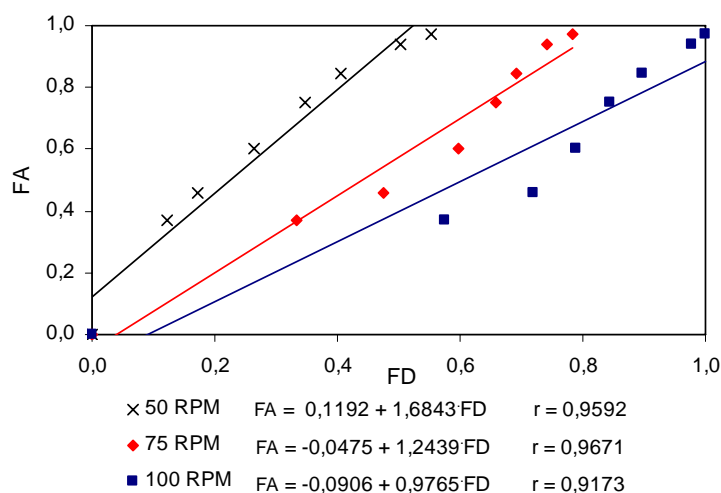


**Figura 4.7** Perfil médio de dissolução do lopinavir, cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>, obtido com 900 ml de meio contendo 2,5 % de LSS pH 6,0, agitação por cestas, nas velocidades de 50, 75 e 100 rpm, determinação por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, Merck) e fase móvel constituída por acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

A literatura recomenda, para formas farmacêuticas de liberação imediata, que a velocidade de agitação do meio de dissolução, efetuada através de cestas ou pás, deve estar, preferentemente, entre de 50 a 100 rpm. Outras velocidades são aceitáveis, desde que justificadas, contudo, não devem ser menores de 25 rpm ou maiores de 150 rpm, devido à falta de hidrodinâmica no primeiro caso e a turbulência, no segundo (FDA, 1997b; USP, 2007).

O gráfico de correlação da Figura 4.8, foi obtido plotando-se a fração absorvida obtida por Wagner-Nelson (FA) versus fração dissolvida (FD), nas velocidades de 50, 75 e 100 rpm. A equação da reta e o coeficiente de correlação é mostrado para cada condição. Pela análise de regressão linear e também conforme pode ser observado visualmente, o intercepto, nas diferentes velocidades de agitação testadas, difere significativamente de zero.

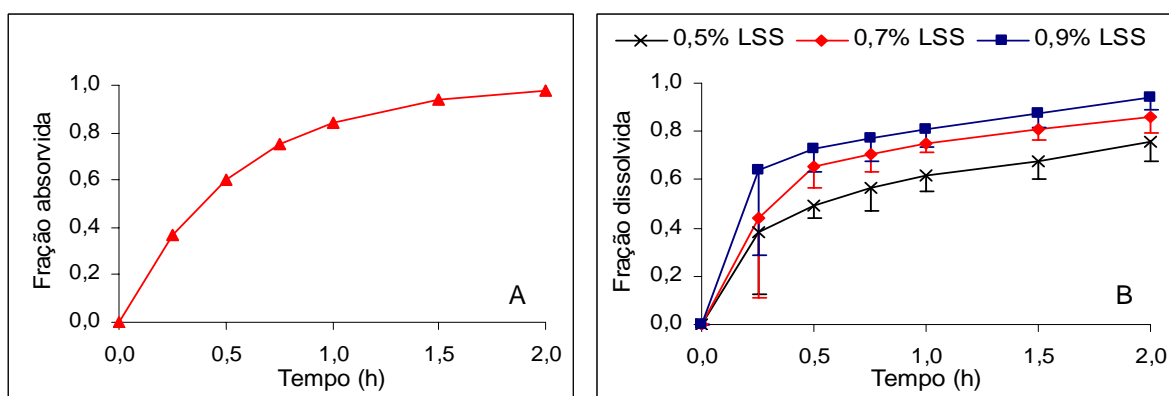
Assim, utilizando meio constituído de água e 2,5% de LSS pH 6,0 e agitação através de cestas, não foi possível estabelecer uma relação ponto a ponto entre a fração absorvida e a fração dissolvida para o lopinavir, conforme nosso objetivo. De posse destes resultados, resolveu-se experimentar a agitação através de pás.



**Figura 4.8** Curva média da fração da dose absorvida (FA) *versus* fração da dose dissolvida (FD) do lopinavir, cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>, com a melhor reta para cada velocidade de agitação.

#### 4.4.2.2 Perfil de dissolução do lopinavir - agitação por pás

Inicialmente os estudos foram realizados utilizando a velocidade de agitação de 50 rpm e diferentes concentrações de LSS. Utilizou-se 900 ml de meio contendo 0,5; 0,7 e 0,9% de LSS pH 6,0 e o volume amostrado em cada tempo foi de 8 ml. Os resultados obtidos nestas condições, com seus respectivos DPRs, comparados à fração absorvida, podem ser visualizados na Figura 4.9.

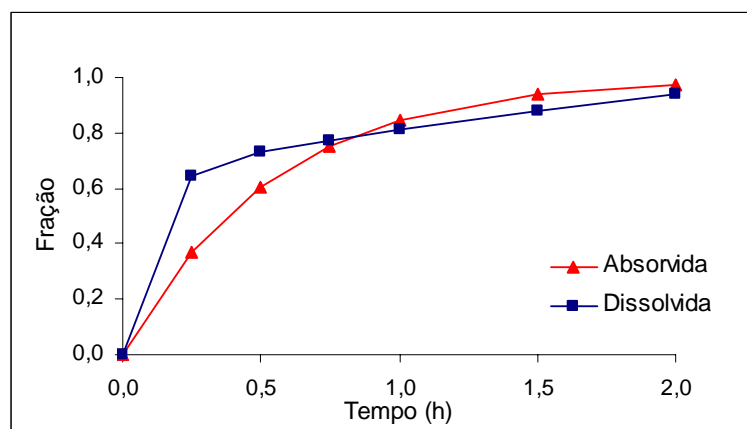


**Figura 4.9** Perfil de absorção médio do lopinavir *versus* tempo obtido por Wagner-Nelson (A) perfil de dissolução médio do lopinavir, cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>, obtido, utilizando como meio de dissolução 900 ml de água contendo 0,5; 0,7 e 0,9% de LSS p/V pH 6,0, agitação por pás, na velocidade 50 rpm e determinação por CLAE, utilizando coluna C18 e fase móvel constituída por acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm (B).

Os valores médios dos DPRs, para as oito cápsulas, no primeiro ponto de amostragem, em ambos os experimentos, também ficaram acima dos 20% (entre 26 a 36%) e partir deste tempo, esses valores foram menores de 10%.

Utilizando 0,5% p/V de LSS, a velocidade de dissolução do lopinavir foi menor, salvo aos 15 minutos, quando comparada com os dados *in vivo*. Com 0,7% de LSS, a velocidade de dissolução nos três pontos iniciais foi semelhante aos dados *in vivo*, entretanto, a partir dos 45 minutos, a velocidade de dissolução foi significativamente menor que a velocidade de absorção.

Utilizando 0,9% de LSS, ao contrário do que ocorreu com a concentração de 0,7%, a velocidade de dissolução nos pontos iniciais foi maior que a velocidade de absorção, entretanto, a partir dos 45 minutos, a velocidade de dissolução do lopinavir foi semelhante à velocidade de absorção, conforme mostrado na Figura 4.10.

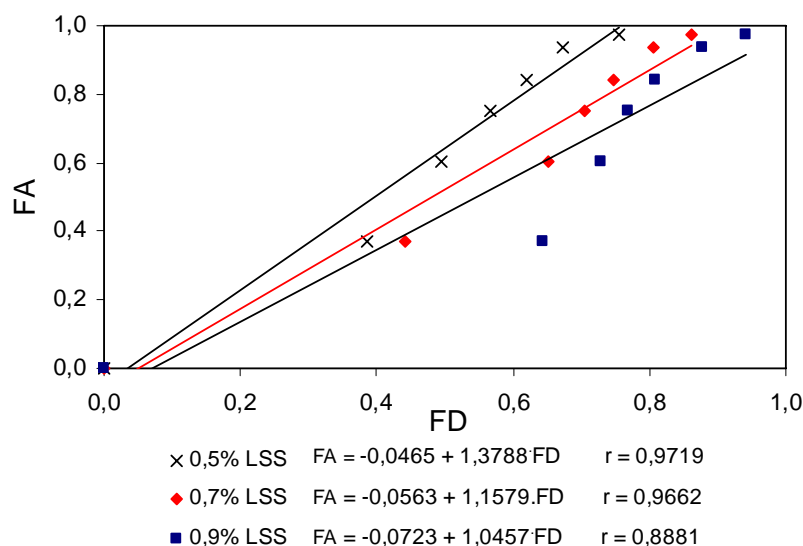


**Figura 4.10** Fração absorvida do lopinavir *versus* tempo obtida pelo método de Wagner-Nelson e fração dissolvida do lopinavir obtida com 900 ml de meio de dissolução contendo 0,9 % de LSS pH 6,0, agitação por pás a 50 rpm, determinação por CLAE, utilizando coluna C18, fase móvel constituída por acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

O gráfico de correlação da Figura 4.11 mostra a relação entre a fração absorvida e dissolvida do lopinavir utilizando as concentrações de 0,5, 0,7 e 0,9% de LSS com a equação da reta e o coeficiente de correlação para cada condição. Nestas condições,



pela análise de regressão linear, também não pode ser estabelecida uma CIVIV significativa.



**Figura 4.11** Curva média da fração da dose absorvida *versus* fração da dose dissolvida para o lopinavir, cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>, agitação por pás a 50 rpm com a melhor reta para cada concentração de LSS.

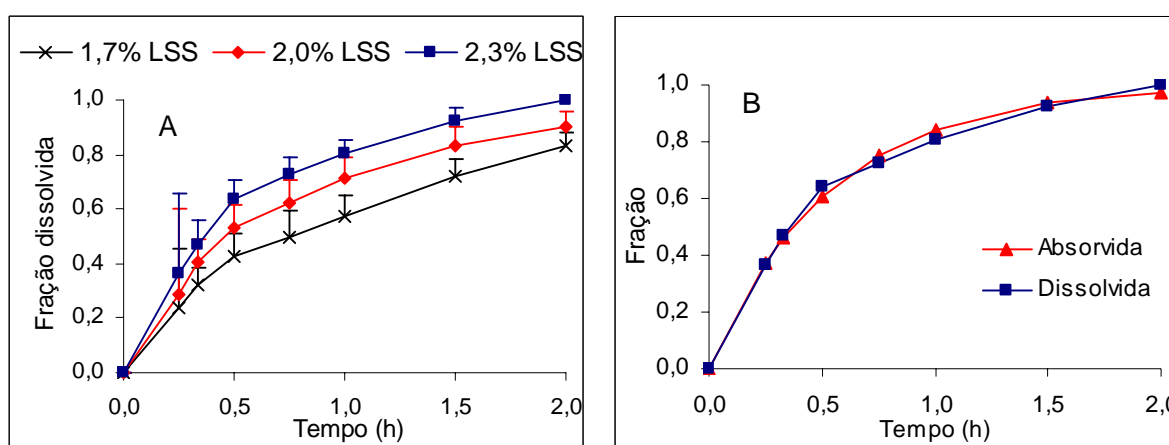
Observa-se que a velocidade de dissolução aumenta, com o aumento da concentração do LSS, entretanto, mesmo utilizando 0,9% de LSS, a velocidade de dissolução do lopinavir ainda é lenta, quando comparada com a velocidade de absorção.

Segundo SHAH e colaboradores (1995), tensoativos têm sido utilizados para aumentar a velocidade de dissolução de fármacos PSA. Meios contendo tensoativos aumentam a velocidade de dissolução comparável a de um meio hidro-alcoólico, sem o uso de álcool. Contudo, é importante utilizar quantidades mínimas necessárias, tendo em vista que altas concentrações de tensoativo podem ser menos discriminatórias para as formulações e também podem causar problemas nos testes automatizados, devido à grande formação de espuma. O LSS é o tensoativo mais utilizado nos testes de dissolução, devido sua excelente capacidade de solubilização, baixo custo, e a

facilidade de uso devido apresentar-se na forma sólida (NOORY *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2004).

Avaliando os resultados até então obtidos e buscando diminuir a diferença entre a velocidade de dissolução *in vitro* e a velocidade de absorção *in vivo* para estabelecer a melhor correlação, ajustes no método de dissolução foram efetuados: aumento do volume do meio de dissolução de 900 para 1000 ml, aumento da concentração de LSS e diminuição da velocidade de agitação para 25 rpm. Três diferentes concentrações de LSS foram avaliadas: 1,7, 2,0 e 2,3% . Os ensaios foram avaliados com 6, 12 e 12 cápsulas, respectivamente. Os volumes amostrados em cada tempo foram de 4 ml. O perfil médio de dissolução do lopinavir, com seus respectivos DPRs para cada experimento pode ser visualizado na Figura 4.12A.

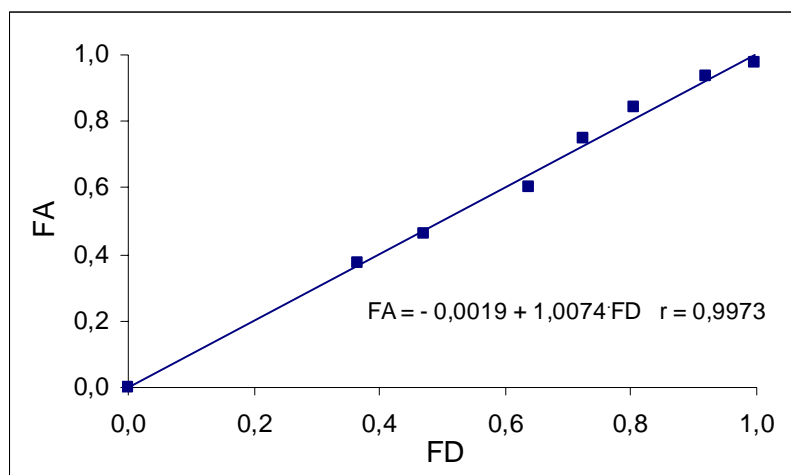
O perfil de absorção do lopinavir cápsulas mole de gelatina obtido pelo método de Wagner-Nelson e perfil de dissolução obtido utilizando 1000 ml de meio contendo 2,3% de LSS e agitação através de pás a 25 rpm é mostrado na Figura 4.13B. Nestas condições, a velocidade de absorção a partir da forma farmacêutica foi semelhante à velocidade de dissolução.



**Figura 4.12** Perfil de dissolução médio do lopinavir obtido com 1000 ml de meio contendo 1,7% 2,0 e 2,3% p/V de LSS pH 6,0 e agitação através de pás a 25 rpm (A). Fração do lopinavir absorvida obtida pelo método de Wagner-Nelson e fração dissolvida obtida utilizando 1000 ml de meio contendo 2,3% de LSS e agitação através de pás a 25 rpm (B).

A análise de regressão linear dos dados demonstrou que o uso de 1000 ml de meio contendo 2,3% de LSS e agitação através de pás a 25 rpm produziu a melhor correlação, e uma correlação nível A foi estabelecida entre os dados *in vitro* e *in vivo*, ou seja, uma relação ponto a ponto entre a fração dissolvida e a fração absorvida do lopinavir, conforme mostra a Figura 4.13. A correlação nível A é o nível de correlação mais alto capaz de ser obtido. O perfil de dissolução assim estabelecido é representativo do perfil de absorção, pois existe uma relação linear com a inclinação da reta, ou seja, uma correlação linear entre a fração absorvida e a fração dissolvida em cada tempo. Ao contrário dos outros níveis de correlação, uma correlação ponto a ponto, reflete inteiramente a curva dos níveis plasmáticos. (UPPOOR, 2001; FDA, 1997b).

A equação resultante do gráfico de correlação ( $FA = -0,0019 + 1,0074 \cdot FD$ ) foi utilizada para recalculer a FA a fim de avaliar a exatidão do modelo. Os resultados são mostrados na Tabela 4.3.



**Figura 4.13** Curva média da fração da dose absorvida *versus* fração da dose dissolvida para o lopinavir, cápsulas de Kaletra<sup>®</sup> utilizando 1000 ml de meio contendo 2,3% de LSS e agitação por pás a 25 rpm.

**Tabela 4.3** Preditivo da fração da dose absorvida (FA) utilizando a equação de correlação (FA = -0,0019 + 1,0074FD).

Tempo (h)	FD	*FA simulada	**FA preditiva	Erro (%)
0,25	0,3653	0,3715	0,3661	-1,45
0,33	0,4705	0,4610	0,4720	2,40
0,50	0,6387	0,6047	0,6415	6,09
0,75	0,7251	0,7513	0,7285	-3,03
1,00	0,8054	0,8433	0,8094	-4,01
1,50	0,9209	0,9375	0,9258	-1,25
2,00	0,9972	0,9745	1,0026	2,89

\*obtida por Wagner-Nelson; \*\*obtida utilizando a equação da CIVIC (FA = -0,0019 + 1,0074FD).

O valor do DPR no primeiro ponto de amostragem do teste de dissolução que gerou a melhor correlação (2,3% LSS), ficou acima dos 20% (entre 21 e 31%) e nos demais tempos, os valores dos DPRs ficaram abaixo dos 10% (n=12). O alto valor do DPR neste tempo é justificável pelas diferenças de tempo em que ocorre a abertura das cápsulas do Kaletra<sup>®</sup>. O pH do meio de dissolução utilizado,  $6,0 \pm 0,1$ , encontra-se dentro da faixa do pH fisiológico e preconizado para formas de liberação imediata, ou seja, entre 1,2 a 6,8. (FDA, 1997a; DRESSMAN e KRÄMER, 2005; USP, 2007). Não houve diferença significativa do pH do meio de dissolução, avaliado antes e depois dos testes realizados.

O volume de meio de dissolução utilizado, 900 e 1000 ml, encontra-se dentro dos volumes normalmente estabelecidos pela literatura e satisfazem as condições *sink*. Em virtude da excessiva formação de espuma, os mesmos não foram degaseificados, estando também em conformidade com a literatura para meios contendo tensoativos (USP, 2007).

Considerando-se que não foi possível estabelecer um perfil de dissolução baseado nos dados *in vivo* utilizando pás na velocidade de agitação entre 50-100 rpm, justifica-se o uso da velocidade de 25 rpm, tendo em vista que velocidades fora do

preconizado são aceitáveis se melhor refletirem os dados *in vivo* (USP, 2007, FDA, 1997a).

Apesar das cápsulas do Kaletra<sup>®</sup> não flutuarem no meio de dissolução, foi necessário utilizar âncoras para mantê-las alinhadas com o eixo da pá. Segundo KAMBA e colaboradores (2003), a velocidade de dissolução pode variar, dependendo da posição da forma farmacêutica na cuba. Esta variação pode ser explicada pela diferença na intensidade da força de agitação. A velocidade de dissolução aumenta com o aumento da distância do fármaco em relação ao centro da cuba, concluem os autores. O uso de âncoras é preconizado pelos compêndios oficiais (USP, 2007).

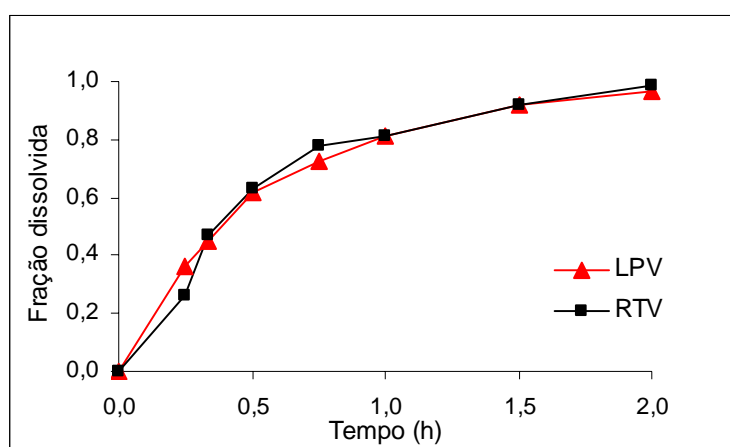
O perfil de dissolução foi estabelecido utilizando a agitação através de pás (equipamento 2 USP), normalmente empregado para dissolução de cápsulas e comprimidos (SHAH, 1989; FDA, 1997a e 1997b; DRESSMAN e KRÄMER, 2005; USP, 2007) e disponíveis nos laboratórios afins. No Quadro 4.1 encontra-se o resumo das condições utilizadas na obtenção da correlação *in vitro* com os dados *in vivo*, nível A, para o lopinavir, cápsulas de mole Kaletra<sup>®</sup>.

**Quadro 4.1** Condições utilizadas para obtenção do perfil de dissolução do lopinavir, cápsulas mole de gelatina, baseado nos dados *in vivo*.

Meio	Volume (ml)	Agitação	Velocidade	Volume amostrado
H2O 2,3% LSS pH 6,0	1000	Pás	25 rpm	4 ml

#### 4.4.3 Comportamento do RTV frente às condições do teste de dissolução

A velocidade de dissolução do ritonavir, nos testes efetuados, foi semelhante à do lopinavir. A Figura 4.14 mostra a velocidade de dissolução do lopinavir e do ritonavir utilizando as condições descritas no Quadro 4.1.



**Figura 4.14** Perfil de dissolução médio do lopinavir e do ritonavir, cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>, obtido com 1000 ml de água contendo 2,3 % de LSS p/V pH 6,0, agitação por pás, na velocidade de 25 rpm, determinação por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) e fase móvel constituída por acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

#### 4.4.4 Determinação das frações dissolvidas por CLAE

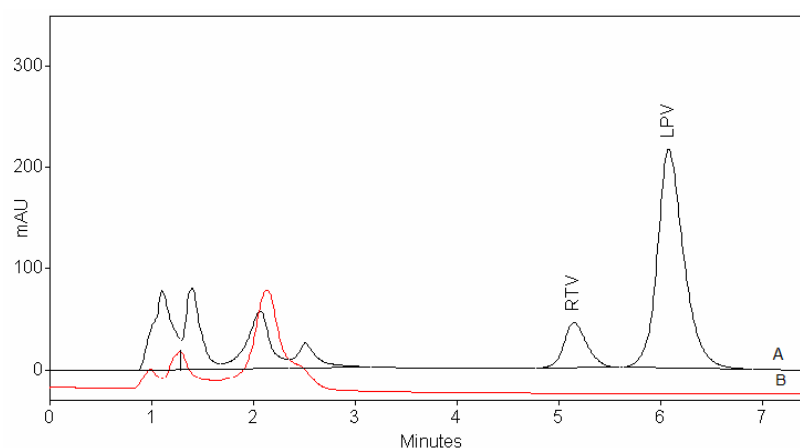
A fração dissolvida em cada tempo foi analisada por CLAE, utilizando o método desenvolvido por DONATO e colaboradores (2006), conforme descrito no Capítulo 2. O aumento da vazão de fluxo para 1,2 ml min<sup>-1</sup> diminuiu o tempo de análise em aproximadamente 2 minutos, tempo este significativo, considerando-se a quantidade de amostras.

#### 4.4.5 Validação do teste de dissolução *in vitro* por CLAE

O método desenvolvido foi validado dentro dos critérios preconizados para o ensaio de dissolução (ICH, 2005; USP, 2007). Assim, foram avaliados os parâmetros de especificidade, adequabilidade do sistema cromatográfico, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade do lopinavir e do ritonavir frente às condições do teste.

#### 4.4.5.1 Especificidade/interferência do placebo

Nenhum pico cromatográfico foi visualizado nos tempos de retenção do ritonavir e o lopinavir, tanto para a mistura dos excipientes do conteúdo da cápsula, como para a cápsula vazia, demonstrando que estes não interferem na determinação daquelas substâncias ativas (Figura 4.15). A pureza dos picos cromatográficos do ritonavir e do lopinavir, verificada através do detector de arranjo de diodos, para ambas as situações, foi superior a 0,999 para ambas as substâncias ativas, indicando que o pico de resposta, refere-se à substância de interesse, sem interferentes. Segundo a USP (2007), a ausência de picos cromatográficos para o placebo demonstra a especificidade do método.



**Figura 4.15** Cromatograma da solução de Kaletra<sup>®</sup> (A) e dos excipientes do conteúdo da cápsula e da cápsula vazia (B), obtidos por CLAE, no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm DI, 5 µm, Merck) e fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10).

#### 4.4.5.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Os valores dos DPRs obtidos para a repetibilidade das injeções e tempo de retenção foram menores que os preconizados (2%) e a separação dos picos cromatográficos ritonavir/lopinavir ( $R = 2,2$ ) foi adequada. Os valores obtidos para os parâmetros cromatográficos, Tabela 4.4, referem-se à média de seis injeções de uma mesma solução padrão (FDA, 1994; USP, 2007).

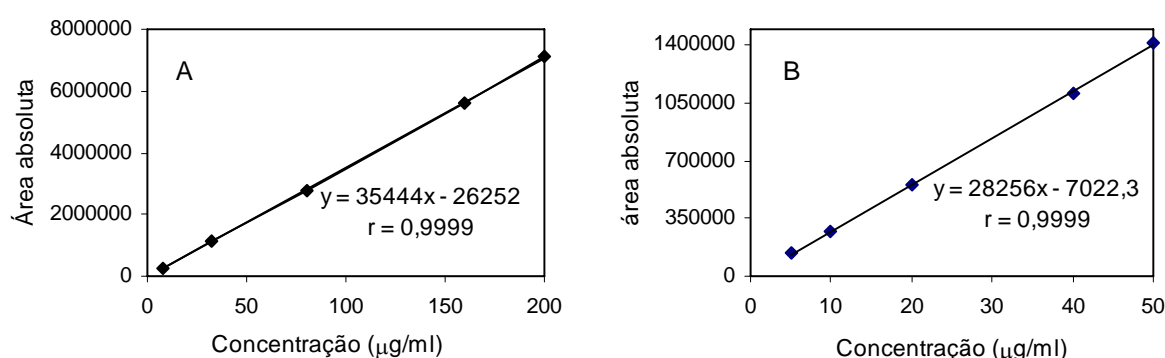
**Tabela 4.4** Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos nos testes de adequabilidade do sistema cromatográfico, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), detenção a 210 nm e fase móvel constituída de acetonitrila água e metanol (53:37:10).

Fármaco	Repetibilidade (área ± DPR)	<i>Tr</i> (min ± DPR)	N	R	A	<i>k</i>
RTV	557816 ± 0,7	5,2 ± 0,1	2499	-	1,2	3,0
LPV	2771093 ± 0,4	6,2 ± 0,2	2801	2,2	1,2	3,7

*Tr*=tempo de retenção; N= eficiência da coluna; R= resolução; A= assimetria; *k* = fator de retenção

#### 4.4.5.3 Linearidade

A faixa de linearidade do lopinavir foi de 8 a 200 µg ml<sup>-1</sup> e a do ritonavir de 5 a 50 µg ml<sup>-1</sup>. As soluções finais continham no máximo, 5% de solvente orgânico, em conformidade com os preconizados pelos compêndios oficiais para os testes de dissolução (USP, 2007). As curvas do lopinavir e do ritonavir estão representadas na Figura 4.16. A análise de variância dos resultados demonstrou que as mesmas apresentaram regressão significativa, não apresentaram desvio de linearidade e o intercepto, para ambos os fármacos, não diferiu significativamente de zero, com confiabilidade de 95% (p = 0,05). A ANOVA para o lopinavir e o ritonavir, encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 4.8 e 4.9 do anexo.



**Figura 4.16** Curvas-padrão do lopinavir (A) e do ritonavir (B) obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.



#### 4.4.5.4 Exatidão e precisão

Na Tabela 4.5 dispõem-se os resultados experimentais da recuperação, com os respectivos DPRs, obtidos com o lopinavir e o ritonavir, nos três diferentes dias. O percentual médio de recuperação, para os três diferentes dias e para as três diferentes concentrações, variou de 99,4 a 102,9%, para ambos os fármacos, indicando a exatidão do método. De acordo com códigos oficiais, os limites de exatidão, para o teste de dissolução, devem estar no intervalo entre de 95 a 105% e não devem conter mais de 5% de solvente orgânico na dissolução final (USP, 2007). Estas normas foram satisfeitas.

A repetibilidade e a precisão intermediária do método calculadas através da análise do DPRs dos estudos de exatidão, demonstraram que o método desenvolvido é preciso. O DPR variou de 0,3 a 1,9 para o lopinavir e de 0,6 a 1,9 para o ritonavir, conforme pode ser visualizado na Tabela 4.6.

**Tabela 4.5** Resultados obtidos no estudo da exatidão do método, por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) e fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:3:10) e detecção em 210 nm.

FÁRMACO	Concentração adicionada à matriz (µg ml <sup>-1</sup> )	Concentração recuperada (µg ml <sup>-1</sup> ) RSD (%)	* Taxa de recuperação (%)
LPV	40	40,0 ± 0,7	99,4 – 101,7
	80	81,3 ± 1,9	99,5 – 103,0
	160	162,5 ± 1,8	100,1 – 103,6
RTV	10	10,3 ± 1,7	99,2 – 102,5
	20	20,6 ± 1,3	101,3 – 103,9
	40	40,8 ± 1,3	100,5 – 102,9

\*n = 9

**Tabela 4.6** Dados relativos à precisão do método de dissolução, obtidos por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) e fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:3:10) e detecção em 210 nm.

FÁRMACO	Concentração adicionada à matriz (µg ml <sup>-1</sup> )	*PRECISÃO	
		Repetibilidade (µg ml <sup>-1</sup> ) DPR	Intermediária (µg ml <sup>-1</sup> ) ± DPR
LPV	40	39,1 ± 1,9	40,0 ± 1,5
	80	81,8 ± 1,3	81,3 ± 1,9
	160	165,8 ± 0,3	162,5 ± 1,6
RTV	10	10,1 ± 1,9	10,2 ± 0,8
	20	20,6 ± 1,5	20,7 ± 1,6
	40	40,8 ± 1,4	40,2 ± 0,8

n = 9

#### 4.4.5.5 Estabilidade da amostra frente às condições do teste

O lopinavir e o ritonavir demonstraram ser estáveis frente às condições do teste de dissolução. As variações encontradas, conforme podem ser visualizadas na Tabela 4.7, para ambos os fármacos, estão dentro do especificado pela USP (2007), a qual permite uma variação de ± 2%.

**Tabela 4.7** Avaliação da estabilidade das soluções amostra e das SQRs frente às condições do teste de dissolução, determinada por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), detenção a 210 nm e fase móvel constituída de acetonitrila água e metanol (53:37:10) (n = 3).

Intervalo	Solução das SQRs *teor encontrado (%)		Solução amostra *teor encontrado (%)	
	Lopinavir	Ritonavir	Lopinavir	Ritonavir
2 horas	101,8	101,1	100,3	98,8
24 horas	101,4	99,3	101,2	98,7

\*em relação ao tempo zero, considerado 100%

O desenvolvimento deste trabalho resultou na publicação do artigo Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on *in vivo* data, publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 547–552, 2008.

#### **4.5 CONCLUSÕES**

- Uma correlação de nível A foi obtida, nas condições estudadas, entre a fração absorvida e a fração dissolvida do lopinavir cápsulas de Kaletra<sup>®</sup> utilizando a agitação através de pás a 25 rpm e meio de dissolução constituído de 1000 ml de água contendo 2,3% p/V de LSS pH 6,0, mantido a  $37 \pm 0,5$  °C.
  
- O método por CLAE desenvolvido e validado pode ser utilizado para avaliar o perfil de liberação do lopinavir a partir do Kaletra<sup>®</sup> cápsulas.
  
- Os excipientes do conteúdo das cápsulas e da cápsula vazia não interferem na determinação do lopinavir e do ritonavir.
  
- O lopinavir e o ritonavir demonstraram ser estáveis frente às condições do teste de dissolução.
  
- A velocidade de dissolução do ritonavir foi semelhante à velocidade de dissolução do lopinavir, frente às condições testadas.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. Dissolution. In: GENNARO, A.R. (Ed.). *Remington's Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*. 20<sup>th</sup>. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.35. p. 654-666.

ABRAHAMSSON, B. Dissolution Testing in the Development of Oral Drug Products. In: DRESSMAN, J. B.; LENNERNÄS, H. *Oral Drug Absorption. Prediction and Assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. Cap. 12. p. 197-220.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H. A.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. *Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6. ed., São Paulo: Premier, 2000. p. 65-71.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica e Avaliação das propriedades biofarmacêuticas In AULTON M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 17 p. 246-284.

BANAKAR, U.K. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. New York: Marcel Dekker Inc., 1992. p. 144-166.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para a realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 dez. 2000.

CRAIG, D. Q. M.; LIEVENS, H.S.R.; PITT, K. G.; STOREY, D. E. An investigation into the physico-chemical properties of self-emulsifying systems using low frequency dielectric spectroscopy, surface tension measurements and particle size analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 96, p. 147-155, 1993.

DIAS, C. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas. *Trabalho de dissertação de mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

DIGENIS, G. A.; GOLD, T. B.; SHAH, V. P. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 83, n. 7, p. 915-921, 1994.

DONATO, E. M.; DIAS, C. L.; ROSSI, R. C., VALENTE, R. S.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A. M. LC Method of studies on the stability of lopinavir and ritonavir soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 63, p. 437-443, 2006.

DRESSMAN, J. B., AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DRESSMAN, J. B. Dissolution Testing of Immediate Release Products and its Application to Forecasting In Vivo Performance. In: DRESSMAN, J. B e LENNERNÄS, H. *Oral Drug Absorption. Prediction and Assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. Cap 10. p. 155-175.

DRESSMAN, J. B.; KRÄMER, J. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 419 p.

DRESSMAN, J. B, AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

EMA. Norvir:Scientific Discussion. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*. CPMP/527/96, 2001, p.1-19. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/norvir.htm>>, acessado em mar/2006.

EMA. Kaletra:Scientific Discussion. CPMP/4530/01. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2001, p.1-25. Disponível em <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/kaletra/kaletra.htm>>, acessado em mar/2006.

FDA. Reviewer Guidance. Validation for Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 1994.

FDA. Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 1997a.

FDA. Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 1997b.

FDA. Reviewer Guidance. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 2000.

GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p-173-182, 2004.

HILFIKER, R. *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Wiley-VCH: Germany, 2006. Cap. 1-2. p. 1-37.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 46, p. 75-87, 2001.

HUTCHISON, K.; FERDINANDO, J. Cápsulas moles de gelatina. In AULTON M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 30, p. 466-477.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline. *International Conference on Harmonization*, 2005.

KAMBA, M.; SETA, Y.; TAKEDA, N.; HAMAURA, T.; KUSAI, A.; NAKANE, H.; NISHIMURA, K. Measurement of agitation force in dissolution test and mechanical destructive force in disintegration test. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p. 99-109, 2003.

KRÄMER, J. IVIVC. A perspective from the Workbench. In: DRESSMAN, J. B e LENNERNÄS, H. *Oral Drug Absorption. Prediction and Assessment*. New York: Marcel Dekker, 2000. Cap 16, p. 307- 320.

LO, Y. I. Incorporating poorly water-soluble compounds. *Journal of Controlled Release*, v. 90, n. 1, p. 37-49, 2003.

MEYER, M. C.; STRAUGHN, A. B.; MHATRE, R. M.; HUSSAIN, A.; SHAH, V. P.; BOTTOM, C. B.; COLE, E. T.; LESKO, L. L.; MALLINOWSKI, H.; WILLIAMNS, R. The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n.8, p. 962-966, 2000.

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 701-705, 2004.

NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L.; SHAH, V. Steps for development of dissolution test for sparingly water-soluble drug products. *American Pharmaceutical Review*, v. 4. p. 16-18, 2002.

OKI, I.; USAMI, Y.; NAKAI, M.; SAGISAKA, M.; ITO, H.; NAGAOKA, K.; MANIYA, N.; YAMANAKA, K.; UTSUMI, M.; KANEDA, T. Pharmacokinetics of lopinavir after administration of Kaletra in healthy Japanese volunteers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, n. 27, v. 2, p. 261-65, 2004.

PORTER, C. J. P.E.; CHARMAN, W. N. *In vitro* assessment of oral lipid based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 50, p. S127-S147, 2001.

PROUDFOOT, S. Regimes terapêuticos. In AULTON M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 19, p. 286-297.

ROSSI, R.C. Desenvolvimento e validação de ensaio de dissolução para o ritonavir cápsulas utilizando correlação *in vitro-in vivo*. *Trabalho de dissertação de mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules base on *in vivo* data. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 63, p. 437-443, 2007.

SCHOTT, H. Colloidal Dispersions. In: GENNARO, A.R. (Ed.). *Remington's Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*. 20<sup>th</sup>. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.21 p. 288-315.

SHAH, V. P.; KONECNY, J. J.; EVERETT, R ; McCULLOUGH, B.; NOORIZADEH, A. C.; SKELLY, J. P. *In vitro* dissolution profile of water-soluble drug dosage forms in the presence of surfactants. *Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 7, p. 612-618, 1989.

SHAH, N. H.; CARVAJAL, M. T.; PATEL, C. I.; INFELD, M. H.; MALICK, A.W. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving *in vitro* dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 106, p. 15-23, 1994.

SHAH, V. P.; NOORY, A., NOORY, C, McCULLOUGH, B.; CLARKE, S.; EVERETT, R.; NAVIASKY, H.; SRINIVASAN, B. N.; FORTMAN, D.; SKELLY, J.



P. In vitro dissolution of dissolution sparingly water-soluble drug dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 25, p. 99-106, 1995.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5.ed., New York: McGraw-Hill, 2005. 892 p.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. In vitro-in vivo correlation: Definitions and Regulatory Guidance. *International Journal of Generic Drugs*. Disponível em: <<http://www.locumusa.com>.> Acessado em mai/2004.

UPPOOR, V.R.S. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. *Journal of Controlled Release*, v. 72, p. 127-132, 2001.

USP. The dissolution procedure: development and validation. Second Supplement USP-NF <1092>. *The United States Pharmacopoeia*. 30<sup>th</sup>. ed., Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, 2007.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.

ZHAO, F.; VYACHESLAV, M.; VENKATRAMANA, R.; HUSSAIN, M. Effect of sodium lauryl sulfate in dissolution media on dissolution of hard gelatin capsule shells. *Pharmaceutical Research*, v. 21, p. 144-148, 2004.







## **5. 1 INTRODUÇÃO**

Degradações físico-químicas em fármacos podem alterar não apenas o efeito farmacológico e conseqüentemente a eficácia terapêutica esperada, mas podem também provocar efeitos tóxicos ao paciente. Conhecer os fatores que podem alterar a estabilidade do fármaco e identificar os meios para garantir a sua estabilidade é um desafio (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

Os estudos de estabilidade fazem parte das exigências dos órgãos reguladores governamentais e buscam evidenciar como a qualidade do medicamento varia sob a influência dos fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, orientam as condições de estocagem e estabelecem o tempo de vida útil para o medicamento. Afora as exigências, obviamente, a razão principal dos estudos de estabilidade deve ser o paciente (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Levando-se em consideração que o tempo de vida útil de um medicamento, normalmente é longo, estudos de estabilidade em tempo real, antes de disponibilizá-lo ao mercado, tornam-se muitas vezes impraticáveis. Os estudos de estabilidade acelerada permitem a liberação provisória do medicamento e podem prever o tempo de vida útil do mesmo, para as condições normais de armazenamento. Contudo, esses estudos não substituem os de longa duração.

Considerando que o Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas, deve ser armazenado na geladeira até a dispensação e que o mesmo pode permanecer à temperatura ambiente até 25 °C, por até dois meses (EMEA, 2001), o objetivo deste Capítulo é avaliar a ação do calor sobre a forma farmacêutica, determinar a cinética de degradação e através dos estudos de estabilidade acelerada, estimar o tempo de vida útil para o Kaletra<sup>®</sup>, a 25 °C.

## **5.2 REVISÃO**

### **5.2.1 Estabilidade de fármacos**

A estabilidade de uma forma farmacêutica pode ser definida como o intervalo de tempo entre a fabricação até que sua atividade química ou biológica não seja menor do que 90% da potência rotulada e que suas características físicas não tenham se modificado de maneira significativa ou nociva. Este intervalo de vida útil é determinado pela aplicação direta dos estudos de estabilidade. Na prática, estes estudos, visam a garantir, que cada dose tenha as características e propriedades homogêneas, dentro dos limites aceitáveis, para assegurar a eficácia clínica e a segurança da formulação, durante todo o período de validade (NUDELMAN, 1975; VADAS, 2000).

A forma mais conhecida de instabilidade de fármacos é a diminuição ou perda da substância ativa, devido à degradação química. A perda da potência é uma causa bem conhecida da falta de qualidade da forma farmacêutica. Entretanto, é importante não apenas determinar quanto de fármaco foi perdido, mas também, quem são os produtos de degradação, pois em alguns casos, eles são tóxicos (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

Os fármacos têm os mais diferentes grupos funcionais em suas estruturas moleculares, portanto, são suscetíveis a diversas rotas de degradação, como hidrólise, oxidação, desidratação, isomerização e racemização, eliminação e fotodegradação. A hidrólise é uma das reações mais frequentes dentro dos medicamentos líquidos e também de formas farmacêuticas sólidas onde a umidade pode estar presente, mesmo em pequenas quantidades. Medicamentos com grupos funcionais éster, ácido carboxílico, amidas, barbituratos, imidas, e hidantoínas são suscetíveis à hidrólise.

Além dos fatores intrínsecos à estrutura molecular, outros como mudanças de pH, força iônica, constante dielétrica, tampões, aditivos, excipientes, contaminação microbiana, fatores ambientais como temperatura, umidade e luz podem afetar a estabilidade da forma farmacêutica (CARSTENSEN, 1995; YOSHIOKA e STELLA, 2002).

A avaliação da estabilidade física da formulação também se faz necessária, considerando que durante o armazenamento podem ocorrer cristalização de amorfos, transições de fases (polimorfos), crescimento de cristais, adsorção de umidade, mudanças na solubilidade ou velocidade de dissolução, separação de fases no caso de suspensão e emulsões, dentre outras (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN, 1995).

### **5.2.2 Velocidade e ordem de reação**

As características das principais ordens de degradação, ou seja, como a concentração do fármaco ou dos reagentes influenciam na velocidade das reações são descritas na seqüência. Na área farmacêutica, não há muitas reações de ordem zero; a maioria são de pseudo-ordem zero ou zero ordem aparente, primeira ordem, e pseudoprimeira ordem (CONNORS *et al.*,1986; YOSHIOKA e STELLA, 2002; SHARGEL, 2005).

#### **5.2.2.1 Reações de ordem zero**

Se a quantidade do fármaco hipotético *A* diminui constantemente num intervalo de tempo *t*, ou seja, independe da concentração remanescente dos reagentes, então a velocidade de degradação de *A* pode ser expressa matematicamente:

$$C = C_o - k \cdot t \quad (5.1)$$

$$k = C_o - C / t \quad (5.2)$$

onde  $C_0$  é a concentração inicial do fármaco,  $C$  é a concentração do fármaco no tempo  $t$  e  $k$  é a constante de velocidade de degradação. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) e o  $t_{90\%}$  quando a concentração do fármaco diminuiu 50% e 10%, respectivamente, para a reação de ordem zero, podendo ser calculados:

$$t_{1/2} = C_0 / 2 \cdot k \quad (5.3)$$

$$t_{90\%} = 0,1 \cdot C_0 / k \quad (5.4)$$

### **5.2.2.2 Reações de primeira ordem**

Quando a velocidade de reação é proporcional à concentração do reagente, ou seja, a quantidade de fármaco diminui na velocidade proporcional à concentração remanescente. A velocidade de reação de primeira ordem pode ser matematicamente expressa pelas equações abaixo:

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (5.5)$$

$$\ln C = \ln C_0 - k \cdot t \quad (5.6)$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (5.7)$$

$$t_{90\%} = 0,106 / k \quad (5.8)$$

### **5.2.2.3 Reações de pseudoprimeira ordem e pseudo-ordem zero**

Uma reação de pseudoprimeira ordem é uma reação de segunda ordem com características de primeira ordem; este tipo de cinética ocorre quando um dos reagentes está presente em grande excesso e a velocidade de reação depende apenas da concentração deste reagente. Ocorre especialmente em soluções aquosas e na prática trata-se como reação de primeira ordem considerando que o erro é menor quando comparada à de segunda ordem.



A cinética de pseudo-ordem zero ocorre frequentemente em fármacos formulados na forma de suspensão, onde a velocidade de degradação é proporcional à concentração do fármaco em solução.

#### **5.2.2.4 Reações de segunda ordem**

Em uma reação de segunda ordem, a velocidade de degradação é proporcional à concentração de dois reagentes ou a segunda potência de um deles. Os valores de  $t_{1/2}$  e de  $t_{90\%}$  também podem ser calculados:

$$1/C = 1/C_o + k \cdot t \quad (5.9)$$

$$k = 1/t \cdot (1/C - 1/C_o) \quad (5.10)$$

$$t_{90\%} = 1/(9 \cdot k \cdot C_o) \quad (5.11)$$

$$t_{1/2} = 1/(k \cdot C_o) \quad (5.12)$$

A ordem de reação dos processos de degradação é determinada representando graficamente a função apropriada da concentração versus tempo e obtendo uma relação linear. Através do melhor coeficiente de correlação (r) pode ser determinada a ordem de reação. É recomendado degradar aproximadamente 50% do valor rotulado do fármaco para determinar a ordem de reação (NUDELMAN, 1975).

#### **5.2.3 Estudos de estabilidade**

O objetivo deste estudo é evidenciar como a qualidade do medicamento varia com o tempo, sob a influência de fatores ambientais como a temperatura, umidade e luz, estabelecer o período de re-teste para a substâncias ativa, estabelecer o prazo de validade para o produto acabado e orientar as condições de estocagem (ICH, 2003).

Os estudos de estabilidade devem englobar os fatores suscetíveis de provocar alterações durante o armazenamento os quais podem influenciar na qualidade, segurança e/ou eficácia do medicamento. Os ensaios quantitativos devem ser efetuados por métodos devidamente validados e devem ser indicativos de estabilidade. Os estudos devem abranger não apenas a estabilidade química e biológica, mas também a perda de conservantes, propriedades e características físicas, organolépticas e atributos microbiológicos quando requeridos (ICH, 2003).

### **5.2.3.1 Estudos de estabilidade acelerada**

Procedimentos que aceleram a velocidade de degradação química e ou alterações físicas que possam ocorrer com o fármaco ou produto acabado, são utilizados para monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade provisório do medicamento. Dentre os métodos de estabilidade acelerada, o mais utilizado é o gráfico de Arrhenius, desenvolvido por Garret. Este método permite estimar a estabilidade do fármaco para a temperatura pretendida, por extrapolação da reta (NUDELMAN, 1975; YOSHIOKA e STELLA, 2002).

### **5.2.3.2 Método de Arrhenius**

Estudos de estabilidade realizados com três ou mais temperaturas possibilitam a previsão da vida útil da forma farmacêutica em outras temperaturas, por extrapolação, utilizando o método gráfico de Arrhenius.

A velocidade de reação é proporcional ao número de colisões por unidade de tempo. Se com o aumento da temperatura, aumenta o número de colisões, então pode se esperar que a velocidade de reação aumente com o aumento da temperatura. A maioria dos fatores que produzem degradação são acelerados em função da temperatura. Empiricamente, para cada 10 °C de aumento de temperatura, a velocidade de reação é duplicada. Este critério é útil para programar os estudos de estabilidade.

Segundo Arrhenius, a constante de velocidade de reação ( $k$ ) tem uma dependência exponencial da temperatura e pode ser representada gráfica e matematicamente, em várias formas equivalentes (NUDELMAN, 1975; CONNORS, 1986; YOSHIOKA e STELLA, 2002).

$$k = A \cdot e^{-Ea/R \cdot T} \quad (5.13)$$

$$\ln k = \ln A - Ea/R \cdot T \quad (5.14)$$

$$\ln k = Ea/R \cdot 1/T + \ln A \quad (5.15)$$

onde  $k$  é a constante de velocidade de reação para qualquer ordem,  $A$  é o fator de frequência,  $R$  é a constante dos gases (1,987),  $T$  é a temperatura em °K ( $t \text{ °C} + 273,16$ ) e  $Ea$  é a energia de ativação. A representação gráfica de  $\ln k$  versus  $1/T$  será uma reta com inclinação de  $-Ea/2,303R$ . Este é o gráfico de Arrhenius para a determinação do prazo de validade em estudos acelerados de estabilidade térmica.

#### **5.2.4 Normas para os estudos de estabilidade**

Pelas normas da ANVISA, para medicamentos cujas recomendações de rótulo especifiquem a temperatura de armazenamento entre 15 e 30 °C, os estudos de estabilidade acelerada devem ser realizados na temperatura de  $40 \pm 2$  °C e 75 ± 5% de umidade relativa do ar (UR) durante seis meses ou a  $30 \pm 2$  °C e 75 ± 5% de UR por um período de doze meses. Quando o medicamento deve ser armazenado na temperatura entre 2 e 8 °C os estudos de estabilidade acelerada devem ser conduzidos a  $25 \pm 2$  °C e 60 ± 5% de UR durante seis meses ou a 5 °C durante doze meses. Essas são as especificações gerais para os estudos de estabilidade, entretanto, existem variações de temperatura e umidade para as diferentes formas farmacêuticas e tipos de embalagem (BRASIL, 2005).

O prazo de validade provisório concedido para o produto, nestes casos, é de 24 meses se a variação de teor for menor ou igual a 5,0% ou de 12 meses se a variação de

teor for de 5,1% a 10,0%, quando comparado ao valor do teor inicial, ou tempo zero. O prazo de validade definitivo deve ser confirmado mediante a apresentação de um estudo de estabilidade de 24 meses, visando a confirmar ou estabelecer o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

Em nosso país, os estudos de estabilidade seguem as normas da ICH, entidade que uniformiza os testes de estabilidade para o registro de novos fármacos e produto acabado na União Européia, Estados Unidos e Japão. Uma diferença é observada na menor UR preconizada pela ICH nos estudos de longa duração (60 ou 65%), típicos das condições climáticas das zonas I-II (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

#### **5.2.5 Estabilidade de inibidores da protease do HIV**

Os efeitos do pH (2,0; 4,0; 5,0 e 7,0), temperatura, antioxidante e diferentes veículos, foram estudados em suspensões extemporâneas de saquinavir (SQV), preparadas a partir de duas soluções etanólicas, obtidas da extração do SQV das cápsulas moles do Fortovase<sup>®</sup>. Houve maior degradação do SQV com o aumento do pH, principalmente acima de 4,0. A estabilidade do SQV melhorou com a adição de antioxidante, e pH ajustado para 4,0, nas temperaturas de 5 °C e 25 °C, quando comparado com outros veículos. A estabilidade das formulações extemporâneas de SQV pode ser influenciada por fatores como pH e a presença de antioxidantes. O pH foi o maior determinante da estabilidade do SQV (TAN *et al.*, 2003).

PAU e colaboradores (2005) avaliaram a estabilidade físico-química da associação lopinavir/ritonavir, a 35 e 45 °C e 88-92% de UR, considerando que esta associação é utilizada em países de elevada temperatura e sem condições adequadas de armazenamento. Os fármacos demonstraram ser estáveis a 35 °C durante 4 semanas.

## **5.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.3.1 Estudos de estabilidade acelerada**

#### **5.3.1.1 Condições**

As cápsulas moles de gelatina, Kaletra<sup>®</sup> lote 330962E21, acondicionadas individualmente em frascos de vidro âmbar de 20 ml com tampa, foram colocadas em estufas, nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, obedecendo ao período de tempo conforme exposto na Quadro 5.1. Para cada tempo e temperatura, foram utilizadas três cápsulas de Kaletra<sup>®</sup>.

**Quadro 5.1** Temperaturas e intervalos entre análises utilizadas na determinação do tempo de vida útil do Kaletra<sup>®</sup>, método de Arrhenius e da ordem de reação do ritonavir.

Tempo de estudo de estabilidade em dias para cada temperatura		
40 °C	50 °C	60 °C
0	0	0
20	10	5
40	20	10
60	30	15
80	40	20
100	50	25
120	60	30
140	70	35
160	80	40
180	90	45
200	100	50

### **5.3.1.2 Procedimentos com o Kaletra®**

Nos tempos pré-determinados, as amostras foram retiradas da estufa. Após o rompimento da cápsula dentro do frasco âmbar, o conteúdo da mesma foi extraído com sete porções de 6 ml de metanol e transferido para balão volumétrico de 50 ml. Duas dessas extrações foram realizadas com o auxílio do ultra-som, durante 5 minutos cada uma. Completou-se o volume com metanol e diluiu-se 3,0 ml desta solução em balão volumétrico de 50 ml, obtendo solução contendo supostamente 160 e 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente, de lopinavir e ritonavir. Este procedimento foi seguido para cada cápsula e a concentração remanescente do lopinavir e do ritonavir foi determinada por CLAE, método previamente desenvolvido e validado e a solução proveniente de cada cápsula foi injetada em triplicata.

### **5.3.1.3 Determinação da ordem de reação**

A ordem de degradação do ritonavir na forma farmacêutica foi determinada plotando-se os valores experimentais obtidos das concentrações remanescentes em função do tempo, para cada temperatura. Foram correlacionadas as concentrações e os tempos, o logaritmo das concentrações remanescentes e o tempo e finalmente o inverso das concentrações remanescentes e o tempo. Através do melhor coeficiente de correlação ( $r$ ) foi determinada a ordem de degradação do ritonavir em estudo, ou seja, se correspondeu à reação de ordem zero, primeira ou segunda ordem, respectivamente.

### **5.3.1.4 Determinação do prazo de validade: Arrhenius**

De posse dos valores médios de  $k$  para cada temperatura, na ordem de reação previamente determinada, os mesmos foram transformados em  $\log k$  e construído um gráfico plotando-se esses valores, versus temperatura ( $1/T \cdot 10^{-5} \text{ }^\circ\text{K}$ ). O prazo de validade ( $t_{90\%}$ ) para a temperatura de 25  $^\circ\text{C}$  foi calculado, utilizando a equação 5.8,

sendo que o valor de  $k$  para esta temperatura foi obtido por extrapolação do gráfico de Arrhenius e ou através da utilização da equação da reta do referido gráfico.

### **5.3.2 Desenvolvimento do método por CLAE**

#### **5.3.2.1 Equipamento e condições cromatográficas**

Cromatógrafo em fase líquida Shimadzu, bomba LC-10AD, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10ADVP, controladora do sistema SLA-10ADVP, desgaseificador DGU-14A, injetor manual Rheodyne (com alça dosadora de 20  $\mu$ l). Foi utilizado o programa CLASS-VP, versão 6,1, para aquisição e análise dos dados cromatográficos. As análises cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e pré-coluna C18 (4 x 3,0 mm, Phenomenex<sup>®</sup>). A fase móvel foi composta de acetonitrila, água e metanol (45:45:10, V/V/V), sem ajuste de pH e eluída em sistema isocrático. A vazão foi de 1,2 ml min<sup>-1</sup> e o detector de DAD foi ajustado em 210 nm.

#### **5.3.2.2 Solução amostra e SQRs**

Solução metanólica de Kaletra<sup>®</sup> contendo supostamente 3,3 e 13,3 mg ml<sup>-1</sup> de ritonavir e lopinavir, respectivamente, foi utilizada no desenvolvimento e validação do método. Soluções trabalho foram preparadas pela diluição de volumes apropriados em metanol, antes da injeção. Foi preparada uma solução metanólica das SQRs contendo 1000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> e 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de lopinavir e ritonavir, respectivamente. Separadamente, foram preparadas soluções metanólicas das substâncias ativas na concentração de 8,0 mg ml<sup>-1</sup> para o lopinavir e 2,0 mg ml<sup>-1</sup> para o ritonavir.

### **5.3.3 Validação do método por CLAE**

Os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e robustez (FDA, 1994; USP, 30; ICH, 2005) foram avaliados conforme descrito no Capítulo 2, item 2.3.6, com pequenas modificações: (a) na especificidade, as substâncias ativas foram expostas à luz UV 352 em placas de Petry, após a evaporação do solvente com auxílio de nitrogênio; (b) a linearidade do lopinavir foi avaliada nos intervalos de 40 a 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e de 40 a 360  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; a do ritonavir, nos intervalos de 10 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e de 10 a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; (c) a precisão foi avaliada utilizando seis amostras contendo 33,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ritonavir e 133,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lopinavir. Nos estudos de robustez, duas diferentes marcas de solvente orgânico e diferentes vazão do fluxo da fase móvel, foram avaliados.



## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Estudos de estabilidade acelerada

A exposição das cápsulas moles de gelatina nas temperaturas de estudo exigiu modificação no processo de estocagem: foi necessário acondicioná-las individualmente para evitar a aderência uma às outras e a perda de material, pois com o passar do tempo, as mesmas apresentaram-se quebradiças e em alguns casos, com extravasamento do conteúdo. Foram utilizados frascos de vidro âmbar com tampa tipo *snap-cap* conforme mostra a Figura 5.1; para cada tempo de amostragem e temperatura foram utilizadas 3 cápsulas, quantificadas individualmente através de 3 injeções cromatográficas.



**Figura 5.1** Acondicionamento individual das cápsulas de Kaletra<sup>®</sup> para os estudos de estabilidade.

### 5.4.1.1 Determinação da ordem de reação

As concentrações remanescentes do lopinavir cápsulas moles de gelatina obtidas por CLAE nos diferentes tempos e temperatura são apresentadas na Tabela 5.1, com os respectivos DPRs. As concentrações remanescentes do ritonavir com seus respectivos DPRs, para as diferentes ordens de reação, nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e nos diferentes tempos são apresentadas nas Tabelas 5.2 a 5.4.

**Tabela 5.1** Valores dos estudos de estabilidade térmica para o lopinavir, cápsulas moles de gelatina, nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, obtidos por CLAE (n = 3).

40 °C		50 °C		60 °C	
Tempo (dias)	Concentração (%)	Tempo (dias)	Concentração (%)	Tempo (dias)	Concentração (%)
0	100,00	0	100,00	0	100,00
20	96,85	10	98,43	5	98,42
40	97,04 <sup>a</sup>	20	97,40	10	97,99
60	96,75*	30	96,32 <sup>b</sup>	15	97,33 <sup>e</sup>
80	96,44*	40	96,11	20	95,97
100	95,32	50	93,35 <sup>c</sup>	25	94,94
120	95,04	60	92,82	30	93,21
140	93,27	70	91,47	35	91,05
160	92,18	80	90,81*	40	90,43 <sup>d</sup>
180	90,19	90	90,28	45	89,93
200	89,01	100	89,19	50	89,15 <sup>f*</sup>

DPR: 2,79<sup>a</sup>; 3,20<sup>b</sup>; 2,96<sup>c</sup>; 2,38<sup>d</sup>; 3,54<sup>e</sup>; 2,78<sup>f</sup> Os demais valores de DPR foram ≤ 2); \*n=2

**Tabela 5.2** Valores dos estudos de estabilidade térmica a 40 °C para o ritonavir, cápsulas moles de gelatina, obtidos por CLAE, para as três diferentes ordens de reação.

Tempo (dias)	ZERO ORDEM (%)	PRIMEIRA ORDEM (log C)	SEGUNDA ORDEM (1/C)	DPR (n = 3)
0	100,00	2,000	0,0100	0,97
20	91,59	1,9618	0,0109	1,99
40	88,26	1,9458	0,0113	2,44
60	86,82	1,9386	0,0115	2,64*
80	82,51	1,9165	0,0121	1,07
100	80,02	1,9032	0,0125	1,30
120	78,23	1,8934	0,0128	1,88
140	76,04	1,8810	0,0132	2,06
160	72,25	1,8588	0,0138	1,29
180	69,34	1,8410	0,0144	1,44*
200	65,69	1,8175	0,0152	0,60

\*n=2

**Tabela 5.3** Valores dos estudos de estabilidade térmica a 50 °C para o ritonavir, cápsulas moles de gelatina, obtidos por CLAE, para as três diferentes ordens de reação.

Tempo (dias)	ZERO ORDEM (%)	PRIMEIRA ORDEM (log C)	SEGUNDA ORDEM (1/C)	DPR (n = 3)
0	100,00	2,0000	0,0100	1,79
10	90,68	1,9575	0,0110	1,17
20	81,47	1,9110	0,0123	1,83
30	74,09	1,8698	0,0135	3,21
40	67,38	1,8285	0,0148	1,43
50	60,73	1,7834	0,0165	1,80
60	53,58	1,7290	0,0187	1,32
70	53,06	1,7248	0,0188	2,26
80	50,56	1,7038	0,0198	2,02*
90	47,54	1,6771	0,0210	1,65
100	46,33	1,6659	0,0216	2,08

\* n=2

**Tabela 5.4** Valores dos estudos de estabilidade térmica a 60 °C para o ritonavir, cápsulas moles de gelatina, obtidos por CLAE, para as três diferentes ordens de reação.

Tempo (dias)	ZERO ORDEM (%)	PRIMEIRA ORDEM (log C)	SEGUNDA ORDEM (1/C)	DPR n=3
0	100,00	2,0000	0,0100	0,69
5	87,93	1,9442	0,0114	1,52
10	76,97	1,8863	0,0130	0,94
15	71,02	1,8514	0,0141	2,30*
20	63,43	1,8023	0,0158	0,91
25	60,18	1,7795	0,0166	0,50
30	52,17	1,7174	0,0192	2,14
35	48,22	1,6832	0,0207	2,56
40	46,33	1,6659	0,0216	3,50
45	40,49	1,6073	0,0247	2,26
50	37,56	1,5747	0,0266	1,76*

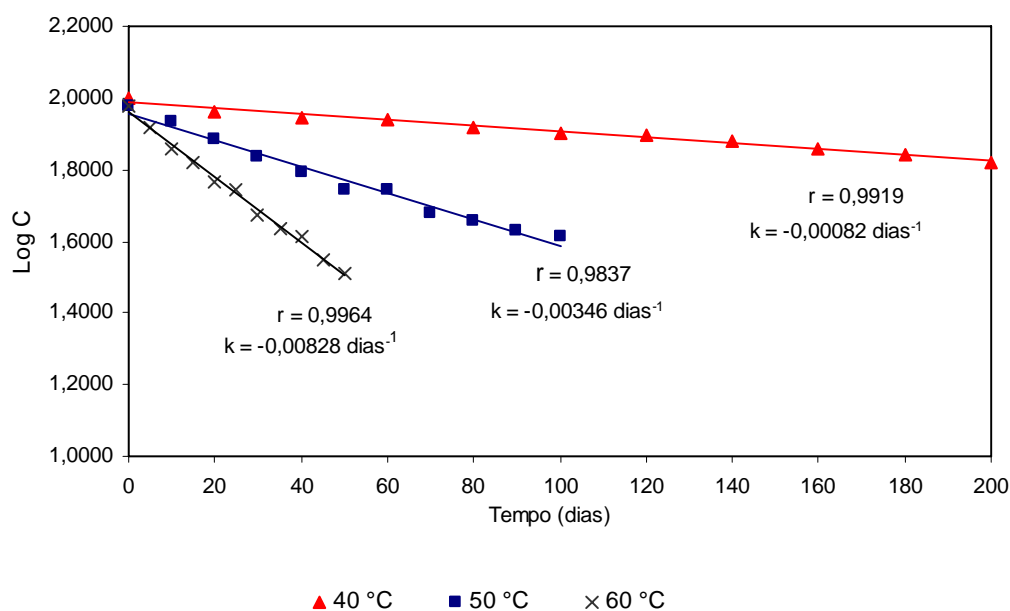
\*n=2

Como o lopinavir degradou apenas em torno de 10% nas condições avaliadas, não foi possível determinar sua ordem de reação. Em conformidade com a literatura, baixos percentuais de degradação levam a erros na determinação da ordem de reação, pois os gráficos de diferentes ordens de reação, levam a retas aproximadamente equivalentes. Segundo NUDELMAN (1975), no mínimo 50% de degradação do fármaco deve ser obtido para que os valores da velocidade de reação sejam mais precisos. Observa-se que o lopinavir na forma farmacêutica cápsulas moles de gelatina demonstrou ser estável nas diferentes temperaturas testadas, mostrando-se estável até seis meses na temperatura de 40 °C.

Para o ritonavir, o gráfico construído plotando-se os resultados do logaritmo das concentrações remanescentes em função do tempo, para as diferentes temperaturas, apresentou a melhor linha de ajuste para os dados pela análise de regressão linear, método usualmente empregado para determinar as constantes de velocidade de

degradação aparente. Desta forma, a degradação do ritonavir em sua forma farmacêutica cápsulas moles de gelatina, obedeceu a uma cinética de primeira ordem. O valor da constante de velocidade de reação ( $k$ ) que representa a fração da substância que reage por unidade de tempo, aumenta com o aumento da temperatura, evidenciado pela maior inclinação da reta. A representação gráfica da degradação do ritonavir, obtida por CLAE, para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C, com os respectivos valores de  $k$  e dos coeficientes de correlação para cada temperatura, para uma cinética de primeira ordem, é mostrado na Figura 5.2.

Mesmo que muitos fármacos se degradem por mecanismos complexos, a maioria das degradações ocorrem de acordo com reações de zero, primeira ordem e pseudo primeira ordem (LACHMAN *et al.*, 2001). Segundo CARTENSEN (1995), as verdadeiras reações de ordem zero não são freqüentes na área farmacêutica; muitos tipos de reações de zero ordem são na verdade, reações de pseudo-ordem zero.



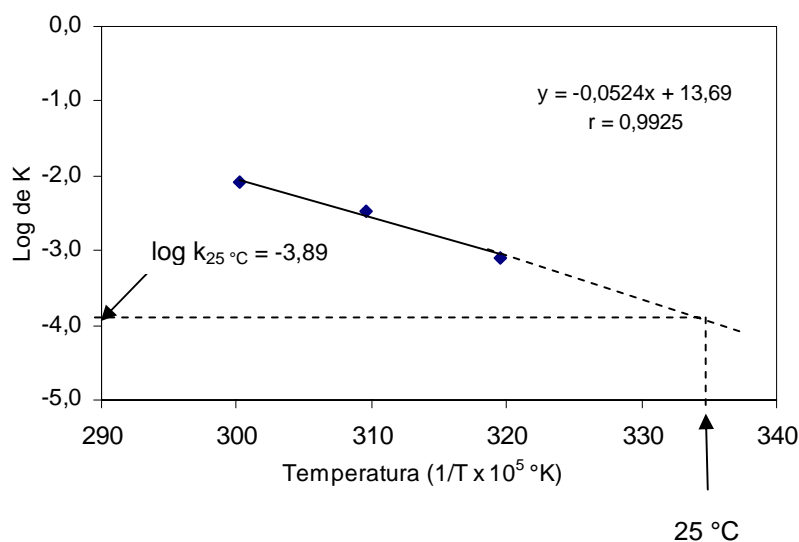
**Figura 5.2** Representação gráfica da degradação do ritonavir, cápsulas moles de gelatina, obtida por CLAE considerando reação de primeira ordem.

### 5.4.1.2 Estimativa da estabilidade do Kaletra<sup>®</sup> a 25 °C: Arrhenius

O tempo de vida útil do ritonavir, na forma farmacêutica a 25 °C ( $t_{90\%}^{25^{\circ}\text{C}}$ ), ou seja, tempo que o ritonavir no medicamento levaria para diminuir seu teor em 10% nas condições de armazenamento, foi estimado pelo método gráfico de Arrhenius da Figura 5.3, construído plotando-se os valores do log k para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C versus temperatura ( $1/T \cdot 10^5 \text{ }^{\circ}\text{K}$ ) e cuja inclinação é  $-Ea/2,303R$ . Por extrapolação da reta do referido gráfico foi obtido o log de k para o ritonavir, a 25 °C,

e, utilizando a equação 5.8, calculou-se o  $t_{90\%}^{25^{\circ}\text{C}}$  :

$$t_{90\%}^{25^{\circ}\text{C}} = \frac{0,106}{1,27 \cdot 10^{-4}} = 834 \text{ dias}$$



**Figura 5.3** Gráfico de Arrhenius para a degradação térmica do ritonavir, cápsulas moles de gelatina.

Desta forma, o tempo de vida útil estimado para o Kaletra<sup>®</sup>, forma farmacêutica cápsulas, a 25 °C foi de 834 dias, nas condições empregadas. Considerando que o

prazo de validade do Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, armazenado na geladeira é de dois anos, podendo ser mantido fora da mesma por até dois meses após a sua dispensação e considerando os resultados obtidos nestes estudos de estabilidade, o Kaletra<sup>®</sup> demonstrou ser efetivamente estável nas condições de armazenamento preconizados pelo laboratório. Conclui-se que estas condições são devido à estabilidade do ritonavir, uma vez que o lopinavir demonstrou ser estável mesmo em condições mais drásticas.

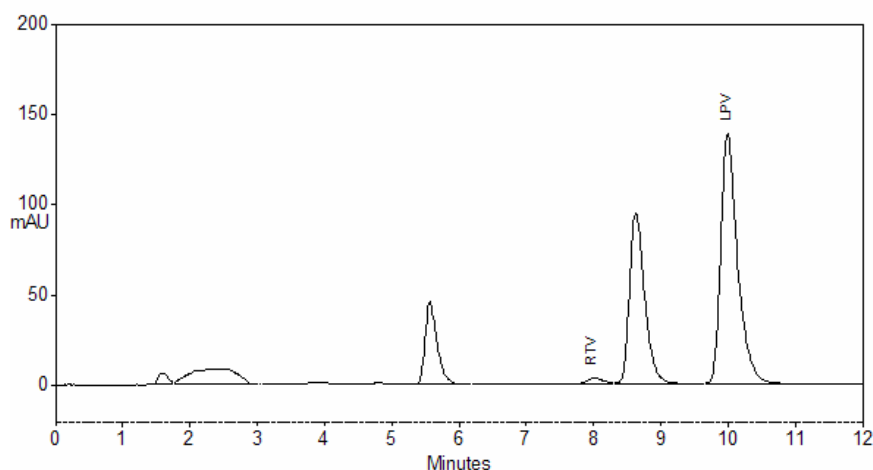
O gráfico de Arrhenius tem sido tradicionalmente utilizado para estimar a velocidade de degradação de fármacos à temperatura ambiente. Entretanto, um pré-requisito para a aplicação da equação  $k = -Ea/2,303R$  é que o mecanismo de degradação não mude no intervalo das temperaturas programadas. Mudanças no mecanismo de degradação em função da temperatura podem resultar em um gráfico de Arrhenius não-linear (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

A energia de ativação ( $E_a$ ) média para decomposição do ritonavir, nas condições empregadas, foi de 23,9 kcal/mol, calculada a partir do gráfico de Arrhenius ( $-\Delta H/2,303R$ ). Segundo CONNORS e colaboradores (1986), a energia de ativação envolvida nos processos de decomposição de fármacos varia de 12 a 24 Kcal mol<sup>-1</sup> e representa a energia necessária para que uma reação ocorra.

Não foi possível comparar os resultados obtidos neste estudo de estabilidade com os obtidos por PAU e colaboradores (2005) no Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, pois naquele estudos, a umidade (88-90%) foi associada à temperatura.

#### **5.4.2 Método por CLAE**

O método por CLAE desenvolvido e validado para a determinação do lopinavir e ritonavir descrito no Capítulo 2 mostrou-se específico para as condições de estresse empregadas. No que se refere à especificidade frente ao calor, para as substâncias ativas, houve uma adequada separação entre os picos do ritonavir, produto de degradação do ritonavir e do lopinavir, conforme mostra a Figura 5.4.

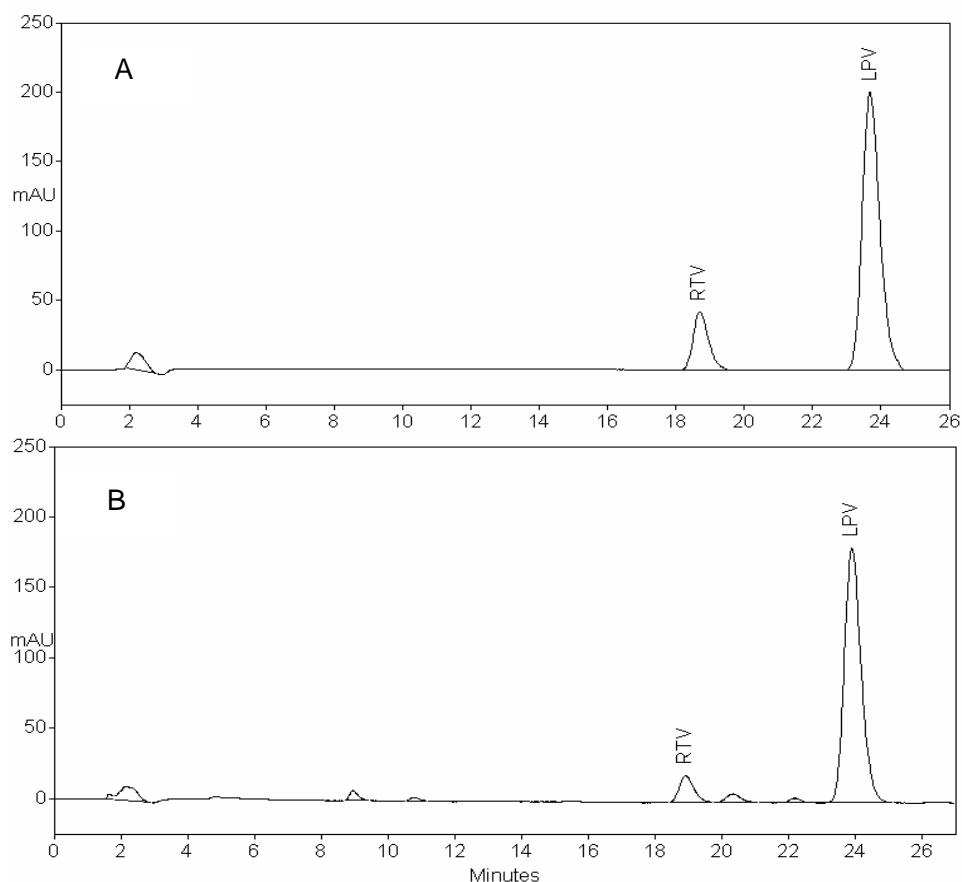


**Figura 5.4** Cromatograma da solução padrão do lopinavir misturada com a solução de ritonavir submetida à hidrólise neutra ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 48 h), mostrando o produto de degradação que elui entre o RTV e LPV, obtido com fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Merck); vazão  $1,0\text{ ml min}^{-1}$ , e detecção em 210 nm.

Entretanto, testes preliminares de estabilidade com amostras de Kaletra<sup>®</sup> submetidas à temperatura, demonstraram a presença de mais um produto de degradação no *Tr* entre 9 e 10 min, ou seja, entre o produto de degradação do RTV e o LPV. Assim, considerando que a exposição da forma farmacêutica ao calor, nas condições empregadas, levou à formação de mais um produto de degradação, um novo método por CLAE foi desenvolvido e validado para os estudos de estabilidade.

Adequada separação dos picos cromatográficos foi obtida utilizando fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10, V/V/V) e coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>). A Figura 5.5 mostra o cromatograma da amostra de Kaletra<sup>®</sup> contendo  $40\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  de RTV e  $160\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV no tempo zero e após ter sido submetida à temperatura de  $50\text{ }^\circ\text{C}$  durante 100 dias, obtido com o novo método por CLAE. Em virtude do considerável aumento no tempo de análise (26 min) quando comparado ao método do Capítulo 2 (12 min) sugere-se a utilização daquele método para as análises de rotina.





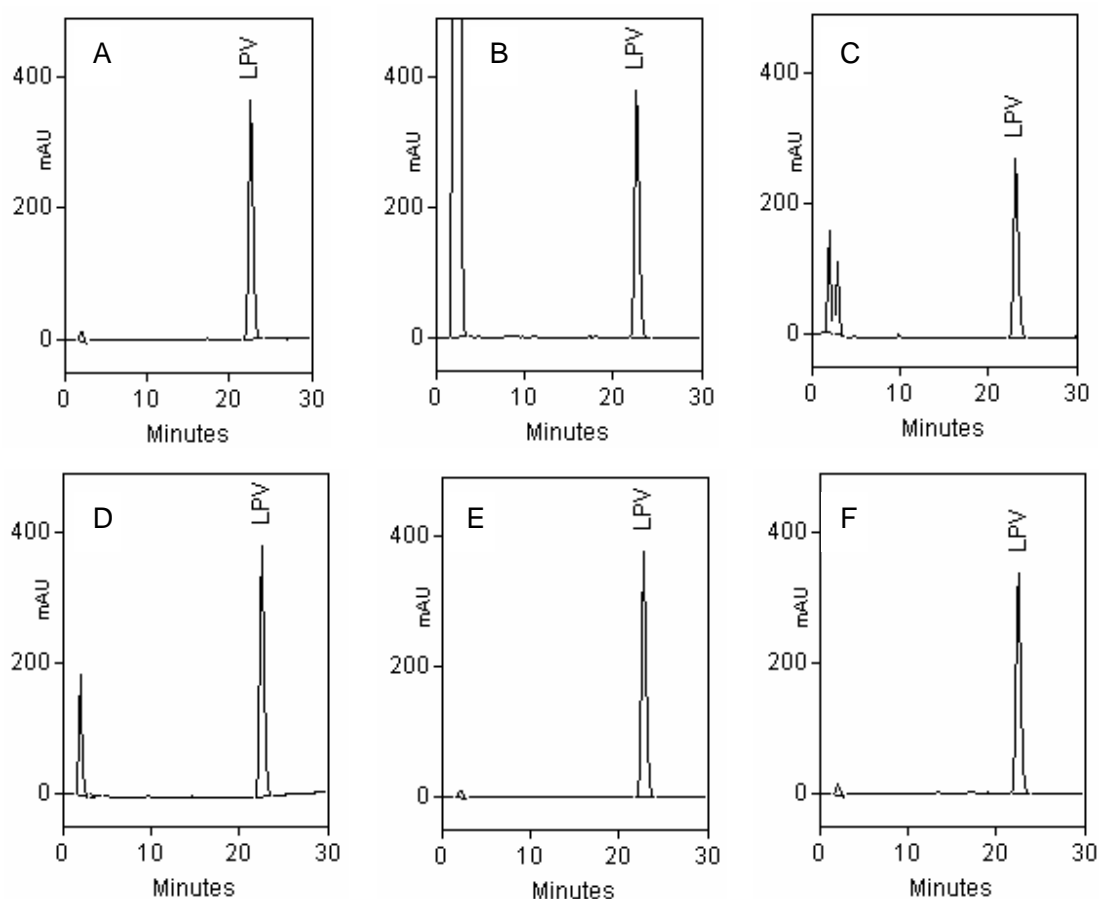
**Figura 5.5** Cromatograma da amostra de Kaletra<sup>®</sup> (40  $\mu\text{m ml}^{-1}$  de RTV e 160  $\mu\text{m ml}^{-1}$  de LPV) no tempo zero (A) e exposta à temperatura de 50° C durante 100 dias (B).

### 5.4.3 Validação do método por CLAE

#### 5.4.3.1 Especificidade

O lopinavir mostrou-se estável em condições oxidativas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30% 72 h), frente à hidrólise alcalina ( $\text{NaOH}$  1 M, 72 h) à temperatura ambiente (Figuras 5.6B e 5.6D). Demonstrou ser estável também, quando submetido a 80 °C durante 72 horas (Figura 5.6E). Degradou aproximadamente 19% quando exposto ao  $\text{HCl}$  1 M, durante 72 h à temperatura ambiente (Figura 5.6C), mostrando um pico cromatográfico adicional no tempo de retenção de 2,5 min. Quanto exposto à luz UV em 352 nm

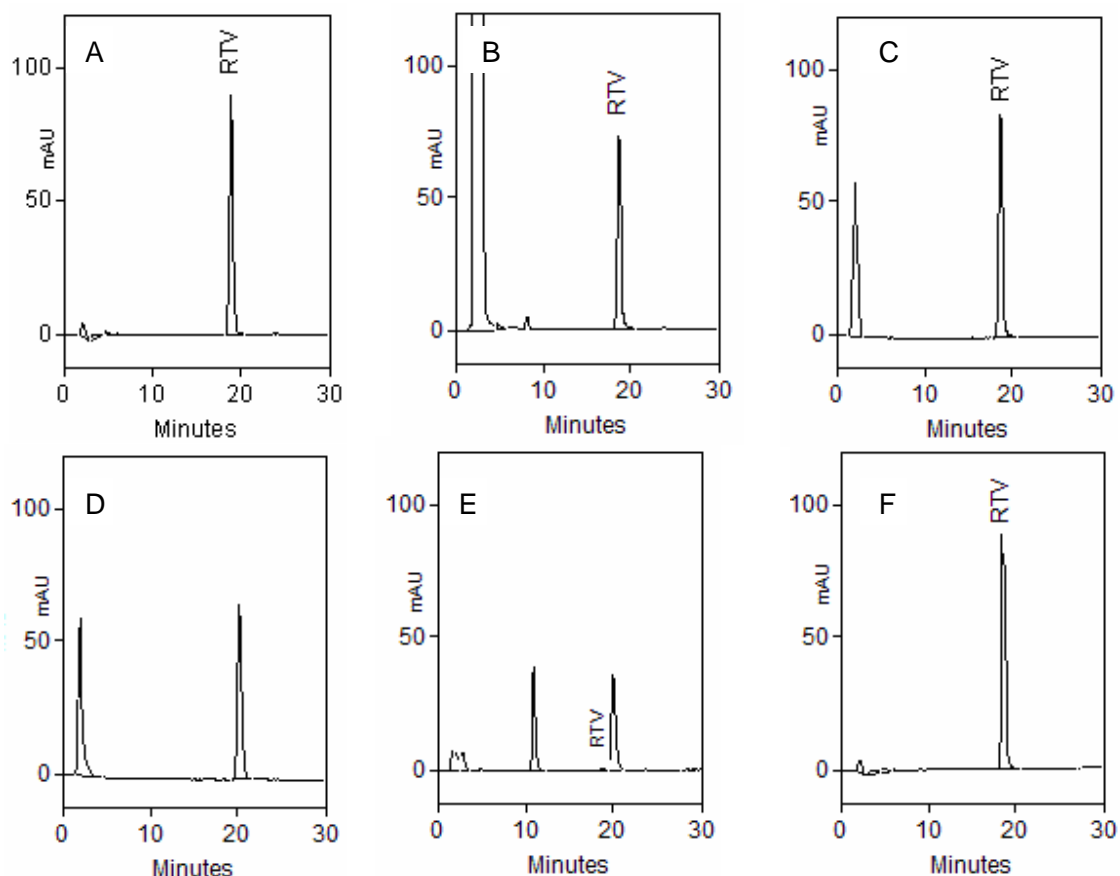
durante 72 h, degradou em média 7% (Figura 5.6F). Os picos nos tempos de retenção ( $T_r$ ) de aproximadamente 1,8 minutos referem-se ao branco.



**Figura 5.6** Estudos de especificidade do lopinavir (A) não degradado, (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, 72 h; (C)  $\text{HCl}$  1 M, 72 h; (D)  $\text{NaOH}$  1 M, 72 h (E)  $\text{H}_2\text{O}$  80 °C, 72 h e (F) luz UV 352 nm, 72 h, obtidos por CLAE utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>) e fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10) e detecção em 210 nm.

O ritonavir em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, 72 h) degradou 20%, apresentando um produto de degradação no  $T_r$  de 8,1 min, mostrado na Figura 5.7B. Degradou 2% em condições ácidas ( $\text{HCl}$  1 M, 72 h) e 8% quando exposto à luz (352 nm, 72 h), não apresentando nenhum pico adicional (Figura 5.7C e 5.7F). O ritonavir degradou 97% na hidrólise neutra ( $\text{H}_2\text{O}$ , 80 °C, 72h) apresentando 2 picos principais de produtos de degradação, um em 8,1 min e o outro em 20,9 min, Figura 5.7E. O mesmo aconteceu na hidrólise básica ( $\text{NaOH}$  1 M, análise imediata), com um produto de degradação no mesmo  $T_r$  da hidrólise neutra, ou seja, em 20,9 min, Figura 5.7D. O ritonavir não degradado,

apresenta um  $T_r$  de 18,6 min (Figura 5.7A). Provavelmente, a hidrólise neutra e básica levam à formação do mesmo produto de degradação (20,9 min). Os picos com  $T_r$  em 1,8 min, com exceção da degradação neutra a 80°C, referem-se ao branco.



**Figura 5.7** Estudos de especificidade do ritonavir (A) não degradado, (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 72 h; (C) HCl 1 M, 72 h; (D) NaOH 1 M, análise imediata; (E) H<sub>2</sub>O 80 °C, 72 h e (F) luz UV 352 nm, 72 h, obtidos por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10) e detecção em 210 nm.

Os resultados obtidos nestes estudos de degradação tanto para o lopinavir como para o ritonavir estão em conformidade com os obtidos no método por CLAE, do Capítulo 2, com exceção da exposição à luz UV a 352 nm. Naquele, o lopinavir e o ritonavir mostraram-se estáveis à luz e neste, degradaram aproximadamente 6% e 8%, respectivamente. As degradações, neste caso, podem ser atribuídas à exposição do fármaco à luz, na forma de película. A Tabela 5.5 apresenta os percentuais médios de

degradação do lopinavir e do ritonavir (n=2) submetidos às diferentes condições de estresse. O índice de pureza obtido pelo DAD foi superior a 0,999 para ambos os fármacos.

**Tabela 5.5** Valores percentuais médios obtidos na determinação do lopinavir e do ritonavir nos testes de estresse, pelo método por CLAE utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10) e detecção em 210 nm.

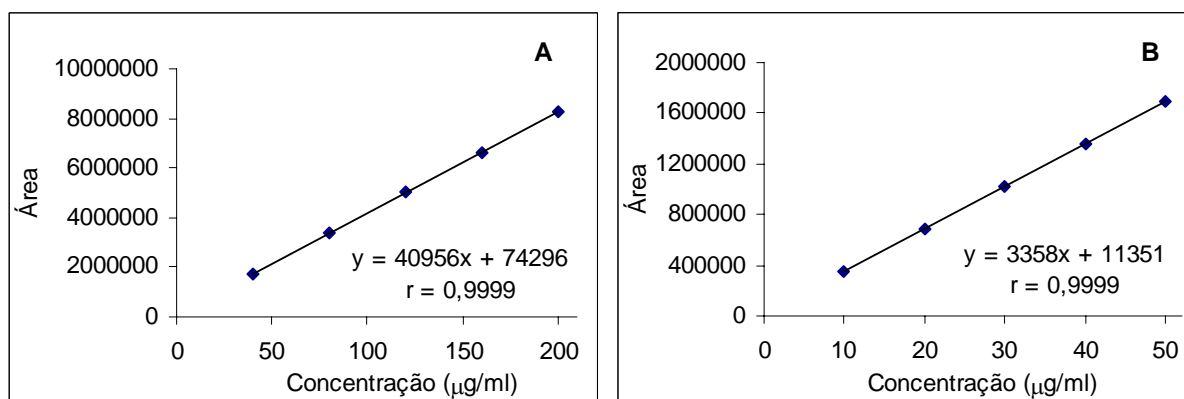
Condição	Tempo (horas)	% de degradação (n=2)	
		LPV	RTV
HCl 1,0 M	72	20	2
NaOH 1,0 M	72	0	ns
NaOH 1,0 M	análise imediata	ns	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	72	0	20
H <sub>2</sub> O 80 °C	72	0	97
UV 352 nm	72	7	8

ns=não submetido

#### 5. 4.3.2 Linearidade

O intervalo de linearidade do lopinavir foi de 40 a 200 µg ml<sup>-1</sup> enquanto que o ritonavir mostrou-se linear no intervalo de 10 a 50 µg ml<sup>-1</sup>, ambos, com coeficiente de correlação superior a 0,999 e, os gráficos obtidos são mostrados na Figura 5.8. A análise de variância (p = 0,05) demonstrou que não houve desvio de linearidade.

O lopinavir e o ritonavir demonstraram linearidade, também, no intervalo entre 40 a 360 µg ml<sup>-1</sup> e no intervalo entre 10 a 90 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente, com *r* superior a 0,999 para ambos os fármacos. A constatação da linearidade neste intervalo deve-se às concentrações utilizadas nos estudos de especificidade do método. As análises de variância para os diferentes intervalos de concentração encontram-se no anexo, Tabelas 5.8-5.9 e 5.10-5.11, respectivamente, para o lopinavir e o ritonavir.



**Figura 5.8** Representação gráfica das curvas-padrão do lopinavir no intervalo de 40 a 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (A) e do ritonavir no intervalo de 10 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (B) obtidas por CLAE, utilizando fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10), coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>) e detecção em 210 nm.

#### 5.4.3.3 Precisão e exatidão

A precisão intermediária foi avaliada através dos DPRs interdias, obtidos pelas análises de seis amostras homogêneas de Kaletra<sup>®</sup> em três diferentes dias e a repetibilidade pela avaliação dos DPRs obtidos no mesmo dia. Os resultados mostrados na Tabela 5.6 demonstraram que o método por CLAE desenvolvido é preciso, com DPRs interdia inferiores a 1,0%.

A exatidão pode ser inferida se os parâmetros de precisão, linearidade e especificidade foram estabelecidos (ICH, 2005). Assim, infere-se que o método desenvolvido é exato tanto para o lopinavir quanto para o ritonavir, visto que esses parâmetros foram avaliados para ambos os fármacos.

#### 5.4.3.4 Robustez

Os resultados percentuais de ritonavir e de lopinavir obtidos nos testes de robustez para uma amostra de Kaletra<sup>®</sup> (33,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de RTV e 133,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de LPV) injetada em triplicada nas diferentes condições encontram-se na Tabela 5.7. Nas

condições empregadas, o método mostrou-se robusto, com DPRs abaixo de 1%, para as diferentes condições, e fármacos.

**Tabela 5.6** Dados dos estudos de precisão do método para o lopinavir e o ritonavir, obtidos por CLAE, utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex<sup>®</sup>), detecção em 210 nm e fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10).

declarada	LPV			declarada	RTV		
	Concentração ( $\mu$ g ml <sup>-1</sup> ) encontrada				Concentração ( $\mu$ g ml <sup>-1</sup> ) encontrada		
	dia1	dia2	dia3		dia1	dia2	dia3
	141,1	141,9	139,4		31,5	32,0	31,6
	141,1	141,2	139,5		31,7	31,8	31,5
133,3	140,1	141,3	139,4	33,3	31,5	31,5	31,4
	140,7	139,7	139,9		31,6	31,7	31,5
	140,7	139,5	138,8		31,6	31,7	31,4
	141,2	139,5	141,0		31,7	31,5	31,3
Precisão intermediária ( $\pm$ DPR): 140,3 $\pm$ 0,9				31,6 $\pm$ 0,5			

**Tabela 5.7** Resultados percentuais obtidos nos estudos de robustez do método utilizando fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10), coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex<sup>®</sup>) e detecção em 210 nm.

CONDIÇÕES	% RITONAVIR ( $\pm$ DPR)	% LOPINAVIR ( $\pm$ DPR)
FM 1,0 ml min <sup>-1</sup>	94,3 ( $\pm$ 0,5)	106,2 ( $\pm$ 0,2)
FM 1,2 ml min <sup>-1</sup>	95,0 ( $\pm$ 0,3)	105,3 ( $\pm$ 0,5)
FM solvente TJBaker	94,7 ( $\pm$ 0,7)	104,8 ( $\pm$ 0,3)
FM solvente Vetec	93,9 ( $\pm$ 0,3)	105,1 ( $\pm$ 0,2)

FM= fase móvel

## **5.5 CONCLUSÕES**

- O método desenvolvido e validado por CLAE permitiu quantificar o ritonavir e o lopinavir remanescentes no Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas moles de gelatina, sendo, portanto, um método adequado para avaliação da estabilidade desta forma farmacêutica.
- O ritonavir degrada frente ao calor, sendo que a degradação é acentuada pelo aumento da temperatura.
- O ritonavir, componente do Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, avaliado nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, obedeceu a uma cinética de degradação de primeira ordem.
- O prazo de validade estimado para a amostra de Kaletra<sup>®</sup>, na temperatura de 25 °C foi de 834 dias.
- Não foi possível determinar a ordem de degradação do lopinavir, devido a sua estabilidade nas condições empregadas.
- O lopinavir na forma farmacêutica cápsulas demonstrou ser estável nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C pelo período de seis meses, 100 dias e 50 dias, respectivamente.
- O lopinavir mostrou-se estável frente à hidrólise alcalina e à oxidação e instável frente à hidrólise ácida.

## 5.6 REFERÊNCIAS

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

CARSTENSEN, J. T. *Drug Stability: Principles and Practice*. New York: Marcel Dekker, 1995. 601 p.

CONNORS, K.A; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A handbook for Pharmacists*. 2<sup>th</sup>. ed., New York: John Wiley & Sons, 1986.

EMEA. Kaletra:Scientific Discussion. CPMP/4530/01. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2001, p.1-25. Disponível em <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/kaletra/kaletra.htm>>, acessado em jun/2006.

FDA. Reviewer Guidance. Validation for Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 1994.

ICH. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2). Harmonized Tripartite Guideline. *International Conference on Harmonization*, 2003.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline. *International Conference on Harmonization*, 2005.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. *Teoria e prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, v.2, 2001. p.1277-1353.

NUDELMAN, N. E. E. *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: Ateneo, 1975. 179 p.

PAU, A. K.; MOODLEY, N .K.; HOLLAND, D. T.; FOMUNDAM, H.; MATCHABA, G. U.; CAPPARELLI, E.V. Instability of lopinavir/ritonavir capsules



at ambient temperatures in sub-Saharan Africa: relevance to WHO antiretroviral guidelines. *AIDS*, v. 19 n. 11, p. 1233-1234, 2005.

SHARGEL, L. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 5<sup>th</sup>.ed., New York: McGraw-Hill, 2005. p.411-450.

TAN, L.K.; THENMOZHIYAL, J.C.; HO, P. C. Stability of extemporaneously prepared saquinavir formulations. *Journal of Chemical Pharmacy and Therapeutics*, v. 28, p.457-463, 2003.

USP. Validation of Compendial Methods <1225>. *The United States Pharmacopoeia*. 30<sup>th</sup>. ed., Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, 2007.

VADAS, E. B. Stability of Pharmaceutical Products. In: GENNARO, A.R. (Ed.). *Remington's Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*. 20<sup>th</sup>. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap. 52. p. 986-994.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. *Stability of drugs and dosage forms*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 268 p.



## **CAPÍTULO 6**

Isolamento e elucidação dos principais produtos de degradação do ritonavir



## **6.1 INTRODUÇÃO**

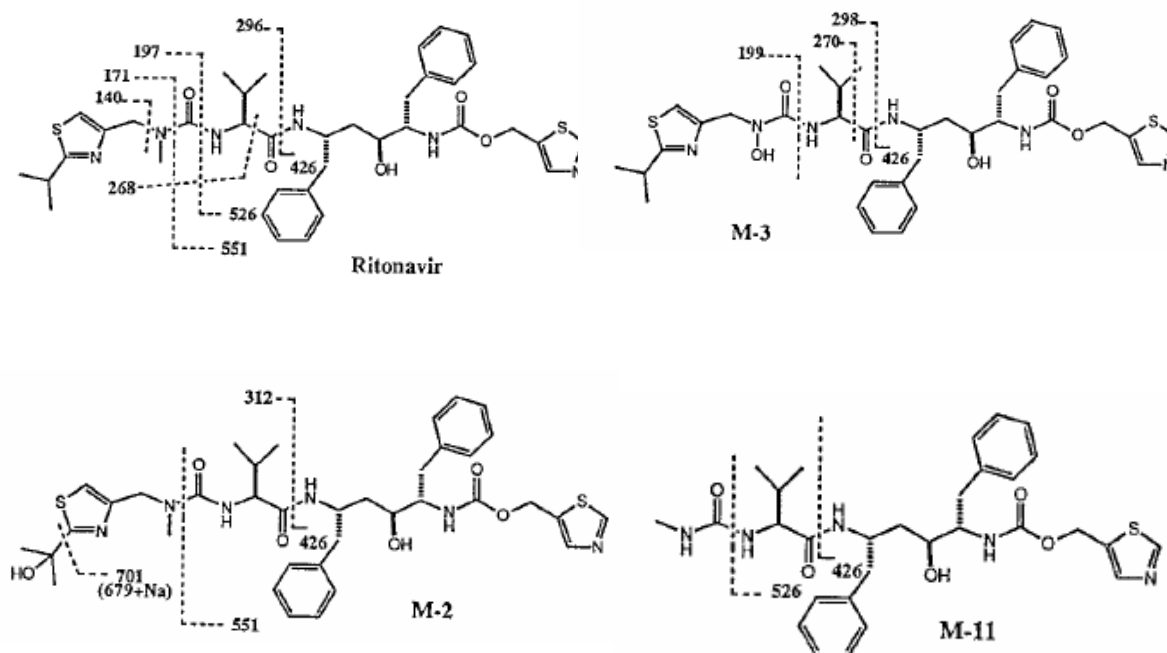
Conhecer os fatores que afetam a estabilidade de um fármaco é de fundamental importância, entretanto, a identificação dos possíveis produtos de degradação resultantes das reações químicas também o é, pois em alguns casos, eles podem ser tóxicos. A identificação dos produtos de degradação leva ao conhecimento do mecanismo dessas reações químicas oferecendo assim uma importante contribuição para o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis. A variabilidade de estruturas na área farmacêutica faz com que sejam suscetíveis a várias rotas de degradação; através da estrutura molecular é possível ter um preditivo da instabilidade do fármaco (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

Diferentes métodos combinados como cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (UV-DAD), cromatografia acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS; CG-MS), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$ ; RMN  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia de infravermelho (IV) e métodos radioativos têm sido utilizados para a elucidação dos produtos de degradação de fármacos bem como na identificação dos seus principais metabólitos.

Sabe-se que o Kaletra<sup>®</sup> deve ser mantido na geladeira em função da instabilidade do ritonavir. Entretanto, os principais produtos de degradação deste fármaco evidenciados pelos estudos de degradação forçada do Capítulo 2 e os estudos de estabilidade acelerada do Capítulo 5 não foram até o momento identificados. Neste contexto, este Capítulo tem por objetivo, elucidar os dois principais produtos de degradação do ritonavir por UV-DAD, IV e RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

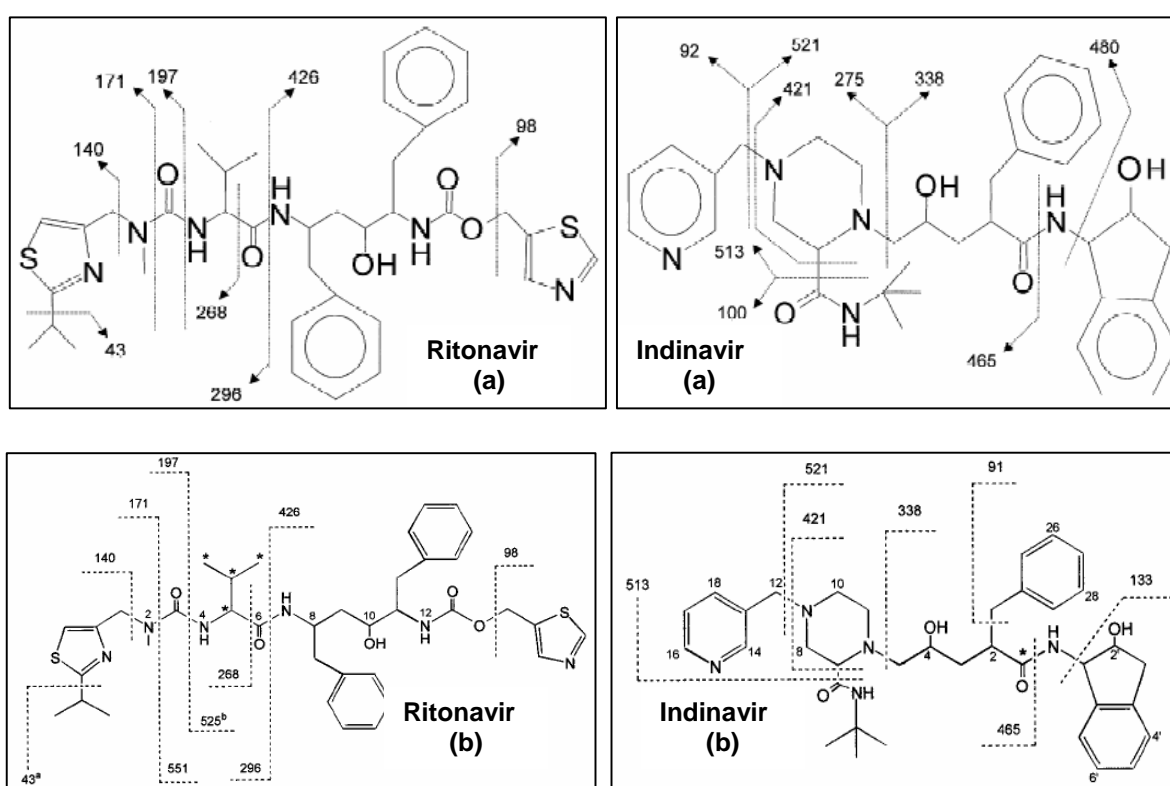
## 6.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos que caracterizam os principais produtos da biotransformação do ritonavir *in vivo* e *in vitro* foram encontrados na literatura. DENISSEN e colaboradores (1996), estudaram o metabolismo e disposição do ritonavir [ $^{14}\text{C}$ ] em humanos, cães e gatos, após administração de dose única do fármaco. Os principais metabólitos foram isolados por CLAE preparativa e através da espectroscopia de massas (MS) foram estabelecidas as prováveis estruturas dos mesmos. A Figura 6.1 mostra as características de fragmentação do ritonavir e de alguns metabólitos por espectroscopia de massas, segundo os autores.



**Figura 6.1** Padrão de fragmentação do ritonavir e seus prováveis metabólitos, obtidos por espectroscopia de massas, segundo DENISSEN e colaboradores (1996).

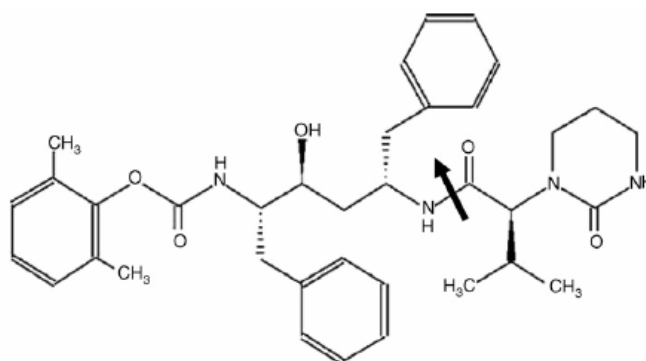
Estudos dos metabólitos do ritonavir e do indinavir, *in vitro*, com células intestinais e hepáticas foram realizados por KOUDRIAKOVA e colaboradores (1998). Semelhante estudos com estes mesmos inibidores da protease, *in vitro*, foram também realizados por GANGL e colaboradores (2002). Ambos os trabalhos buscaram elucidar os metabólitos do ritonavir e do indinavir por cromatografia líquida associada à espectroscopia de massas (LC-MS). O padrão de fragmentação sugerido pelos autores para ambos inibidores da protease são apresentados na Figura 6.2.



**Figura 6.2** Estudos *in vitro* dos metabólitos do ritonavir e do indinavir. (a) estrutura química do ritonavir e do indinavir mostrando os sinais de marcação (\*) [<sup>14</sup>C] e características de fragmentação produzida por espectroscopia de massas (CID-MS) segundo KOUDRIAKOVA e colaboradores (1998) e (b) fragmentos do ritonavir e do indinavir observados por GANGL e colaboradores (2002) em condições MS-MS.

DIFRANCESCO e colaboradores (2007) mostraram o padrão de fragmentação do lopinavir em estudos de determinação da concentração deste inibidor da protease em fluido cérebro espinhal por LC-MS. Segundo BAKSHI e SINGH (2002), a maioria

dos novos fármacos são congêneres de moléculas de fármacos já existentes e, para um novo congênera sua degradação química, muitas vezes, pode ser postulada baseada nas características de outros fármacos da classe. Entretanto, alguns congêneres podem apresentar comportamento de degradação totalmente novo.



**Figura 6.3** Padrão de fragmentação do lopinavir por espectroscopia de massas, segundo DIFRANCESCO e colaboradores (2007).



## **6.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.3.1 Degradação do ritonavir**

O ritonavir, matéria prima, foi dissolvido em água-metanol (40:60 V/V) de forma a obter solução contendo aproximadamente 2500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e foi submetido à hidrólise a 80 °C durante 72 horas. Esta solução foi injetada em CLAE preparativa.

### **6.3.2 Isolamento dos produtos de degradação do ritonavir**

O isolamento dos principais produtos de degradação da solução de ritonavir submetida à hidrólise sob aquecimento foi realizado por CLAE Shimadzu constituído de bomba LC-10AD, detector de UV-VIS SPD10A, controladora do sistema SCL 10A VP, desgaseificador DGU-14A e injetor manual Rheodyne com alça dosadora de 200  $\mu\text{l}$ . O sistema cromatográfico foi constituído de coluna preparativa Gemini C18 (250 x 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>) e fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (63:27:10, V/V/V), sem ajuste de pH e eluída em sistema isocrático. A vazão foi de 2,5  $\text{ml min}^{-1}$  e o detector foi ajustado em 210 nm.

A verificação da pureza dos picos cromatográficos das frações coletadas foi efetuada utilizando CLAE Shimadzu, bomba LC 10AD VP, controladora SCL 10A VP detector UV-DAD SPD-M10A VP, injetor manual Rheodyne com alça dosadora de 20  $\mu\text{l}$ . A aquisição e a análise dos dados de pureza foram efetuados pelo programa CLASS-VP, versão 6.1. Foi utilizado coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e a mesma fase móvel utilizada no isolamento dos produtos de degradação, na vazão de 1,0  $\text{ml min}^{-1}$ .

### **6.3.3 Tratamento das frações isoladas**

Os solventes orgânicos das frações isoladas foram evaporados com auxílio de nitrogênio e a água foi eliminada pelo processo de sublimação através da liofilização, utilizando liofilizador modular Edwards, modelo Modulyo 4K, série 5260. A liofilização foi realizada na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os liofilizados foram identificados como produto de degradação 1 (DGR1) e produto de degradação 2 (DGR2), do ritonavir.

### **6.3.4 Elucidação estrutural dos produtos de degradação do ritonavir**

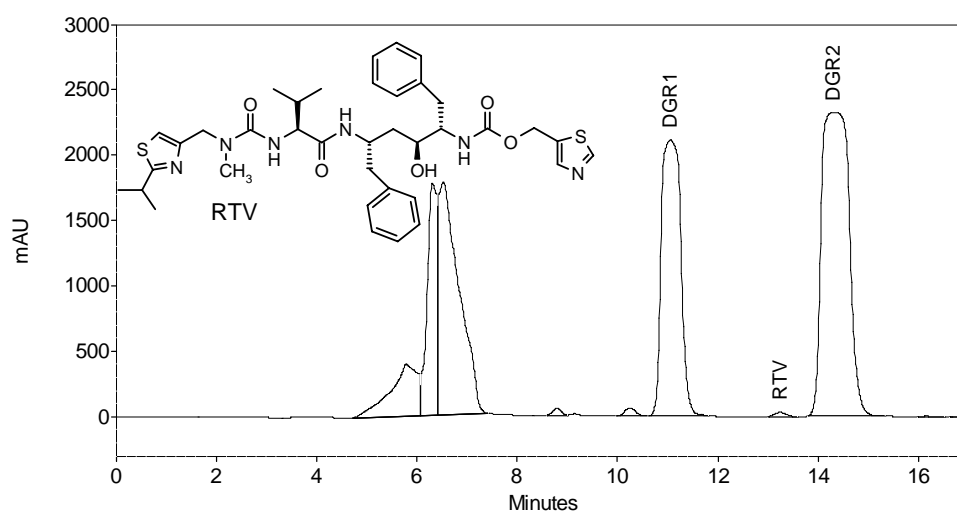
Foram utilizados os métodos UV-DAD, IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . Os espectros de UV-DAD para o DGR1 e o DGR2 foram obtidos durante os estudos de verificação da pureza dos picos cromatográficos. Os de IV, pela dispersão de 1,5 mg de cada liofilizado em 150 mg de brometo de potássio e posterior obtenção das pastilhas as quais foram analisadas em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System, Spectrum V5.3.

Para as análises de ressonância magnética nuclear, vinte miligramas de cada liofilizado foram dissolvidos em aproximadamente 0,5 ml de metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e acondicionados em tubos de RMN. Os espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , este último, na forma de APT (teste de próton anexado), o HMQC (espectro bidimensional de correlação heteronuclear) e o COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (espectro bidimensional de correlação homonuclear) foram obtidos em equipamento de RMN Varian, modelo Inova, 300 MHz. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química da UFRGS.

## 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.4.1 Isolamento dos produtos de degradação do ritonavir: DRG1 e DGR2

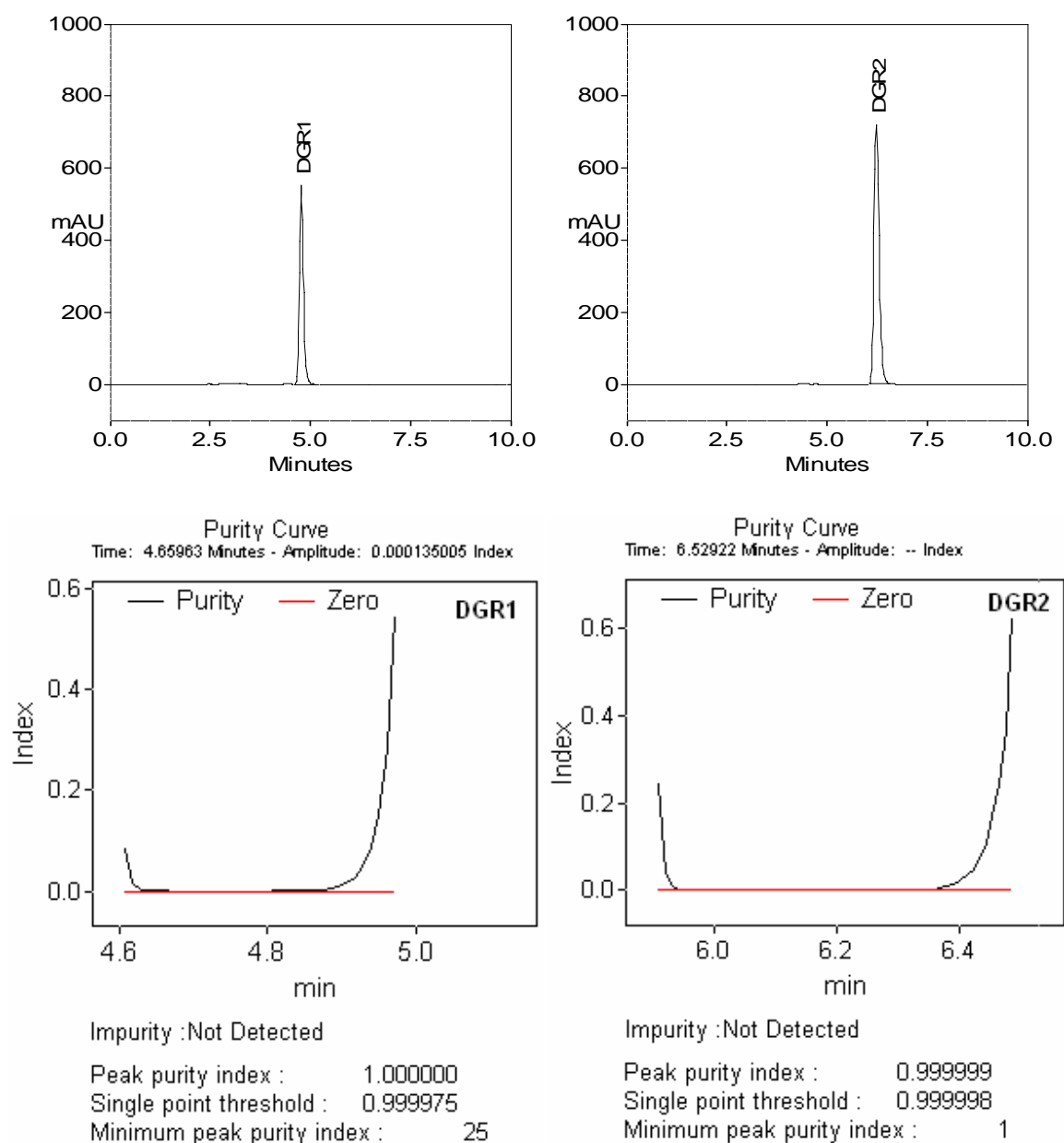
Diversas fases móveis foram testadas para o isolamento dos principais produtos de degradação do ritonavir por CLAE-preparativa. Aquela constituída de acetonitrila, água e metanol na proporção de 63:27:10 foi selecionada pois além de proporcionar uma adequada separação dos picos dos degradados DGR1 e DGR2 e do ritonavir, foi a fase com menor teor de água possível de ser utilizada, considerando a resolução entre o ritonavir e o DGR2. A separação foi obtida utilizando coluna preparativa Gemini C18 (250 x 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>); a fase móvel foi eluída em sistema isocrático, na vazão de 2,5 ml min<sup>-1</sup> e a detecção foi efetuada em 210 nm. A Figura 6.4 mostra o cromatograma da solução de ritonavir 2500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  submetida à hidrólise a 80 °C durante 72 horas, mostrando o ritonavir remanescente e seus dois principais produtos de degradação isolados, o DGR1 e o DGR2.



**Figura 6.4** Cromatograma da solução de ritonavir submetida à hidrólise neutra (80 °C, 72h) para fins de isolamento dos produtos de degradação, DGR1 e DGR2, obtido com coluna Gemini C18 (250 x 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>) fase móvel acetonitrila, água e metanol (63:27:10), vazão 2,5 ml min<sup>-1</sup>, 210 nm.

### 6.4.2 Avaliação das frações isoladas

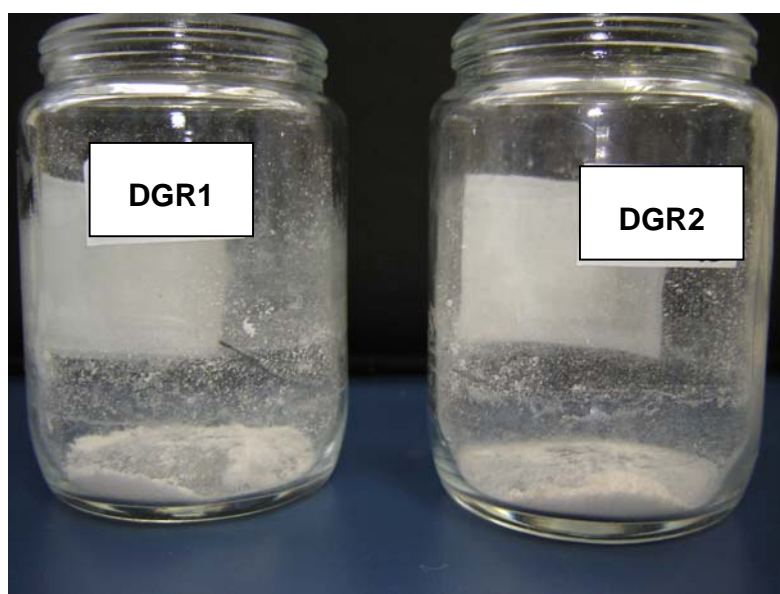
As frações DGR1 e DGR2 isoladas por CLAE preparativa e analisadas por CLAE com DAD indicaram a presença de apenas um pico cromatográfico para cada fração isolada e a curva de pureza dos picos destas frações indicaram que os mesmos foram homogêneos, conforme mostrado na Figura 6.5.



**Figura 6.5** Cromatograma das frações isoladas por CLAE preparativa conforme Figura 6.4, com suas respectivas curvas de pureza dos picos cromatográficos, obtidos utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex<sup>®</sup>), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (63:27:10) e detector de DAD em 210 nm.

### **6.4.3 Liofilização das frações isoladas**

Algumas tentativas foram utilizadas para evaporação dos solventes das frações do DGR1 e do DGR2 isolados por CLAE preparativa. Inicialmente foi utilizado evaporador rotatório à vácuo sob temperatura não superior a 48 °C. Nestas condições a fração DGR1 obtida adquiriu uma cor rósea. Novas frações foram concentradas, entretanto, o rendimento pareceu mínimo, para ambas as frações. Desconhecendo a estabilidade dessas frações a esta temperatura, e pela dificuldade de visualizar ou obter esses produtos, optou-se pela liofilização. Assim, os solventes orgânicos foram evaporados com auxílio de nitrogênio e a água pelo processo de sublimação, através da liofilização. Os liofilizados assim obtidos podem ser vistos na Figura 6.6. Obteve-se aproximadamente 30 mg de cada liofilizado.

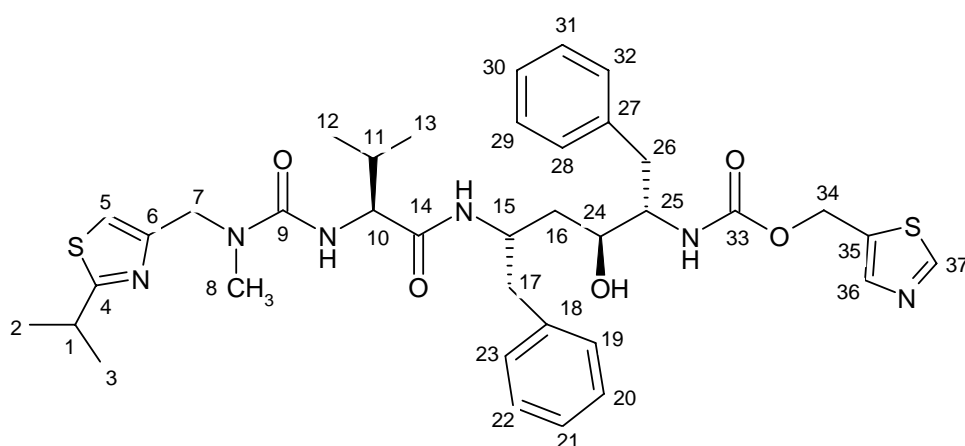


**Figura 6.6** Principais produtos de degradação do ritonavir, DGR1 e DR2, liofilizados.

### **6.4.4 Elucidação do DGR1 e do DGR2**

Os produtos de degradação do ritonavir, DGR1 e DGR2, foram analisados por UV-DAD, IV e especialmente RMN de  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , incluindo as técnicas

bidimensionais de correlação heteronuclear (HMQC) e homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY). No RMN  $^{13}\text{C}$  optou-se pela forma de APT devido à multiplicidade de átomos de carbono apresentarem-se diferenciados: os sinais de intensidade negativa caracterizam os carbonos metínicos e metílicos enquanto que os de intensidade positiva, os quaternários e os metilênicos. A Figura 6.7 mostra a estrutura molecular do ritonavir, enumerada de forma a facilitar a compreensão por parte do leitor, não seguindo as normas IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada).



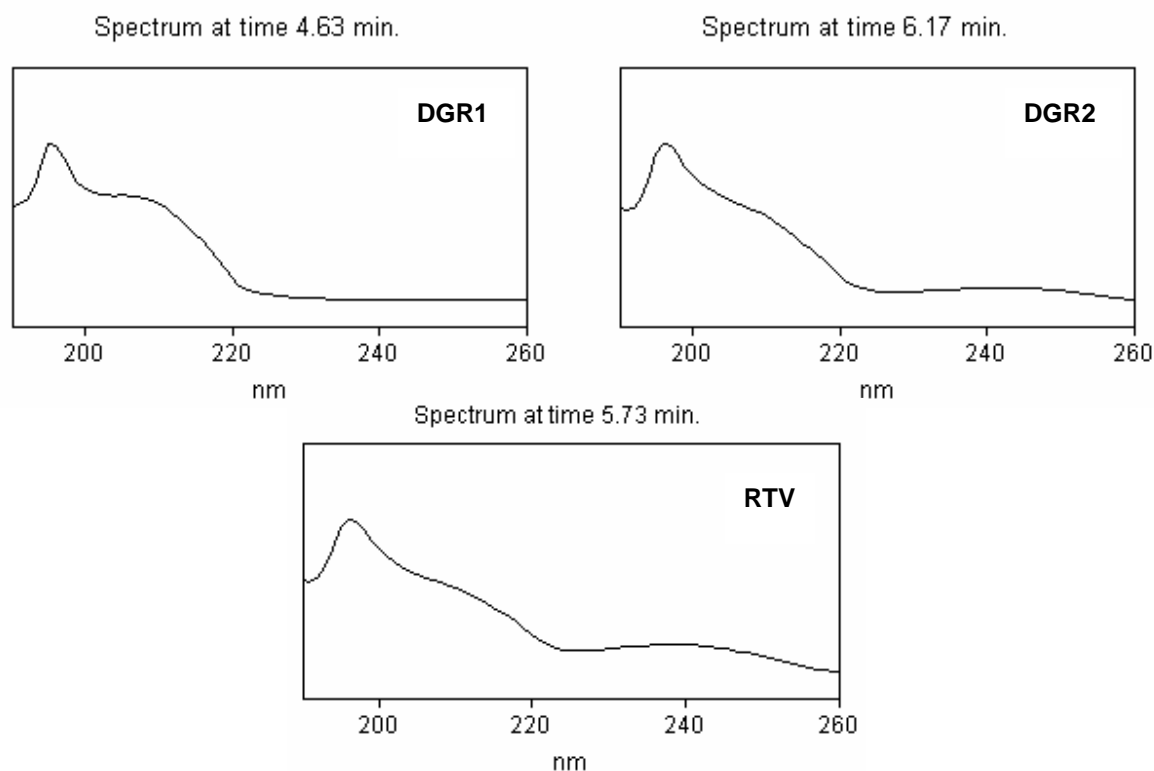
**Figura 6.7** Estrutura química do ritonavir

#### 6.4.4.1 UV-DAD

Os espectros de ultravioleta do DGR1 e do DGR2, incluindo o do RTV, para fins comparativos, obtidos por UV-DAD são mostrados na Figura 6.8. Apesar da similaridade entre os espectros, sabe-se que podem ter estruturas bem diferenciadas, considerando que a maior parte da mesma é transparente no UV. Observa-se o pico de absorção próximo a 200 nm, característica das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel aromático em todos os espectros.

Entretanto, o pico característico deste anel na região de 256, apesar de ser uma absorção de baixa intensidade, ( $\epsilon_{\text{max}}$  200), não foi visualizada no espectro do DGR1. Considerando que o DGR1 e o DGR2 possuem anéis aromáticos em suas estruturas,

evidenciados pelo IV e RMN, a absorção nesta região não é devida aos anéis benzênicos, e sim aos anéis tiazólicos. O UV é um dos métodos utilizados com frequência para conferir a identidade da substância. Na elucidação, indicou a presença dos anéis benzênicos, em ambos os produtos de degradação.



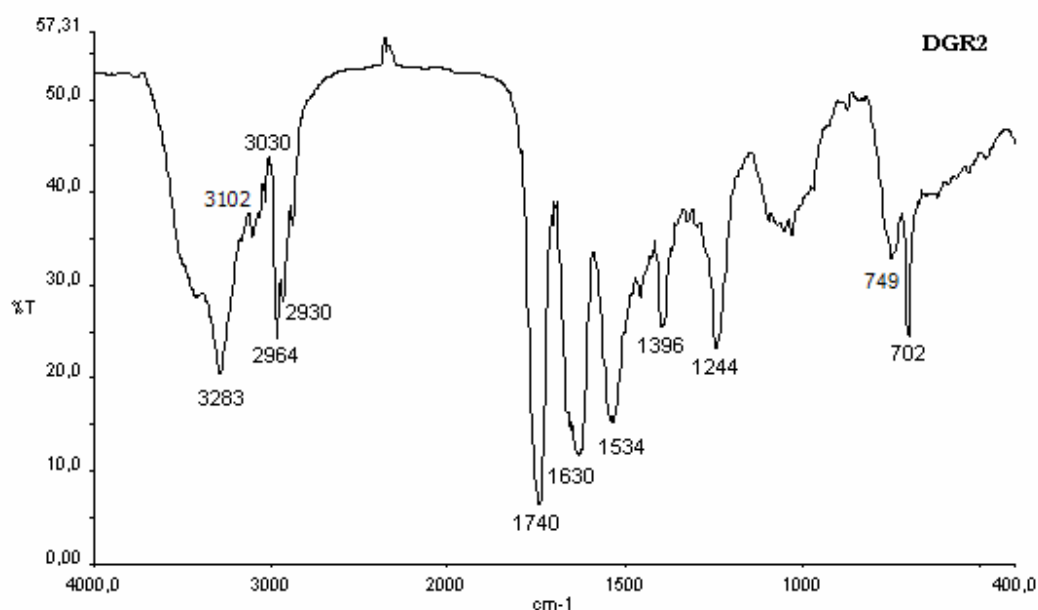
**Figura 6.8** Espectro de UV-DAD do RTV e de seus produtos de degradação, DGR1 e DGR2, obtidos durante a verificação da pureza dos picos cromatográficos.

#### **6.4.4.2 Espectroscopia no IV**

Embora a ressonância magnética nuclear seja amplamente utilizada para a elucidação estrutural de substâncias orgânicas, a espectroscopia de infravermelho é uma técnica simples que requer uma quantidade relativamente pequena de amostra e responde a questões importantes como a presença de certos grupos funcionais, como a carbonila (STUART, 2004; WATSON, 1999). Segundo PAVIA e colaboradores, a

combinação do IV e dados de RMN é, muitas vezes, suficiente para elucidar completamente a estrutura da molécula desconhecida.

O espectro de IV do DGR2 é mostrado, na Figura 6.9 enquanto que o espectro do DGR1 pode ser visualizado na Figura 6.10. As atribuições, onde  $\nu$  é o estiramento,  $\nu_{as}$  o estiramento assimétrico,  $\nu_s$  o estiramento simétrico, e  $\delta$  a deformação foram efetuadas de acordo com a literatura consultada (NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001; STUART, 2004). Em ambos os espectros de IV, observam-se as bandas das carbonilas, o estiramento N-H da amida e a presença dos aromáticos. A presença do estiramento O-H pode ser evidenciado pelo alargamento da banda da amida (N-H) na região acima de  $3200\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 6.9** Espectro na região do infravermelho do DGR2 em KBr, obtido utilizando espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System.

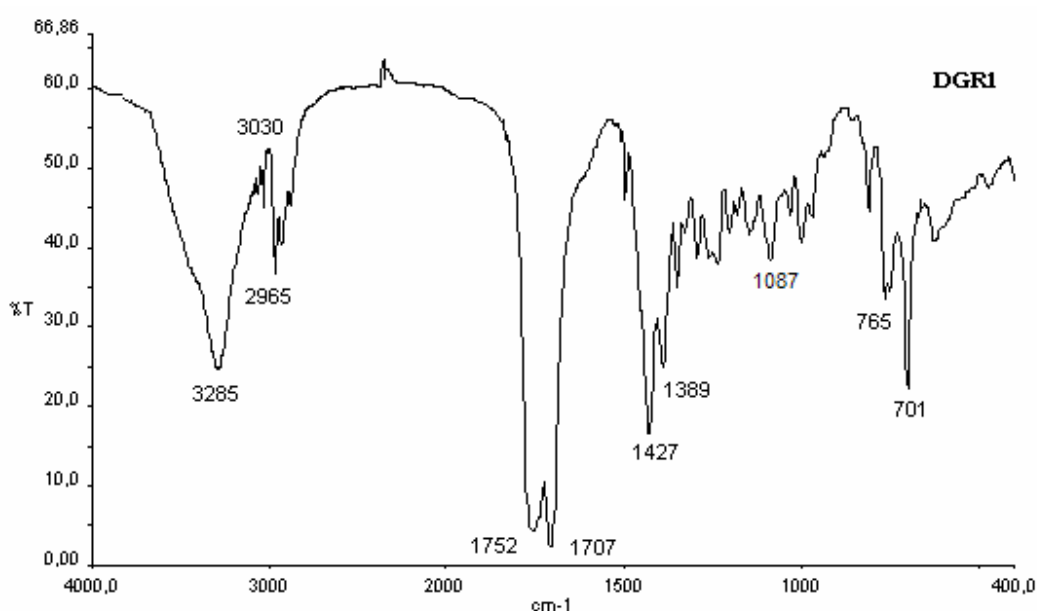
**IV DGR2 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3283  $\nu(\text{N-H})$ ; 3102  $\nu(=\text{C-H})$ ; 3030  $\nu_{as}(=\text{CH})$ ; 2964  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ ; 2930  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ ; 1740  $\nu(\text{C=O})$ ; 1630  $\nu(\text{C=O})$ ,  $\nu(\text{C=N})$ ,  $\delta(\text{N-H})$ ; 1534  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ ,  $\nu(\text{C-N})$ ,  $\delta(\text{N-H})$ ; 1458  $\delta(\text{CH}_3)$ ; 1396  $\delta(\text{CH}_3)$ ; 1244  $\nu(\text{C-N})$ ,  $\nu(\text{C-O})$ ; 749  $\nu(=\text{C-H})$ ; 702  $\nu(=\text{C-H})$ .

No espectro do DGR2 a banda de absorção em 1740 pode ser atribuída à carbonila do ácido enquanto que as duas carbonilas da amida encontram-se na região



de 1630, menor número de onda, tendo em vista que a ressonância com o par de elétrons desemparelhados do nitrogênio reduz o caráter de dupla ligação. No espectro do DGR1 não foi visualizada a banda do estiramento C=N na região de 1640  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a ausência dos anéis tiazólicos.

**IV DGR1 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3285  $\nu(\text{N-H})$ ; 3030  $\nu(\text{=C-H})$ ; 2965  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ ; 1752  $\nu(\text{C=O})$ ; 1707  $\nu(\text{C=O})$ ; 1427  $\delta(\text{CH}_2)$ ; 1389  $\delta(\text{CH}_3)$ ; 1087  $\nu(\text{C-O})$ ; 765  $\nu(\text{=C-H})$ ; 701  $\nu(\text{=C-H})$ .



**Figura 6.10** Espectro na região do infravermelho do DGR1 em KBr, obtido utilizando espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System.

#### 6.4.4.3 RMN de $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ e HMQC - DGR2

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (APT) e de RMN  $^1\text{H}$  para o DGR2 são mostrados, respectivamente nas Figuras 6.11 e 6.12. A estrutura química do RTV foi incluída no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  com o objetivo de facilitar a identificação dos sinais característicos em ambos os espectros, por parte do leitor; a parte da molécula representada na cor cinza refere-se aos sinais não encontrados em ambos os espectros de RMN.

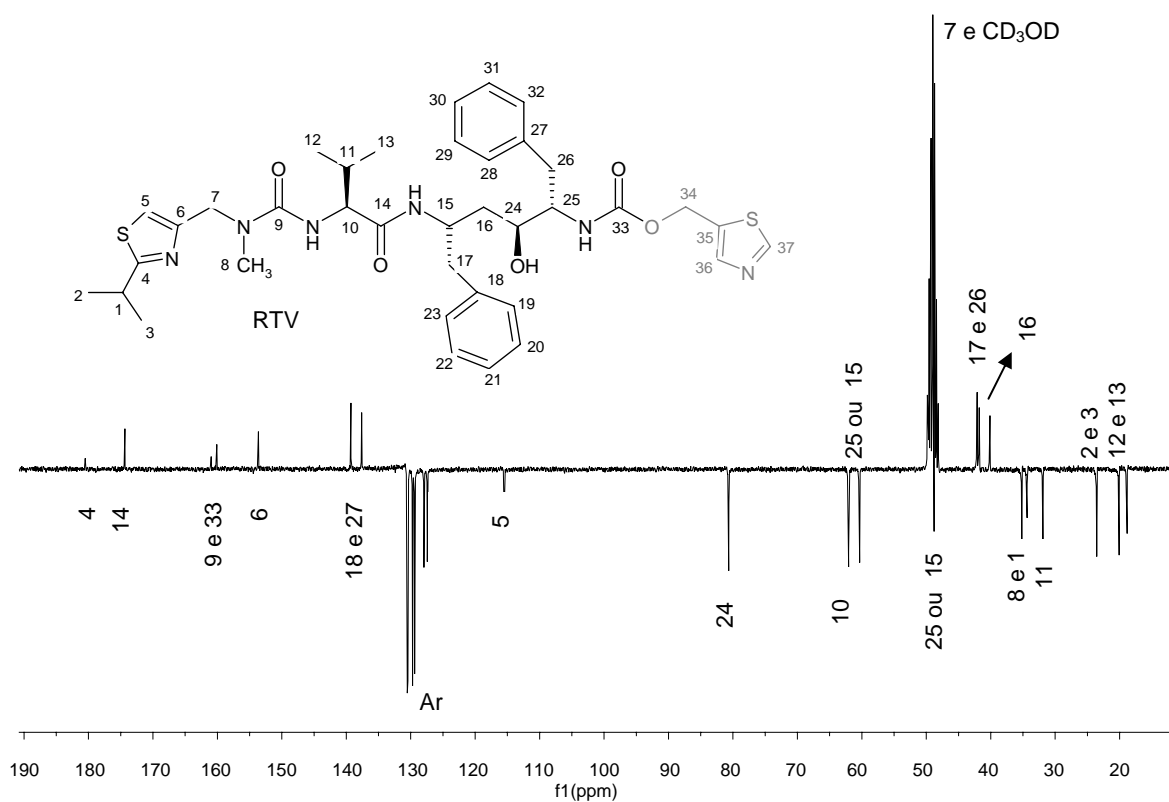


Figura 6.11 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (APT) do DGR2 em CD<sub>3</sub>OD a 300 MHz

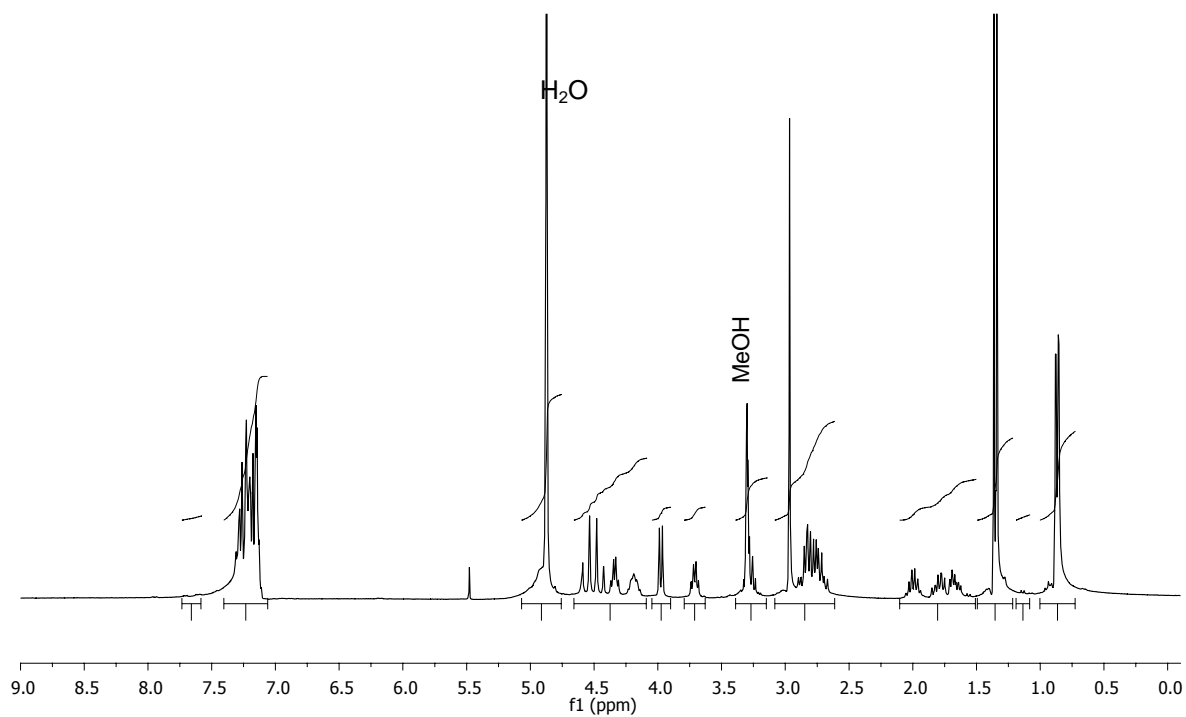


Figura 6.12 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do DGR2 em CD<sub>3</sub>OD a 75 MHz

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou 29 sinais (sendo que quatro deles correspondentes a 2 carbonos cada) os quais, com auxílio do espectro de HMQC (Figura 6.13) foram atribuídos a quatro carbonos quaternários, dezessete metínicos, quatro metilênicos, 5 metílicos e três carbonílicos, totalizando 33 carbonos. O espectro bidimensional HMQC, permitiu confirmar os deslocamentos químicos dos carbonos presentes no DGR2, através da correlação de cada hidrogênio com seu respectivo carbono. Entretanto, carbonos semelhantes, como por exemplo, C12 e C13, C17 e C26, dentre outros, não puderam ser diferenciados. O RMN  $^{13}\text{C}$  na forma de APT contribuiu para diferenciar carbonos quaternários e metilênicos dos metínicos e metílicos.

Os três sinais com  $\delta$  entre 160,9 e 174,4 ppm foram atribuídos aos carbonos ligados à carbonila, os quais devido ao efeito indutivo encontram-se em baixo-campo. Foram identificados os carbonos quaternários do anel tiazólico inicial com  $\delta$  de 153,6 e 180,5 ppm, este último, referente ao carbono ligado ao grupo propila. Os sinais com  $\delta$  de aproximadamente 50 ppm referem-se ao  $\text{CD}_3\text{OD}$ . O espectro de HMQC permitiu visualizar o C7 com  $\delta$  de 49,7, sobreposto ao solvente. Não foram observados os carbonos do anel tiazólico terminal da molécula.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  observa-se o singlete característico dos hidrogênios metílicos ( $\delta$  2,97 ppm), o dubleto com  $\delta$  de 0,86 referentes as metilas 12 e 13, o dubleto com  $\delta$  de 1,35 ppm referentes as metilas 2 e 3 e o dubleto em 3,97 ppm referente ao H10. Os dubletos com  $\delta$  4,4 e 4,5 ppm referem-se aos hidrogênios ligados ao C7. Apresenta vários sinais com  $\delta$  entre 7 e 7,4 ppm, os quais, pela integração, correspondem a 11 hidrogênios: 10 hidrogênios dos anéis aromáticos e um hidrogênio do anel tiazólico inicial. Os  $\delta$  de 3,3 e 4,8 ppm referem-se, respectivamente, ao solvente e a água.

As atribuições dos sinais observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  encontram-se no Quadro 6.1, enquanto que no Quadro 6.2 são apresentados os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, a multiplicidade, a constante de acoplamento ( $J$ ) em Hertz, as atribuições

e o número de hidrogênios observados no espectro do RMN de  $^1\text{H}$ . As atribuições de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram efetuadas com base na literatura consultada (WATSON, 1999; PAVIA, 2000; HOLZGRABE *et al.*, 2008).

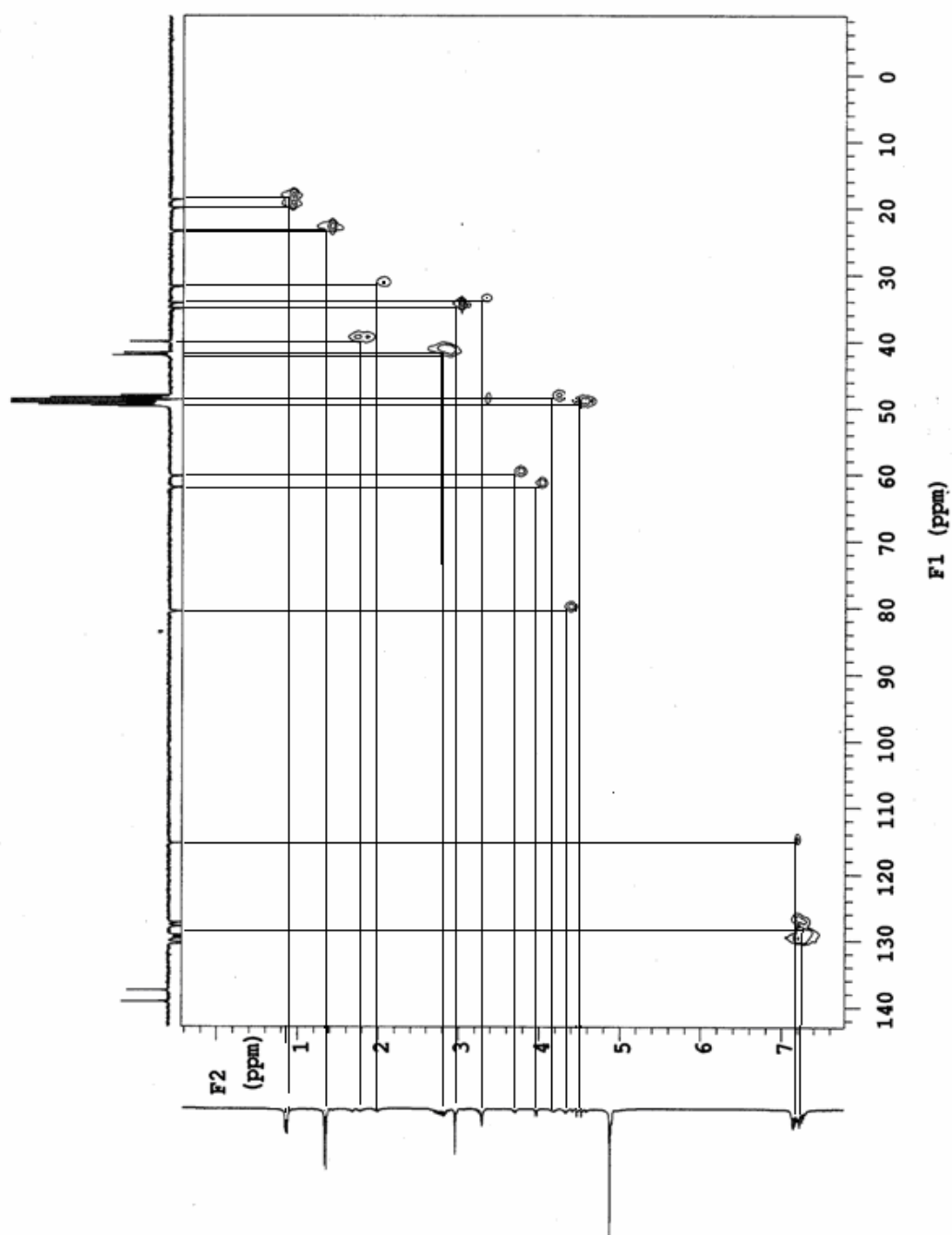


Figura 6.13 Espectro HMQC do DGR2 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 300 MHz

**Quadro 6.1** Dados de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm e atribuição dos carbonos do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do DGR2 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 300 MHz para.

$\delta$ (ppm)	Atribuições (Figura 6.7)	$\delta$ (ppm)	Atribuições (Figura 6.7)
18,84	C12 ou C13	115,51	C5
20,09	C12 ou C13	127,44	C21 ou C30
23,52	C2 ou C3	127,96	C21 ou C30
23,57	C2 ou C3	129,41	C20 e C22 ou C29 e C31
31,91	C11	129,72	C20 e C22 ou C29 e C31
34,38	C1	130,45	C19 e C23 ou C28 e C32
35,18	C8	130,55	C19 e C23 ou C28 e C32
40,13	C16	137,62	C27 ou C18
41,81	C17 ou C26	139,31	C27 ou C18
42,12	C17 ou C26	153,65	C6
48,81	C15 ou C25	160,12	C9
49,69	C7	160,98	C33
60,34	C15 ou C25	174,38	C14
62,07	C10	180,52	C4
80,68	C24		

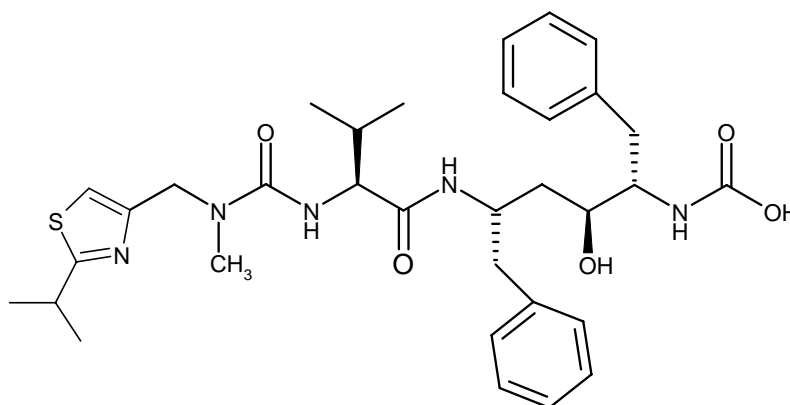
( $\delta$ ), deslocamento químico em ppm;

**Quadro 6.2** Dados dos deslocamentos químicos, multiplicidade, constante de acoplamento, número e atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do DGR2 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 75 MHz.

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade e $J$ (Hz)	Número de Hidrogênios	Atribuições (Figura 6.7)
0,86	d, $^3J$ (6,7 Hz)	6	H12 e H13
1,35	d, $^3J$ (6,9 Hz)	6	H2 e H3
1,77	m	2	H16
1,99	m	1	H11
2,79	m	4	H17 e H26
2,97	s	3	H8
3,29	m	1	H1
3,71	m	1	H15 ou H25
3,97	d, $^3J$ (7,3 Hz)	1	H10
4,17	m	1	H15 ou H25
4,38	m	1	H24
4,46	d, $^2J$ (16,1 Hz)	1	H7
4,55	d, $^2J$ (16,1 Hz)	1	H7'
7,21	m	11	H23, H22, H21, H20, H19, H28, H29, H30, H32, H31, H5

( $\delta$ ), deslocamento químico em ppm;  $J$ , constante de acoplamento em Hertz (Hz); s, singlete; d, dublete; m, multiplete.

Com os dados até então obtidos postula-se que a hidrólise na molécula do ritonavir ocorreu entre o carbono da carbonila (C33) e o oxigênio do carbamato formando o composto de fórmula molecular  $C_{33}H_{45}N_5O_5S$  e estrutura química da Figura 6.14. Este composto foi sugerido para o DGR2, considerando que o número de átomos de carbono, hidrogênio e a multiplicidade da análise dos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  e de HMQC estão de acordo com esta fórmula molecular e estrutura química.



**Figura 6.14** Estrutura química proposta para o DGR2 ( $C_{33}H_{45}N_5O_5S$ )

Este composto difere ligeiramente do fragmento proposto por KOUDRIAKOVA e colaboradores (1998) e também por GANGL e colaboradores (2002) nos estudos dos metabólitos do ritonavir *in vitro*, por espectroscopia de massas.

#### 6.4.4.4 RMN de $^{13}C$ , $^1H$ e HMQC – DGR1

Nos espectros de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  do DGR1 Figuras 6.15 e 6.16, respectivamente, foram observados a duplicação de todos os sinais, sugerindo inicialmente, a presença de outro composto, porém semelhante a este. A duplicação dos sinais no RMN de  $^{13}C$  foi melhor visualizado no espectro ampliado, conforme pode ser verificado na Figura 6.15, onde alguns destes sinais foram expandidos.

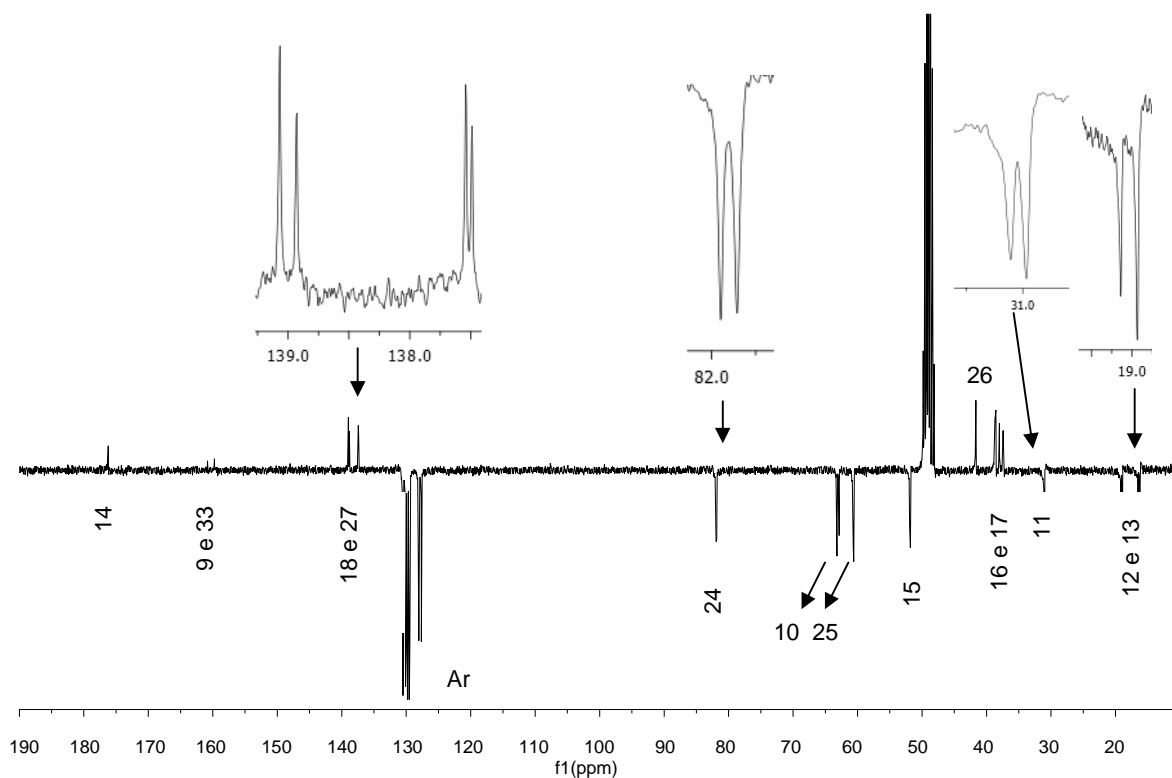


Figura 6.15 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) do DGR1 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 300 MHz

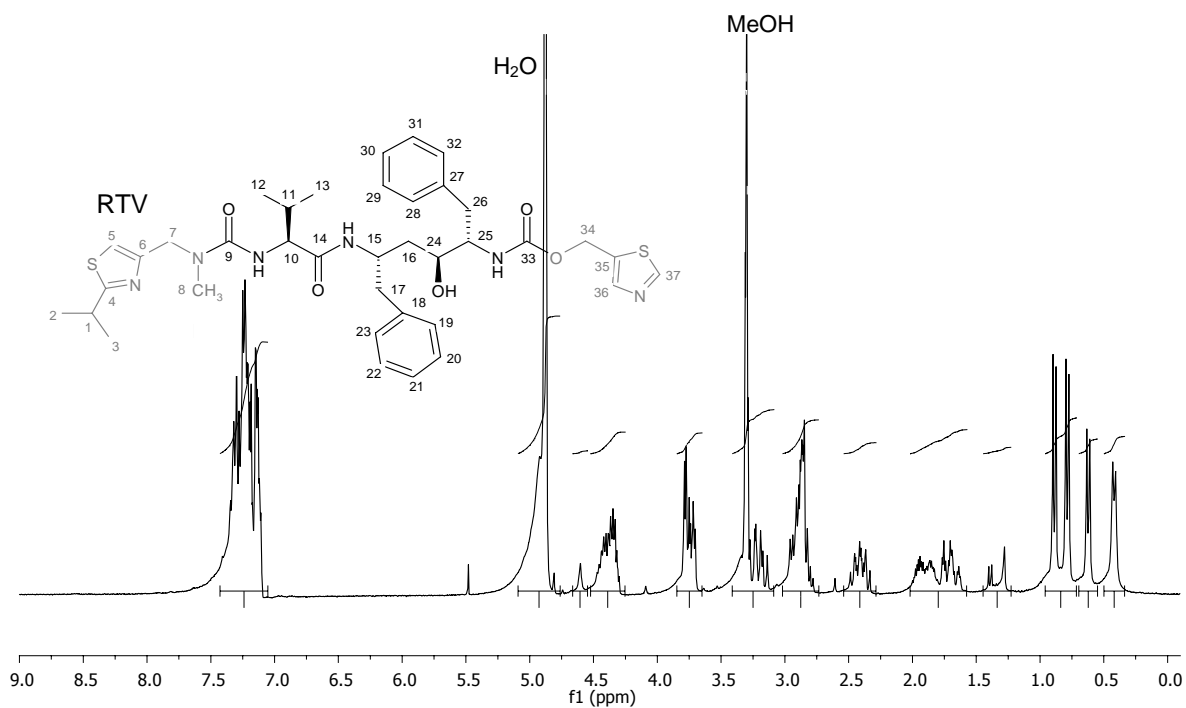


Figura 6.16 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do DGR1 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 75 MHz

A estrutura química do RTV, molécula de origem, foi incluída no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com o objetivo de facilitar a identificação dos sinais característicos por parte do leitor, em ambos os espectros; a parte da molécula representada na cor cinza refere-se aos sinais não encontrados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

A duplicação dos sinais tornou os espectros complexos, principalmente o de RMN de  $^1\text{H}$ . O espectro de correlação, HMQC, Figura 17, foi fundamental, inclusive o do DGR2, pois auxiliou também nas atribuições dos carbonos e hidrogênios do DGR1.

Considerando o resultado da homogeneidade do pico cromatográfico do DGR1 obtido por CLAE-DAD, a duplicação dos sinais de  $^{13}\text{C}$  que é de intensidade semelhante e analisando o sistema de acoplamento no RMN  $^1\text{H}$ , principalmente com  $\delta$  entre 0,2 e 1,0 ppm referentes às metilas (12 e 13), atribuiu-se este fenômeno à racemização da molécula, levando à formação de diastereoisômeros. Em concordância com a literatura (ROMERO, 1998; PAVIA, 2000; HOLZGRABE *et al.*, 2008), diastereoisômeros têm deslocamentos químicos ligeiramente diferentes no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , o que explicaria a duplicidade dos sinais do DGR1 nestes espectros.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mesmo com a duplicidade dos sinais, além da ausência dos sinais do anel tiazólico final, como no DGR2, observa-se também a ausência dos sinais do anel tiazólico inicial e de sua metilas, bem como a ausência dos carbonos 7 e 8 (C7 e C8). Os sinais com  $\delta$  de aproximadamente 50 ppm referem-se ao  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Apesar da complexidade do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  devido à duplicação de sinais é possível verificar a ausência do singlete característico da metila (H8) ligada ao nitrogênio. A ausência dos sinais característicos das metilas e do hidrogênio metínico da isopropila, bem como a ausência dos hidrogênios dos anéis tiazólicos também pode ser observada. A perda da metila em 8 sugere a hidrólise da molécula entre o C9 (carbonila) e o N ao qual está ligada esta metila, além da hidrólise entre o carbono da



carbonila (C33) e o oxigênio do carbamato, como no DGR2. Os  $\delta$  de 3,3 e 4,9 ppm referem-se, respectivamente, ao solvente e a água.

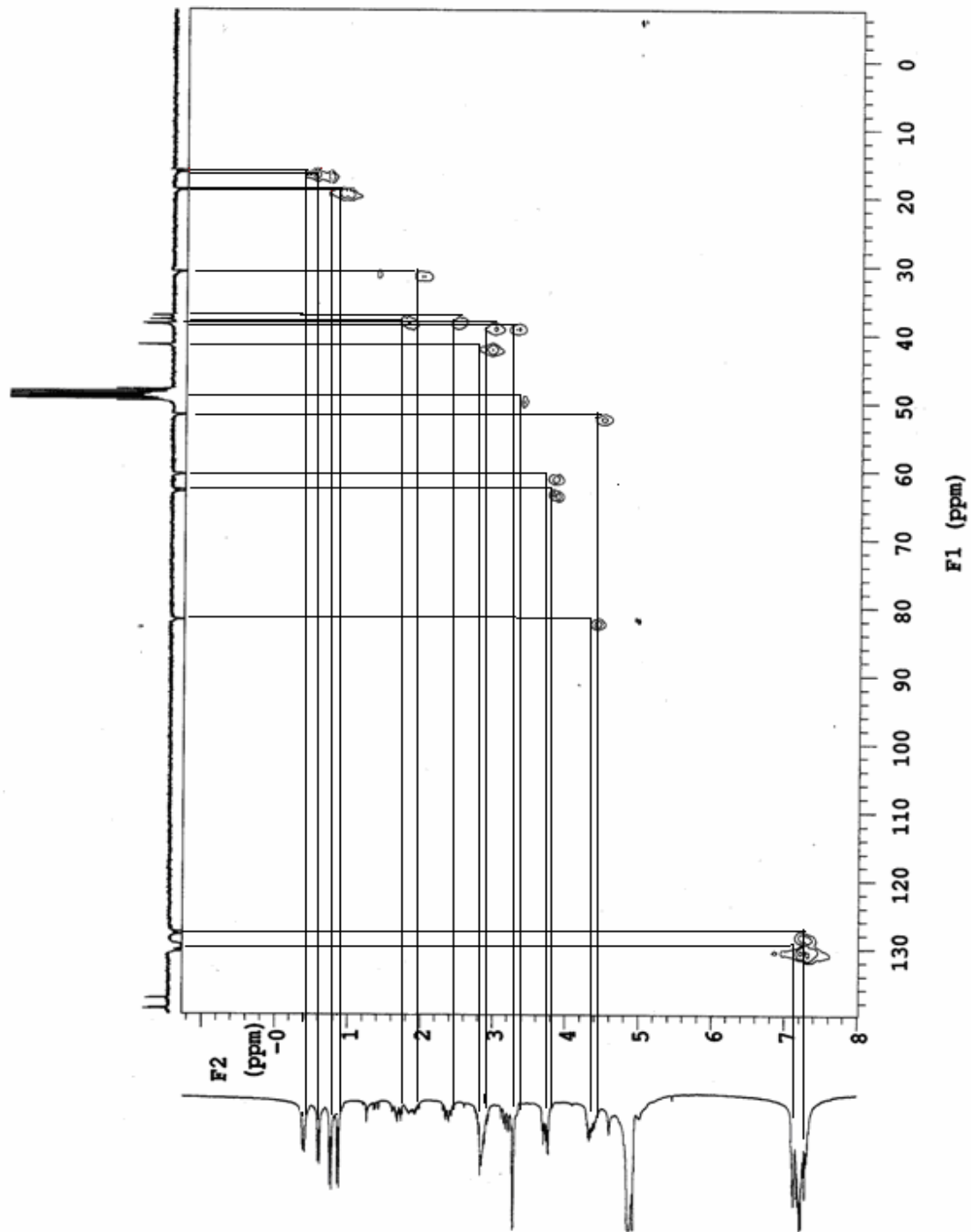


Figura 6.17 Espectro HMQC do DGR1 em CD<sub>3</sub>OD a 300 MHz

O  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY do DGR1, Figura 6.18, permitiu concluir que os quatro dubletos com  $\delta$  entre 0,42 e 0,88 referem-se as metilas 12 e 13 de dois diferentes compostos, pois as mesmas têm deslocamentos químicos diferentes. O hidrogênio em 11 apresenta-se como dois multipletos, também com deslocamentos químicos diferentes, pertencentes, portanto, a dois diferentes compostos. Considerando a duplicação dos sinais nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e o  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY indicando que nas proximidades do centro estereogênico (\*C10) os hidrogênios têm comportamento químico diferente, postula-se que a molécula sofreu isomerização levando a formação de dois diastereoisômeros (A e B). As atribuições de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , com base na Figura 6.7, podem ser visualizadas, respectivamente, nos Quadros 6.3 e 6.4.

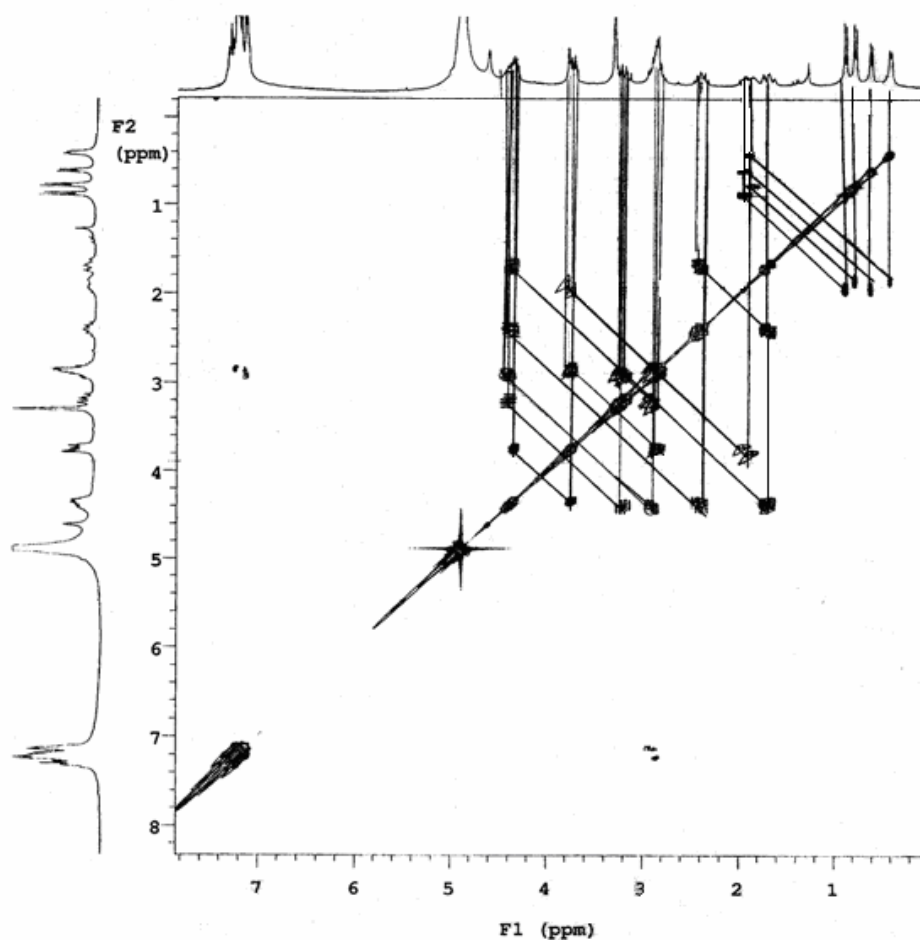


Figura 6.18 Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY do DGR1 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 300 MHz

**Quadro 6.3** Dados de deslocamentos químicos e atribuição dos carbonos do espectro de RMN <sup>13</sup>C do DGR1 em CD<sub>3</sub>OD a 300 MHz.

$\delta$ (ppm)	Atribuições (Figura 6.7)	$\delta$ (ppm)	Atribuições (Figura 6.7)
16,51	C12 ou C13	127,66	C21 ou C30
19,14	C12 ou C13	128,06	C21 ou C30
31,07	C11	129,52	C20 e C22 ou C29 e C31
37,43	C16	129,77	C20 e C22 ou C29 e C31
38,00	C16'	130,13	C19 e C23 ou C28 e C32
38,79	C17	130,53	C19 e C23 ou C28 e C32
41,70	C26	137,45	C18 ou C27
51,93	C15	138,97	C18 ou C27
60,69	C25	159,61	C9
63,21	C10	160,83	C33
81,95	C24	176,22	C14

( $\delta$ ), deslocamento químico em ppm.

**Quadro 6.4** Dados dos deslocamentos químicos, multiplicidade, constante de acoplamento, integral e atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN <sup>1</sup>H do DGR1 em CD<sub>3</sub>OD a 75 MHz.

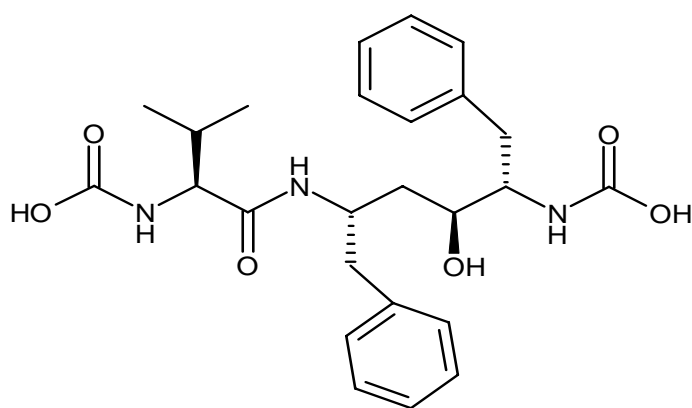
$\delta$ (ppm)	Multiplicidade e $J$ (Hz)	Integral	Atribuições (Figura 6.7)
0,42	d, <sup>3</sup> $J$ (6,6 Hz)	1,5	H12 <sub>A</sub> ou H13 <sub>A</sub>
0,62	d, <sup>3</sup> $J$ (6,9 Hz)	1,5	H12 <sub>B</sub> ou H13 <sub>B</sub>
0,78	d, <sup>3</sup> $J$ (6,9 Hz)	1,5	H12 <sub>A</sub> ou H13 <sub>A</sub>
0,88	d, <sup>3</sup> $J$ (7,0 Hz)	1,5	H12 <sub>B</sub> ou H13 <sub>B</sub>
1,75	m	1	H16 ou H16'
1,86	m	0,5	H11 <sub>A</sub>
1,94	m	0,5	H11 <sub>B</sub>
2,41	m	1	H16 ou H16'
2,87	m	3	H17, H26 e H26'
3,19	m	1	H17'
3,78	m	2	H10 <sub>A</sub> , H10 <sub>B</sub> e H25
4,35	m	1	H15
4,42	m	1	H24
7,22	m	10	H23, H22, H21, H20, H19, H28, H29, H30, H31, H32

( $\delta$ ), deslocamento químico em ppm;  $J$ , constante de acoplamento em Hertz (Hz); d, dubleto; m, multipletto.

Importante salientar que todos os sinais encontram-se duplicados em ambos os espectros de RMN; nas atribuições de  $^{13}\text{C}$ , Quadro 6.3, constam apenas os sinais de maior valor de deslocamento químico ( $\delta$ ). As atribuições de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram efetuadas com base na literatura consultada (WATSON, 1999; PAVIA, 2000; HOLZGRABE *et al.*, 2008).

Apesar da duplicidade dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do DGR1, é possível constatar a ausência dos sinais dos dois anéis tiazólicos da molécula do RTV em ambos os espectros de RMN. No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , a ausência do singlete da metila ligada ao nitrogênio (H8), indica que a hidrólise da molécula do RTV ocorreu entre este nitrogênio e o C9. Postula-se que a hidrólise na molécula do ritonavir, ocorre inicialmente, entre o oxigênio do carbamato e o C33 formando o composto DGR2 e posteriormente entre o nitrogênio e o C9, levando a formação do DGR1.

Os sinais observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , para o DGR1 estão em concordância com o composto de fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$  e estrutura química representada na Figura 6.19. Entretanto, a duplicação dos sinais em ambos os espectros de RMN e o  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, indicam a presença de uma mistura de compostos, possivelmente, dois diastereoisômeros.



**6.19** Estrutura química proposta para o DGR1 ( $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ ).

## 6.5 CONCLUSÕES

- O método por CLAE-preparativa desenvolvido possibilitou o isolamento dos produtos majoritários de degradação do ritonavir.
- A eliminação da água das frações isoladas por CLAE preparativa pelo processo de liofilização, apresentou resultados satisfatórios.
- A absorção no UV na região de 240 nm, para o ritonavir, é devida aos anéis tiazólicos.
- A fração isolada denominada DGR2 de fórmula molecular  $C_{33}H_{45}N_5O_5S$  é o principal produto de degradação do ritonavir, elucidada através da ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono-13 ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ) e de correlação inversa bidimensional (HMQC).
- A duplicidade dos sinais observados nos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1H$  e de  $^{13}C$  do DGR1 pode ser atribuído à racemização da molécula.
- A fração isolada denominada DGR1, de fórmula molecular  $C_{25}H_{33}N_3O_6$ , elucidada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono-13 ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ), de correlação inversa bidimensional (HMQC) e de correlação bidimensional homonuclear ( $^1H$ - $^1H$  COSY) é uma mistura, possivelmente, de dois diastereoisômeros.

## 6.6 REFERÊNCIAS

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

DENISSEN, J. F.; GRABOWSKI, B. A.; KPHNSON, M. K.; BUKO, A. M.; KEMPF, D. J.; THOMAS, S. B.; SURBER, B. W. Metabolism and Disposition of the HIV-1 Protease Inhibitor Ritonavir (ABNT-538) in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 25, n. 4, p.489-501, 1996.

DIFRANCESCO, R.; DICENZO, R.; VICENTE, G.; DONNELLY, J. ;MARTIN, T. M.; COLON, L. .; SCHIFITO, G.; MORSE, G. D. Determination of lopinavir cerebral spinal fluid and plasma ultrafiltrate concentrations by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 1139–1146, 2007.

GANGL, E.; UTKIN, I.; GERBER, N.; VOUIROS , P. Structural elucidation of metabolites of ritonavir and indinavir by liquid chromatography–mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, v. 974, p. 91–101, 2002.

HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B. (Ed.) *NMR Spectroscopy in pharmaceutical Analysis*. 1<sup>th</sup>. ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2008, 528 p.

KOUDRIAKOVA, T.; IATSIMIRSKAIA, E.; TKIN, I.; GANGL, E.; VOUIROS, P.; STOROZHUK, E.; ORZA, D.; MARININA, J.; GERBER, N. Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors Indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed Cytochrome p4503A4/3A5: Mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 26, no. 6, 1998.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared absorption spectroscopy*. 2<sup>th</sup>. ed., San Francisco: Holden-Day, 1977. 287 p.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3<sup>th</sup>. ed., Melbourne: Brooks/Cole, 2001. 579 p.

ROMERO, J. R. *Fundamentos de Estereoquímica dos Compostos Orgânicos*. Ribeirão Preto: Holos Editora, 1998. 108 p.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2000. 482 p.

STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1<sup>th</sup>. ed., England: John Wiley & Sons, 2004, Cap. 4, p. 71-94.

WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. 2<sup>th</sup> ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 1999. 337 p.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. *Stability of drugs and dosage forms*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 268 p.





**DISCUSSÃO GERAL**

---



Com normas bem definidas de bioequivalência, biodisponibilidade e do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), o teste de dissolução utilizado inicialmente para verificar a liberação a partir da forma farmacêutica para fins de controle de qualidade, agregou importância e passou do tradicional teste de controle de qualidade para teste substituto de estudos de bioequivalência, em alguns casos.

Considerando que o valor do teste de dissolução, como uma ferramenta para o controle de qualidade e como preditivo do comportamento *in vivo*, é significativamente maior se uma correlação com os dados *in vitro* for estabelecida, neste contexto e com base no SCB a possibilidade de estabelecer esta correlação, buscou-se então estabelecer o perfil de dissolução do lopinavir *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, como parte deste trabalho. Entretanto, para o desenvolvimento deste, foi necessário desenvolver e validar métodos para quantificação dessas substâncias nas cápsulas, uma vez que não constam nos compêndios oficiais e não foram encontrados na literatura consultada. Estes trabalhos permitiram a publicação de dois artigos para a associação lopinavir/ritonavir cápsulas e dois trabalhos para o ritonavir cápsulas:

**DONATO, E. M.; DIAS, C. L.; ROSSI, R. C., VALENTE, R. S.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M.** LC Method of studies on the stability of lopinavir and ritonavir soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 63, p. 437-443, 2006.

**DONATO, E. M.; MARTINS, L. A; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M.** Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on *in vivo* data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 547–552, 2008.

**ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; BERGOLD, A. M.; FRÖEHLICH, P. E.** Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules base on *in vivo* data. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 63, p. 437-443, 2007.

**DIAS, C. L.; ROSSI, R. C.; DONATO, E. M.; BERGOLD, A. M.; FRÖEHLICH, P. E.** LC Determination of Ritonavir, a HIV Protease Inhibitor, in Soft Gelatin Capsules. *Chromatographia*, v. 62, p. 589–593, 2005.

Nos estudos de dissolução, normalmente, o método de escolha para a determinação das quantidades dissolvidas em cada tempo, em função do custo da análise e da rapidez dos resultados, é a espectroscopia de ultravioleta. Neste contexto, foi tentado o desenvolvimento e validação de um método por espectroscopia derivada. Entretanto, o método desenvolvido apresentou diferença significativa quando comparado ao método por CLAE, para ambos os fármacos. Tendo em vista a grande quantidade de amostras a serem analisadas, o uso do CLAE com injetor automático facilitou consideravelmente a execução deste trabalho.

Nos estudos de estabilidade, constatou-se que o ritonavir, componente das cápsulas do Kaletra<sup>®</sup>, é suscetível à hidrólise a qual é intensificada pela temperatura, levando a um decréscimo no seu teor, com o passar do tempo e culminando com o aparecimento de dois produtos majoritários de degradação. Esses produtos de degradação foram isolados e elucidados através da espectroscopia de UV-DAD, IV e de RMN de hidrogênio, de carbono-13, de HMQC e de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY.

Foi possível determinar, nos estudos de estabilidade térmica, que o ritonavir, componente do Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, obedece a uma cinética de primeira ordem e que o lopinavir demonstrou ser estável por até seis meses, nas condições de estudo. Assim, a forma farmacêutica deve ser mantida em geladeira em função da instabilidade do ritonavir frente à temperatura.

**CONCLUSÕES GERAIS**

---



- A SQR do lopinavir estudada apresentou padrão de difração compatível com o cristal Tipo I mais hidratado, conforme demonstrado pela difração de raios X.
- A CCD desenvolvida pode ser utilizada para identificação do lopinavir e do ritonavir substância ativa.
- Nas condições utilizadas nos estudos de degradação forçada, o lopinavir demonstrou ser sensível à hidrólise ácida à temperatura ambiente, degradou em condições oxidativas e básicas apenas quando estes fatores foram associados à temperatura. Demonstrou ser estável frente à hidrólise neutra sob aquecimento. Quando exposto à luz UV 352 nm demonstrou ser estável em solução mantida em cubetas transparentes à luz UV durante 72 horas, entretanto, degradou quando exposto na forma de película, pelo mesmo período de tempo.
- O ritonavir, nas condições utilizadas nos estudos de degradação forçada, degradou em meio ácido, alcalino, meio neutro associado à temperatura e na presença de oxidante. Na forma sólida, demonstrou ser estável quando exposto à temperatura e a umidade, não associadas. Demonstrou ser estável à luz UV 352 quando exposto em solução mantida em cubetas de UV durante 72 horas, entretanto, degradou quando exposto na forma de película, pelo mesmo período de tempo.
- O método por CLAE desenvolvido e validado para quantificar a associação lopinavir / ritonavir cápsulas, apesar ter demonstrado especificidade nos testes de estresse realizados com as respectivas substâncias ativas, demonstrou não ser específico quando estas foram submetidas à temperatura, na forma farmacêutica

cápsulas, durante um maior período de tempo. Desta forma, o método pode ser utilizado na rotina para quantificar estes fármacos associados, nesta forma farmacêutica, mas não quando houver degradação.

- O método por CLAE desenvolvido e validado nos estudos de estabilidade térmica para quantificar o lopinavir e o ritonavir associados, na forma de cápsulas, pode ser utilizado para quantificar os teores remanescentes desses fármacos quando associados nesta forma farmacêutica, na presença de seus produtos de degradação.
- A análise estatística comparativa entre os métodos propostos por CLAE e UVD demonstrou haver diferença significativa entre eles, nas condições empregadas, não sendo, portanto, o método de UVD intercambiável com o método por CLAE para a determinação quantitativa do lopinavir e do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup>, cápsulas.
- Uma correlação nível A foi obtida, entre a fração absorvida e a fração dissolvida do lopinavir cápsulas de Kaletra<sup>®</sup> utilizando a agitação através de pás a 25 rpm e meio de dissolução constituído de 1000 ml de água contendo 2,3% p/V de LSS pH 6,0, mantido a  $37 \pm 0,5$  °C.
- O método por CLAE validado para o perfil de dissolução do lopinavir cápsulas baseado nos dados *in vivo*, pode ser utilizado em estudos de dissolução do lopinavir a partir do Kaletra<sup>®</sup> cápsulas.
- A velocidade de dissolução do ritonavir a partir das cápsulas foi semelhante à velocidade de dissolução do lopinavir, frente às condições testadas.
- O ritonavir, componente do Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, avaliado nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, obedeceu a uma cinética de degradação de primeira ordem.

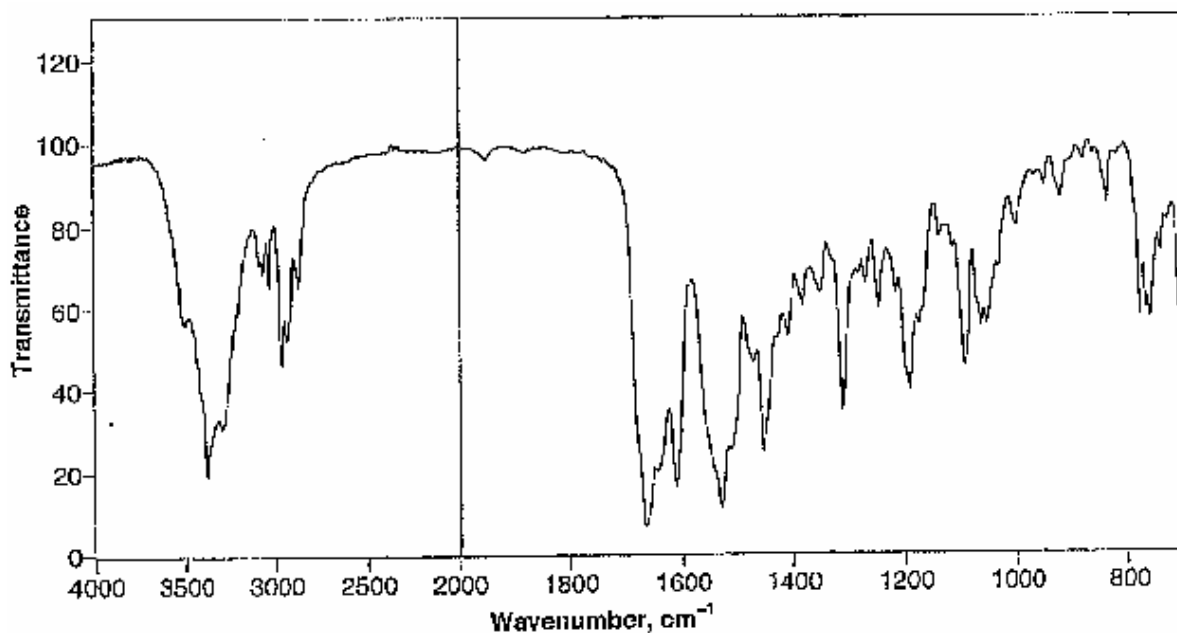


- Não foi possível determinar ordem de degradação do lopinavir, nas condições empregadas, considerando sua estabilidade.
- As condições de armazenamento (geladeira) preconizadas pelo Laboratório para o Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, deve-se a instabilidade do ritonavir em temperatura ambiente.
- O prazo de validade estimado para o Kaletra<sup>®</sup> cápsulas, para a temperatura de 25 °C, pelo método gráfico de Arrhenius, foi de 834 dias.
- O lopinavir na forma farmacêutica cápsulas demonstrou ser estável nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C pelo período, respectivamente, de seis meses, 100 e 50 dias.
- A fração isolada denominada DGR2 de fórmula molecular  $C_{33}H_{45}N_5O_5S$  é o principal produto de degradação do ritonavir, elucidada através da ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono-13 ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ) e de correlação inversa bidimensional (HMQC).
- A duplicidade dos sinais observados nos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1H$  e de  $^{13}C$  do DGR1 pode ser atribuído à racemização da molécula.
- A fração isolada denominada DGR1, de fórmula molecular  $C_{25}H_{33}N_3O_6$ , elucidada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono-13 ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ), de correlação inversa bidimensional (HMQC) e de correlação bidimensional homonuclear ( $^1H$ - $^1H$  COSY) é uma mistura, possivelmente, de dois diastereoisômeros.









**Figura 1.9** Espectro na região do IV para o cristal Tipo I, forma cristalina mais hidratada do lopinavir (ABBOTT, 2001).

**Quadro 1.2** Posições, 2-Theta dos principais picos dos difratogramas: (a) SQR lopinavir em estudos, obtido com difratômetro D5000, Siemens, ânodo de cobre,  $\text{CuK}\alpha=1,54 \text{ \AA}$  e (b) cristal Tipo I, forma cristalina mais hidratada do lopinavir obtido com Difratômetro Bruker SMART, radiação, ânodo de molibdênio,  $\text{MoK}\alpha=0,71 \text{ \AA}$  (ABBOTT, 2001).

2-Theta ( $\pm 0,1^\circ$ )	
SQR lopinavir (a)	Cristal Tipo I mais hidratado do lopinavir (b)
3,88	3,89
6,50	6,55
7,74	7,76
8,54	8,55
9,70	9,70
10,56	10,56
14,72	14,74
15,06	15,06
15,56	15,57
16,48	16,49
17,50	17,51
18,28	18,30
18,92	18,95
21,70	21,73

**Tabela 2.7** Análise de variância das áreas absolutas da curva padrão do lopinavir, obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	411829784668166	102957446167042	6195,27*	3,48
Regressão linear	1	411750427399196	411750427399196	24776,29*	4,96
Desvio de linearidade	3	79357268970	26452422990	1,59	3,71
DENTRO	10	166187274207	16618727421		
Total	14	18746781589134			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 2.8** Análise de variância das áreas absolutas da curva padrão do ritonavir, obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (53:37:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	18741081937832	4685270484458	8220,28*	3,48
Regressão linear	1	18740964166956	18740964166956	32880,90*	4,96
Desvio de linearidade	3	117770876	39256959	0,07	3,71
DENTRO	10	5699651301	569965130		
Total	14	18746781589134			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 3.4** Análise de variância dos resultados obtidos na determinação da curva padrão do lopinavir por UVD<sup>2</sup>  $\lambda = 258,5$  nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	0,369991	0,092498	6586,58*	3,48
Regressão linear	1	0,369929	0,369929	26341,94*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,000062	0,000021	1,46	3,71
DENTRO	10	0,000140	0,000014		
Total	14	0,370131			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 3.5** Análise de variância dos resultados obtidos na determinação da curva padrão do lopinavir por UVD<sup>2</sup>  $\lambda=264,6$  nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	0,329300	0,082325	6442,92*	3,48
Regressão linear	1	0,329219	0,329219	25765,36*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,000081	0,000027	2,10	3,71
DENTRO	10	0,000128	0,000013		
Total	14	0,329428			

\*Significativo para  $p < 0,05$ **Tabela 3.6** Análise de variância dos resultados obtidos na determinação da curva padrão do ritonavir por UVD<sup>1</sup>  $\lambda=253,4$  nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	0,040750	0,010187	6082,44*	3,48
Regressão linear	1	0,040736	0,040736	24321,56*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,000014	0,000005	2,73	3,71
DENTRO	10	0,000017	0,000002		
Total	14	0,040767			

\*Significativo para  $p < 0,05$ **Tabela 3.7** Análise de variância dos resultados obtidos na determinação da curva padrão do ritonavir por UVD<sup>1</sup>  $\lambda=254,8$  nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	0,038123	0,009531	10312,49*	3,48
Regressão linear	1	0,038118	0,038118	41244,12*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,000005	0,000002	1,94	3,71
DENTRO	10	0,000009	0,000001		
Total	14	0,038133			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 3.8** Análise de variância dos resultados obtidos na determinação da curva padrão do ritonavir por UVD<sup>1</sup>  $\lambda=259,0$  nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	0,015755	0,003939	9136,63*	3,48
Regressão linear	1	0,015751	0,015751	36538,74*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,000003	0,000001	2,59	3,71
DENTRO	10	0,000004			
Total	14	0,015759			

\*Significativo para  $p < 0,05$ **Tabela 3.9** Teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ), presumindo variâncias equivalentes, para os resultados obtidos na determinação do lopinavir no Kaletra<sup>®</sup> por UVD<sup>2</sup>  $\lambda=258,5$  nm e CLAE, calculados pelo Microsoft Excel 2003.

	CLAE	UVD 258,5 nm
Média	105,25	101,19
Variância	0,4259	4,4690
Observações	18	18
Variância agrupada	2,4475	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	<b>7,7884</b>	
P(T<=t) bi-caudal	4,6080E-09	
t crítico bi-caudal	<b>2,0322</b>	



**Tabela 3.10** Teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ), presumindo variâncias equivalentes, para os resultados obtidos na determinação do lopinavir no Kaletra<sup>®</sup> por  $UVD^2_{\lambda=264,6 \text{ nm}}$  e CLAE, calculados pelo Microsoft Excel 2003.

	CLAE	UVD 264,6
Média	105,25	93,93
Variância	0,4259	5,4400
Observações	18	18
Variância agrupada	2,9330	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	<b>19,8264</b>	
P(T<=t) bi-caudal	2,9264E-20	
t crítico bi-caudal	<b>2,0322</b>	

**Tabela 3.11** Teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ), presumindo variâncias equivalentes, para os resultados obtidos na determinação do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup> por  $UVD^1_{\lambda=253,4 \text{ nm}}$  e CLAE, calculados pelo Microsoft Excel 2003.

	CLAE	UVD 253,4
Média	94,80	135,99
Variância	0,2195	4,3068
Observações	18	18
Variância agrupada	2,2632	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	<b>-82,1421</b>	
P(T<=t) bi-caudal	1,0885E-40	
t crítico bi-caudal	<b>2,0322</b>	

**Tabela 3.12** Teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ), presumindo variâncias equivalentes, para os resultados obtidos na determinação do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup> por UVD<sup>1</sup> <sub>$\lambda=254,8$  nm</sub> e CLAE, calculados pelo Microsoft Excel 2003.

	CLAE	UVD 254,8
Média	94,80	116,14
Variância	0,2195	5,5711
Observações	18	18
Variância agrupada	2,8953	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	<b>-37,6292</b>	
P(T<=t) bi-caudal	2,6915E-29	
t crítico bi-caudal	<b>2,0322</b>	

**Tabela 3.13** Teste  $t$  de Student ( $p = 0,05$ ), presumindo variâncias equivalentes, para os resultados obtidos na determinação do ritonavir no Kaletra<sup>®</sup> por UVD<sup>1</sup> <sub>$\lambda=259,0$  nm</sub> e CLAE, calculados pelo Microsoft Excel 2003.

	CLAE	UVD 259,0
Média	94,80	121,18
Variância	0,2195	4,2276
Observações	18	18
Variância agrupada	2,2235	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	<b>-53,0875</b>	
P(T<=t) bi-caudal	2,70601E-34	
t crítico bi-caudal	<b>2,0322</b>	

**Tabela 4.8** ANOVA das áreas absolutas da curva padrão do lopinavir, obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol ( 53:37:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	101811816205737	25452954051434	6216,41*	3,48
Regressão linear	1	101789040441759	101789040441759	24860,09*	4,96
Desvio de linearidade	3	22775763978	7591921326	1,85	3,71
DENTRO	10	40944759304	4094475930		
Total	14	101852760965041			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 4.9** ANOVA das áreas absolutas da curva padrão do ritonavir, obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6, 5 µm, Merck), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol ( 53:37:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	3593248343691	898312085923	8772,76*	3,48
Regressão linear	1	3592843362332	3592843362332	35087,10*	4,96
Desvio de linearidade	3	404981358	134993786	1,32	3,71
DENTRO	10	1023978403	102397840		
Total	14	3594272322093			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 5.8** ANOVA das áreas absolutas da curva padrão do lopinavir, intervalo de 40 a 200 µg ml<sup>-1</sup>, obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6, 5 µm, Phenomenex®), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol ( 45:45:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	80517508581319	20129377145330	10744*	3,48
Regressão linear	1	80514643533339	80514643533339	42975*	4,96
Desvio de linearidade	3	2865047980	955015993	0,50	3,71
DENTRO	10	18735163235	1873516323		
Total	14	80536243744554			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 5.9** ANOVA das áreas absolutas da curva padrão do lopinavir, intervalo de 40 a 360  $\mu\text{g ml}^{-1}$  obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	336303025421011	84075756355253	3477,32*	3,48
Regressão linear	1	336224856963842	336224856963842	13906,06*	4,96
Desvio de linearidade	3	78168457169	26056152390	1,08*	3,71
DENTRO	10	241782974249	24178297425		
Total	14	336544808395259			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 5.10** ANOVA das áreas absolutas da curva padrão do ritonavir, intervalo de 10 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10) e detecção em 210 nm.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	3383371606098	845842901525	2356,51*	3,48
Regressão linear	1	3383206500634	3383206500634	9425,57*	4,96
Desvio de linearidade	3	165105464	55035155	0,15	3,71
DENTRO	10	3589390961	358939096		
Total	14	3386960997060			

\*Significativo para  $p < 0,05$

**Tabela 5.11** ANOVA das áreas absolutas da curva padrão do ritonavir, intervalo de 10 a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , obtidas por CLAE, utilizando coluna C18 (150 x 4,6, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>), fase móvel constituída de acetonitrila, água e metanol (45:45:10) e detecção em 210 nm.

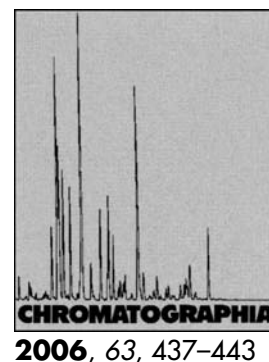
Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
ENTRE	4	16902440057523	4225610014381	77,22*	3,48
Regressão linear	1	16891505534067	16891505534067	308,68*	4,96
Desvio de linearidade	3	10934523457	3644841152	0,07	3,71
DENTRO	10	547223651852	547722365185		
Total	14	17449663709374			

\*Significativo para  $p < 0,05$





# LC Method for Studies on the Stability of Lopinavir and Ritonavir in Soft Gelatin Capsules



E. M. Donato<sup>✉</sup>, C. L. Dias, R. C. Rossi, R. S. Valente, P. E. Fröhlich, A. M. Bergold

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre CEP 90610-000, RS, Brasil; E-Mail: elianemd@terra.com.br

Received: 1 February 2006 / Revised: 21 March 2006 / Accepted: 22 March 2006  
Online publication: 4 May 2006

## Abstract

This study describes the development and full validation of a stability-indicating HPLC method to quantify ritonavir (RTV) and lopinavir (LPV) in soft gelatin capsules. The method uses a LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Merck) column and isocratic elution. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile-water-methanol (53:37:10, v/v/v), pumped at a flow-rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and UV detection at 210 nm using a photodiode array detector. LPV and RTV were exposed to thermal, photolytic, hydrolytic and oxidative stress conditions, and the stressed samples were analyzed by the proposed method. The response was linear over a range of 40–360 μg mL<sup>-1</sup> for LPV and 10–90 μg mL<sup>-1</sup> for RTV (*r* > 0,999 for both drugs). The mean recoveries were 99.46 and 100.81% for LPV and RTV, respectively. The RSD values for intra- and inter-day precision studies were < 0.70% for both drugs. Degradation studies showed that lopinavir is stable in thermal, alkaline and oxidative conditions, while ritonavir degraded under these conditions. The method was found to be stability-indicating and can be used for the routine analysis of the association LPV/RTV in soft gelatin capsules.

## Keywords

Column liquid chromatography  
Stability-indicating method  
Validation  
Lopinavir/ritonavir protease inhibitors

## Introduction

Lopinavir and ritonavir (LPV/r) is a fixed combination of two human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors (PIs). This class of drugs inhibits the HIV protease preventing cleavage of the gag-pol polyprotein, reducing the probability of viral particles reaching a mature, infectious state [1–3]. The combination of two PIs in

one capsule decreases total pill burden, which may increase adherence and patient acceptance. The recommended dosage of LPV/r is 400/100 mg taken twice daily with food, as part of a combination therapy with other antiretroviral (ARV) agents [2–4]. LPV is the antiviral component of Kaletra<sup>®</sup> with a favorable resistance profile, currently considered a valid therapeutic option both in ARV-naive and in ARV-expe-

rienced patients [4–5]. The small amount of ritonavir present in the standard clinical dose of this drug does not contribute directly to antiviral activity; lopinavir is extensively metabolized by cytochrome P-450 (CYP3A) and RTV inhibits the CYP3A-mediated metabolism of LPV, resulting in higher plasma levels of LPV. Studies conducted with LPV in animal models demonstrated that, when dosed alone, minimal plasma levels are achieved and when co-administered with RTV, plasma levels of LPV are increased substantially [4, 6–8].

Several HPLC methods have been published for the determination of LPV/r in plasma from patients receiving antiretroviral therapy, in combination with other antiretroviral compounds [9–16]. However, most of these methods are complex and not very practical for routine analysis. Dias et al [17] have reported a simple stability indicating method for the determination of RTV in pharmaceutical samples, however LPV was not evaluated. Thus, the purpose of this work was to develop and validate a simple, fast and stability-indicating reverse-phase HPLC method for the determination LPV/r, combined, in the presence of their degradation products, in soft gelatin capsules. Forced degradation of the drug substances were performed under a variety of stress conditions recommended by the International Conference on Harmonization (ICH) [18], to establish the stability-indicating method.

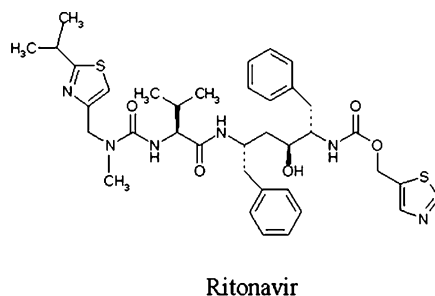
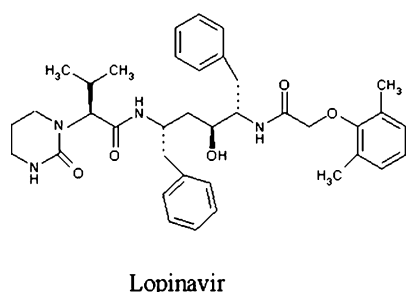


Fig. 1. Chemical structures of LPV and RTV

## Experimental

### Materials and Chemicals

The chemical structures of the two studied protease inhibitors are shown in Fig. 1. Lopinavir and ritonavir reference substances (assigned purity of 98.72% and 99.53%, respectively) were kindly supplied by Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (São Paulo, Brazil). Kaletra<sup>®</sup> soft gelatin capsules (133.33 mg LPV and 33.33 mg RTV) were purchased from the market. HPLC grade acetonitrile and methanol were from Fischer Scientific (New Jersey, USA) and from Merck (Darmstadt, Germany). Propylene glycol, oleic acid, polyoxyl 35 castor oil were obtained from Alfa Química (São Paulo, Brazil). All other reagents were from Nuclear (São Paulo, Brazil) and were of analytical grade. Ultra-pure water Milli-Q Plus, Millipore<sup>®</sup>, USA) was used throughout analysis.

### Instrumentation

The HPLC system consisted of a LC-10AD pump, an SPD-M10ADVP photodiode array (PDA) detector, a SLA-10ADVP system controller, a DGU-14A degasser, and Rheodyne<sup>®</sup> manual injector with 20  $\mu\text{L}$  loop; data were acquired and processed using CLASS-VP software, version 6.1 (all from Shimadzu Corporation, Japan). The chromatographic separation was carried out using a Li-Chrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm i.d., with particle size of 5  $\mu\text{m}$ , Merck) and robustness was verified using a Phenomenex<sup>®</sup> RP-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm i.d., with particle size of 5  $\mu\text{m}$ ). Photodegradation was carried out in a photostability UV chamber (1.0  $\times$  0.17  $\times$  0.17 m) with mirrors and equipped with blacklight blue lamp, UV-A 352 nm (ORION, 30W, 130V) and

UV UltraVette<sup>®</sup> cuvettes were used as a container for the samples. For thermal stability studies, a dry air oven (Biomatic, Porto Alegre, Brazil) was used.

### Chromatographic Conditions

The chromatographic analysis was performed at room temperature, on a Li-Chrospher<sup>®</sup> RP-18 column with a mobile phase composed of acetonitrile-water-methanol (53:37:10, v/v/v), without pH adjustment. The flow-rate was 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  and the PDA detector was set at 210 nm.

### Standard and Sample Solution Preparation

Individual stock solutions of LPV and RTV were prepared by dissolving the appropriate amount of each drug substance in methanol, to yield a final concentration of 1.0 mg  $\text{mL}^{-1}$  and 4.0 mg  $\text{mL}^{-1}$ , respectively. Twenty Kaletra<sup>®</sup> soft gelatin capsules were separately weighed a their contents washed out with methanol and collected in a 100 mL volumetric flask and diluted to volume with the same solvent. Working solutions of the reference substances and sample were prepared by diluting an appropriate volume of stock solutions in a mixture of methanol and mobile phase (80:20, v/v), named DS, before injection. The samples were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter.

### Validation Study

The developed method was validated for specificity, linearity, accuracy, precision, and robustness according to published guidelines [18–22]. The chromatographic parameters: retention time, resolution, theoretical plate number, tailing factor

and retention factor were monitored [21–24].

### Specificity/Forced Degradation Studies

Specificity was established by determining the purity of the drug peak using a PDA detector, checking the absence of excipients interference (placebo solution) or degradation products generated during forced degradation studies. Drugs were evaluated separately in solutions containing 1600 and 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of LPV and RTV, respectively, and prepared by diluting the stock solutions with acid, alkaline or oxidative solutions. After the degradation, these solutions were further neutralized (if necessary), diluted with the DS to achieve a concentration of 320  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for LPV and for RTV, respectively, and analyzed by the proposed method. The used stress conditions were the following:

**Hydrolytic studies:** Solutions of LPV and RTV in 1.0 M HCl were exposed at room temperature for 72 h and a solution of LPV in 1.0 M HCl was also exposed at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 90 min. The studies in alkaline conditions were done at room temperature in 1.0 M NaOH for 72 h for LPV and in 0.25 M NaOH for RTV (immediate analysis). LPV solutions in 1.0 M NaOH were also submitted at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 14 h. For studies in neutral condition, drug solutions in water were heated at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 48 and 72 h, respectively, for RTV and LPV.

**Oxidative studies:** Drug solutions of LPV and RTV in 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , individually, were stored at room temperature for 72 h.

**Photolytic studies:** Photolytic studies were done in methanolic solutions for both, LPV and RTV, by exposure to a 352 nm UV lamp for 10 days, in a photostability chamber. The samples were placed in UltraVette<sup>®</sup> cuvettes and kept at a distance of 15 cm of the lamp.

**Thermal studies:** Susceptibility to dry heat was studied by exposing the solid drugs to 60  $^{\circ}\text{C}$  for 10 days.

**Humidity:** Susceptibility of the LPV and RTV to humidity was studied exposing the solid drugs at 75% of relative humidity (RH), at room temperature, for 20 days.

### Linearity and Range

Linearity of the method was studied by the injection of five concentrations of



both LPV and RTV, in the range of 40–360  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 10–90  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The solutions were injected in triplicate into the HPLC system each time on three different days over a period of one week. The calibration curve for each drug was constructed by plotting the peak area versus concentration and linearity was validated by linear regression analysis and ANOVA.

#### Precision and Accuracy

Precision was tested by repeatability and intermediate precision studies. Repeatability was performed by analysis of six samples containing 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of LPV and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of RTV injected in triplicate on the same day. Intermediate precision was tested by repeating the studies on three different days ( $n = 18$ ) and comparing the results between days. The results of precision were expressed in terms of relative standard deviation (RSD). For the accuracy determination sample solutions were fortified with three known concentrations of each drug substance, corresponding to 75.0, 100.0 and 130.0% of the sample concentration (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of LPV and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of RTV). These studies were performed on three different days and the recovery of the added drug substance ( $n = 9$ ) was determined.

#### Robustness

In order to evaluate the robustness of the proposed method, experimental conditions were modified on purpose and the chromatographic parameters (retention time, theoretical plate numbers, retention factor; and resolution between LPV and RTV) [24] and RSD of measured concentration of LPV and RTV were evaluated. The conditions included RP-18 columns from different manufacturers (Merck and Phenomenex), composition of mobile phase ( $\pm 2.0\%$  of acetonitrile) and different manufacturers of methanol and acetonitrile. Each factor was changed separately to estimate the effect. In each assay samples ( $n=3$ ) were analyzed with a working standard solution.

## Results and Discussion

Different mobile phases and columns (RP-8 and RP-18) were tested in order to develop stability-indicating HPLC assay

**Table 1.** Result of analysis of forced degradation study samples using proposed method, indicating percentage degradation and purity of LPV and RTV peaks in chromatograms

Stress condition/ duration/state	LPV		RTV	
	Degradation (%)	Peak purity	Degradation (%)	Peak purity
Acidic/1.0 M HCl/72h	14	0.9999	17	0.9999
Acidic/1.0 M HCl/80°C/ 90min	68	0.9999	ns	0.9999
Alkaline/0.25 M NaOH/0min	ns	–	67	1.0000
Alkaline/1.0 M NaOH/72h	0	1.0000	ns	–
Alkaline/1.0 M NaOH/80°C/14h	26	1.0000	ns	–
Neutral/H <sub>2</sub> O/80 °C/48h	ns	–	96	0.9999
Neutral/H <sub>2</sub> O/80 °C/72h	0	1.0000	ns	–
Oxidative 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /72h	0	0.9999	20	0.9999
Photolysis/UV 352nm/10d	0	1.0000	0	1.0000
Thermal 60°C/10d	0	0.9999	0	0.9999
RH* 75%/20d	0	0.9999	0	0.9999

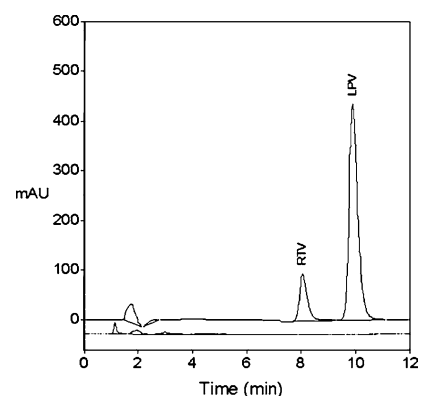
\* relative humidity; ns = not submitted

for the analysis of the association of LPV and RTV. The best conditions for separation of LPV and RTV in the presence of its degradation products combined with a short analytical run were obtained by the use of a LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Merck) column and mobile phase composed by acetonitrile-water-methanol (53:37:10, v/v/v) without pH adjustment. The flow-rate of the mobile phase was 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ . The absorption spectra of LPV and RTV are very similar showing maxima at approximately 202 nm. The PDA detector wavelength was therefore set at 210 nm.

Figure 2 (top) shows the chromatogram obtained from Kaletra® solution containing 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of LPV and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of RTV. The peaks of RTV and LPV are well resolved with retention times around 8.0 and 9.8 min, respectively, and the placebo chromatogram (bottom) shows that there was no interference of the excipients used in the pharmaceutical preparation.

#### Degradation Behavior/Specificity

The chromatograms of RTV and LPV, after being submitted to different degradation conditions, were compared with blank solutions injected in a similar manner and recently prepared solution. Degradation peaks for both drugs were identified by their retention times and their diode array spectra. The peak purity values for LPV and RTV in chromatograms of stressed samples were in the range of 0.999–1.000 indicating homogeneous peaks. Table 1 shows the results of the forced degradation studies using the

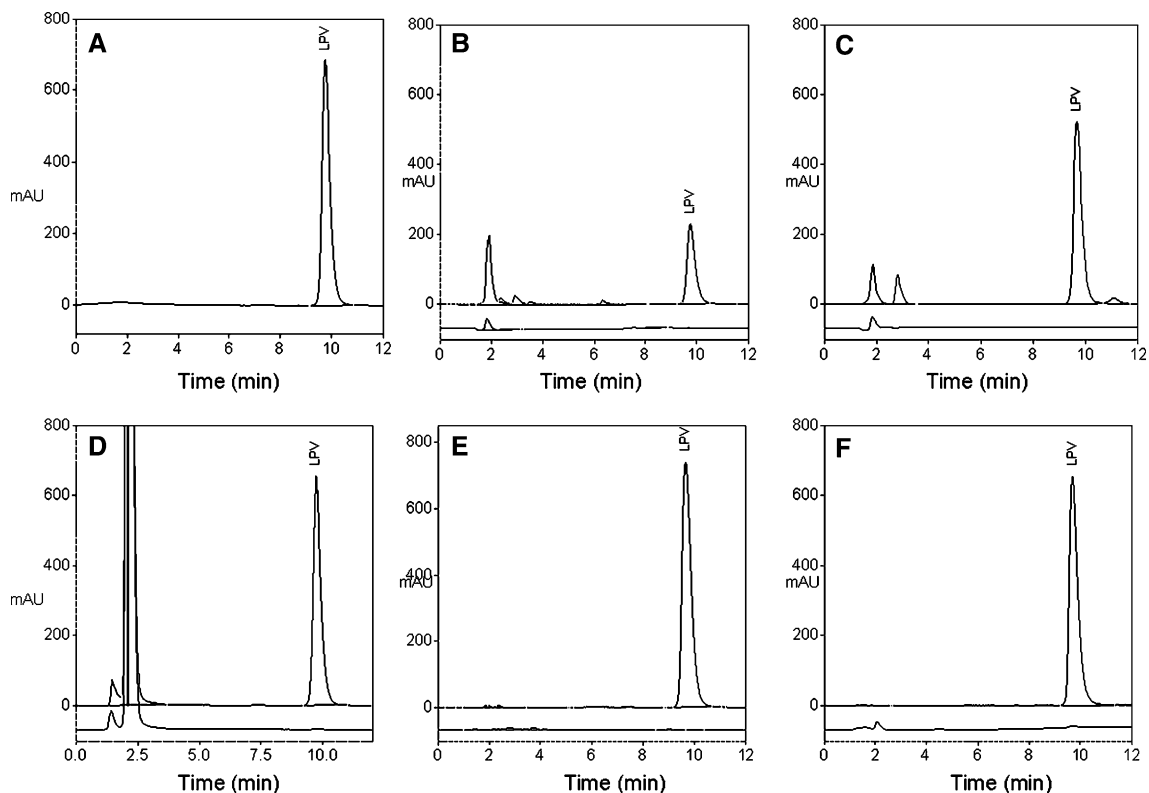


**Fig. 2.** Chromatogram of sample solution containing 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of LPV and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of RTV (top) and excipients preparation (bottom). Chromatographic conditions: RP-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  packing, Merck); 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  flow rate; mobile phase acetonitrile-water-methanol (53:37:10 v/v/v); UV detection at 210 nm

proposed method, indicating degradation percentage and purity of LPV and RTV peaks in the chromatograms. LPV was submitted to more drastic conditions due to its higher stability.

#### Lopinavir

No degradation was observed under alkaline hydrolysis (1.0 M NaOH, 72 h, room temperature). Studies on solid drug showed that LPV was stable to temperature and humidity. No decomposition was seen after exposure to dry heat at 60 °C for 10 days or to 75% RH for 20 days (chromatograms not shown). Lopinavir was also stable when exposed at UV light (352 nm) for 10 days (Fig. 3E, top), neutral hydrolysis (80 °C) for 72 h (Fig. 3F, top) and oxidation



**Fig. 3.** Representative chromatograms of LPV obtained from degradation studies. (A) solution not subjected to forced degradation; (B) acid hydrolysis (1.0 M HCl, 80 °C, 90 min); (C) alkaline hydrolysis (1.0 M NaOH, 80 °C, 14 h); (D) oxidative degradation (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 72 h); (E) photolytic degradation (UV 352 nm, 10 d); and (F) neutral hydrolysis (H<sub>2</sub>O, 80°C, 72 h). Chromatographic conditions: RP-18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm packing, Merck); 1.0 mL min<sup>-1</sup> flow rate; mobile phase acetonitrile-water-methanol (53:37:10 v/v/v); UV detection at 210 nm. In B, C, D, E and F, the bottom chromatograms represent the blank solution

(30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, room temperature) for 72 h (Fig. 3D, top). In these conditions, lopinavir did not show any change in the chromatograms or diode array spectra, when compared with the drug not subjected to forced degradation (Fig. 3A), indicating that these factors had no effect on the drug.

Only 14% of LPV degraded in acid condition (1.0 M, 72 h, room temperature). However, when heated at 80 °C for 90 min, 68% of degradation was observed. The major degradation product was detected at 2.0 min. Other smaller peaks were observed at 3.0, 3.8 and 6.5 min (Fig. 3B, top). The drug degraded 26% after alkaline hydrolysis (1.0 M NaOH, 80 °C, 14 h), where the major peak was observed at 2.0 min, at the same retention time as the one observed after hydrolytic acid decomposition and a second peak eluted at 3.0 min. An additional small peak also eluted after elution of LPV, (*t<sub>R</sub>* = 11 min) (Fig. 3C, top).

It was observed that lopinavir solution degraded at room temperature, only in acid condition (1.0 M HCl).

#### Ritonavir

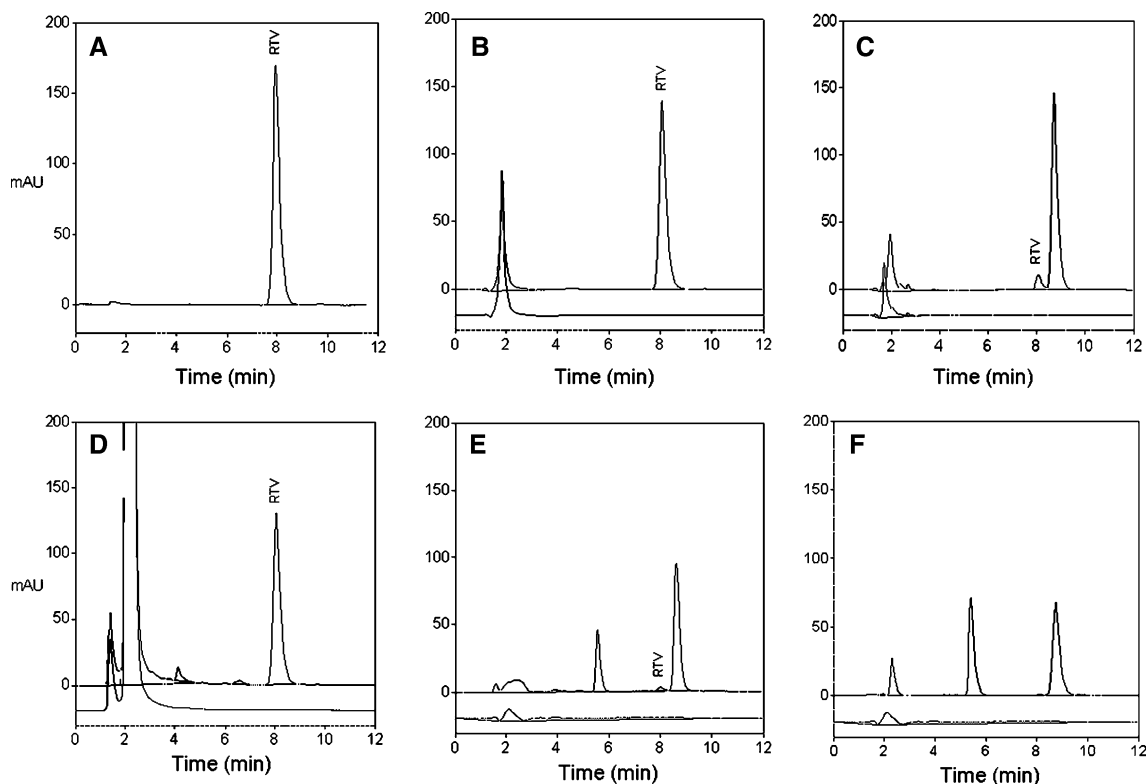
In acidic condition (1.0 M HCl, 72 h) 17% of the drug degraded. However no additional peaks were seen in the chromatogram (Fig. 4B, top) when compared with the solution not subjected to forced degradation (Fig. 4A), indicating that RTV might degrade to non-chromophoric compounds. On the other hand, the peak purity results derived from PDA, confirmed that the peak that eluted at 1.8 min is not homogeneous, suggesting that a degradation product might be eluting at this retention time.

In contrast, 67% of degradation was observed in alkaline condition (0,25 M NaOH, immediate analysis), with one potential degradation product at ca. 8.8 min (Fig. 4C, top) and almost complete degradation was seen (97%) in neutral hydrolysis (water, 80 °C, 48 h) where the chromatogram showed three additional peaks at 2.3, 5.4 and 8.8 min (Fig. 4E, top). It was observed that the area values of both peaks, RTV and the main degradation product (*t<sub>R</sub>* = 8.8 min) were decreasing over the time and this

observation was followed by increasing in concentration of the degradation products that eluted at 2.3 and 5.8 min (Fig. 4F, top), suggesting that, over the time, the main degradation product is converted on those products (*t<sub>R</sub>* 2.3 and 5.8 min).

A representative photodiode array spectrum of the peak at 8.8 min from both alkaline and neutral hydrolysis and from RTV reference substance is shown in Fig. 5. The similarity index between spectra from both alkaline and neutral hydrolysis was 1.0000. Thus, it is reasonable to assume that alkaline and neutral hydrolysis led to the formation of the same major degradation product with a peak at 8.8 min. On the other hand, the similarity index of the spectra from alkaline and neutral hydrolysis were 0.9865 and 0.9856, respectively, when compared with the spectrum of the RTV reference substance.

In oxidative conditions at least two small degradation products were detected, with retention times of 4.1 and 6.6 min. Under this condition, RTV degraded 20% (Fig. 4D, top). This drug showed stability when submitted to 60 °C

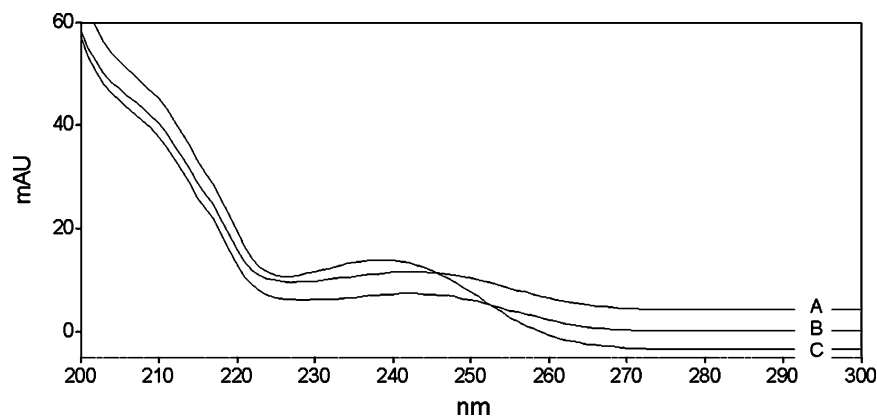


**Fig. 4.** Representative chromatograms of RTV obtained from degradation studies. (A) solution not subjected to forced degradation; (B) acid hydrolysis (1.0 M HCl for 72 h); (C) alkaline hydrolysis (0.25 M NaOH, immediate analysis); (D) oxidative degradation (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 72 h); (E) and (F) neutral hydrolysis (water, 80 °C, 48 h and 72 h, respectively). Chromatographic conditions: RP-18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm packing, Merck); 1.0 mL min<sup>-1</sup> flow rate; mobile phase acetonitrile-water-methanol (53:37:10 v/v/v); UV detection at 210 nm. In B, C, D, E and F, the bottom chromatograms represent the blank solution

for 10 days, 75% of relative humidity for 20 days and when exposed to light at 352 nm, in methanolic solution for 10 days.

#### Development of a Stability-Indicating Method

The presence of potential degradation products in the solution did not interfere with the determination of RTV and LPV under the proposed HPLC conditions. All the degradation products eluted at different retention times and did not co-elute with the parent compound. The resolution was satisfactory among RTV, LPV and the degradation product of RTV formed under alkaline hydrolysis, that eluted between them ( $t_R = 8.8$  min), as shown in Fig. 6, where LPV reference substance was spiked with RTV solution submitted to alkaline hydrolysis. The purities of the peaks (Table 1) indicate that they are not contaminated with any of the degradation products. thus, the developed method is stability-indicating and can be used even in the presence



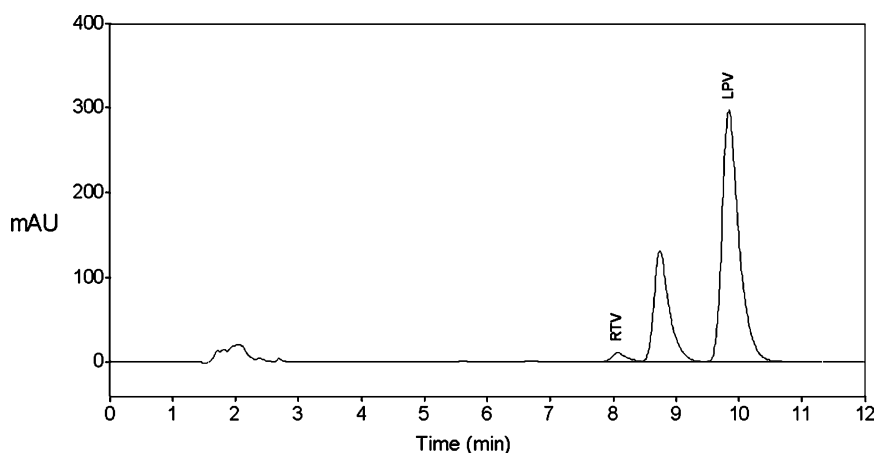
**Fig. 5.** Overlaid diode array spectra of the degradation product of RTV at time retention about 8.8 minutes from (A) alkaline hydrolysis (0.25 M NaOH, immediate analysis); (B) neutral hydrolysis (water, 80 °C, 48 h); and (C) RTV reference substance. Chromatographic conditions: RP-18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm packing, Merck); 1.0 mL min<sup>-1</sup> flow rate; mobile phase acetonitrile-water-methanol (53:37:10 v/v/v); UV detection at 210 nm

of LPV and RTV major degradation products.

#### Linearity

The response was linear in the concentration range between 40–360 μg mL<sup>-1</sup>

and 10–90 μg mL<sup>-1</sup>, respectively, for LPV and RTV. For both drugs the correlation coefficient ( $r$ ) was more than 0.999, indicating highly significant correlations between concentration and peak area. The intercept was not significantly different from zero at the 95% confidence



**Fig. 6.** Chromatogram of solution of RTV subjected to alkaline hydrolysis (0.25 M NaOH, immediate analysis) with their potential degradation product ( $t_R = 8.8$  min) spiked with LPV reference substance. Chromatographic conditions: RP-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m packing, Merck); 1.0 mL min<sup>-1</sup> flow rate; mobile phase acetonitrile-water-methanol (53:37:10 v/v/v); UV detection at 210 nm

**Table 2.** Data for lopinavir and ritonavir from linearity studies ( $n = 3$ )

Lopinavir		Ritonavir	
Concentration ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	Mean peak area $\pm$ SD; RSD (%)	Concentration ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	Mean peak area $\pm$ SD; RSD (%)
40	2061687 $\pm$ 24200; 1.17	10	426368 $\pm$ 2744; 0.64
120	5870210 $\pm$ 55799; 0.95	30	1220433 $\pm$ 13067; 1.07
200	9676429 $\pm$ 83548; 0.86	50	2013018 $\pm$ 25447; 1.26
280	13217882 $\pm$ 1228826; 0.97	70	2799870 $\pm$ 30200; 1.08
360	16911494 $\pm$ 236257; 1.40	90	3588543 $\pm$ 33336; 0.93

**Table 3.** Accuracy of assay for lopinavir and ritonavir

Drug	Level of the sample concentration (%)	Spiked concentration ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	Mean concentration $\pm$ SD ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ); RSD (%) ( $n = 3$ )	Recovery (%)
LPV	50	140	139.2 $\pm$ 1.11; 0.80	99.45
	100	200	201.6 $\pm$ 2.84; 1.41	100.81
	130	260	260.4 $\pm$ 3.50; 1.34	100.17
RTV	50	35	35.0 $\pm$ 0.49; 1.41	99.96
	100	50	49.9 $\pm$ 0.18; 0.37	99.72
	130	65	65.2 $\pm$ 1.23; 1.88	100.25

**Table 4.** Repeatability and intermediate precision data evaluated through intra-day and inter-day studies for lopinavir and ritonavir

Drug	Actual concentration ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	Mean concentration $\pm$ SD ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ); RSD (%)	
		Intra-day ( $n = 6$ )	Inter-day ( $n = 18$ )
LPV	200	214.8 $\pm$ 0.44; 0.20	214.8 $\pm$ 1.49; 0.69
RTV	50	49.6 $\pm$ 0.26; 0.52	49.6 $\pm$ 0.34; 0.69

level. Table 2 lists the data obtained during the determination of linearity.

#### Accuracy and Precision

The results obtained for the accuracy study are presented in Table 3. The standard deviation and relative standard deviation are also given. Good recoveries (99.72–100.81%) of the spiked solutions of the drugs were obtained at each added concentration, for both drugs, indicating that the developed method was accurate. The result of repeatability and intermediate precision experiments are shown in Table 4. The RSD values in the two cases, for both drugs, were less than 0.7%, confirming that the method is precise.

#### Robustness

Results presented in Table 5 indicate that the method is not affected by small changes in the chromatographic conditions. The resolution between ritonavir and lopinavir was more than 2.0 and the RSD of assay as percentage of the theoretical concentration ( $n = 3$ ) was less than 2.0%, illustrating the robustness of the method. However, considerable increase in retention time was observed when using Phenomenex<sup>®</sup> column and lower percentage of acetonitrile (–2%) in the mobile phase.

## Conclusions

An isocratic stability-indicating HPLC assay was developed to quantify LPV and RTV associated in a soft gelatin capsule, evaluating the influence of their potential degradation products, following the recommendations of ICH guidelines. This stability-indicating method can be used for the routine analyses of both drugs when associated in this dosage form and to evaluate the stability of bulk samples of LPV and RTV.

## Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES, for the financial support of E. Donato, and Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, São Paulo, Brasil for providing lopinavir and ritonavir reference substances.

## References

- Sethi ML (2002) Antiviral Agents and Protease Inhibitors. In: Williams DA, Lemke TL Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 967–975
- Raffanti S, Hass DW (2003) Antimicrobial Agents-Antiretroviral Agents. In: Hardman JG, Limbird LE (eds) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Brasil, pp. 1212–1033
- França FFAC (2004) Andrejus Korolkovas: Dicionário Terapêutico Guanabara, Guanabara Koogan, Brasil, pp. 18.36–18.54
- Abbott Laboratories, Kaletra® Product Monograph <http://www.rxabbott.com/PDF/kaletrapi.pdf>
- US Department of Health and Human Services Guidelines for use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. <http://www.aidsinfo.nih.gov>
- Sham HL, Kempf DJ, Molla A, Marsh KC, Kumar GN, Chen CM, Kati W, Stewart K, Lal R, Hsu A, Betebenner DA, Korneyeva M, Vasavanonda S, McDonald E, Saldivar A, Wideburg N, Chen X, Niur P, Park O, Jayanti V, Grabowski B, Granneman GR, Sun E, Japour AJ Leonard JM, Plattner, JJ, Norbeck, DW (1998) Antimicrob Agents Chemother 42:3218–24
- Molla A, Vasavanonda S, Kumar GN, Sham HL, Johnson M, Grabowski B, Denissen JF, Kohlbrenner W, Plattner JJ, Leonard JM, Norbeck DW, Kempf DJ (1998) Virology 63:250–255
- Cvetkovic RS and Goa KL (2003) Drugs 63:769–802
- Ray J, Pang E, Carey D (2002) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 775: 225–230
- Justesen US, Pedersen C, Klitgaard, NA (2002) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 783:491–500

**Table 5.** Robustness evaluation of the LC method for lopinavir and ritonavir ( $n = 3$ )

Parameter	Lopinavir				Ritonavir				$R_s$ <sup>e</sup>
	$t_R$ <sup>a</sup>	$N$ <sup>b</sup>	$k$ <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	$t_R$	N	k	(%)	
Merck column	9.78	5220	4.75	107.95	8.01	4810	3.71	99.95	3.43
Phenomenex column	13.10	8407	3.83	108.46	10.87	7279	3.02	97.53	4.13
MP <sup>f</sup> (- 2% acetonitrile)	11.47	5580	5.75	108.67	9.34	4857	4.49	97.26	3.72
MP <sup>f</sup> (+ 2% acetonitrile)	7.52	3775	3.42	106.00	6.34	3475	2.73	97.90	2.56
Fischer S. solvent	9.79	5216	4.76	107.42	8.01	4796	3.71	99.27	3.42
Merck solvent	9.78	5215	4.75	107.22	8.01	4792	3.71	98.48	3.42
RSD (%)	1.06				0.90				

<sup>a</sup> retention time; <sup>b</sup> theoretical plates number; <sup>c</sup> retention factor; <sup>d</sup> of label claim, <sup>e</sup> resolution between LPV and RTV and <sup>f</sup> mobile phase

- Titier K, Lagrange F, Pehourcq F, Edno-Mcheik L, Moore N, Molimard M (2002) Ther Drug Monit 24: 417–424
- Faux J, Venisse N, Moal G, Dupuis A, Bouquet S (2003) Chromatographia 59:421–426
- Usami Y, Oki T, Nakai M, Sagisaka M, Kaneda T (2003) Chem Pharm Bull 51:715–718
- Dailly E, Raffib F, Jollieta P (2004) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 813: 353–358
- Naser L, Rezk NL, Tidwell RR, Kashuba ADM (2004) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 805: 241–247
- Takahashi M, Yoshida M, Oki T, Okumura N, Suzuki T, Kaneda, S (2005) Biol Pharm Bull 28:1286–1290
- Dias LC, Rossi, RC, Donato EM, Bergold AM, Fröhlich, PE (2005) Chromatographia 62: 589–593
- ICH (2003) International Conference on Harmonization, Guideline on Stability Testing of New Drug Substances and Products (Q1A)
- ICH (1994) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Text on Validation of Analytical Procedures (Q2A)
- ICH (1996) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology, (Q2B)
- FDA (1994) Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, Rockville, MD
- USP (2005) The United States Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD
- Watson DG Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- Snyder LG, Kirkland JJ, Glajch JL (1997). Practical HPLC method development, John Wiley & Sons, USA, pp. 21–57.





## Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on *in vivo* data

Eliane Maria Donato, Laura Alegria Martins, Pedro Eduardo Fröhlich\*, Ana Maria Bergold

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 October 2007  
Received in revised form 12 February 2008  
Accepted 18 February 2008  
Available online 26 February 2008

#### Keywords:

Lopinavir  
Dissolution  
Validation  
*In vitro*–*in vivo* correlation

### ABSTRACT

The objective of the present study was to develop and validate a dissolution test for lopinavir soft gel capsules (Kaletra®), using a simulated absorption profile based on *in vivo* data. Different conditions such as surfactant concentration, apparatus and rotation speed were evaluated. *In vivo* release profiles were obtained from the literature. The fraction (and percentage) of dose absorbed (FA) was calculated by using Wagner–Nelson method. The best *in vitro* dissolution profile was obtained using Apparatus 2 (paddle) at 25 rpm, 1000 ml of medium with 2.3% of sodium lauryl sulfate and pH 6.0. Under these conditions a level-A *in vitro*–*in vivo* correlation (IVIVC) was obtained ( $r = 0.997$ ). The *in vitro* dissolution samples were analyzed using a HPLC method and the validation was performed according to USP protocol. The method showed accuracy, precision, linearity and specificity within the acceptable range. Both the HPLC method and the *in vitro* dissolution method were validated and could be used to evaluate the release profile of lopinavir soft gel capsules.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The level of interest in the *in vitro* dissolution of poorly water-soluble drugs has increased in recent years due to the need of finding a suitable dissolution media for pharmaceutical formulations that may reflect their *in vivo* performance [1]. IVIVC is defined as the correlation between *in vitro* dissolution and *in vivo* input rate and it may be used as an alternative for *in vivo* bioequivalence tests in order to minimize unnecessary tests with humans [2–4]. It may also be used instead of *in vivo* studies that may be required to demonstrate bioequivalence, when certain pre-approval and post-approval changes are performed in formulation, equipment, manufacturing process or in the manufacture site. However, in order to use *in vitro* dissolution test as an alternative for bioequivalence studies, the IVIVC must be predictive of the *in vivo* product performance [2–5]. The Biopharmaceutical Classification System (BCS) based on drug aqueous solubility and intestinal permeability proposed by Amidon et al. [6] may be used as a guide for setting *in vitro* dissolution specifications and also to foresee when an IVIVC may be successfully obtained. An IVIVC for immediate release solid oral dosage forms containing poorly water-soluble products may be established if the dissolution is the rate-limiting step in absorption [2,5,6].

*In vivo* poorly water-soluble drugs are solubilized through complex endogenous surfactants such as bile acids, bile salts and lecithin. However, *in vitro* dissolution models in less complex micelle systems have been used [1]. The use of surfactants in the dissolution system for poorly water-soluble drugs may be physiologically more meaningful due to the presence of natural surfactants in the gastrointestinal tract [7].

Lopinavir (LPV) and ritonavir (RTV) are two human immunodeficiency virus protease inhibitors. LPV is the antiviral component of Kaletra®, and the small amount of RTV present in the formulation does not contribute directly to antiviral activity, but it increases the oral bioavailability of LPV [8–10]. Considering that both drugs are practically insoluble, a dissolution test might be useful to predict the formulation *in vivo* performance [11]. Recently a dissolution method for RTV (Norvir®), based on its *in vivo* absorption profile was reported [12].

The objective of this study is to develop and validate a dissolution test for LPV (Kaletra®) soft gel capsules. The *in vivo* data was obtained from literature [13].

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Reagents

LPV and RTV standards (assigned purity of 99.5% and 98.7%, respectively) were kindly supplied by Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brazil). Kaletra® soft gel capsules

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33085313; fax: +55 51 33085313.  
E-mail address: [pedroef@ufrgs.br](mailto:pedroef@ufrgs.br) (P.E. Fröhlich).

(133.3 mg LPV and 33.3 mg RTV) were purchased from the market (batch no. 330962E21). Sodium lauryl sulfate (SLS) was obtained from Synth (São Paulo, Brazil). HPLC grade acetonitrile and methanol were obtained from Fischer Scientific (New Jersey, USA) and Merck (Darmstadt, Germany). Propylene glycol, oleic acid, polyoxyl 35 castor oil were obtained from Alfa Química (São Paulo, Brazil). All other reagents were analytical grade obtained from Nuclear (São Paulo, Brazil). Ultra-pure water (Milli-Q Plus, Millipore®, MA, USA) was used for the dissolution medium and throughout analysis.

## 2.2. *In vivo* study

The average plasma concentration versus time curve was fitted with a non-linear software (Micromath Scientist®, v.2.01) using a one-compartment open model, according to Eq. (1), and the resulting curve and parameters were used to estimate intermediate plasma concentration data points:

$$C = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V_d \cdot (k_a - k_e)} \cdot (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) \quad (1)$$

where  $C$  is the plasma concentration at time  $t$ ,  $k_e$  and  $k_a$  are the elimination and absorption rate constants, respectively,  $V_d$  the distribution volume,  $D$  the dose and  $F$  is the bioavailability. The fraction of drug absorbed versus time plot was calculated using Wagner–Nelson method [14].

## 2.3. *In vitro* study

### 2.3.1. Dissolution test

The development and validation of the dissolution test was performed using a VANKEL® VK 8000 dissolution auto-sampling station, VK type bidirectional peristaltic pump, VK 750D digitally controlled heater/circulator, VK 7010 dissolution testing station multi-bath ( $n=8$ ) with automated sampling manifold. The influence of different SLS concentrations in the dissolution medium, different apparatus (USP basket and paddle) and different rotation speeds were evaluated. The medium volume used was 900 and 1000 ml and all tests were performed at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The dissolution medium pH was monitored before and after the performance of the tests. Sample aliquots were collected at 15, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min and assayed using HPLC.

### 2.3.2. Dissolution medium

The different dissolution media were prepared through simple SLS dissolution in ultra-pure water. The pH of all media was adjusted to 6.0 with 10% *o*-phosphoric acid. Acetate buffer (pH 4.4) was prepared by dissolving 10.9 g of sodium acetate trihydrate, 6.2 g of ammonium acetate and 20 ml of acetic acid in 1 l of water.

### 2.3.3. HPLC analysis

LPV and RTV were analyzed using a previously developed method [15]. Chromatographic analysis was carried out using a LC-20AT pump, CBM-20A system controller, SPD-10AV detector, SIL-20A auto sampler. Data integration was performed using Class-VP software for chromatographic peak integration (all from Shimadzu, Japan). For the specificity and stability studies, an SPD-M10ADVP photodiode array detector was used. The separation was achieved using a Merck C18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$  i.d.) column. The mobile phase was composed of acetonitrile:water:methanol (53:37:10, v/v/v) at a flow rate of  $1.2 \text{ ml min}^{-1}$ . Detection was performed at 210 nm and all assays were performed at room temperature conditions. The auto sampler was programmed to inject  $20 \mu\text{l}$ .

### 2.3.4. Solubility

LPV/RTV solubility was determined in three different media 0.1 M HCl, acetate buffer pH 4.4 and 2.3% SLS solution pH 6.0. Vessels containing 250 ml of medium were pre-heated at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  before adding the drugs in excess (133.3 mg of LPV and 33.3 mg of RTV). The samples were gently rotated in a heating chamber at  $37^\circ\text{C}$ . Aliquots (5 ml) were removed from each vessel after 1 and 2 h, filtered, neutralized, diluted with the mobile phase and analyzed using the HPLC method. The solubility of Kaletra® was also evaluated through the same procedure. A capsule was placed in each vessel containing 250 ml of 2.3% SLS solution pH 6.0 The solubility in each medium was determined in triplicate.

### 2.3.5. *In vitro*–*in vivo* correlation

An IVIVC for LPV was evaluated by plotting the mean fraction of drug absorbed (FA) versus the mean fraction of drug dissolved (FD). Linear regression analysis was used to fit the data.

## 2.4. Validation of the dissolution test

The *in vitro* dissolution method developed was validated according to current guidelines [16–18]. Specificity, linearity, accuracy and precision were evaluated. LPV/RTV stabilities using test conditions were also evaluated.

### 2.4.1. Specificity

Specificity was evaluated in placebo samples. The placebo samples consisted of all the excipients (oleic acid, propylene glycol and polyoxyl 35 castor oil), sinkers and shell capsules without the active substance. The estimated concentration of excipients in Kaletra® was based on literature data [19]. The placebo sample were transferred to separate vessels ( $n=3$ ) filled with 1000 ml of dissolution medium at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  and stirred for 1 h at 150 rpm using paddle (USP Apparatus 2). Aliquots were collected and analyzed.

### 2.4.2. Linearity

Linearity of the method was studied through the injection of both LPV and RTV at the concentration range of 8–200 and 5–50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively, with five different concentration levels in each curve. Dilutions were performed with 2.3% SLS solution pH 6.0 from a methanolic solution containing 1600  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of LPV and 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of RTV. This study was conducted in 3 different days, and each solution was injected in triplicate into the HPLC system. The mean peaks area versus concentration data was treated by least-squares linear regression analysis. The relative standard deviation (R.S.D.) value for the slope and Y-intercept of the calibration curve was calculated.

### 2.4.3. Accuracy and precision

The accuracy of the method was evaluated through the recovery test of known amounts of LPV and RTV reference substance added to the placebo. A stock solution containing 10  $\text{mg ml}^{-1}$  of LPV and 2.5  $\text{mg ml}^{-1}$  of RTV was prepared in methanol. Aliquots of 4, 8 and 16 ml of this solution were added to vessels containing dissolution medium for a final volume of 1000 ml kept at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (final concentrations were 40, 80 and 160  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , for LPV, and 10, 20 and 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for RTV, respectively). Samples were stirred at 150 rpm for 1 h. After that aliquots of each vessel were collected and analyzed. These studies were performed in triplicate on three different days. The same solutions used in the accuracy test were analyzed in order to ensure the precision of the method. Intra- and inter-day precision were established based on R.S.D. of the results.



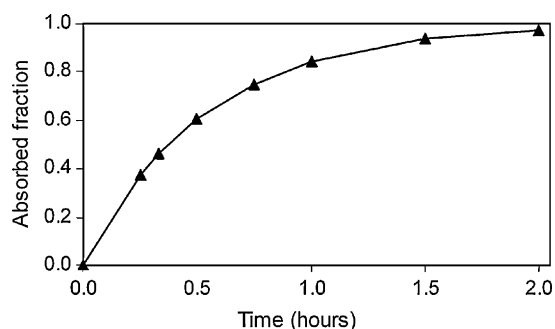


Fig. 1. Fraction of dose absorbed vs. time curve for lopinavir soft gel capsules (Kaletra®) using Wagner–Nelson method.

#### 2.4.4. Stability studies

Stability of both drugs in the dissolution medium was evaluated using standards and samples. The solutions were kept at  $37 \pm 0.5$  °C for 2 h under light shaking, being later left at room temperature for 24 h. Aliquots of the samples were tested at time 0, and after 2 and 24 h. The responses for the aged solutions were evaluated using a freshly prepared standard. The assay was performed in triplicate.

### 3. Result and discussion

#### 3.1. In vivo study

The pharmacokinetic data for the IVIVC were obtained from the literature [13]. Using the Wagner–Nelson method, the average plasma concentration versus time curve was transformed into fraction of dose absorbed versus time (Fig. 1). Considering that the best fit for the *in vivo* data was obtained using an open one-compartment body model equation, the Wagner–Nelson method was used to obtain the fractions of dose absorbed.

#### 3.2. In vitro study

##### 3.2.1. Solubility of samples

Unlike RTV, LPV was rather insoluble in 0.1 M HCl. The highest solubility of ritonavir in low pH is due to protonation of the two weakly basic thiazole groups ( $pK_a$ s 1.8 and 2.6). Lopinavir is a weak acid with  $pK_a$  of 2.8 and is not ionized in this pH [20,21]. The dissolution rate of both drugs in the dosage form was higher than the drug substances at the same conditions. Kaletra® soft gel capsule is an example of self-emulsifying drug delivery system (SEDDS), which is a technique used to improve the dissolution rate and hence the bioavailability [4].

Considering the volume of medium used in the tests and according to Table 1, the *sink* condition, defined as the volume of medium being at least three times higher than that necessary to obtain a saturated solution of the drug, was obtained with the SLS solution

Table 1  
Solution solubility results

Medium	Sample	Solubility ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			
		Lopinavir		Ritonavir	
		1 h	2 h	1 h	2 h
0.1 M HCl	ds	5.4	13.7	132.1	133.3
Acetate buffer pH 4.4	ds	64.6	77.1	20.9	45.5
H <sub>2</sub> O + 2.3% SLS pH 6.0	ds	458.7	477.2	112.8	118.9
H <sub>2</sub> O + 2.3% SLS pH 6.0	Capsule	533.2	533.3	131.5	133.3

ds, drug substance.

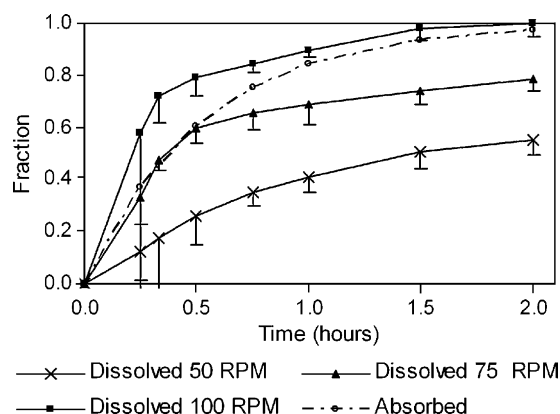


Fig. 2. Mean dissolution profiles of lopinavir from Kaletra® ( $n=8$ ) in 900 ml of 2.5% SLS as dissolution medium using basket in different rotation speeds compared with fraction absorbed using Wagner–Nelson method.

2.3%, pH 6.0. It is believed that if the dissolution of the drug from its dosage form is the rate-limiting step for its absorption, then it will never saturate the medium in the gastrointestinal gut [1].

##### 3.2.2. Dissolution profile of LPV—basket (USP Apparatus 1)

Using 900 ml of 2.5% SLS solution pH 6.0 as dissolution medium, three different rotation speeds were evaluated: 50, 75 and 100 rpm. Fig. 2 shows the mean dissolution profiles of LPV in Kaletra® capsules under these conditions ( $n=8$ ). At 50 rpm, the dissolution rate of LPV was too slow. Using 75 rpm, the *in vitro* dissolution profile was similar to the *in vivo* dissolution profile only at initial times. After 30 min, the dissolution rate was smaller than the absorption rate. At 100 rpm, unlike what was observed at 75 rpm, the dissolution rate of LPV up to 1 h was higher than the absorption rate. After this period, the dissolution rate was similar when compared to the absorption rate. Data at 15 or 20 min showed large R.S.D. (between 32 and 35%), which were attributed to differences in the opening times of the capsules. Afterward, R.S.D.s were smaller than 10%.

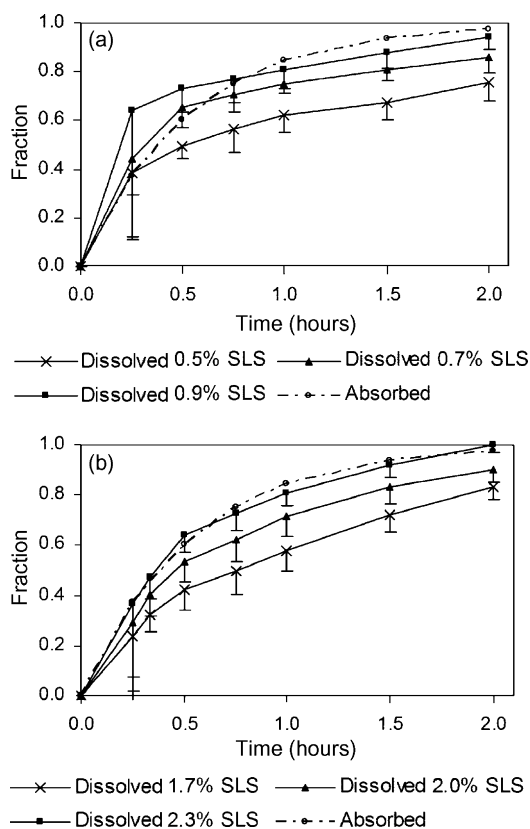
Under these conditions a poor correlation was established. Due to the higher or lower dissolution rate when compared to other *in vivo* data, other equipment was evaluated.

##### 3.2.3. Dissolution profiles for LPV—paddle (USP Apparatus 2)

In these dissolution studies, using 50 rpm and 900 ml of medium containing three different SLS concentrations in water at pH 6.0 (0.5, 0.7 and 0.9%, w/v) were tested. Each experiment was performed with eight capsules. Although Kaletra® capsules did not float in the dissolution media, sinkers were used to keep them aligned with the paddle axis [16,18,22]. Fig. 3(a) shows the mean dissolution profiles of LPV (Kaletra®). Using 0.5% of SLS solution, LPV showed a very low dissolution rate. Increasing the concentration to 0.7% SLS, the dissolution rate was similar when compared to the absorption rate only up to 45 min. Using 0.9% SLS, LPV showed very high dissolution rate up to 45 min. However, in both SLS concentrations (0.7 and 0.9%, w/v), the dissolution rate was lower when compared to the absorption rate after 45 min.

It is possible to observe that the dissolution rate of LPV increases with the increase on the SLS concentration. According to Shah et al. [7,23] mediums containing surfactants solubilize poorly water-soluble drugs similarly to micelles from bile salts and lecithin, and increase the dissolution rate comparable to a hydro-alcoholic medium without using alcohol.

However, when using 50 rpm it was not possible to establish a good IVIVC. In order to obtain a better correlation, the following adjustments in the dissolution method were tested: dissolution medium volume was increased from 900 to 1000 ml; SLS concen-



**Fig. 3.** Mean dissolution profiles of lopinavir from Kaletra® in three SLS concentrations using paddle at 50 rpm and 900 ml of dissolution medium (a) and paddle at 25 rpm and 1000 ml of dissolution medium (b), compared with fraction of drug absorbed (Wagner–Nelson method).

tration was changed and the rotation speed was reduced to 25 rpm. Three SLS concentrations were evaluated: 1.7, 2.0 and 2.3% and each assay was performed with 12 Kaletra® capsules. The rotation speed of 25 rpm is justifiable if it reflects better the *in vivo* performance [16–18].

The mean dissolution profiles of LPV in these conditions are shown in Fig. 3(b).

Data at 15 min from both experiments showed R.S.D. higher than 20% (between 21 and 31%) and thereafter R.S.D. were lower than 10%. It was possible to notice that the dissolution profile using 2.3% of SLS is similar to the *in vivo* absorption profile. The pH of the dissolution medium used is within physiological values as recommended for immediate release dosage forms [2,16,18]. There was no change in the pH of the dissolution medium before and after the test.

### 3.3. *In vitro*–*in vivo* correlation

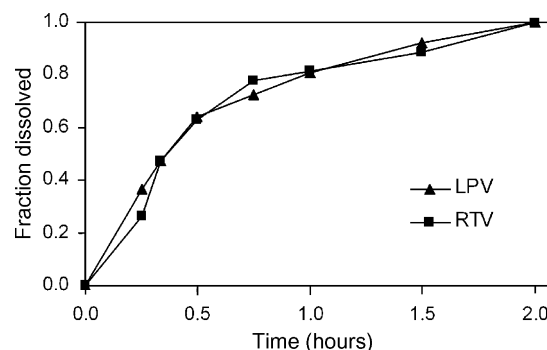
The linear regression analysis of the data demonstrated that the use of 1000 ml of dissolution medium with 2.3% SLS at pH 6.0 and paddle at 25 rpm produced the best IVIVC and a level-A correlation was established ( $r=0.997$ ). The resulting equation ( $FA = -0.0019 + 1.0074FD$ ) was used to back calculate FA in order to evaluate the accuracy of the model. The results are shown in Table 2. The level-A correlation is the highest correlation level possible, meaning that all the *in vivo* data points correlate well with the respective *in vitro* data points and thus one could be used to predict the other [2,3].

**Table 2**

Predicted fraction of lopinavir absorbed using the IVIVC equation ( $FA = -0.0019 + 1.0074FD$ )

Time (h)	FD	FA simulated	FA predicted	Error (%)
0.25	0.37	0.37	0.37	-1.4
0.33	0.47	0.46	0.47	2.4
0.50	0.64	0.60	0.64	6.1
0.75	0.72	0.75	0.73	-3.0
1.00	0.80	0.84	0.81	-4.0
1.50	0.92	0.94	0.92	-1.2
2.00	0.99	0.97	1.00	2.9

FA, fraction absorbed; FD, fraction dissolved.

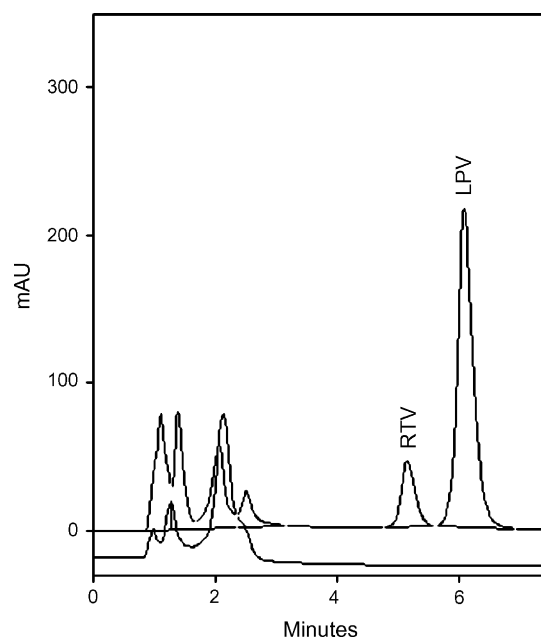


**Fig. 4.** Mean dissolution profiles of LPV and RTV from Kaletra® ( $n=12$ ) in 1000 ml of 2.3% SLS as dissolution medium using basket at 25 rpm.

### 3.4. Dissolution profile of RTV

The dissolution profile of RTV was similar when compared with LPV in the same conditions. The use of 2.3% SLS produced the best correlation for LPV (IVIVC) and in this condition the dissolution rate for RTV was similar to LPV (Fig. 4).

Although LPV is present in Kaletra® it does not contribute directly to antiviral activity but instead it inhibits CYP3A-mediated metabolism of RTV, improving its bioavailability [8–10].



**Fig. 5.** The specificity of the method shows peaks of RTV and LPV from Kaletra® (top) and placebo sample (bottom) both in dissolution medium.

**Table 3**  
Accuracy studies for lopinavir and ritonavir

Drug	Concentration added ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Concentration found ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) $\pm$ R.S.D. (%)	Recovery rate (%) ( $n=9$ )
Lopinavir	40	40.0 $\pm$ 0.7	99.4–100.7
	80	81.3 $\pm$ 1.9	99.5–103.0
	160	162.5 $\pm$ 1.8	100.1–103.6
Ritonavir	10	10.3 $\pm$ 1.7	99.2–102.5
	20	20.6 $\pm$ 1.3	101.3–103.9
	40	40.8 $\pm$ 1.3	100.5–102.9

**Table 4**  
Precision studies for lopinavir and ritonavir

Drug	Concentration added ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Intra-day ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) $\pm$ R.S.D. ( $n=6$ )	Intermediate precision ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) $\pm$ R.S.D. ( $n=3$ )
Lopinavir	40	40.3 $\pm$ 1.4	40.6 $\pm$ 0.6
	80	79.6 $\pm$ 1.2	80.8 $\pm$ 0.7
	160	161.3 $\pm$ 0.3	162.4 $\pm$ 0.7
Ritonavir	10	10.4 $\pm$ 1.7	10.0 $\pm$ 0.8
	20	20.3 $\pm$ 0.7	20.5 $\pm$ 0.8
	40	41.2 $\pm$ 1.3	41.5 $\pm$ 1.1

### 3.5. Validation of the *in vitro* dissolution profile

#### 3.5.1. Specificity

No chromatographic peak from the placebo formulation was observed with the same retention time for both LPV and RTV (Fig. 5). LPV and RTV purities were higher than 0.999 and were obtained using a PDA detector, indicating that no interferences were observed. According to the USP Pharmacopeial Forum [16], the lack of chromatographic peaks from the placebo formulation demonstrates the specificity of the method.

#### 3.5.2. Sample stability and standard solution

LPV and RTV were found to be stable under dissolution test conditions. The results demonstrated that sample and standard solutions remained at  $100.0 \pm 2.0\%$  over a period of 24 h.

#### 3.5.3. Linearity

LPV was linear in concentration range of 8 to 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The mean ( $\pm$ R.S.D.) values of slope and Y-intercept were 35,444 ( $\pm$ 0.68) and  $-26,252$  ( $\pm$ 8.94), respectively. The response for RTV was linear in concentration range of 5–50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with a slope of 28,256 ( $\pm$ 0.58) and the Y-intercept at  $-7022$  ( $\pm$ 5.42), respectively. The correlation coefficients were  $>0.999$  for both drugs. These results show there was a good correlation between the peak area and drugs concentration. The concentration range evaluated for both drugs included percentiles recommended for the dissolution test, from  $\pm 20\%$  below the lowest expected concentration to  $\pm 20\%$  above the highest expected concentration.

#### 3.5.4. Accuracy and precision

The accuracy was demonstrated by the recovery of known amounts of LPV and RTV to the dissolution vessels. Recoveries from 95.0 to 105.0% of the added amounts are recommended in dissolution tests [16,18]. The mean recovery percentages for three different days ranged from 99.2 to 103.9% for both drugs (Table 3), corroborating the accuracy of the method. The intra-day precision was evaluated at three different concentration levels. The intermediate precision was evaluated in the same solutions at different days. Values presented in Table 4 show the good precision of the method with R.S.D. lower than 2%.

## 4. Conclusions

A level-A *in vitro*–*in vivo* correlation was established for lopinavir soft gelatin capsules (Kaletra®). The *in vitro* dissolution profile for lopinavir was obtained using 1000 ml of dissolution medium containing 2.3% of sodium lauryl sulfate in water at pH 6.0, USP Apparatus 2 at 25 rpm and  $37 \pm 0.5$  °C. The equation that correlates fraction dissolved (FA) and fraction absorbed (FD) is:  $\text{FA} = -0.0019 + 1.0074\text{FD}$ . The validation results demonstrated that the *in vitro* dissolution method was accurate, precise, linear and specific. Both the HPLC analytical method and *in vitro* dissolution test were validated and could be used to evaluate the release profile of lopinavir soft gel capsules (Kaletra®).

## Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES, for the financial support of E. Donato, and Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brazil for providing LPV and RTV reference substances.

## References

- [1] H.M. Abdou, in: A.R. Gennaro (Ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp. 654–666.
- [2] FDA, Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations. Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1997.
- [3] V.R.S. Uppoor, J. Control. Release 72 (2001) 127–132.
- [4] M. Ashford, in: M.E. Aulton (Ed.), Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design, Churchill Livingstone, London, 2002, pp. 234–253.
- [5] FDA, Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1997.
- [6] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, Pharm. Res. 12 (1995) 413–420.
- [7] V.P. Shah, J.J. Konecny, R. Everett, B. McCullough, A.C. Noorizadeth, J.P. Skelly, Pharm. Res. 6 (1989) 612–618.
- [8] M.L. Sethi, in: D.A. Williams, T.L. Lemke (Eds.), Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002, pp. 967–975.
- [9] S. Raffanti, D.W. Hass, in: J.G. Hardman, L.R. Limbird (Eds.), Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica, McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2003, pp. 1012–1033.
- [10] Abbott Laboratories, Kaletra® Product Monograph, 2005, <http://www.rxabbott.com/PDF/Kaletrapi.pdr>.
- [11] D. Hörter, J.B. Dressman, Adv. Drug Deliv. Rev. 46 (2001) 75–87.
- [12] R.C. Rossi, C.L. Dias, E.M. Donato, L.A. Martins, A.M. Bergold, P.E. Fröhlich, Int. J. Pharm. 338 (2007) 119–124.
- [13] I. Oki, Y. Usami, M. Nakai, M. Sagisaka, H. Ito, K. Nagaoka, N. Maniya, K. Yamanaka, M. Utsumi, T. Kaneda, Biol. Pharm. Bull. 27 (2004) 261–265.
- [14] L. Shargel, S. Wu-Pong, A.B.C. Yu, Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, 5th ed., McGraw-Hill, New York, 2005.

- [15] E.M. Donato, C.L. Dias, R.C. Rossi, R.S. Valente, P.E. Fröhlich, A.M. Bergold, *Chromatographia* 63 (2006) 437–443.
- [16] USP Pharmacopeial Forum, *Pharmacopeial Previews* 30 (2004) 351–363.
- [17] ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1)*, International Conference on Harmonization, Geneva, 2005.
- [18] US Pharmacopoeia, 30th ed., NF-25 <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2007.
- [19] R.N. Gursoy, S. Benita, *Biomed. Pharmacother.* 58 (2004) 173–182.
- [20] D. Law, S.L. Krill, E.A. Schmitt, J.J. Fort, Y. Qiu, W. Wang, W.R. Porter, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1015–1025.
- [21] O. Launay, M. Tod, K. Louchahi, L. Belarbi, O. Bouchaud, N. Mémain, O. Petitjean, M. Robineau, L. Guillevin, O. Lortholary, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 632–634.
- [22] M. Kamba, Y. Seta, N. Takeda, T. Hamaura, A. Kusai, H. Nakane, K. Nishimura, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 99–109.
- [23] V.P. Shah, A. Noory, C. Noory, B. McCullough, S. Clarke, R. Everett, H. Navitsky, B.N. Srinivasan, D. Fortman, J.P. Skelly, *Int. J. Pharm.* 125 (1995) 99–106.





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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS  
FARMACÊUTICAS

Título: "Lopinavir/Ritonavir perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, estudos de estabilidade  
térmica e metodologia analítica"

Doutoranda: ELIANE MARIA DONATO

**PARECER**

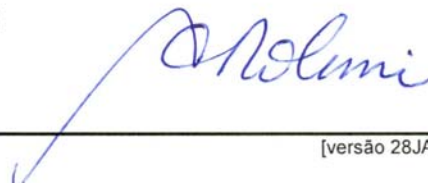
A tese de doutorado da acadêmica Eliane Maria Donato representa uma excelente contribuição científica, pois vários artigos já publicados em periódicos de alta relevância na área.

Apresenta uma adequada revisão utilizando literatura atual e expressiva.

Os dados apresentados de forma ordenada, trazem informações importantes, apresentando uma vasta contribuição, principalmente, na área biofarmacêutica.

Assim, pelo exposto o parecer é favorável a aprovação e reconhecimento da tese apresentada.

Profa. Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim  
Porto Alegre, 20 novembro 2008.







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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS

Título: "Lopinavir/Ritonavir perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica"

Doutoranda: ELIANE MARIA DONATO

PARECER

A tese de doutorado apresentada por Eliane Maria Donato tem por objetivos desenvolver métodos qualitativos para a identificação e avaliação da estabilidade de amoníacos Lopinavir/Ritonavir em cápsulas moles, desenvolver método de dissolução *in vitro* com base no comportamento *in vivo*, e identificar produto de degradação dos fármacos. O trabalho, inédito, traz importantes contribuições a uma linha de pesquisa do grupo, e a excelente redação e o conteúdo de metodologias e equipamentos adequados mostram-se compatíveis com o título proposto. Pelo exposto, sou de parecer favorável à aprovação da candidata.



Profa. Dr. Leticia Scherer Koester  
Porto Alegre, 26 de Novembro 2008.



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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS

Título: "Lopinavir/Ritonavir perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo*, estudos de estabilidade térmica e metodologia analítica"

Doutoranda: ELIANE MARIA DONATO

**PARECER**

O presente parecer refere-se a tese de Eliane Donato apresentada ao PPGCF.

Após análise cuidadosa do manuscrito opinamos que se trata de um trabalho de pesquisa de alto nível científico, em área atual e de grande interesse, bem redigido e acompanhado de um número considerável de referências bibliográficas. A tese apresenta boas impressões visuais que podem ser revistas após a defesa.

A doutoranda também demonstrou segurança em sua apresentação oral e conhecimentos sobre o tema durante a arguição.

Por estas razões expostas declaramos a mesma **APROVADA**.

Paulo Schneider

Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider  
Porto Alegre, 26 de novembro 2008.



**BIOGRAFIA**

---



## **DADOS PESSOAIS**

Nome: Eliane Maria Donato

Nascimento: 04/08/60

Naturalidade: Pejuçara-RS, Brasil

Filiação: Elda Lorenzon Donato e Manuel Domingos Donato

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

2004-2008     Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

2001-2003     Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

1989-1994     Farmacêutica Industrial pela Universidade Federal de Santa Maria - UFSM.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

1994 -1999    Responsável técnica pelo Controle de Qualidade de Medicamentos Veterinários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Laboratório Nacional Agropecuário - Porto Alegre/RS.

2000-2003     Assessora na análise de processos para registro de produtos farmacêuticos e fitoquímicos de uso veterinário. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Brasília – DF.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

DONATO, E. M., MARTINS, L. A., FRÖELICH, P. E., BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on in vivo data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 547 - 552, 2008.

DONATO, E. M., DIAS, C. L., ROSSI, R. C., VALENTE, R. S., FRÖELICH, P. E., BERGOLD, A. M. LC methods for studies on the stability of lopinavir and ritonavir in soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 63, p. 437 - 443, 2006.

DONATO, E. M., ZANOTTO, A. R., BERGOLD, A. M. CLAE-PI aplicada ao doseamento de vitaminas do complexo B em misturas: fundamentação e validação de métodos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 363 - 371, 2004.

ROSSI, R. C., DONATO, E. M., MARTINS, L. A., FRÖELICH, P. E., BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on in vivo data. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p.119 - 124, 2007.

DIAS, C. L., ROSSI, R. C., DONATO, E. M., MARTINS, L. A., FRÖELICH, P. E., BERGOLD, A. M. LC Determination of ritonavir, a HIV protease inhibitor, in soft gelatin capsules. *Chromatographia*, v. 62, p. 589 - 593, 2005.