

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

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA,
ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE
DO ANTI-RETROVIRAL FOSAMPRENAVIR**

ROCHELE CASSANTA ROSSI

PORTO ALEGRE, 2011.

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

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA,
ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE
DO ANTI-RETROVIRAL FOSAMPRENAVIR**

Tese apresentada por **Rochele Cassanta Rossi**
para obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2011.

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 07.01.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Eliane Maria Donato
Pontifícia Universidade Católica

Profa. Dr. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva
Universidade Federal do Pampa

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

R833v Rossi, Rochele Cassanta

Validação de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade do anti-retroviral fosamprenavir / Rochele Cassanta Rossi – Porto Alegre : UFRGS, 2011. – xvii, 197 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Fosamprenavir. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 3. Validação : Métodos de análise de fármacos. 4. Dissolução. 5. Estabilidade. I. Fröhlich, Pedro Eduardo. II. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Dedico esta minha conquista...

... aos meus pais Gabriel e Alvenir por terem lutado e se dedicado incondicional e incessantemente à nós, seus filhos. Guiando-nos e incentivando em cada choro, em cada queda, em cada vontade de desistir. Ensinando-nos que a queda, o choro e a dor, fazem parte da vida, mas que com Deus em nossos corações, com a união e o amor da família e com muita coragem, sempre superaremos as pedras do caminho, seguindo em busca dos nossos objetivos, que hoje, alcanço mais um deles;

... ao meu esposo, Luis, por todo o carinho, amor, compreensão e palavras de incentivo. Por estar sempre ao meu lado em todos os momentos;

... a minha filha Bibiana que desde nenê teve que aprender a superar minha ausência. A ti que és minha própria vida, não te ofereço somente esta conquista, mas também algo mais valioso, o exemplo de como lutar e superar os obstáculos da vida, para que tu possas alcançar as tuas próprias e inumeráveis conquistas, sempre colocando Deus em tua via sem O qual não há felicidade completa.

... a minha irmã e melhor amiga Rossana, por ser meu exemplo de coragem e determinação;

... ao meu irmão Rodrigo, por dispensar seu preciso tempo com a família para me ajudar com espectros, reações, análises, ... Muito deste trabalho devo a você, obrigada por tudo! A Silvane, Gabriel, Giovanni e ..., a vocês agradeço os momentos de alegria durante este período e a disposição por cuidar da minha amada filha nos momentos em que estive ausente.

Agradecimentos

Ao professor Pedro Eduardo Fröhlich, sinceros agradecimentos pela orientação, amizade e constante incentivo durante todas as etapas deste trabalho.

À professora Ana Maria Bergold, pelo convívio, amizade e esclarecimentos durante a realização deste trabalho.

Às colegas e amigas de Pós-Graduação Andréa, Carolina, Eliane e Lisiane, pela amizade sincera, apoio e cooperação.

Aos amigos do LAPPS, Sirlei, Marquinhos, Luiz, Andréia, César, Leonardo, Fernanda, Tâmara, Cristiane e Marcela pela amizade e convívio.

À bolsista Pâmela pela ajuda durante o transcorrer deste trabalho.

À amiga Rosselei Caiel e a professora Ionara Pizzuti por estarem sempre disponíveis em qualquer situação.

À Deus, por guiar todos os caminhos que percorri até aqui.

RESUMO

Fosamprenavir cálcico é o estér de fosfato do inibidor de protease amprenavir, aprovado pelo FDA em 2003. Considerando que não existe monografia disponível para este fármaco em nenhum código oficial, o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos para o controle de qualidade do fosamprenavir em comprimidos. Após a extração e purificação do fármaco, a partir dos comprimidos, o mesmo foi caracterizado utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{31}P e espectroscopia na região do infravermelho. Métodos por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) foram utilizados para a análise qualitativa do fármaco no produto acabado. A determinação quantitativa foi realizada através do desenvolvimento e validação dos métodos por UV, CLAE e EC. Os métodos quantitativos e qualitativos descritos neste trabalho demonstraram ser adequados para a determinação do fosamprenavir nos comprimidos. O ensaio de dissolução foi desenvolvido baseado em dados *in vivo*. Para esta formulação a melhor condição obtida foi: cestos a 75 rpm e 900 ml de HCl 0,01 M. Utilizando essas condições, uma correlação nível A foi estabelecida ($R^2 = 0,984$). A cinética de dissolução foi determinada utilizando métodos modelos-dependentes sendo o modelo de liberação proposto por Hixson-Crowell o mais adequado. O ensaio de dissolução foi validado e pode ser aplicado para avaliar o perfil de dissolução dos comprimidos contendo fosamprenavir. O estudo preliminar de estabilidade para os comprimidos contendo fosamprenavir frente a degradação ácida, alcalina, oxidativa, térmica e fotolítica mostrou a luz como o fator importante de degradação com uma cinética de primeira ordem.

Palavras-chave: Fosamprenavir, ensaio de dissolução, cromatografia líquida de alta eficiência, estudo de estabilidade.

ABSTRACT

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY, DISSOLUTION TEST AND STABILITY STUDY OF FOSAMPRENAVIR

Fosamprenavir calcium is the phosphate ester prodrug of the human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor amprenavir. Fosamprenavir was first approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2003. There is no monograph available for this drug in any official code. Thus, the objective of this study was to validate analytical methods for quality control of fosamprenavir tablets. Due to the lack of fosamprenavir reference standard, it was necessary to extract the drug from the tablets. Characterization was carried out by ^1H , ^{13}C -ATP and ^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopy (IR). Methods using thin-layer chromatography, ultraviolet spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) were performed for qualitative analysis. The quantitative determination was carried out through the development and validation of ultraviolet spectroscopy, HPLC and CE methods. The quantitative and qualitative methods described in this study demonstrated to be adequate to the determination of fosamprenavir in tablets. The dissolution test was developed based on *in vivo* data. The dissolution conditions selected provided a significant linear relationship between fraction of drug absorbed versus fraction of drugs dissolved ($R^2= 0.984$) and a level A IVIVC was established. The discriminatory power of the dissolution method was challenged. The kinetics of dissolution was determined using model-dependent methods. The dissolution profiles were better described by Hixson-Crowell model. The dissolution test was validated and can be used to evaluate the dissolution profile of fosamprenavir tablets. Forced degradation of fosamprenavir tablets after acid, alkaline, oxidative, thermal, photolytic conditions showed that light is the major concern. The photodegradation kinetics was determined, indicating a first order process.

Keywords: Fosamprenavir, dissolution test, high-performance liquid chromatography, stability studies.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 4.1 — Condições cromatográficas para o doseamento do FPV por CLAE.....	33
Quadro 4.2 — Programação do gradiente.....	34
Quadro 4.3 — Condições analíticas utilizadas para a identificação e quantificação do FPV por EC.....	35
Quadro 5.1 — Métodos utilizados para a determinação simultânea de anti-retrovirais, por cromatografia a líquido de alta eficiência, em plasma humano.....	56
Quadro 6.1 — Condições cromatográficas para o doseamento do fosamprenavir por CLAE.....	125
Quadro 6.2 — Dados farmacocinéticos médios do fosamprenavir.....	130
Tabela 3.1 — Dados Epidemiológicos da SIDA.....	11
Tabela 3.2 — Medicamentos anti-retrovirais.....	15
Tabela 3.3 — Parâmetros farmacocinéticos do fosamprenavir em adultos.....	21
Tabela 3.4 — Posologia para o fosamprenavir.....	22
Tabela 4.1 — Frequências de absorção das principais bandas no espectro de IV do produto de extração.....	37
Tabela 4.2 — Atribuições do espectro de RMN ¹ H do produto de extração em cloreto de deutério.....	39
Tabela 4.3 — Atribuições do espectro de RMN ¹³ C-APT do produto de extração.....	40
Tabela 5.1 — Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.....	64
Tabela 5.2 — Parâmetros cromatográficos relativos ao cromatograma da Figura 2.1..	67
Tabela 5.3 — Valores recomendados para os parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.....	68
Tabela 5.4 — Resultados das análises de degradação forçada utilizando CLAE.....	72
Tabela 5.5 — Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do fosamprenavir.....	73
Tabela 5.6 — Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por CLAE, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e inter-dias.....	74

Tabela 5.7 — Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o fosamprenavir.....	75
Tabela 5.8 — Avaliação da robustez do método CLAE para fosamprenavir.....	76
Tabela 5.9 — Preparo das soluções para o teste de recuperação por UV.....	80
Tabela 5.10 — Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do fosamprenavir.....	82
Tabela 5.11 — Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por UV, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e inter-dias.....	83
Tabela 5.12 — Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por UV para o fosamprenavir.....	84
Tabela 5.13 — Preparo das soluções para o teste de recuperação por EC.....	90
Tabela 5.14 — Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por EC, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e inter-dias.....	93
Tabela 5.15 — Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por EC para o fosamprenavir.....	94
Tabela 5.16 — Resultados experimentais obtidos para o doseamento do fosamprenavir, pelos métodos propostos.....	95
Tabela 5.17 — Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos do fosamprenavir comprimidos.....	95
Tabela 6.1 — Tipos de equipamentos preconizados.....	114
Tabela 6.2 — Percentagem dissolvida de fosamprenavir SQR em diferentes meios de dissolução.....	132
Tabela 6.3 — Análise de regressão para a CIVIV.....	138
Tabela 6.4 — Condições selecionadas para o ensaio de perfil de dissolução de comprimidos de Telzir®.....	140
Tabela 6.5 — Estabilidade do fosamprenavir nas condições do ensaio de dissolução.	140
Tabela 6.6 — Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do fosamprenavir.....	143
Tabela 6.7 — Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o fosamprenavir.....	144
Tabela 6.8 — Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por CLAE, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.....	145

Tabela 6.9 — Coeficiente de determinação (R^2) e Critério de Seleção do Modelo (MSC) dos modelos matemáticos.....	146
Tabela 6.10 — Comparação dos perfis de dissolução utilizando os fatores de diferença (f_1) e semelhança (f_2).....	148
Tabela 7.1 — Parâmetros da cinética de zero, primeira e de segunda ordem.....	182
Tabela 7.2 — Percentagens obtidas após a exposição dos comprimidos ao calor.....	191
Tabela 7.3 — Valores dos estudos de fotoestabilidade para o fosamprenavir, obtidos por CLAE, para as três diferentes ordens de reações.....	194

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 — Morfologia do VIH.....	13
Figura 3.2 — Grupos funcionais envolvidos no desenvolvimento de pró-fármacos.....	17
Figura 3.3 — Síntese do GW433908.....	19
Figura 4.1 — Espectro de absorção na região do IV do produto de extração.....	36
Figura 4.2 — Espectro de RMN ¹ H do produto extraído.....	38
Figura 4.3 — Espectro de RMN ¹³ C-ATP do produto extraído.....	40
Figura 4.4 — Espectro de RMN ³¹ P do produto extraído.....	42
Figura 4.5 — CCD do fosamprenavir SQR e amostra, obtida utilizando placa gel de sílica 60 F ₂₅₄ e fase móvel constituída de metanol:acetato de etila: hidróxido de amônio 6 M (2,5:5,5:2 V/V/V) e revelação com lâmpada de UV 254 nm.....	44
Figura 4.6 — Espectros sobrepostos na região do UV da solução fosamprenavir SQR (A) e amostra dos comprimidos (B) em metanol a 15 µg/ml.....	46
Figura 4.7 — Cromatogramas da solução de fosamprenavir SQR (a) e da amostra dos comprimidos (b). Condições cromatográficas: coluna Vertical C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio: acetonitrila; fluxo de 1,2 ml/min λ= 264 nm.....	47
Figura 4.8 — Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de fosamprenavir SQR (a) e amostra dos comprimidos (b).....	47
Figura 5.1 — Cromatogramas da solução de fosamprenavir SQR (50 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Vertical C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio: acetonitrila; fluxo de 1,2 ml/min.; λ= 264 nm.....	67
Figura 5.2 — Cromatogramas obtidos do FPV (40,0 µg mL ⁻¹)	70
Figura 5.3 — Representação gráfica da curva padrão média do fosamprenavir SQR obtida por CLAE.....	72
Figura 5.4 — Espectro de absorção na região do UV da solução placebo e da solução fosamprenavir SQR em metanol, na faixa de 200 a 400 nm.....	81
Figura 5.5 — Representação gráfica da curva padrão do fosamprenavir obtida por UV.....	82
Figura 5.6 — Reação da fluorescamina com uma amina livre.....	91
Figura 5.7 — Eletroferograma obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de fosamprenavir SQR (a) e solução placebo (b), na concentração de (4 µM).....	92
Figura 5.8 — Representação gráfica da curva padrão do fosamprenavir obtida por EC.....	93

Figura 6.1 — Percentagem da dose absorvida versus tempo (h) de comprimidos de fosamprenavir (Telzir [®] , 700 mg) utilizando o método de Wagner-Nelson.....	131
Figura 6.2 — Perfil de dissolução médio de comprimidos de Telzir [®] (n= 6) nos meios de dissolução HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio utilizando equipamento USP 2 a 50 rpm.....	134
Figura 6.3 — Formação de cone sobre a forma farmacêutica.....	135
Figura 6.4 — Perfil de dissolução médio de comprimidos de Telzir [®] (n= 6) nos meios de dissolução HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio utilizando equipamento USP 2 a 75 rpm.....	136
Figura 6.5 — Perfil de dissolução médio de comprimidos de Telzir [®] (n= 6) nos meios de dissolução HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio utilizando equipamento USP 1 a 75 rpm.....	137
Figura 6.6 — Curva média da percentagem da dose absorvida <i>versus</i> a percentagem da dose dissolvida para os comprimidos de Telzir [®] . A melhor linha de ajuste é demonstrada para cada meio de dissolução....	138
Figura 6.7 — Especificidade: solução de fosamprenavir SQR e solução dos excipientes Condições cromatográficas: coluna vertical C ₁₈ (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 4,5) : ACN (70:30); fluxo de 1,2 ml/min.; λ= 264 nm.....	141
Figura 6.8 — Representação gráfica da curva padrão média do fosamprenavir obtida por CLAE. Condições cromatográficas: coluna vertical C ₁₈ (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 4,5) : ACN (70:30); fluxo de 1,2 ml/min.; λ= 264 nm.....	142
Figura 6.9 — Alterações no perfil de dissolução dos comprimidos de fosamprenavir após o armazenamento.....	147
Figura 7.1 — Cromatogramas obtidos do FPV.....	188
Figura 7.2 — Provável rota de degradação do fosamprenavir em meio ácido e básico.....	189
Figura 7.3 — Provável rota de degradação do fosamprenavir em meio oxidativo.....	190
Figura 7.4 — Alterações no perfil de dissolução dos comprimidos de fosamprenavir após estudo de estabilidade frente ao calor.....	192
Figura 7.5 — Cromatogramas da solução amostra dos comprimidos contendo fosamprenavir submetidas a fotólise 254 nm.....	193
Figura 7.6 — Representação gráfica da degradação da solução amostra dos comprimidos contendo fosamprenavir obtida por CLAE considerando reação de primeira ordem.....	195

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

ADN – ácido desoxirribonucléico

ANOVA – análise de variância

ARN – ácido ribonucléico

ASC – área sob a curva

CIVIV – correlação *in vitro-in vivo*

DAD – detector de arranjo de diodos

DPR – desvio padrão relativo

FA – fração absorvida

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MeOH – metanol

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SCB – sistema de classificação biofarmacêutica

SQR – substância química de referência

TR – transcriptase reversa

VIH – vírus da imunodeficiência humana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1 Epidemiologia.....	11
3.2 Vírus da Imunodeficiência Humana.....	12
3.3 Morfologia e Ciclo de Replicação Viral.....	12
3.4 Medicamentos Anti-retrovirais.....	14
3.5 Fosamprenavir.....	16
3.5.1 Síntese.....	18
3.5.2 Mecanismo de ação.....	19
3.5.3 Propriedades físico-químicas.....	20
3.5.4 Farmacocinética.....	20
3.5.5 Posologia.....	22
3.5.6 Contra-indicações.....	22
3.5.7 Efeitos adversos.....	23
3.6 Referências.....	24
CAPÍTULO I — Análise qualitativa do Fosamprenavir SQR e comprimidos revestidos.....	27
4.1 Introdução.....	29
4.2 Material e Métodos.....	30
4.2.1 Produto farmacêutico.....	30
4.2.2 Extração do fármaco da formulação.....	30
4.2.3 Caracterização do produto de extração.....	31
4.2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	31
4.2.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	31
4.2.3.3 Determinação do ponto de fusão.....	31
4.2.4 Análise qualitativa.....	31
4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada.....	32
4.2.4.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	33
4.2.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
4.2.4.4 Eletroforese Capilar.....	34
4.3 Resultados e Discussão.....	36
4.3.1 Caracterização do produto de extração.....	36
4.3.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	36
4.3.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	38
4.3.1.3 Determinação do ponto de fusão.....	43
4.3.2 Análise qualitativa.....	44
4.3.2.1 Cromatografia em camada delgada.....	44
4.3.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	45
4.3.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	46

4.3.2.4 Eletroforese capilar.....	47
4.4 Conclusões.....	49
4.5 Referências.....	50
CAPÍTULO II — Análise quantitativa do fosamprenavir comprimidos.....	51
5.1 Introdução.....	53
5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	55
5.2.1 Revisão.....	55
5.2.1.1 Determinações quantitativas.....	56
5.2.2 Material e métodos.....	58
5.2.2.1 Preparo das soluções.....	58
5.2.2.2 Validação do método	58
5.2.2.2.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	59
5.2.2.2.2 Especificidade	59
5.2.2.2.3 Linearidade.....	62
5.2.2.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	63
5.2.2.2.5 Exatidão	63
5.2.2.2.6 Precisão.....	65
5.2.2.2.7 Robustez.....	65
5.2.3 Resultados e discussão.....	66
5.2.3.1 Validação do método	66
5.2.3.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	68
5.2.3.1.2 Especificidade.....	69
5.2.3.1.3 Linearidade.....	72
5.2.3.1.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	73
5.2.3.1.5 Precisão.....	74
5.2.3.1.6 Exatidão.....	75
5.2.3.1.7 Robustez.....	76
5.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	77
5.3.1 Revisão.....	77
5.3.2.1 Especificidade.....	78
5.3.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	78
5.3.2.3 Linearidade.....	79
5.3.2.4 Precisão.....	79
5.3.2.5 Exatidão	80
5.3.3 Resultados e discussão.....	81
5.3.3.1.1 Especificidade.....	81
5.3.3.1.2 Linearidade.....	81
5.3.3.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	83
5.3.3.1.4 Precisão.....	83
5.3.3.1.5 Exatidão.....	84
5.4 Eletroforese Capilar.....	85
5.4.1 Revisão.....	85
5.4.2 Material e Métodos.....	87
5.4.2.1 Preparo das soluções.....	87

5.4.2.2 Especificidade.....	88
5.4.2.3 Linearidade.....	88
5.4.2.4 Precisão.....	89
5.4.2.5 Exatidão.....	89
5.4.3 Resultados e Discussão.....	91
5.4.3.1 Derivatização.....	91
5.4.3.2 Especificidade.....	92
5.4.3.3 Linearidade.....	93
5.4.3.4 Precisão.....	93
5.4.3.5 Exatidão.....	94
5.5 Análise comparativa dos métodos.....	95
5.5.1 Resultados.....	95
5.5.2 Discussão.....	96
5.6 Conclusões.....	97
5.7 Referências.....	98

CAPÍTULO III — Desenvolvimento e validação de método de dissolução para fosamprenavir comprimidos, baseado em dados *in vivo*.....

6.1 Introdução.....	87
6.2 Revisão.....	88
6.2.1 Dissolução.....	88
6.2.1.1 Dissolução e absorção.....	88
6.2.1.2 Fatores que afetam a velocidade de dissolução <i>in vitro</i>	89
6.2.1.3 Tamanho da partícula.....	90
6.2.1.4 Surfactantes.....	90
6.2.1.5 pH.....	91
6.2.1.6 Velocidade de agitação.....	92
6.2.1.7 Natureza química	93
6.2.2 Ensaio de dissolução.....	94
6.2.3 Especificações de dissolução.....	96
6.2.4 Tipos de equipamentos.....	97
6.2.5 Comparação de perfis de dissolução.....	98
6.2.6 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	99
6.2.6.1 Níveis de correlação.....	99
6.2.7 Cinética de dissolução.....	101
6.2.8 Poder discriminatório do método.....	105
6.3 Material e métodos.....	106
6.3.1 Estudo <i>in vivo</i>	106
6.3.1.1 Fração da dose absorvida.....	106
6.3.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	107
6.3.2.1 Equipamento de dissolução.....	107
6.3.2.2 Determinação da solubilidade do fosamprenavir em diferentes meios....	108
6.3.2.3 Condições do ensaio de dissolução.....	108
6.3.2.4 Estabilidade do fosamprenavir nas condições do ensaio.....	108
6.3.3 Validação do método de dissolução.....	109
6.3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	109
6.3.3.1.1 Especificidade.....	110
6.3.3.1.2 Linearidade.....	110
6.3.3.1.3 Precisão e exatidão.....	111
6.3.4 Cinética de dissolução.....	111

6.3.5 Poder discriminatório do método.....	112
6.3.5.1 Comparação do perfil de dissolução.....	112
6.4 Resultados e discussão.....	114
6.4.1 Estudo <i>in vivo</i>	114
6.4.1.1 Modelagem matemática.....	114
6.4.1.2 Fração absorvida da dose.....	115
6.4.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	116
6.4.2.1 Determinação da solubilidade do fosamprenavir em diferentes meios....	116
6.4.2.2 Desenvolvimento do teste de dissolução.....	117
6.4.2.3 Estabilidade do fosamprenavir nas condições do ensaio.....	124
6.4.3 Validação do método de dissolução.....	124
6.4.3.1 Especificidade.....	125
6.4.3.2 Linearidade.....	126
6.4.3.3 Exatidão.....	127
6.4.3.4 Precisão.....	128
6.4.4 Cinética de dissolução.....	129
6.4.5 Poder discriminatório do método.....	130
6.4.5.1 Comparação do perfil de dissolução.....	131
6.5 Conclusões.....	133
6.6 Referências.....	134
CAPÍTULO IV — Estudo de estabilidade.....	179
7.1 Introdução.....	181
7.2 Revisão.....	182
7.2.1 Estudo preliminar de estabilidade.....	182
7.2.2 Determinação de cinética de degradação.....	183
7.2.3 Estabilidade de inibidores de protease.....	183
7.3 Material e métodos.....	185
7.3.1 Estudo preliminar de estabilidade.....	185
7.3.2 Estudo de estabilidade acelerada.....	186
7.3.3 Estudo da cinética de fotodegradação.....	187
7.3.3.1 Preparo da solução amostra.....	187
7.3.3.2 Avaliação da cinética de degradação.....	187
7.4 Resultados e discussão.....	188
7.4.1 Estudo preliminar de estabilidade.....	188
7.4.2 Estudo de estabilidade acelerada.....	191
7.4.3 Avaliação da cinética de fotodegradação.....	193
7.5 Conclusões.....	196
7.6 Referências.....	197

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) representa um dos maiores desafios já enfrentados pelos profissionais de saúde pública. No mundo, cerca de 33,2 milhões de pessoas já foram infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (UNAIDS/WHO, 2009). No Brasil, já foram notificados 462.237 casos de SIDA, sendo 323.069 no Sudeste, 104.671 no Sul, 64.706 no Nordeste, 31.011 no Centro Oeste e 21.389 no Norte (DST-AIDS, 2009).

Com a introdução da terapia anti-retroviral combinada como padrão de qualidade no tratamento das pessoas portadoras do VIH, a adesão a esquemas terapêuticos com múltiplos fármacos tornou-se fundamental no manejo clínico da doença (CHEQUER *et al.*, 2004; HOFFMANN *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, foi observada uma importante diminuição das internações hospitalares, das ocorrências de complicações oportunistas e da mortalidade associada ao VIH em diversos países. A infecção pelo VIH passou a ser vista como uma doença de caráter evolutivo crônico e potencialmente controlável. Embora isto esteja relacionado a diversos fatores de melhoria no cuidado clínico e a alguns aspectos epidemiológicos, o papel da terapia combinada, particularmente com o advento dos inibidores de protease, foi fundamental (CHEQUER *et al.*, 2004; HOFFMANN *et al.*, 2007).

O fosamprenavir é um medicamento anti-retroviral pertencente à classe dos inibidores de protease. Foi aprovado pelo FDA em outubro de 2003. No Brasil, começou a ser distribuído em agosto de 2007 em substituição ao amprenavir (AGENERASE[®]). É sintetizado pelo laboratório GlaxoSmithKline e comercializado nas formas farmacêuticas comprimidos e solução oral, ambos sob o nome de TELZIR[®] (FDA, 2010).

Embora aprovado e comercializado há quase cinco anos, não foram encontrados artigos referentes a dados físico-químicos, metodologia analítica para controle de qualidade e estudos de estabilidade do fosamprenavir.

Desta forma, a presente proposta de tese tem por objetivo desenvolver métodos analíticos qualitativos e quantitativos que possibilitem o controle de qualidade do anti-retroviral fosamprenavir na forma farmacêutica comprimidos, avaliar fatores que possam provocar alterações e/ou interferir na sua estabilidade e avaliar seu perfil de dissolução *in vitro* baseado em dados *in vivo*.

2. OBJETIVOS

A presente tese tem como objetivo geral desenvolver e validar metodologia analítica para o controle de qualidade do anti-retroviral fosamprenavir, simular o perfil de dissolução *in vitro* baseado nos dados *in vivo* e realizar estudo de estabilidade, para a forma farmacêutica comprimidos. Desta forma, o presente trabalho encontra-se dividido em quatro capítulos, tendo como objetivos específicos:

- Caracterizar a SQR do fosamprenavir através do emprego de espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RNM) de ^1H , ^{13}C e ^{31}P . Para o produto acabado (comprimidos revestidos), realizar sua identificação através da cromatografia em camada delgada (CCD), espectroscopia na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);
- Desenvolver e validar métodos analíticos empregando a espectroscopia na região do ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar para a quantificação do fosamprenavir na forma farmacêutica comprimidos;
- Desenvolver e validar ensaio de dissolução *in vitro* para os comprimidos contendo fosamprenavir, baseado em dados *in vivo*, avaliar o poder discriminatório do método e determinar sua cinética de dissolução;
- Avaliar a estabilidade do fosamprenavir comprimidos e determinar a cinética de fotodegradação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EPIDEMIOLOGIA

A epidemia de SIDA é um dos maiores desafios já enfrentados pelos profissionais da saúde. Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde, estima-se que 33,4 milhões de pessoas no mundo já foram infectadas pelo VIH (Tabela 3.1) (UNAIDS/WHO, 2009). No Brasil, desde a identificação do primeiro caso da SIDA, em 1980, até junho de 2008, foram identificados cerca de 506 mil casos da doença. Do total de notificações, cerca de 80% estão concentrados nas regiões Sudeste e Sul (DST-AIDS, 2009).

Atualmente, a SIDA já pode ser considerada uma doença crônica, pois uma pessoa infectada pelo VIH pode viver com o vírus por um longo período sem apresentar nenhum sintoma ou sinal. Essa condição de melhoria da qualidade de vida deve-se aos avanços tecnológicos e às pesquisas que propiciam o desenvolvimento de medicamentos cada vez mais eficazes (CHEQUER *et al.*, 2004).

Tabela 3.1 – Dados Epidemiológicos da SIDA*.

	Adultos e crianças infectadas	Novas infecções em 2008	Mortes em 2008 por SIDA
África Subsaariana	22,4 milhões	1,9 milhões	1,4 milhões
Sul e Sudeste da Ásia	3,8 milhões	280 mil	240 mil
Europa Oriental e Ásia Central	1,5 milhões	110 mil	87 mil
América Latina	2,0 milhões	170 mil	77 mil
Leste da Ásia	850 mil	75 mil	59 mil
Norte da África e Metade Leste	310 mil	35 mil	20 mil
América do Norte	1,4 milhões	55 mil	25 mil
Caribe	240 mil	20 mil	12 mil
Europa Ocidental e Central	830 mil	30 mil	13 mil
Oceania	59 mil	39 mil	2 mil
Total	33,4 milhões	2,7 milhões	2 milhões

*Adaptado de <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2010>. Acessado em 06/02/2010.

3.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

A SIDA é uma doença que se manifesta após a infecção do organismo humano pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). O VIH é um retrovírus que atua infectando linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, comprometendo tanto o sistema nervoso central quanto o sistema imunológico (RAFFANTI & HAAS, 2008).

Dentre os linfócitos T existe uma classe denominada T4 (T CD4+), que tem um papel de extrema importância no desencadear da resposta imunitária e na coordenação dessa mesma resposta. Desta forma, as células mais susceptíveis à invasão pelo VIH são aquelas que apresentam, na superfície de sua membrana celular, receptores primários CD4. Os linfócitos T, por apresentarem elevadas concentrações desses receptores, constituem as principais células-alvo do VIH. Além dos linfócitos T, outras células podem ser infectadas, como macrófagos e monócitos, incluindo a micróglia do sistema nervoso central, as células dendríticas foliculares dos linfonodos e as células de Langerhans da pele (KATZUNG, 2001; RAFFANTI & HAAS, 2008).

3.3 MORFOLOGIA E CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Os retrovírus são constituídos por moléculas de ácido ribonucléico (ARN) que, através da enzima transcriptase reversa, são capazes de replicar seu genoma de ARN em uma fita dupla de ácido desoxirribonucléico (ADN) integrando-se, assim, ao genoma da célula hospedeira (RANG *et al.*, 2004).

O mapa genético do VIH mostra três regiões principais: a região GAG p55, que codifica as proteínas estruturais internas p17 (matriz), p24 (capsídeo) e p7 (núcleo capsídeo); a região GAG-POL p160, que codifica a protease (p11), transcriptase reversa (p66/p51, RT) e integrase (p31, IN); e a região env,

responsável pela codificação das proteínas do envoltório, glicoproteínas — gp120 e gp41 (FRANKEL & YOUNG, 1998).

Internamente às glicoproteínas de superfície (gp120 e gp41) e à membrana de lipídios, a proteína p17 completa o envelope viral. O cerne ou capsídeo viral são envolvidos pela proteína GAG p24 e no seu interior há duas cópias de RNA genômico de mono-fita (Figura 3.1) (FRANKEL & YOUNG, 1998).

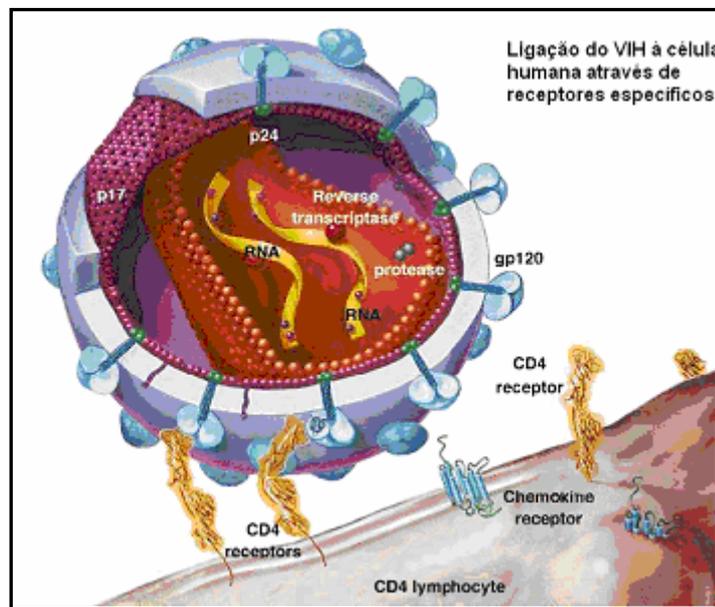


Figura 3.1 - Morfologia do VIH (adaptado de www.bio.davidson.edu/.../Cobain/geneprotein.html)

A etapa inicial da replicação viral envolve ligação e fusão de membranas. O VIH penetra na célula através de interações entre glicoproteínas do envelope do vírus (gp41 e gp120) e receptores específicos da célula hospedeira (CD4). Após a ligação à membrana celular, a proteína gp120 dissocia-se da proteína gp41, que passa por modificações conformacionais, promovendo a fusão vírus-célula e, assim, permitindo a entrada do capsídeo na célula hospedeira (GUBERT, 2004; PERVES *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2004). Após a fusão, ocorre a transcrição reversa mediada pela enzima transcriptase

reversa (TR), que promove a síntese de uma cópia de ADN a partir do ARN viral. A TR atua também como polimerase de ADN, produzindo uma segunda cadeia de ADN. A dupla fita de ADN formada penetra no núcleo da célula hospedeira através de poros na membrana nuclear. Por ação da enzima integrase, a cadeia de ADN é integrada ao genoma da célula hospedeira (RAFFANTI & HAAS, 2008; PERVES *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Proteínas virais são produzidas utilizando os constituintes celulares da célula hospedeira. Inicialmente, apenas as proteínas regulatórias (Tat, Ver) e proteínas acessórias (Nef, Vif e Vpr) são sintetizadas, sendo as proteínas estruturais e o ARN genômico sintetizados posteriormente. O vírus é liberado por brotamento e, durante ou após o brotamento, partículas virais imaturas passam por um processo de maturação. Nesta etapa, a enzima protease cliva e estrutura as proteínas virais (GAG e GAG-POL), tornando a partícula viral madura e capaz de infectar uma nova célula (PERVES *et al.*, 2003; GUBERT, 2004; RANG *et al.*, 2004).

3.4 MEDICAMENTOS ANTI-RETROVIRAIS

A infecção pandêmica pelo VIH levou à intensa pesquisa em busca de agentes antivirais mais potentes para controlar a doença, com melhores perfis farmacocinéticos e diminuição dos efeitos colaterais (GUBERT, 2004). Atualmente, seis diferentes classes de fármacos têm se mostrado eficazes no tratamento da doença causada pelo VIH, atuando em diferentes etapas do ciclo de replicação viral (Tabela 3.2) (FDA, 2010):

- Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTRs);
- Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR);
- Inibidores de protease (IP);
- Inibidores de fusão (IF);
- Inibidores de entrada antagonista do co-receptor CCR5 (IE);
- Inibidores da Integrase (II).

Tabela 3.2 – Medicamentos anti-retrovirais (FDA, 2010).

Nome Comercial	Abreviatura	Fármaco	Fabricante
<i>INTRs</i>			
Combivir™	CBV	AZT+3TC	GSK
Emtriva™	FTC	Entricitabina	Gilead
Epivir™	3TC	Lamivudina	GSK
HIVID™	ddC	Zalcitabina	Roche
Kivexa/Epzicom™	KVX	3TC+ABC	GSK
Retrovir™	AZT	Zidovudina	GSK
Trizivir™	TZV	AZT+3TC+ABC	GSK
Truvada™	TVD	FTC+TDF	Gilead
Videx™	ddI	Didanosina	BMS
Viread™	TDF	Tenofovir	Gilead
Zerit™	d4T	Estavudina	BMS
Ziagen™	ABC	Abacavir	GSK
<i>INNTR</i>			
Intelence	—	Etravirine	Tibotec
Rescriptor™	DLV	Delavirfina	Pfizer
Sustiva/Stocrin™	EFV	Efavirenz	BMS/MSD
Viramune™	NVP	Nevirapina	Boehringer
<i>IP</i>			
Aptivus™	TPV	Tipranavir	Boehringer
Agenerase™	APV	Amprenavir	GSK
Crixivan™	IDV	Indinavir	MSD
Invirase 500™	SQV	Saquinavir	Roche
Kaletra™	LPV	Lopinavir/ritonavir	Abbott
Norvir™	RTV	Ritonavir	Abbott
Reyataz™	ATV	Atazanavir	BMS
Prezista	DRV	Darunavir	Tibotec
Telzir/Lexiva™	FPV	Fosamprenavir	GSK
Viracept™	NFV	Nelfinavir	Roche/Pfizer
<i>IF</i>			
Fuzeon	T-20	Enfuvirtida	Roche
<i>IE</i>			
Celsentri/Selzentry™	MVC	Maraviroc	Pfizer
<i>II</i>			
Isentress	RGV	Raltegravir	Merck & Co., Inc.

3.5 FOSAMPRENAVIR

O desenvolvimento de novos fármacos tem sido uma das áreas de pesquisa mais concorridas nas últimas décadas. A aplicação de tecnologias modernas pelas indústrias farmacêuticas, tal como a síntese combinatória, viabilizou a rápida construção de coleções combinatórias, preparadas por síntese paralela ou na forma de mistura, de centenas ou milhares de compostos/dia, na tentativa de maximizar a relação tempo-produção (STELLA & NTI-ADDAE, 2007; RAUTIO *et al.*, 2008). Contudo, estima-se que 40% dessas novas entidades químicas (New Chemical Entities, NMEs) sejam fármacos poucos solúveis (solubilidade < 10 μ M) (LIPINSKI *et al.*, 2001).

A descoberta desses compostos pouco solúveis tem se tornado um problema quando se trata de obter uma dissolução satisfatória, necessária para garantir uma boa biodisponibilidade. Na tentativa de se aumentar a solubilidade desses fármacos, diversas abordagens são utilizadas, como a de formulação, através da redução do tamanho da partícula pela micronização, formação de nanosuspensões, uso de agentes complexantes (ciclodextrinas) e solubilizantes (AULTON, 2005; RAUTIO *et al.*, 2008).

Outra abordagem efetiva para aumentar a solubilidade aquosa é converter a substância ativa em um pró-fármaco solúvel. A utilização de pró-fármacos solúveis é uma estratégia que possibilita melhora nas propriedades físico-químicas, biofarmacêuticas e farmacocinéticas de compostos farmacologicamente potentes (AULTON, 2005; RAUTIO *et al.*, 2008). Entre os grupos funcionais mais utilizados no desenvolvimento de pró-fármacos estão os grupos carboxila, hidroxila, amina, fosfato e carbonila. Os pró-fármacos tipicamente produzidos por modificação desses grupos são ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas, fosfatos e oximas (Figura 3.2) (CHIN & FERREIRA, 1999; RAUTIO *et al.*, 2008).

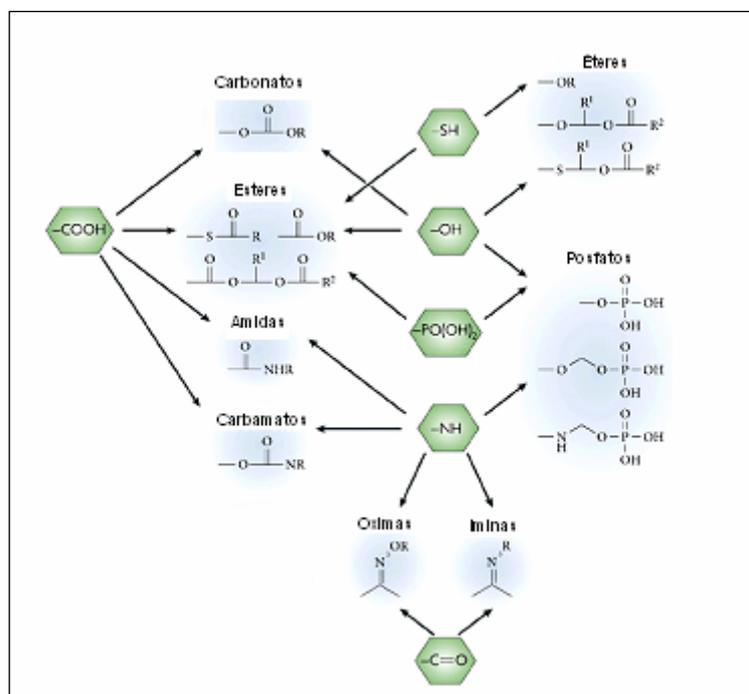


Figura 3.2 – Grupos funcionais envolvidos no desenvolvimento de pró-fármacos (adaptado de RAUTIO *et al.*, 2008).

O pró-fármaco fosamprenavir (Telzir[®]) é um sal cálcico do éster de fosfato do inibidor de protease amprenavir (Agenerase[®]), sintetizado pelas indústrias Vertex Pharmaceutical (VX-175) e GlaxoSmithKline (GW433908). Os pró-fármacos que contêm grupos ésteres de fosfato são projetados a partir de modificações nos grupos funcionais hidroxila e amina, do fármaco original, com o objetivo de melhorar sua solubilidade aquosa, sendo que esses compostos apresentam uma boa estabilidade química e uma rápida bioconversão *in vivo* no fármaco original na presença de fosfatases intestinais (RAUTIO *et al.*, 2008).

O amprenavir (Agenerase[®]) é um fármaco que apresenta baixa solubilidade aquosa (0,04 mg/ml) e alta permeabilidade *in vivo*. Com a finalidade de melhorar a velocidade de dissolução do amprenavir utilizou-se, em sua formulação, grande percentagem de excipientes solubilizantes,

resultando em uma cápsula com baixa concentração da substância ativa (150 mg). Por essa razão, o regime de dosagem recomendado é de 1200 mg ou 8 cápsulas, duas vezes ao dia, o que pode resultar na não adesão do paciente ao tratamento, principalmente quando é utilizado em combinação com outros agentes anti-retrovirais de diferentes classes (HU, L., 2004; RAUTIO *et al.*, 2008).

A descoberta do fosamprenavir, um pró-fármaco do amprenavir, possibilitou uma redução no regime de dosagem (4 comprimidos por dia) e melhoria da adesão ao tratamento, uma vez que apresenta uma solubilidade 10 vezes maior (0,31 mg/ml) e biodisponibilidade oral equivalente ou maior que a do amprenavir (FURFINE *et al.*, 2004; HU, L., 2004; RAUTIO *et al.*, 2008).

3.5.1 Síntese

O fosamprenavir foi aprovado pelo FDA em 2003. Foi obtido pela fosforilação do penúltimo precursor do amprenavir com oxicloreto de fósforo (POCl_3) em piridina (Figura 3.3). O sal de sódio e o ácido livre do GW433908 apresentaram alta solubilidade (≥ 3 mg/ml) em pH na faixa de 1-8. O sal de cálcio demonstrou ser pH dependente: pH 7 (0,3 mg/ml) e pH 3-4 (54 mg/ml). No processo de cristalização do sal de sódio e do ácido livre todas as formas isoladas demonstraram ser amorfas e o sal de sódio demonstrou ser extremamente higroscópico. Por outro lado, o sal de cálcio apresentou-se numa forma cristalina estável, considerada adequada ao desenvolvimento farmacêutico (FURFINE *et al.*, 2004).

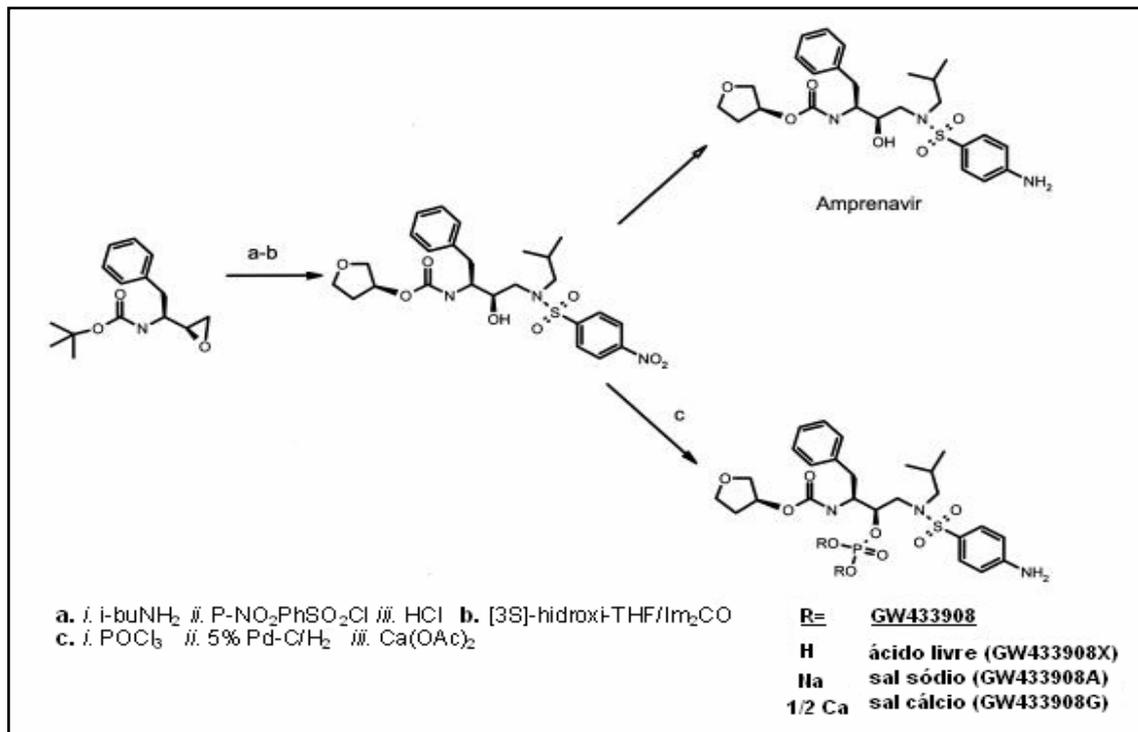


Figura 3.3 — Síntese do GW433908 (FURFINE *et al.*, 2004).

3.5.2 Mecanismo de ação

Como pró-farmaco, ao ser administrado por via oral, é rápido e completamente hidrolisado por fosfatases alcalinas no trato gastrointestinal a fosfato inorgânico e amprenavir, sendo este último, responsável pela ação antiviral.

Atua bloqueando a ação da protease que é responsável por clivar as poliproteínas em várias proteínas estruturais e funcionais, produzindo, assim, vírus maduro e infeccioso. Como essa protease não ocorre no hospedeiro, trata-se de um bom alvo para intervenção quimioterápica (RANG *et al.*, 2004; GUBERT, 2004). Os inibidores de protease, ao tornarem a partícula viral não-infecciosa, impedem novos episódios de infecção (KATZUNG, 2001).

3.5.3 Propriedades físico-químicas

- Nome químico: (3S)-tetraidrofurano-3-il (1S,2R)-3-[[[4-aminofenil) sulfonil](isobutil) amino]-1-benzil-2-(fosfonooxi) propilcarbamato monocalcico.
- Fórmula molecular: C₂₅H₃₄CaN₃O₉PS.
- Massa molecular: 623,7 g/mol.
- CAS: 226700-81-8
- Apresenta três centros quirais, porém é sintetizado como enantiômero 3S, 1S, 2R. Dados experimentais demonstraram que a inversão dos centros quirais durante a síntese e estocagem é muito improvável. Somente uma forma cristalina foi identificada, produzida e utilizada em estudos clínicos e não clínicos (EMEA, 2005).
- Solubilidade: solúvel em metanol.

3.5.4 Farmacocinética

Ao ser administrado por via oral o fosamprenavir é primeiramente hidrolisado a amprenavir e fosfato inorgânico no epitélio intestinal por fosfatases alcalinas (99%), com mínima absorção sistêmica. Estudos realizados por FURFINE e colaboradores (2004), utilizando sistema monocamada de células Caco-2 como modelo de absorção intestinal, demonstraram que o amprenavir possui uma alta permeabilidade nessas membranas sendo absorvido via difusão passiva e como substrato de glicoproteínas P.

O amprenavir apresenta um volume aparente de distribuição de 430 l, sugerindo que penetra facilmente nos tecidos. Possui uma alta ligação às proteínas plasmáticas (90%), ligando-se principalmente à glicoproteína- α_1 ácida. O pico máximo de concentração plasmática é atingido entre 1,5-2,5 horas, apresentando tempo de meia-vida de eliminação de 7,7 horas. É metabolizado no fígado via citocromo P450 principalmente pelas isoenzimas CYP3A4. O fármaco e seus metabólitos são excretados na urina (14%) e nas fezes (75%), sendo apenas 1% excretado na urina na forma inalterada (EMEA, 2005; HESTER *et al.*, 2006; WIRE *et al.*, 2006; BROUWERS *et al.*, 2007).

A co-administração do fosamprenavir (700 mg) com ritonavir (100 mg), duas vezes ao dia, é indicada. Estudos farmacocinéticos demonstraram um aumento na concentração plasmática máxima no *steady-state* ($C_{p_{max,ss}}$) de aproximadamente 51% e um aumento de 3-4 vezes na área sob a curva no intervalo entre doses no *steady-state* (ASC_{ss}). Diminuição de 40% no volume aparente de distribuição foi observada, provavelmente, devido ao aumento da biodisponibilidade do amprenavir (EMEA, 2005; WIRE *et al.*, 2006).

Os parâmetros farmacocinéticos do fosamprenavir obtidos após a administração oral são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Parâmetros farmacocinéticos do fosamprenavir em adultos.

Regime	$C_{p_{max}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	t_{max} (horas)	ASC_{24} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$)	$C_{p_{min}}$ ($\mu\text{g/mL}$)
Fosamprenavir 1400 mg duas vezes ao dia	4,82 (4,06-5,72)	1,3 (0,8-4,0)	33,0 (27,6-39,2)	0,35 (0,27-0,46)
Fosamprenavir 1400 mg + Ritonavir 200 mg	7,24 (6,32-8,28)	2,1 (0,8-5,0)	69,4 (59,7-80,8)	1,45 (1,16-1,81)
Fosamprenavir 700 mg + Ritonavir 100 mg, duas vezes ao dia.	6,08 (5,38-6,86)	1,5 (0,75-5,0)	79,2 (69,0-90,6)	2,12 (1,77-2,54)

3.5.5 Posologia

O fosamprenavir pode ser administrado com ou sem alimentos. A posologia utilizada para o fosamprenavir está descrita na Tabela 3.4 (EMEA, 2005; HESTER *et al.*, 2006).

Tabela 3.4. Posologia para o fosamprenavir.

FOSAMPRENAVIR	DOSE
	1400 mg duas vezes ao dia (sem ritonavir)
Adultos	1400 mg uma vez ao dia + 200 mg ritonavir uma vez ao dia
	700 mg duas vezes ao dia + 100 mg ritonavir duas vezes ao dia
Crianças (2 a 5 anos)	30 mg/kg (suspensão oral) duas vezes ao dia
Crianças (> 6 anos)	30 mg/kg (suspensão oral) duas vezes ao dia ou 18 mg/kg + 3 mg/kg ritonavir duas vezes ao dia

3.5.6 Contra-indicações

O Telzir[®] é contra-indicado em casos de hipersensibilidade ao fosamprenavir, amprenavir, ritonavir ou excipientes da formulação. Não deve ser administrado concomitantemente com medicamentos com janela terapêutica estreita, que sejam metabolizados pelo citocromo CYP3A4, como por exemplo, amiodarona, astemizol, cisaprida, diidroergotamina, ergotamina,

pimozida, quinidina, terfenadina, midazolam oral e triazolam oral (EMEA, 2005; HESTER *et al.*, 2006).

Telzir[®] associado com ritonavir não deve ser co-administrado com medicamentos com janela terapêutica estreita que sejam altamente dependentes do metabolismo por CYP2D6: flecainida e propafenona (EMEA, 2005; HESTER *et al.*, 2006).

3.5.7 Efeitos Adversos

Os efeitos adversos mais freqüentemente reportados ao uso do fosamprenavir incluem diarreia, erupção cutânea, náusea, vômito, dor abdominal, fadiga, dor na cabeça, fraqueza e insônia.

3.6 REFERÊNCIAS

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 25; 35-46; 230-231.

BROUWERS, J.; TACK, J.; AUGUSTIJNS, P. In vitro behavior of a phosphate ester prodrug of amprenavir in human intestinal fluids and in the Caco-2 system: illustration of intraluminal supersaturation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 24, p. 302-309, 2007.

CHEQUER, P.; SUDO, E.; VITÓRIA, M.A.A.; CUNHA, C.; VELOSO, V.G. Impacto da terapia anti-retroviral. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acessado em: 4 de agosto de 2004.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**. v. 22, p. 75-84, 1999.

DST-AIDS: Programa Nacional de DST-AIDS. AIDS no Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/boletim-epidemiologico>. Acessado em: 03 de setembro de 2010.

EMA. Fosamprenavir: Scientific Discussion. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2005, p.1-31. Disponível em: <http://www.emea.eu.int>. Acessado em: 18 de março de 2008.

FURFINE, E. S.; BAKER, C. T.; HALE, M. R.; REYNOLDS, D. J.; STUDERNBERG, S. D.; SPALTENSTEIN, A. Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, p. 791-798, 2004.

FDA Drugs Used in the Treatment of HIV Infections. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSAactivities/ucm118915.htm>. Acessado em: 09 de fevereiro de 2010.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Reviews Biochemistry**. v. 67, p. 1-25, 1998.

GUBERT, I. C. **Farmacologia Integrada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 104-108.

HESTER, E. K.; CHANDLER, H. V.; SIMS, K. M. Fosamprenavir: drug development for adherence. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, p. 1301-1310, 2006.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J. K.; KAMPS, B. S.; **HIV Medicine**. 15th. Flying Publisher – Paris, Cagliari, Wuppertal, 2007. p.160-263.

HU, L. Prodrugs: effective solutions for solubility, permeability and targeting challenges. **Drugs**, v. 7, p. 736-742, 2004.

KATZUNG, B. G. **Basic and Clinical Pharmacology**. 2nd ed. U.S.A.: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2001. p. 728-730.

LIPINSKI C. A.; LOMBARDO F.; DOMINY B. W.; FEENEY P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 46, p. 3-26, 2001.

PERVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. **Life: The Science of Biology**. 5th ed., U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2003. Cap. 4. p. 141-144.

RAFFANTI, S. E.; HASS, D. W. Antimicrobial agents, In: **Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th Edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, New Delhi, 2008. p.1349-1380

RANG, H. P.; DALE, M. M. RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5^a ed., RJ, 2004. p. 743-764.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, p 1-16, 2008.

STELLA, V. J.; NTI-ADDAE, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 677-694, 2007.

UNAIDS/WHO - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. AIDS Epidemic Update, 2009. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2010>. Acessado em: 06 de fevereiro de 2010.

WIRE, M. B.; SHELTON, M. J.; STUDENBERG, S. Fosamprenavir: clinical pharmacokinetics and drugs interactions of the amprenavir prodrug. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, p. 137-168, 2006.

4. CAPÍTULO I

Análise qualitativa do fosamprenavir SQR e comprimidos revestidos

4.1 INTRODUÇÃO

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para a validação de métodos analíticos. Segundo o FDA, existem duas categorias de padrões de referência: compendiais e não compendiais. Os padrões de referência compendiais são obtidos de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior. Os padrões de referência não compendiais são substâncias com elevado teor de pureza, e devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ e KRULL, 1998).

Devido ao alto custo de aquisição da substância química de referência (SQR) do fosamprenavir, optou-se por realizar a extração da substância ativa a partir de comprimidos do produto comercial (Telzir[®] – 700 mg) e, posteriormente, a caracterização do fármaco para a realização deste trabalho. Caracterizou-se a SQR do fosamprenavir através do emprego da espectroscopia na região do infravermelho, da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H), de carbono (RMN de ¹³C) e de fósforo (RMN de ³¹P) e da determinação do ponto de fusão.

Para o produto acabado (comprimidos revestidos), realizou-se sua identificação através da cromatografia em camada delgada (CCD), espectroscopia na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO

Os comprimidos de fosamprenavir (Telzir[®] - Glaxo-Smith-Kline) foram gentilmente fornecidos pelo Ministério da Saúde (Brasília), Unidade de Assistência e Tratamento – UAT /Programa Nacional de DST e Aids - SVS/MS.

Cada comprimido revestido de TELZIR[®] contém:

- 700 mg de fosamprenavir cálcico (*);
- Excipientes do conteúdo do comprimido: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, povidona K30, estearato de magnésio e sílica coloidal anidra.
- Excipientes do revestimento dos comprimidos: hipromelose, dióxido de titânio (E171), triacetina, óxido de ferro vermelho (E172).

(*) equivalente a 600 mg de amprenavir.

4.2.2 EXTRAÇÃO DO FÁRMACO DA FORMULAÇÃO

Para realizar a extração do fosamprenavir dos comprimidos revestidos, transferiram-se 5 comprimidos previamente triturados para um balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 50 ml de água ultrapura e agitou-se mecanicamente a mistura por 10 minutos. Filtrou-se em filtro quantitativo Framex, para separar os produtos solúveis em água. Com auxílio de uma espátula, transferiu-se a porção insolúvel para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de metanol grau CLAE e colocou-se no ultra-som por 1 minuto. Filtrou-se, novamente, para completa separação dos produtos insolúveis presentes na formulação e realizou-se a evaporação do solvente em evaporador rotatório Fisatom, modelo 802D, a 40 °C. O resíduo obtido foi dessecado a vácuo a 40 °C por 24 horas. Todo o procedimento descrito foi realizado sob proteção da

luz. O método de extração utilizado foi baseado em dados de solubilidade dos excipientes (KIBBE, 2000).

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE EXTRAÇÃO

4.2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O espectro de infravermelho do produto de extração foi obtido através da dispersão do mesmo em brometo de potássio e posterior obtenção da pastilha. Foi utilizado espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR, modelo 8101.

4.2.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), de carbono (RMN de ^{13}C) e de fósforo (RMN de ^{31}P)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{31}P foram obtidos em equipamento Varian Inova, modelo YH-300 de 300 MHz, utilizando como solvente água deuterada (D_2O) acidificada com solução de cloreto de deutério (DCI) a 37%. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UFRGS.

4.2.3.3 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão do fosamprenavir SQR 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. Entre 160 e 200 °C o incremento de temperatura foi de 1 °C por minuto. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.4 ANÁLISE QUALITATIVA

4.2.4.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 F254 (Merck). A fase eluente foi constituída de metanol:acetato de etila:hidróxido de amônio 6 M (2,5:5,5:2 V/V/V). Com auxílio de um capilar, 6 μ l de uma solução metanólica 1 mg/ml do fosamprenavir foram aplicados. A cromatoplasma foi transferida para a cuba cromatográfica, contendo o eluente, previamente saturada com o mesmo. 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. Foi calculado o valor do fator de retenção, R_f , através da Equação 4.1, onde, d_s é a distância percorrida pela substância e d_m é a distância percorrida pela fase móvel.

$$R_f = \frac{d_s}{d_m} \quad \text{Equação 4.1}$$

4.2.4.2 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA

Os máximos de absorção na região do UV foram determinados em soluções metanólicas da SQR de fosamprenavir contendo 15 μ g/ml. Os espectros foram traçados em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV-1601 PC, microprocessado, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm.

4.2.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10AD, equipado com detector de arranjo de diodos SPD-M10AVvp, degaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10Avp e injetor manual RHEODYNE. O software CLASS-VP foi utilizado para a aquisição e análise dos dados.

As condições cromatográficas definidas para a identificação e quantificação do fosamprenavir estão apresentadas no Quadro 4.1 e 4.2.

Quadro 4.1 – Condições cromatográficas para o doseamento do fosamprenavir por CLAE.

Coluna	Vertical [®] C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna Phenomenex [®]
Fase móvel	Tampão acetato de sódio (pH 4,5) : acetonitrila (gradiente programado)
Diluyente	Metanol
Detecção	Ultravioleta (λ= 264 nm)
Volume de injeção	20 µl
Fluxo	1,2 ml/min

Quadro 4.2 – Programação do gradiente.

Tempo (min)	Concentração de acetonitrila
0,01 — 8,00	25
8,00 — 12,00	35
13,00 — 15,00	25

4.2.4.4 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

A solução de fosamprenavir SQR e amostra foram preparadas em metanol a uma concentração final de 1 mM. Como padrão interno foi utilizado a sulfametazina SQR. Para solubilização da sulfametazina, utilizou-se hidróxido de sódio 1 M. As amostras foram filtradas em membrana de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro, anteriormente a injeção.

As análises foram realizadas em eletroforese capilar com detector de Fluorescência Induzida a LASER de diodo. Para realização das análises, as amostras foram previamente derivatizadas com fluorescamina.

As condições analíticas utilizadas para a identificação e quantificação do fosamprenavir estão apresentadas no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 – Condições analíticas utilizadas para a identificação e quantificação do FPV por EC.

Capilar	Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida de 60 cm x 75 µm de diâmetro interno
Eletrólito	Tampão Borato 25 mM, pH= 10,10
Tensão aplicada	10 kV
Excitação	405 nm
Intervalo de emissão	455 a 525 nm
Diluyente das amostras	Tampão Borato 25 mM, pH= 9,0
Pressão de injeção	17 mBar
Tempo de injeção	3 segundos
Padrão interno	Sulfametazina
Derivatizante das amostras	Fluorescamina
Temperatura	25 ± 1 °C

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE EXTRAÇÃO

4.3.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O espectro de absorção do produto de extração na região do infravermelho está representado na Figura 4.1.

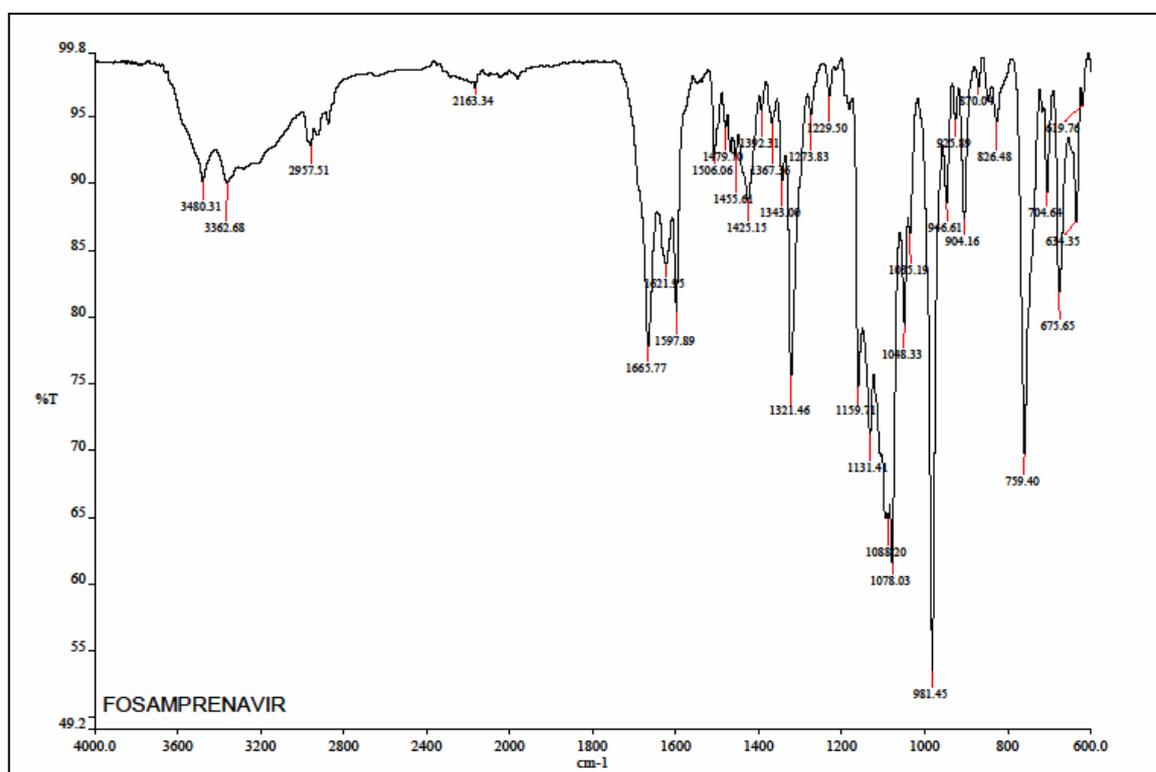


Figura 4.1 – Espectro de absorção na região do IV do produto de extração.

As atribuições das principais bandas, características à estrutura do fosamprenavir, estão apresentadas Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Freqüências de absorção das principais bandas no espectro de IV do produto de extração.

Freqüência (cm ⁻¹)	Atribuição
3480 e 3363	Estiramentos da ligação NH ₂ (simétrico e assimétrico)
2958	Estiramento da ligação C (sp ³) – H
1666	Estiramento da ligação C=O do grupamento carbamato
1622	Deformação angular da ligação NH ₂
1598	Estiramento da ligação C=C
1321	Estiramento da ligação S=O do grupamento R-SO ₂ -N

Fontes: PRETSCH *et al.*, 2000; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000.

Na ausência de um espectro de IV do fosamprenavir para fins de comparação, a atribuição das bandas foi efetuada considerando a região de absorção, o formato e a intensidade, em comparação a dados de literatura tabelados para os respectivos grupos funcionais (PRETSCH *et al.*, 2000).

O espectro obtido para o fosamprenavir apresenta bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. O espectro de infravermelho é único para cada substância, sendo pouco provável que duas substâncias que não sejam enantiômeros apresentem o mesmo espectro nesta região (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

4.3.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), carbono (RMN de ^{13}C) e fósforo (RMN de ^{31}P)

O espectro de RMN ^1H do produto extraído está apresentado na Figura 4.2.

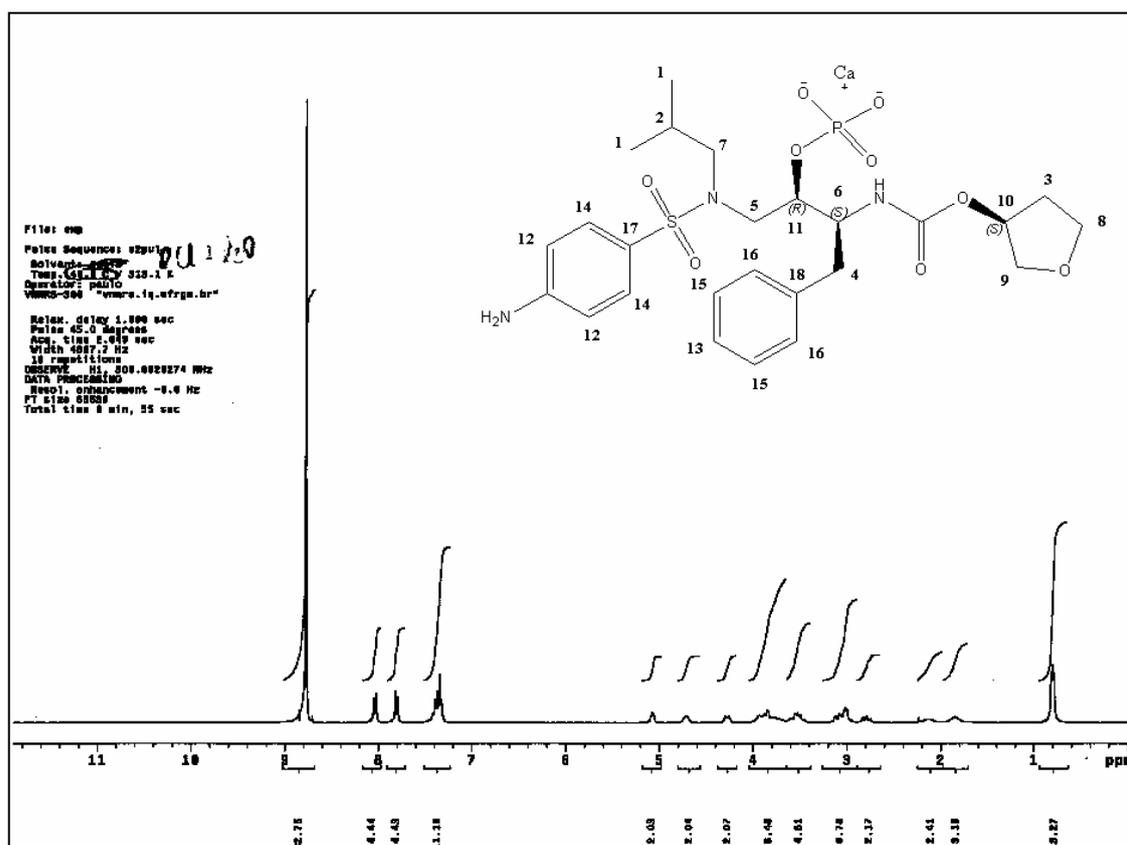


Figura 4.2 – Espectro de RMN ^1H do produto extraído.

As atribuições do espectro de RMN ^1H , estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Atribuições do espectro de RMN ^1H do produto de extração em água deuterada (D_2O) acidificada com solução de cloreto de deutério (DCI) a 37%. (PRETSCH *et al.*, 2000).

Posição (H)	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade
1	0,81	Multipleteo (6H)
2	1,85	Multipleteo (1H)
3	2,12	Multipleteo (2H)
4	2,79	Multipleteo (2H)
5	3,44 - 3,59	Multipleteo (2H)
6	4,29 ou 4,70 ou 5,07	Multipleteo (1H)
7	2,95 – 3,13	Multipleteo (2H)
8 e 9	3,65 – 3,99	Multipleteo (4H)
10	4,29 ou 4,70 ou 5,07	Multipleteo (1H)
11	4,29 ou 4,70 ou 5,07	Multipleteo (1H)
13, 15 e 16	7,30 – 7,37	Multipleteo (5H)
12	7,70	Dupleto (2H, $J= 8$ Hz)
14	8,05	Dupleto (2H, $J= 8$ Hz)

4.3. O espectro de RMN ^{13}C do produto extraído está apresentado na Figura 4.3.

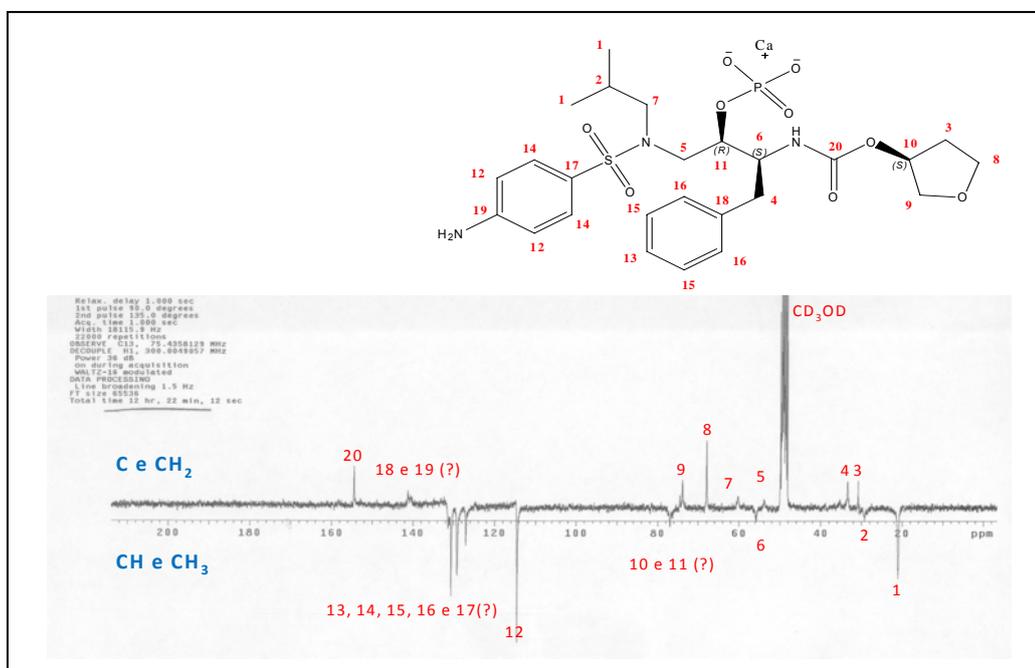


Figura 4.3 – Espectro de RMN ^{13}C -ATP do produto extraído.

As atribuições do espectro de RMN ^{13}C -APT estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C -APT do produto de extração (PRETSCH *et al.*, 2000).

Posição	Deslocamento químico	Interpretação
1	20,98	CH ₃
2	29,21	CH
3	30,78	CH ₂

Continuação da Tabela 4.3.

4	33,38	CH ₂
5	53,8	CH ₂
6	55,8	CH
7	60,15	CH ₂
8	67,9	CH ₂
9	73,8	CH ₂
10 e 11	76,9	CH
12	114,47	CH
13, 14, 15 e 16	126,98; 129,13; 130,58 e 131,35	CH
17	?	C
18 e 19	?	C
20	154,4	C

O espectro de RMN ^{31}P do produto extraído está apresentado na Figura 4.4.

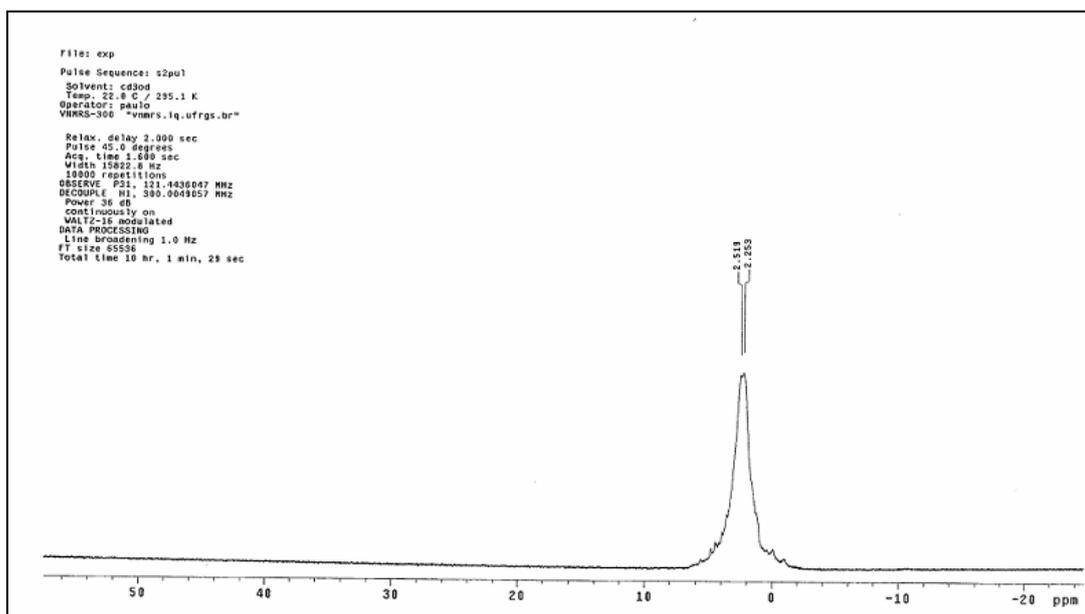


Figura 4.4 – Espectro de RMN ^{31}P do produto extraído.

As análises qualitativas por RMN ^1H e RMN ^{13}C são extremamente úteis para as determinações estruturais, uma vez que fornecem dados indispensáveis para a caracterização e estudo das moléculas das substâncias. A utilização de experimentos de ^{13}C desacoplado, como o APT (Attached Proton Test), fornecem o número de átomos de ^1H diretamente ligados ao ^{13}C , sem os problemas de sobreposição ou distorção (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; GIL, 2010).

Os resultados obtidos nos ensaios de RMN ^1H e RMN ^{13}C -APT para o produto extraído demonstraram estar de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de fosamprenavir. Além disso, esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por FURFINE e colaboradores (2004).

A análise do espectro de RMN ^{31}P confirmou a presença desse elemento na molécula, ou seja, o fosamprenavir manteve-se na sua forma de sal cálcico do éster fosfato, não ocorrendo hidrólise durante a extração.

4.3.1.3 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão é um método indicativo de pureza e utilizado na identificação de substâncias, uma vez que cada substância, por sua estrutura química, apresenta uma faixa de fusão característica. Logo, a presença de qualquer outra substância irá causar alteração do resultado (WATSON, 2005; GIL, 2010).

O ponto de fusão do fosamprenavir (\pm DPR), obtido por método capilar, foi de $182,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,56$). Os resultados obtidos confirmam os resultados obtidos por FURFINE e colaboradores (2004) cujos valores encontrados estão na faixa de $182\text{-}184\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2 ANÁLISE QUALITATIVA

4.3.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A CCD é uma técnica de separação que apresenta múltiplas vantagens, tais como: fácil compreensão e execução, separações em espaço de tempo curto, versatilidade, grande repetibilidade e baixo custo (COLLINS, 2006).

A comparação dos valores de R_f da amostra com o 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 (WATSON, 2005; COLLINS, 2006). A Figura 4.5 mostra a cromatoplaça da SQR (P) e da amostra (A) do fosamprenavir.

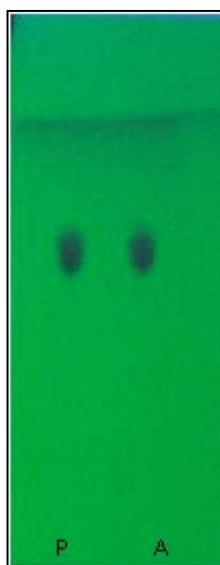


Figura 4.5 – CCD do fosamprenavir SQR (P) e amostra (A), obtida utilizando placa gel de sílica 60 F₂₅₄, fase móvel constituída de metanol:acetato de etila:hidróxido de amônio 6 M (2,5:5,5:2 V/V/V) e revelação com lâmpada de UV 254 nm.

A utilização do método por CCD permitiu identificar o fármaco fosamprenavir em comprimidos, quando este foi analisado juntamente com o fosamprenavir SQR, através da comparação dos fatores de retenção (R_f) obtidos. O valor de R_f obtido foi de 0,59 utilizando fase móvel constituída de metanol:acetato de etila:hidróxido de amônio 6 M (2,5:5,5:2 V/V/V).

Portanto, a CCD desenvolvida pode ser utilizada para a identificação do fosamprenavir SQR e no produto acabado, uma vez que é uma das técnicas cromatográficas mais simples, econômica e de fácil execução, quando se pretende a separação rápida e a identificação visual (COLLINS, 2006).

4.3.2.2 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA

Os espectros sobrepostos das soluções do fosamprenavir SQR e da amostra, diluídas em metanol a 15 µg/ml estão apresentadas na Figura 4.6.

A espectroscopia na região do ultravioleta apresenta uma série de aplicações na análise farmacêutica, destacando-se a identificação e quantificação de fármacos (WATSON, 2005). Assim, verificou-se que o método proposto é útil para a identificação do fosamprenavir nos comprimidos na região do UV quando associado a outros métodos de identificação. Os espectros obtidos apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda.

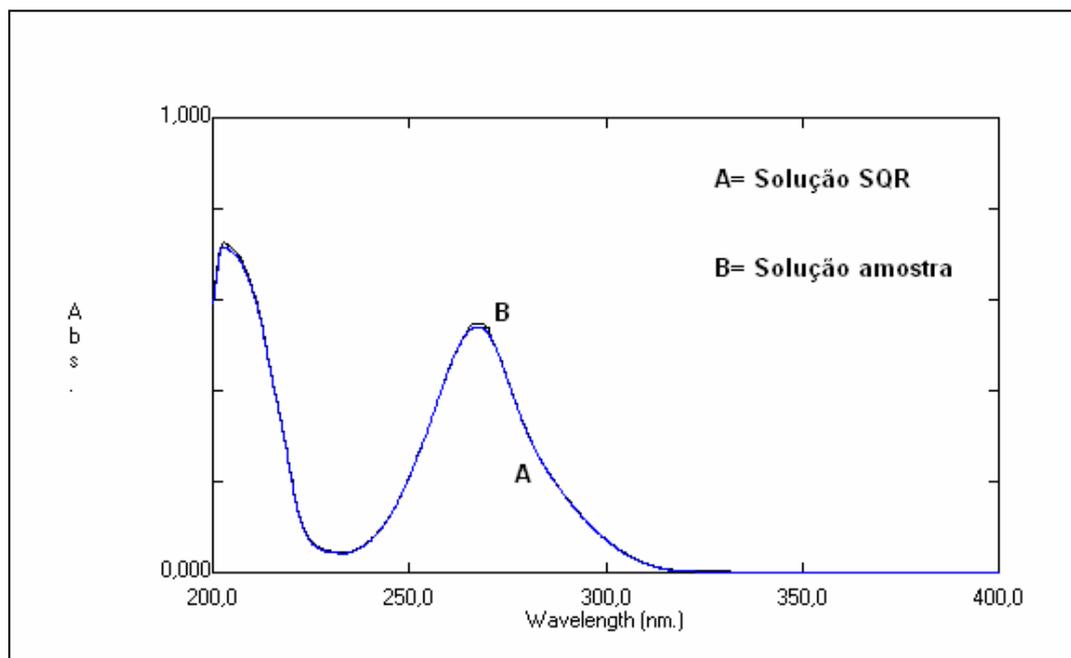


Figura 4.6 – Espectros de absorção sobrepostos na região do UV da solução fosamprenavir SQR (A) e amostra dos comprimidos (B) em metanol a 15 µg/ml.

1.3.2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os cromatogramas sobrepostos das soluções do fosamprenavir SQR e da amostra dos comprimidos, na concentração de 50 µg/ml estão apresentados na Figura 4.7. As semelhanças entre os tempos de retenção permitiram identificar o fosamprenavir na forma farmacêutica e desta maneira os resultados demonstraram adequabilidade do método para identificação do fosamprenavir nos comprimidos.

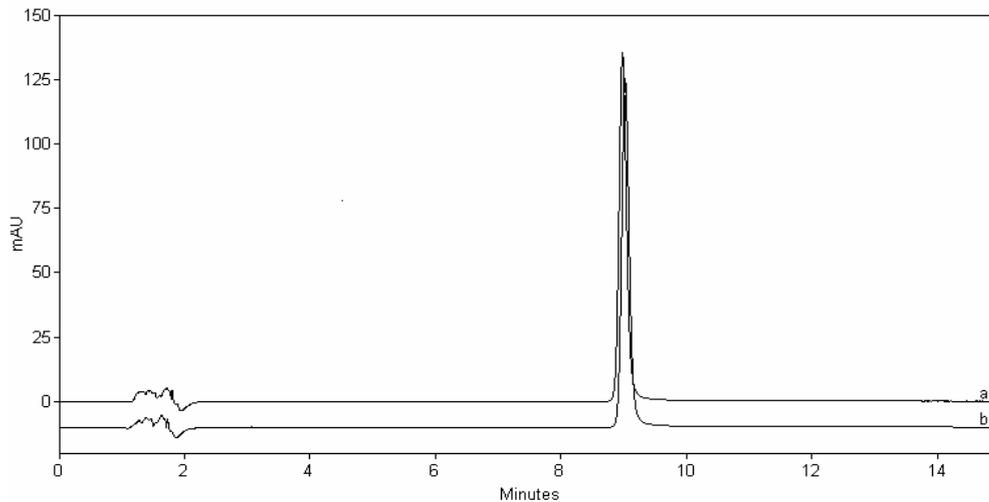


Figura 4.7 – Cromatogramas da solução de fosamprenavir SQR (a) e da amostra dos comprimidos (b). Condições cromatográficas: coluna Vertical C₁₈ (5 μm, 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio: acetonitrila (gradiente); fluxo de 1,2 ml/min; λ= 264 nm.

4.3.2.4 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

Os eletroferogramas sobrepostos do fosamprenavir SQR e amostra dos comprimidos podem ser visualizados na Figura 4.8.

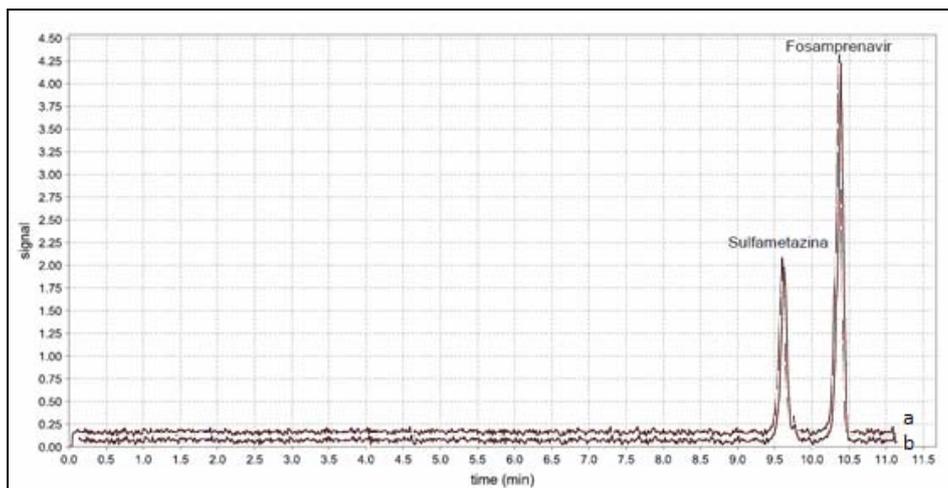


Figura 4.8 – Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de fosamprenavir SQR (a) e amostra dos comprimidos (b), utilizando a sulfametazina como padrão interno. Condições eletroforéticas: Capilar de sílica 60 cm; tampão Borato 25 mM pH 9,0 + fluorescamina.

A eletroforese capilar é um método de separação cujas vantagens são: rapidez, alta eficiência e capacidade de análise de grande número de analitos (KUHR, 1990; TAVARES, 1996; KOK, 2000).

A comparação dos tempos de migração da solução de fosamprenavir SQR (10,3 minutos) e da solução amostra (10,4 minutos) indica que as amostras possuem a mesma identidade.

4.4 CONCLUSÕES

- As análises por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), carbono (RMN de ^{13}C) e fósforo (RMN de ^{31}P) permitiram a caracterização do fosamprenavir, como substância química de referência, após a extração dos comprimidos, não sendo observada a presença de impurezas;
- Os métodos propostos utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD), espectroscopia na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) são adequados para a identificação do fosamprenavir no produto acabado (comprimidos).

4.5 REFERÊNCIAS

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1^a ed. Campinas, SP: UNICAMP, 2006. 453 p.

FURFINE, E. S.; BAKER, C. T.; HALE, M. R.; REYNOLDS, D. J.; STUDERNBERG, S. D.; SPALTENSTEIN, A. Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, p. 791-798, 2004.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3^a ed. São Paulo, SP. Editora Pharmabooks, 2010. 511 p.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington, 2000.

KOK, W., **Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation**, Chromatographia, Supplement Vol. 51, Vieweg, Wiesbaden, 2000.

KUHR, W. G. Capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**. v. 62, p 403-414, 1990.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, CH. **Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data**. 3rd. ed. Springer-Verlag: Berlin, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Espectroscopia no infravermelho**. 6 ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2000, p. 67-135.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Validação de métodos cromatográficos**. Pharmaceutical Technology, v.2, n.3, p. 12-20, 1998.

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

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v.19, p. 173-181, 1996.

5. CAPÍTULO II

Análise quantitativa do fosamprenavir comprimidos

5.1 INTRODUÇÃO

Uma análise química consiste na determinação dos componentes de uma amostra química. Quando esta análise tem por objetivo determinar quanto de cada espécie está presente na amostra analisada, denomina-se de análise quantitativa (LANÇAS, 2009).

Os métodos instrumentais se destacam pela maior sensibilidade em relação às análises clássicas. Entre os principais métodos utilizados na rotina de análises de doseamento, destacam-se a espectroscopia de absorção no visível e no ultravioleta, a espectroscopia de fluorescência, técnicas eletroanalíticas (voltametria, polarografia e potenciometria), a espectroscopia de absorção atômica, eletroforese capilar, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GIL, 2010).

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 mais adequado para este propósito.

A utilização da espectroscopia (UV/VISÍVEL) 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 (GIL, 2010).

A eletroforese capilar constitui uma técnica moderna de separação, baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico. É uma técnica que prima pela excelência de seu desempenho analítico, da diversidade de suas aplicações e da simplicidade e relativo baixo custo do instrumental necessário (TAVARES, 1996).

Vários métodos por CLAE foram publicados para a determinação do fosamprenavir, em associação com outros anti-retrovirais (Quadro 5.1). Em 2010 foi publicado um método por voltametria para a quantificação do fosamprenavir (GUMUSTAS e OZKAN, 2010). Contudo, não foram encontrados métodos analíticos quantitativos para a determinação do fosamprenavir matéria-prima e forma farmacêutica comprimidos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, a espectrofotometria no ultravioleta e a eletroforese capilar. Assim, o objetivo deste capítulo é desenvolver e validar métodos para análise quantitativa deste fármaco.

5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

5.2.1 REVISÃO

Diversos métodos de separação cromatográfica têm sido aplicados em milhares de laboratórios no mundo para identificar e quantificar os inúmeros compostos. A cromatografia é uma técnica de separação que está presente em praticamente todas as áreas do conhecimento científico e tecnológico modernos e fundamenta-se na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e outra, denominada fase móvel, onde um fluido percola através da fase estacionária (LANÇAS, 2009).

Existem dois mecanismos principais que produzem a separação de um composto que passa através da coluna. Por convenção, quando a fase estacionária contém grupos polares (cianopropil ou aminopropil quimicamente ligados à sílica) o sistema é dito fase normal. Neste caso o eluente é, usualmente, menos polar (hexano e diclorometano) para que ocorra a partição do analito entre as duas fases e a separação desejada seja obtida (WATSON, 2005; COLLINS *et al.*, 2006).

Empregando-se fases estacionárias contendo grupos apolares tais como octadecil, o processo é denominado fase reversa. Neste caso, a fase móvel será mais polar, usualmente empregando solventes como metanol ou acetonitrila misturado com água. Nesta, a separação é obtida pela partição da porção apolar da molécula com a fase estacionária e, portanto, o grau de retenção depende da lipofilia do composto. Assim, quanto mais apolar um composto, mais ele será retido pela coluna. A maioria das moléculas de fármacos possui ambas as características, ou seja, grupo polar e grupo apolar (WATSON, 2005; LANÇAS, 2009).

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).

5.2.1.1 DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS

Os métodos encontrados na literatura para a quantificação do fosamprenavir se referem basicamente a métodos utilizados em estudos farmacocinéticos, os quais determinam o fosamprenavir em associação com outros fármacos anti-retrovirais, em plasma humano, por CLAE. O Quadro 5.1 mostra alguns exemplos da cromatografia em fase reversa, utilizada na determinação de anti-retrovirais.

No entanto, não foram encontrados métodos oficiais ou estudos publicados para o controle de qualidade do fosamprenavir no produto farmacêutico.

Quadro 5.1 — Métodos utilizados para a determinação simultânea de anti-retrovirais, por cromatografia a líquido de alta eficiência, em plasma humano.

ANTI RETROVIRAIS	COLUNA / TEMPERATURA	FASE MOVEL / VAZÃO	λ (nm)	AUTORES
APV, IDV, LPV, NFV, RTV, SQV, EFV, NVP	C ₁₈ (150 mm x 3,9 mm D.I., 5 μ m)	acetonitrila: 3-cicloexilamino-1-ácido propanossulfônico pH 10,5 (37: 63) 1,5 ml/min	210 320	FAUX <i>et al.</i> , 2003

Continuação quadro 5.1.

IDV, APV, RTV, LPV, SQV, NFV e M8	Nova-Pak C ₁₈ (150 mm x 3,9 mm D.I.)	140 ml acetonitrila 75 µl de trietilamina 160 ml de tampão fosfato de sódio 5 mM pH 5,0. 1 ml/min	210 239	JUSTESEN <i>et al.</i> , 2003
FPV, NVP, IDV, SQV, ATZ, RTV, LPV, EFZ, NFV, TPV	Symmetry C ₁₈ (250 × 4,6, D.I., 5 µm)	acetonitrila: tampão fosfato 50 mM pH 5, 65 sistema gradiente 1,5 ml/min	260	REBIERE <i>et al.</i> , 2007
IDV, RTV, LPV	Phenomenex Luna fenilexil (250 mm x 4,6 mm D.I.) 40 °C	acetonitrila: tampão fosfato de potássio 10 mM (50:50) 1,0 ml/min	210	RAY <i>et al.</i> , 2002
APV, RTV, IDV, SQV, NFV, EFV, DLV, LPV, M8	Discovery® C ₈ (250 mm x 4,6 mm D.I., 5 µm) 27 °C	tampão fosfato de potássio 25 mM pH 3,1: acetonitrila: metanol sistema gradiente 1,5 ml/min	210	TURNER <i>et al.</i> , 2003

FPV, fosamprenavir; NVP, nevirapine; APV, amprenavir; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; RTV, ritonavir; NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir; EFV, evafirenzo; EMC, emtricitabina; TVF, tenofovir; M8, metabólito do nelfinavir, ATZ, atazanavir; EFZ, enfavirez; TPV, tipranavir; NVP, nevirapine.

5.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.2.1 Preparo das soluções

- **Solução amostra**

Transferiu-se, quantitativamente, a partir dos comprimidos, o equivalente a 20 mg de fosamprenavir para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com metanol (200 µg/ml). A solução foi homogeneizada, filtrada, armazenada em vidro âmbar e mantida sob refrigeração.

- **Solução padrão**

Todas as soluções da SQR de fosamprenavir (estoque) foram preparadas, analiticamente, utilizando metanol como solvente. A solução estoque foi armazenada em vidro âmbar e mantida sob refrigeração.

5.2.2.2 Validação do método

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10AD, equipado com detector de arranjo de diodos SPD-M10AVvp, degaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10Avp e injetor manual RHEODYNE. O software CLASS-VP foi utilizado para a aquisição e análise dos dados.

Foram utilizados reagentes grau CLAE e água ultrapura obtida por sistema MILLI-Q PLUS (Millipore®). As condições cromatográficas selecionadas no método de doseamento do fosamprenavir por CLAE estão apresentadas no Quadro 4.1. O gradiente foi programado conforme descrito no quadro 4.2 do item 4.2.4.3

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez. Foram também analisados os parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.

5.2.2.2.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foram avaliados os parâmetros: resolução (R), tempo de retenção (Tr), repetibilidade das injeções, eficiência da coluna (N), assimetria (T) e fator de capacidade (k').

Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram efetuados injetando-se cinco vezes a solução SQR de fosamprenavir (50 µg/ml) e a solução amostra (50 µg/ml), preparadas em metanol a partir da solução estoque na concentração de 200 µg/ml.

5.2.2.2.2 Especificidade

Para a avaliação da especificidade do método, a SQR de fosamprenavir foi submetida a condições de estresse com o objetivo de forçar a formação de produtos de degradação. Os estudos de degradação forçada do fosamprenavir foram realizados separadamente, a partir das soluções contendo 400 µg/ml.

Alíquotas de 2,5 ml dessas soluções, separadamente, foram diluídas com soluções de ácido, base, oxidante ou mistura de solventes de forma a obter soluções contendo 100 µg/ml do fármaco.

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 em metanol até a concentração de 40 µg/ml de fosamprenavir e analisadas pelo método proposto.

Para cada condição, foram preparadas três amostras e um branco, o qual consistiu de todos os reagentes, menos a amostra. Amostras não degradadas foram preparadas em metanol a partir das soluções-estoque nas concentrações de 40 µg/ml.

Verificou-se também a pureza do pico cromatográfico do fármaco, com o auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD).

Do mesmo modo, foi avaliada a interferência dos excipientes da formulação, sendo que nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do fosamprenavir.

As condições de estresse às quais o fármaco foi submetido e o preparo das soluções analisadas são descritos a seguir.

a) Hidrólise alcalina

Soluções de fosamprenavir 100 µg/ml em NaOH 1 M foram mantidas à temperatura ambiente durante 72 horas. Após este período, transferiram-se 2,0 ml desta solução resultante para um balão volumétrico de 5 ml (40 µg/ml), neutralizou-se a solução com HCl 1 M e completou-se o volume com metanol. Preparou-se um branco sob as mesmas condições.

b) Hidrólise ácida

Soluções de fosamprenavir 100 µg/ml em HCl 1 M foram mantidas à temperatura ambiente durante 72 horas e a 80 °C por 90 minutos. Após este período, transferiram-se 2,0 ml desta solução resultante para um balão

volumétrico de 5 ml (40 µg/ml), neutralizou-se a solução com NaOH 1 M e completou-se o volume com metanol. Preparou-se um branco sob as mesmas condições.

c) Oxidação com peróxido de hidrogênio

Soluções de fosamprenavir 100 µg/ml em H₂O₂ 3%, foram expostas à temperatura ambiente durante 72 horas. Após este período, transferiu-se 2,0 ml desta solução resultante para um balão volumétrico de 5 ml (40 µg/ml) e completou-se o volume com metanol. Um branco foi preparado sob as mesmas condições.

d) Fotólise

Transferiu-se 1,0 ml da solução SQR de fosamprenavir (400 µg/ml) para uma cubeta de quartzo (UV-CUVETTE, MICRO-BRAND). Deixou-se exposta por 90 minutos e 10 dias à lâmpada de radiação UV 254 nm e 352 nm, respectivamente, em câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm).

Após este período, transferiu-se toda a solução, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10 ml. Preparou-se uma outra amostra da mesma forma descrita acima, que foi submetida às mesmas condições, porém protegida da ação da luz com papel alumínio.

e) Estufa 60 °C

Soluções de fosamprenavir 100 µg/ml foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60 °C e deixadas em repouso por 10 dias. Após este período, aferiu-se novamente a solução com diluente devido à evaporação do mesmo.

Transferiu-se 2,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 5 ml (40 µg/ml) e completou-se o volume com o diluente.

f) Excipientes dos comprimidos

Preparou-se uma solução contendo os excipientes da formulação (Telzir[®]). As concentrações de cada excipiente foram baseadas na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas a partir do peso médio de 20 comprimidos (1,165 g).

5.2.2.2.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão da SQR contendo cinco níveis de concentração.

Primeiramente, preparou-se uma solução de fosamprenavir SQR contendo 200 µg/ml em metanol. A seguir, com auxílio de bureta, alíquotas de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 ml foram transferidas para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com metanol. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 10, 30, 50, 70 e 90 µg/ml. Cada solução foi injetada em triplicata.

A obtenção da curva padrão foi realizada em três dias diferentes e, com a área absoluta média obtida nos diferentes dias, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco (µg/ml). Calculou-se a equação da reta através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

5.2.2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração. Preparou-se uma solução amostra contendo 200 µg/ml de fosamprenavir e uma solução da SQR a 200 µg/ml.

Para a análise, foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,0 ml da solução amostra para balões volumétricos de 10 ml e estes foram denominados A, R₁, R₂ e R₃. Foram adicionadas alíquotas de 0,5 ml; 1,5 ml e 2,5 ml da solução de fosamprenavir SQR aos balões R₁, R₂ e R₃, respectivamente, e completou-se o volume com metanol.

O preparo das soluções para o teste de recuperação está representado, esquematicamente, na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 — Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.

Balão Volumétrico	Volume amostra 1 mg/ml (ml)	Volume SQR 1 mg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	1,0	—	20
R ₁	1,0	0,5	30
R ₂	1,0	1,5	50
R ₃	1,0	2,5	70
P	—	1,0	20

As soluções denominadas A, P, R₁, R₂ e R₃ foram preparadas em triplicada. Para cada solução foram realizadas três determinações.

As percentagens de recuperação (R%) da SQR foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$R \% = \frac{R_x - C_A}{C_P} \times 100 \quad \text{Equação 5.3}$$

Onde:

R_x = concentração da solução contendo fosamprenavir SQR e amostra ($\mu\text{g/ml}$);

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

C_P = concentração da solução fosamprenavir SQR ($\mu\text{g/ml}$).

5.2.2.2.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através de 6 ensaios diários completos, realizados em três dias diferentes. Verificou-se a precisão intermediária e a repetibilidade do método nas amostras de fosamprenavir (comprimidos de Telzir[®]). As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

Pesou-se o equivalente a 20 mg de fosamprenavir e transferiram-se para balão volumétrico de 100 ml obtendo-se concentração final de 200 $\mu\text{g/ml}$. Transferiram-se 2,5 ml da solução com auxílio de bureta para BV de 10 ml obtendo-se uma concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Os resultados de precisão foram avaliados pelo desvio padrão relativo (DPR). A concentração de fosamprenavir foi calculada de acordo com a Equação 5.4:

$$C_s = \frac{A_s \times C_{SRQ}}{A_{SR}} \quad \text{Equação 5.4}$$

Onde:

C_s = concentração do fármaco na solução ($\mu\text{g/ml}$);

A_s = área absoluta obtida para a solução;

C_{SRQ} = concentração da SQR ($\mu\text{g/ml}$);

A_{SR} = área absoluta obtida para a SQR.

5.2.2.2.6 Robustez

Para avaliar a robustez do método proposto, condições experimentais foram modificadas e os parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, número de pratos teóricos, fator de capacidade e resolução) e os DPR das determinações quantitativas foram calculados. As condições incluíram diferente fabricante de coluna C_{18} (Phenomenex[®]), equipamento e variação do fluxo da fase móvel. Em cada condição, amostras foram injetadas em triplicata ($n = 3$) e analisadas frente a uma solução padrão nas mesmas condições.

5.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.3.1 Validação do método

Após o desenvolvimento de um método analítico, e antes de sua aplicação na análise de amostras, o mesmo precisa ser validado de forma a assegurar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez adequadas à análise (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2009).

Com o objetivo de desenvolver e validar um método para o doseamento do fosamprenavir, foram realizados testes preliminares a fim de otimizar as condições cromatográficas para a análise quantitativa do fármaco. Foram testados diferentes solventes, proporções dos componentes da fase móvel e diluente, colunas, fluxos e comprimentos de onda.

As condições cromatográficas selecionadas para o método de doseamento do fosamprenavir por CLAE são descritas no item 4.2.4.3 no quadro 4.1.

Na Tabela 5.2 encontram-se os valores médios dos parâmetros obtidos após 5 injeções da solução SQR (50 µg/ml) a partir das condições cromatográficas selecionadas. A Figura 5.1 apresenta um cromatograma obtido com a solução de fosamprenavir SQR.

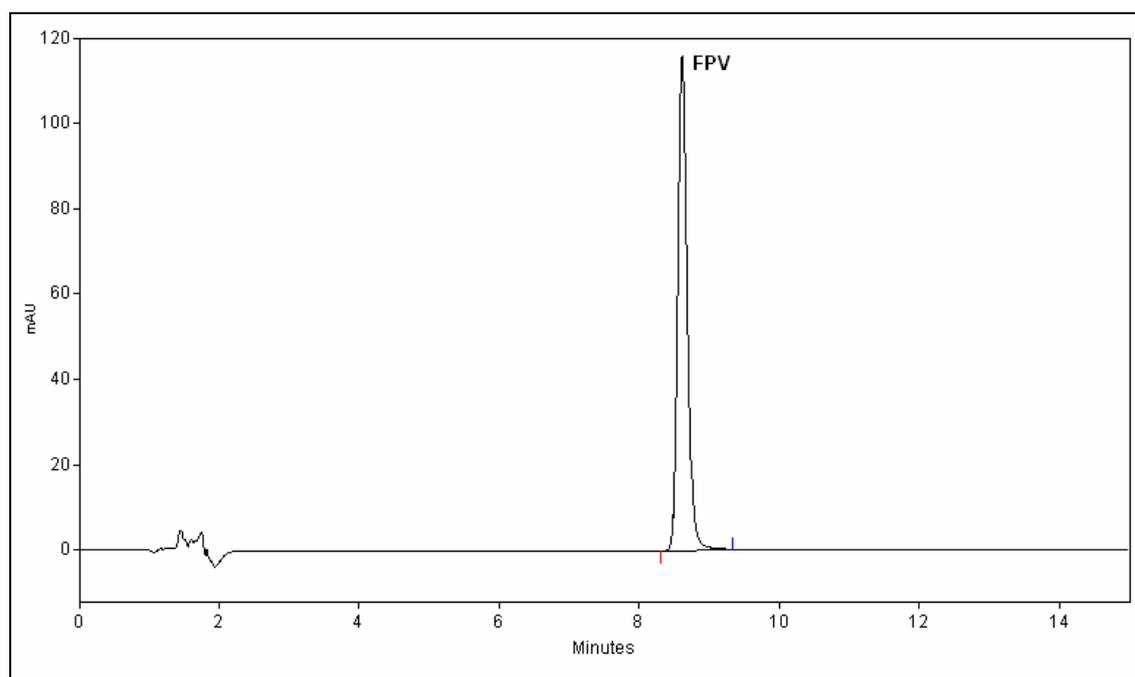


Figura 5.1 — Cromatograma da solução de fosamprenavir SQR (50 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Vertical C₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio: acetonitrila (gradiente); fluxo de 1,2 ml/min; λ= 264 nm.

Tabela 5.2 — Parâmetros cromatográficos relativos ao cromatograma da Figura 5.1.

Parâmetro	Valor observado	Valor recomendado (ICH, 2005)
Tempo de retenção	8,6	—
Repetibilidade	1,2	—
Fator de capacidade	6,3	> 2
Assimetria	1,2	≤ 2
Números de pratos teóricos	19443	> 2000

Os resultados demonstram que os valores encontrados para todos os parâmetros cromatográficos avaliados estão em conformidade com os valores preconizados pela ICH (2005).

5.2.3.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema, que podem ser definido como um conjunto de testes que visam a garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (FDA, 1994, LANÇAS, 2006).

Os testes de adequabilidade do sistema são essenciais para medir o desempenho do sistema cromatográfico. Os parâmetros determinados e seus limites recomendados são apresentados na Tabela 5.3 (FDA, 1994; ICH, 2005).

Tabela 5.3 — Valores recomendados para os parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	FDA (1994)	ICH (2005)
Resolução (Rs)	$R_s > 2$	$R_s > 2$
Fator de capacidade (k')	$K' > 2$	$K' > 2$
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$	$TF < 2$
Números de pratos teóricos (N)	$N > 2000$	$N > 2000$
Repetibilidade (DPR)	$\leq 1\%$ ($n \geq 5$)	$\leq 1\%$ ($n \geq 5$)

Na Tabela 5.2 encontram-se os resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico, utilizando solução SQR. Os resultados experimentais obtidos, referentes a cinco injeções consecutivas, demonstram que estes estão em conformidade com os valores preconizados.

Após a adequação do sistema, a metodologia analítica por CLAE foi validada através da avaliação dos seguintes parâmetros: precisão, exatidão, especificidade, linearidade e robustez.

5.2.3.1.2 Especificidade

A especificidade de um método instrumental é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a(s) substância(s) em exame na presença de espécies como outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação (ICH, 2005).

Com o objetivo de investigar potenciais produtos de degradação, submeteu-se a SQR a condições de estresse conforme descrito em 5.2.2.2.2 Com auxílio de detector de arranjo de diodos (DAD) foi verificada a pureza do pico cromatográfico do fármaco. Os cromatogramas obtidos para cada condição testada são apresentados a seguir.

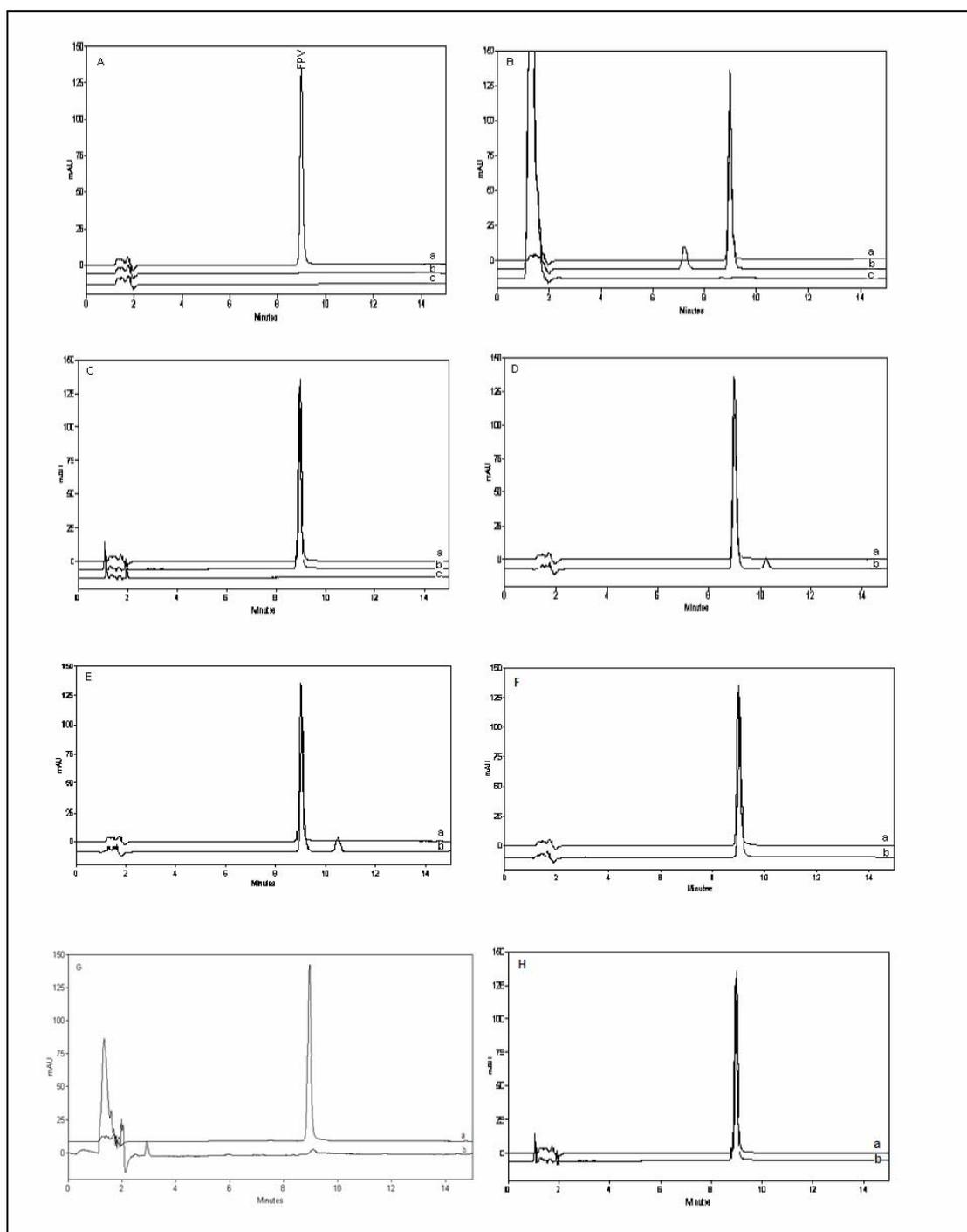


Figura 5.2 – Cromatogramas obtidos do FPV (40,0 µg/ml): A – SQR fosamprenavir (a), placebo (b), branco (c); B- oxidação 3% H₂O₂, 0 h (a), 72 h (b) e branco (c); C- hidrólise básica 0 h (a), 72 h (b) e branco (c); D- hidrólise ácida 0 h (a) e 72 h (b); E- hidrólise ácida 0 h (a) e 90 min / 80 °C (b); F- fotodegradação 352 nm 0 h (a) e 10 dias (b); G- fotodegradação 254 nm 0 h (a) e 90 min (b); H- degradação térmica/60 °C: 0 h (a) e 10 dias (b).

A avaliação do método de CLAE quanto à sua especificidade para o fosamprenavir foi realizada frente aos excipientes da formulação e aos potenciais produtos de degradação térmica, fotólise, hidrólise ácida, alcalina e oxidação, de acordo com o procedimento descrito no item 5.2.2.2.2.

A avaliação da interferência dos excipientes da formulação demonstrou que nenhum dos componentes da formulação interfere no pico de absorção do fosamprenavir (Figura 5.2 A).

Picos secundários, relativos a potenciais produtos de degradação foram observados nas soluções submetidas à oxidação (H_2O_2 3%), à fotólise (254 nm) e à hidrólise ácida (HCl 1M; HCl 1M + 80 °C/90 min). Estes produtos apresentaram tempo de retenção de 7,3 (Figura 5.2 B) 1,5 e 2,7 (Figura 5.2 G) e 10, 2 minutos (Figura 5.2 D, E), respectivamente. O pico extra com baixo tempo de retenção, no caso da degradação oxidativa, se refere ao conservante (fenacetina) do peróxido de hidrogênio.

Os testes de estresse por fotólise (352 nm), hidrólise alcalina (NaOH 1 M) e degradação térmica (80 °C) não apresentaram picos secundários em seus cromatogramas.

O DAD (Tabela 5.4) comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do fosamprenavir após os testes de degradação acelerada, indicando que o método por CLAE é útil na determinação deste fármaco frente aos seus potenciais produtos de degradação.

Tabela 5.4 – Resultados das análises de degradação forçada utilizando CLAE.

Condição	Degradação (%) (redução de área do pico principal)	Pureza do pico principal
Amostra controle	ausência de degradação	0,9999
Hidrólise ácida (1 M HCl, 72 h)	4,1	0,9999
Hidrólise ácida (1 M HCl, 72 h/80 °C)	11,4	1,0000
Hidrólise básica (1 M NaOH, 72 h)	ausência de degradação	0,9999
Oxidação (3% H ₂ O ₂ , 72 h)	17,5	0,9999
Degradação térmica (80 °C, 10 dias)	ausência de degradação	1,0000
Fotólise (352 nm, 10 dias)	ausência de degradação	1,0000
Fotólise (254 nm, 90 min)	93,2	0,9999

5.2.3.1.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância. A linearidade é avaliada através da construção de curvas padrão com, no mínimo, 5 níveis de concentração (ICH, 2005; USP 32, 2009).

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão da SQR contendo cinco níveis de concentração, realizada em dias diferentes. Na Figura 5.3 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de correlação.

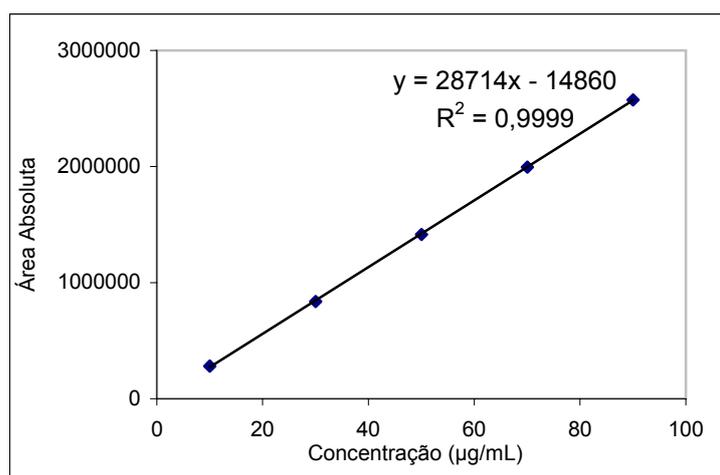


Figura 5.3 – Representação gráfica da curva padrão média do fosamprenavir SQR obtida por CLAE.

A linearidade da curva padrão foi avaliada através a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.5.

Os resultados demonstram que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação de 0,9999, indicam que o método é linear na faixa de concentração de 10 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 5.5 – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do fosamprenavir.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre	4	9909136567619	2477284141905	5604,84*	3,48
Regressão linear	1	9908359022848	9908359022848	22417,59*	4,96
Desvio de linearidade	3	777544771	259181590	0,59	3,71
Dentro	10	4419904331	441990433		
Total	14	9913556471950			

*Significativo para $p < 0,05$

5.2.3.1.5 Precisão

A precisão de um método representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Usualmente, é expressa através do desvio padrão relativo (DPR) (ICH, 2005; USP 32, 2009).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas, sob as mesmas condições; a precisão intermediária expressa variações no laboratório: dias, analistas ou equipamentos diferentes, etc.; a reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos inter-laboratoriais (ICH, 2005; USP 32, 2009).

A precisão do método foi avaliada através dos DPR intradia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) conforme descrito em 5.2.2.2.5. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por CLAE, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e inter-dias.

n	1	2	3	4	5	6	Média	DPR (%)
Dia 1	101,6	102,5	99,9	101,9	100,4	100,7	101,2	0,97
Teor (%) Dia 2	99,4	100,9	99,6	99,0	100,5	100,8	100,0	0,81
Dia 3	100,8	101,2	99,7	101,3	100,8	100,6	100,8	0,55
Média dos três dias							100,8%	
DPR dos 3 dias (%)							0,59	

Artigos da literatura sugerem que a precisão intermediária típica para ensaios de CLAE se encontra na faixa de 0,2% - 1,7%, com resultados médios entre 0,6% e 1,1% (RENGER, 2000; ERMER e PLOSS, 2005; ERMER *et al.*, 2005).

Assim sendo, os baixos valores de DPR obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária indicam que o método proposto possui repetibilidade quando executado mais de uma vez no mesmo dia e sua análise é precisa quando realizada em diferentes dias.

5.2.3.1.6 Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É expressa em termos de percentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na amostra (ICH, 2005; USP 32, 2009).

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 5.2.2.2.4. Os valores experimentais obtidos são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o fosamprenavir.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Recuperação (%)	Faixa (%)
	Adicionada	Recuperada*		
R1	10	9,87	98,7	
R1	10	9,98	99,8	
R1	10	9,93	99,3	
R2	30	29,98	99,9	
R2	30	29,91	99,7	98,7-100,1
R2	30	29,89	99,6	
R3	50	50,05	100,1	
R3	50	49,97	99,9	
R3	50	49,92	99,8	

*cada valor representa a média de três injeções.

Os resultados do ensaio de adição padrão demonstram que o método proposto é exato, uma vez que as concentrações determinadas estão próximas aos valores teóricos esperados.

5.2.3.1.7 Robustez

A robustez de um método mede a capacidade deste de fornecer resultados confiáveis mesmo com pequenas variações em seus parâmetro (ICH, 2005; LANÇAS, 2009).

Modificações no fluxo da fase móvel, coluna e equipamento de marca diferente foram avaliados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.8

Tabela 5.8 – Avaliação da robustez do método CLAE para fosamprenavir (n = 3).

Parâmetro	R_t^a (min)	As^b (≤ 2.0)	N^c (> 2.000)	K^d (> 2.0)	(%) ^e
Método proposto	8,8	1,2	19443	8,8	100,8
Fluxo (1,0 ml ⁻¹)	10,2	1,3	35992	5,6	99,1
Fluxo (1,4 ml ⁻¹)	8,1	1,2	22920	6,3	101,1
Coluna Phenomenex	10,1	1,4	10554	3,2	99,1
Equipamento diferente	9,3	1,3	16923	4,3	99,3

^atempo de retenção; ^b assimetria; ^cpratos teóricos; ^dfator de capacidade e ^e teor rotulado.

Verificou-se que as mudanças realizadas não alteram significativamente os parâmetros cromatográficos do pico fosamprenavir e estes continuam em conformidade com aqueles preconizados pela ICH (2005).

5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

5.3.1 REVISÃO

A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância T ou absorvância A de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico de b cm. Desta forma, a concentração c de um analito absorvente está relacionada linearmente com a absorvância. A absorção de radiação ultravioleta ou visível resulta da excitação de elétrons de ligação e assim, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo (SKOOG, 2002).

A medida de absorção da luz pela solução de moléculas é 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, ϵ é o coeficiente de extinção molar, b o caminho óptico em cm e c é a concentração da amostra em moles/l (WATSON, 2005).

Compostos orgânicos que possuem dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta remoto. Os compostos que possuem ligações simples e duplas alternadamente, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à região do visível (SKOOG, 2002).

A espectrofotometria na região do UV/visível é um método muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões e por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo (WATSON, 2005).

5.3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As condições espectrofotométricas para a validação do método de UV foram selecionadas a partir de ensaios preliminares com soluções metanólicas do fosamprenavir SQR.

Foi utilizado espectrofotômetro SHIMADZU UV-2201 e cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 264 nm, utilizando metanol grau CLAE como branco.

Para a validação do método por UV foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão e precisão.

5.3.2.1 Especificidade

Para análise da especificidade foram preparadas soluções de fosamprenavir SQR e de placebo, em metanol.

A mistura placebo foi composta pelos excipientes da formulação (Telzir[®]). As concentrações percentuais médias de cada excipiente foram baseadas na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas a partir do peso médio de 20 comprimidos (1,165 g).

5.3.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão da SQR contendo cinco níveis de concentração, realizada em três diferentes dias.

Primeiramente, preparou-se uma solução de fosamprenavir SQR contendo 50 µg/ml em metanol. A seguir, com auxílio de uma bureta, alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml foram transferidas para balão volumétrico de 10 ml e

aferidas com metanol. Foram obtidos os pontos da curva com, respectivamente, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml. Foram realizadas três leituras para cada solução.

A curva padrão foi obtida a partir dos valores de absorvância *versus* concentração de fosamprenavir nas soluções correspondentes (µg/ml). A equação da reta foi calculada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

5.3.2.3 Precisão

A precisão do método analítico, realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária, foi avaliada através da determinação do desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos na determinação quantitativa do fosamprenavir comprimidos.

Para a determinação da repetibilidade, o DPR foi calculado a partir da análise de 6 amostras em um mesmo dia. A determinação da precisão intermediária foi avaliada através da determinação do DPR entre os resultados obtidos durante os três dias de análise. As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir.

Pesou-se o equivalente a 5 mg de fosamprenavir e transferiram-se para balão volumétrico de 100 ml obtendo-se concentração final de 50 µg/ml. Transferiram-se 3,0 ml da solução com auxílio de bureta para balão volumétrico de 10 ml obtendo-se concentração final de 15 µg/ml.

5.3.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração. Preparou-se uma solução amostra contendo 25 µg/ml de fosamprenavir e uma solução da SQR a 25 µg/ml.

Para a análise, foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas de 2,0 ml da solução amostra para balões volumétricos de 10 ml e estes foram denominados A, R₁, R₂ e R₃. Foram adicionadas alíquotas de 2,0 ml; 4,0 ml e 6,0 ml da solução de fosamprenavir SQR aos balões R₁, R₂ e R₃, respectivamente, e completou-se o volume com metanol.

O preparo das soluções para o teste de recuperação está representado, esquematicamente, na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Preparo das soluções para o teste de recuperação por UV.

Balão Volumétrico	Volume amostra 25 µg/ml (ml)	Volume SQR 25 µg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	2,0	—	5
R ₁	2,0	2,0	10
R ₂	2,0	4,0	15
R ₃	2,0	6,0	20
P	—	2,0	5

As soluções denominadas A, P, R₁, R₂ e R₃ foram preparadas em triplicada. Para cada solução foram realizadas três determinações.

As percentagens de recuperação (R%) da SQR foram calculadas de acordo com a equação 5.3 descrita no item 5.2.2.2.4.

5.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada fazendo-se uma varredura de 200 a 400 nm para as soluções fosamprenavir SQR (25 µg/ml) e solução placebo dos comprimidos. Conforme pode ser observado na Figura 5.4, os excipientes da formulação não causam interferência no comprimento de onda máximo do fosamprenavir em metanol (264 nm) demonstrando a especificidade do método analítico.

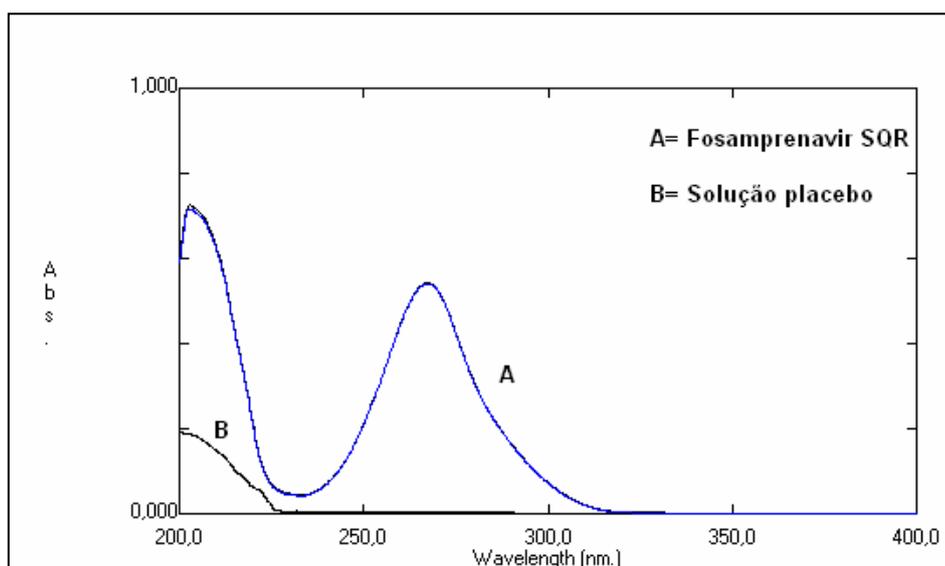


Figura 5.4 — Espectro de absorção na região do UV da solução placebo e da solução fosamprenavir SQR em metanol, na faixa de 200 a 400 nm.

5.3.3.2 Linearidade

A partir das absorvâncias obtidas na faixa de concentração estudada (5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml), construiu-se três curvas padrão do fosamprenavir SQR. Na

Figura 5.5 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de correlação.

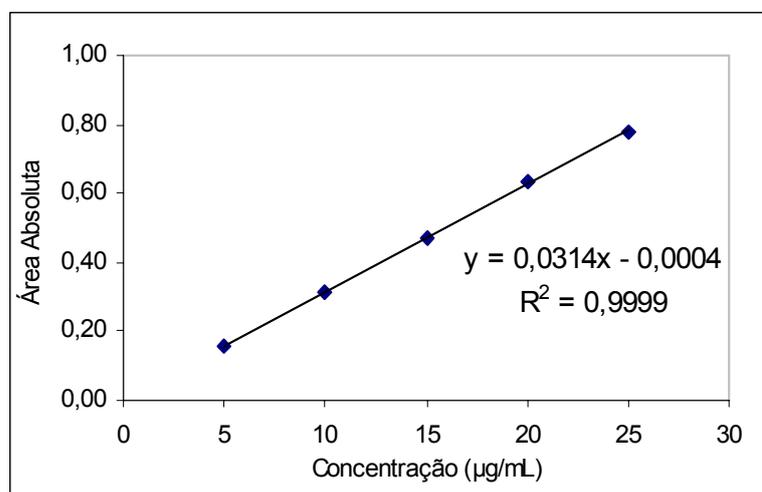


Figura 5.5— Representação gráfica da curva padrão do fosamprenavir obtida por UV.

A linearidade da curva padrão foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) demonstrada na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 — Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do fosamprenavir.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre	4	0,73926	0,184816	4959,28*	3,48
Regressão linear	1	0,73916	0,739156	19834,24*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,00011	0,000036	0,96	3,71
Resíduo	10	0,000373	0,000037		
Total	14	0,73964			

*Significativo para $p < 0,05$

Os resultados demonstram que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade.

Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação de 0,9999, indicam que o método é linear na faixa de concentração de 5 a 25 µg/ml de fosamprenavir.

5.3.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos DPR intradia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) conforme descrito em 5.3.2.3. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11— Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por UV, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e inter-dias.

n	1	2	3	4	5	6	Média	DPR (%)
Dia 1	100,6	10,9	100,2	101,1	100,3	100,1	100,7	0,42
Teor (%) Dia 2	99,4	99,9	98,8	97,0	98,7	98,8	98,8	1,01
Dia 3	101,4	101,7	100,9	101,0	101,1	102,0	101,2	0,43
Média dos três dias							100,5	
DPR dos 3 dias (%)							1,25	

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intradia) e da precisão intermediária (entre-dias). Os resultados de DPR obtidos, inferiores a 2,0, conforme preconiza a literatura, demonstram a concordância entre os vários resultados analíticos, indicando que o método proposto utilizando a espectroscopia no ultravioleta é preciso (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 32, 2009).

5.3.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na solução dos excipientes, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 5.3.2.4.

Os valores experimentais obtidos são apresentados na Tabela 5.12. As percentagens médias de recuperação estiveram na faixa de 99,3 a 101,4, o que demonstrou que o método proposto é exato.

Tabela 5.12— Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por UV para o fosamprenavir.

	Concentração (µg/ml)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	Adicionada	Recuperada*			
R1	5	5,07	101,4	101,4	1,18
R1	5	5,03	100,6		
R1	5	5,01	100,2		
R2	10	9,98	99,8	99,3	0,45
R2	10	9,93	99,3		
R2	10	9,89	98,9		
R3	15	15,10	100,7	100,9	0,49
R3	15	15,22	101,5		
R3	15	15,09	100,6		

*cada valor representa a média de três injeções.

5.4 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

5.4.1 REVISÃO

A Eletroforese Capilar é uma técnica amplamente utilizada para separação e análise de fármacos devido a sua seletividade, simplicidade, utilização de volumes pequenos da amostra e do eletrólito de trabalho e desta forma, volume mínimo de resíduos produzidos. O uso de capilares com diâmetros internos extremamente pequenos (na faixa de 15-100 μm) permite uma melhor dissipação do calor e, assim, é possível obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise (TAVARES, 1996; SANTORO *et al.*, 2000).

A eletroforese é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica, compreendem a “eletroforese capilar”. Os principais modos de EC desenvolvidos e atualmente aplicados incluem a eletroforese capilar de zona (CZE). Nesta categoria enquadram-se a eletroforese capilar em solução livre, a eletroforese capilar eletrocínética micelar (MEKC), a eletrocromatografia (CEC) e a isotacoforese capilar em gel (CITP) (KUHR, 1990; TAVARES, 1996; KOK, 2000).

A eletroforese de zona em solução livre é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados devido a sua facilidade de implementação e otimização das condições experimentais. Apresenta esta denominação devido ao fato de que o capilar e os reservatórios contendo os eletrodos são preenchidos com um tampão (denominado eletrólito carreador), o qual conduz a corrente elétrica e fornece a capacidade tamponante. Sob a influência do campo elétrico, as espécies iônicas da amostra e do tampão migram para o eletrodo correspondente, isto é, cátions em direção ao catodo e ânions em direção ao anodo (TAVARES, 1997; KOK, 2000).

Na eletroforese capilar eletrocinética micelar a solução tampão contém um tensoativo que atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna de fase reversa em CLAE. O tensoativo é introduzido dentro do capilar em concentração acima da concentração micelar crítica. As micelas carregadas atuam como fase estacionária. Assim, os compostos mais hidrofóbicos permanecem mais tempo na micela carregada negativamente e, conseqüentemente, eluem por último (SANTORO *et al.*, 2000; KUHN *et al.*, 1993).

As separações por eletrocromatografia capilar baseiam-se em processos eletroforéticos e, simultaneamente, interações cromatográficas, como partição, adsorção e permeação em gel por meio de um fino capilar. A introdução de uma fase estacionária em ambiente eletroforético, tanto na forma de um leito empacotado, ou como um filme superficial recobrando as paredes do capilar, permite a possibilidade de partição cromatográfica com mecanismo alternativo de separação eletroforética (KUHN *et al.*, 1993).

Na isotacoforese a amostra é introduzida na interface de um sistema tampão, consistindo de um eletrólito “líder” e um eletrólito “terminal”. Para efetuar a separação, utilizam-se as diferenças nas mobilidades eletroforéticas de cátions e ânions, em relação aos íons dos eletrólitos líder e terminal. Na separação de uma amostra de cátions, por exemplo, o eletrólito líder deve conter um cátion cuja mobilidade seja maior que a dos íons a serem separados e o eletrólito terminal deve possuir cátions com mobilidades inferiores aos cátions da amostra. Desta forma, estabelecem-se zonas de amostras, entre os dois tipos de eletrólitos, que vão sendo continuamente separadas, até que cada zona contenha um único tipo de íon. Todas as zonas migram, na mesma velocidade do íon do eletrólito líder, em direção ao eletrodo correspondente (TAVARES, 1997; KUHN *et al.*, 1993).

5.4.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.2.1 Preparo das soluções

- **Solução SQR, amostra e padrão interno**

Para solubilização dos comprimidos e da solução SQR de fosamprenavir foi utilizado metanol, preparado no dia da análise. Para solubilização da sulfametazina, padrão interno, utilizou-se hidróxido de sódio 1 *M*.

- **Derivatização das soluções**

Para a realização das análises, as soluções foram derivatizadas com fluorescamina. Misturou-se as seguintes soluções: 5 µl de amostra (fosamprenavir + sulfametazina) + 25 µl de Tampão Borato 25 mM pH 9,0 + 65 µl água + 5 µl fluorescamina 20 mM. Após preparo da solução esperou-se 40 minutos, tempo para reação completa, para iniciar a análise das amostras.

As condições eletroforéticas empregadas estão descritas no Quadro 4.3, página 35, item 4.2.4.4.

A ativação do capilar foi realizada com hidróxido de sódio 1 *M* e fluoresceína 25 mM por 10 e 20 minutos respectivamente. Este procedimento precedeu a primeira utilização do capilar. Nas corridas eletroforéticas posteriores, a etapa de pré-condicionamento constitui na lavagem do capilar com hidróxido de sódio 1 *M* e eletrólito de corrida por 10 e 5 minutos respectivamente.

Os parâmetros analíticos avaliados para a validação do método por eletroforese capilar foram: especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

5.4.2.2 Especificidade

Para análise da especificidade foram preparadas soluções de fosamprenavir SQR e de placebo, em metanol. Após seguiu-se o procedimento de derivatização, conforme descrito no item 5.4.2.1.

A mistura placebo foi composta pelos excipientes da formulação (Telzir®). As concentrações percentuais médias de cada excipiente foram baseadas na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas a partir do peso médio de 20 comprimidos (1,165 g).

5.4.2.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão da SQR contendo cinco níveis de concentração, realizada em três diferentes dias.

Primeiramente, preparou-se uma solução de fosamprenavir SQR contendo 1 mM em metanol. A seguir, com auxílio de uma pipeta automática, alíquotas de 400, 600, 800, 1000 e 1200 µl foram transferidas para balão volumétrico de 10 ml, e adicionou-se 400 µl de sulfametazina a cada um dos balões os quais foram aferidos com tampão Borato 25 mM, pH 9,0. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 µM. Realizaram-se três leituras para cada solução.

A curva padrão foi obtida a partir dos valores de concentração *versus* relação área fosamprenavir/sulfametazina (PI) nas soluções correspondentes (µM). A equação da reta foi calculada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

5.4.2.4 Precisão

A precisão do método analítico, realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária, foi avaliada através da determinação do desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos na determinação quantitativa do fosamprenavir comprimidos.

Para a determinação da repetibilidade, o DPR foi calculado a partir da análise de 6 amostras em um mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada através da determinação do DPR entre os resultados obtidos durante os três dias de análise. As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir.

Pesou-se o equivalente a 6,23 mg de fosamprenavir em um balão volumétrico de 10 ml, diluído em metanol, obtendo-se concentração final de 1 mM. Transferiram-se 800 µl da solução e 500 µl de sulfametazina, padrão interno, com auxílio de pipeta automática para balão volumétrico de 10 ml, o volume sendo aferido com tampão borato 25 mM com pH de 9,0. Após a derivatização e posteriores diluições, obteve-se uma concentração final de 4 µM.

5.4.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração. Preparou-se uma solução amostra de 1 mM de fosamprenavir e uma solução da SQR a 1 mM.

Para a análise, foram transferidas, com auxílio de pipeta automática, alíquotas de 400 µl da solução amostra para balões volumétricos de 10 ml e estes foram denominados A, R₁, R₂ e R₃. Foram adicionadas alíquotas de 200 400 e 600 µl da solução de fosamprenavir SQR aos balões R₁, R₂ e R₃, respectivamente, em todos os balões foi adicionado 500 µl de sulfametazina, PI, e aferiu-se o volume tampão borato.

O preparo das soluções para o teste de recuperação está representado, esquematicamente, na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Preparo das soluções para o teste de recuperação por EC.

Balão Volumétrico	Volume amostra 1 mM (μl)	Volume PI 1 mM (μl)	Volume SQR 1 mM (μl)	Concentração final FPV (μM)
A	400	500	—	2
R ₁	400	500	200	3
R ₂	400	500	400	4
R ₃	400	500	600	5
P	—	500	400	2

As soluções denominadas A, P, R₁, R₂ e R₃ foram preparadas em triplicada. Para cada solução foram realizadas três determinações.

As percentagens de recuperação (R%) da SQR foram calculadas de acordo com a equação 5.3 descrito no item 5.2.2.2.5.

5.4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.3.1 Derivatização

A fluorescamina é um agente derivatizante muito utilizado na determinação de compostos de interesse farmacêutico tais como oseltamavir, penicilamina, resíduos de sulfonamida, lisinopril, vigabatrin, gabapenti, dentre outros (SULIMAN *et al.*, 2008; SOTO-CHINCHILA *et al.*, 2005; MAUDENS *et al.*, 2004; SAGIRLI e ERSOY, 2004). É intrinsecamente não fluorescente, mas reage rapidamente com aminas primárias (aminoácidos, peptídeos e proteínas) produzindo um derivado fluorescente (azul-esverdeado) (Figura 5.6). O excesso de reagente adicionado é rapidamente hidrolisado, em meio aquoso, convertendo-se em um produto não fluorescente. A fluorescência de uma solução contendo aminas e fluorescamina é proporcional a quantidade de grupo amina livre presente molécula (BARDELMEIJER *et al.*, 1998).

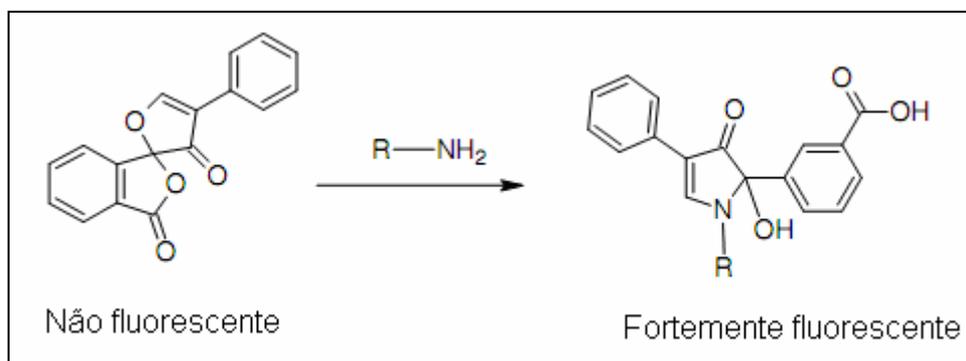


Figura 5.6 — Reação da fluorescamina com uma amina livre.

A presença de uma amina primária na molécula de fosamprenavir possibilitou o emprego de fluorescamina como agente derivatizante e posterior detecção por fluorescência.

5.4.3.2 Especificidade

Os eletroferogramas obtidos na análise das soluções fosamprenavir SQR ($4 \mu\text{M}$) e solução placebo dos comprimidos estão apresentados na Figura 5.7. Conforme pode ser observado os excipientes da formulação não interferem na determinação do fosamprenavir, uma vez que nenhum pico com tempo de migração igual ao fosamprenavir foi observado, indicando que o método proposto é específico.

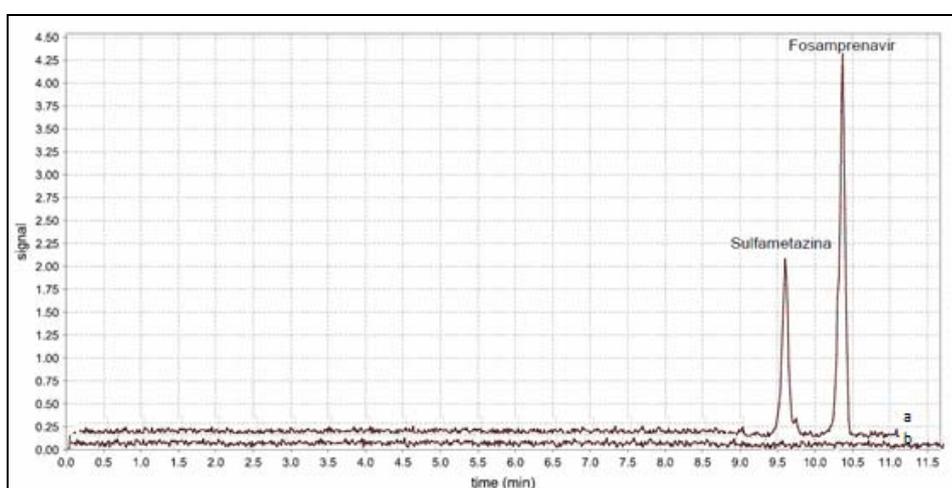


Figura 5.7 — Eletroferograma obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de fosamprenavir SQR (a) e solução placebo (b), na concentração de ($4 \mu\text{M}$). Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida de 60 cm x $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno; Comprimento de onda: Intervalo de detecção de 475 a 525 nm; Eletrólito: Tampão Borato 25 mM, pH= 10,10.

5.4.3.2 Linearidade

A partir das áreas absolutas obtidas na faixa de concentração estudada (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 μM), construiu-se três curvas padrão do fosamprenavir SQR. Na Figura 5.8 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de correlação.

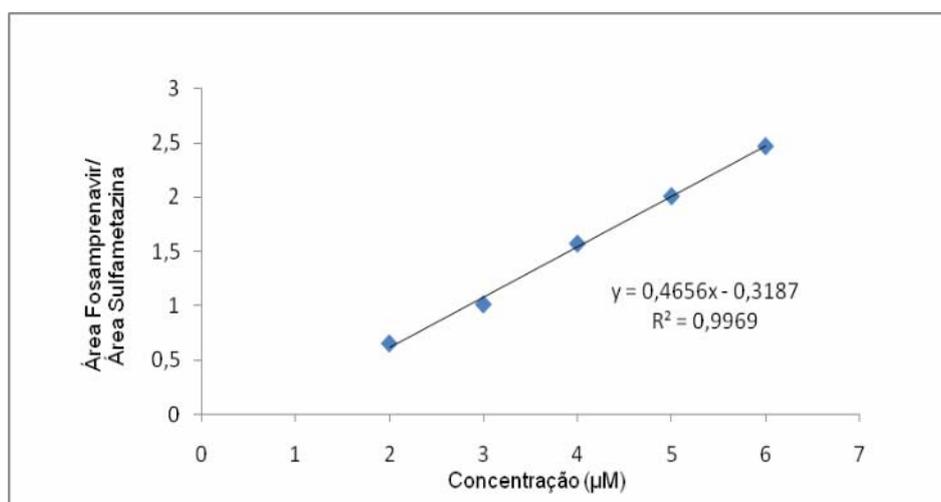


Figura 5.8 – Representação gráfica da curva padrão do fosamprenavir obtida por EC.

Os resultados demonstram que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação de 0,9969 indicam que o método é linear na faixa de concentração de 2 a 6 μM de fosamprenavir.

5.4.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos DPR intradia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) conforme descrito em 5.3.2.3. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14— Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por EC, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e inter-dias.

n	1	2	3	4	5	6	Média	DPR (%)	
Teor (%)	Dia 1	101,7	99,2	99,1	102,6	101,4	98,1	100,4	1,8
	Dia 2	99,7	99,9	99,6	99,4	100,9	99,3	99,8	0,5
	Dia 3	100,3	99,5	100,9	99,0	96,4	101,0	99,5	1,7
Média dos três dias							99,9		
DPR dos 3 dias (%)							0,42		

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intradia) e da precisão intermediária (entre-dias). Os resultados obtidos indicaram um teor médio de 99,9 % (DPR= 0,42), em três dias de análise. Os baixos valores de DPR observados indicam que o método é preciso.

5.4.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na solução dos excipientes, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 5.4.2.4.

Os valores experimentais obtidos são apresentados na Tabela 5.15. As percentagens médias de recuperação estiveram na faixa de 99,7 a 102,9, o que demonstrou que o método proposto é exato.

Tabela 5.15 —Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por EC para o fosamprenavir.

	Concentração (μM)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR
	Adicionada	Recuperada*			
R1	1	0,986	98,7	100,9	0,51
R1	1	1,024	102,5		
R1	1	1,014	101,4		
R2	2	1,998	99,9	99,7	0,89
R2	2	2,035	101,8		
R2	2	1,948	97,4		
R3	3	3,083	102,8	99,9	1,66
R3	3	2,944	98,1		
R3	3	2,962	98,7		

5.5 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para a determinação do fosamprenavir no produto acabado, foi realizada análise estatística dos teores médios obtidos nos diferentes métodos, através da análise de variância (ANOVA).

5.5.1 RESULTADOS

Os resultados obtidos para a determinação quantitativa do fosamprenavir, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabelas 5.16. A Tabela 4.17 apresentam-se os resultados da ANOVA realizada para comparação dos valores experimentais obtidos a partir dos métodos propostos.

Tabela 5.16— Resultados experimentais obtidos para o doseamento do fosamprenavir, pelos métodos propostos.

	UV	CLAE	EC
Média (%)	100,5	100,8	99,9
DPR	1,25	0,59	0,42
n	18	18	18

Tabela 5.17— Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos do fosamprenavir comprimidos.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	2	7,85741	3,92001	3,6214
Resíduo	51	54,9878	1,06471	F crítico: 5,18
Total	53	62,8874		

*significativo para $p = 0,05$

5.5.2 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da ANOVA demonstraram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para um nível de significância de 5%. Desta forma, os métodos são equivalentes, ou seja, intercambiáveis, sendo adequado para a análise quantitativa do fosamprenavir na forma farmacêutica comprimidos.

5.6 CONCLUSÕES

- O método por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado para o doseamento do fosamprenavir na forma farmacêutica comprimidos, demonstrando ser linear, específico, exato, preciso e robusto;
- O fosamprenavir demonstrou ser instável quando submetido à oxidação (H_2O_2 3%), à fotólise (254 nm) e à hidrólise ácida (HCl 1M; HCl 1M, 80 °C/90 min);
- A utilização do detector de arranjo de diodos comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interfere na determinação do fosamprenavir, indicando que o método proposto por CLAE é útil na determinação deste fármaco frente a seus produtos de degradação;
- O método de quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta mostrou-se linear, preciso, exato e específico;
- O método de determinação do fosamprenavir utilizando a eletroforese capilar demonstrou ser específico, linear, preciso e exato;
- A análise estatística comparativa dos métodos de quantificação por CLAE, UV e EC demonstrou não haver diferença significativa, sendo considerados equivalentes para análise do fosamprenavir.

5.7 REFERÊNCIAS

BARDELMEIJER, H. A.; LINGEMAN, H.; RUITER, C.; UNDERBERG, W. J. M. Derivatization in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 807, p. 3-26, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da união**, Brasília, 29 de maio de 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1ª ed. Campinas, SP: UNICAMP, 2006. 453 p.

ERMER, J.; PLOSS, H. J. Validation in pharmaceutical analysis - Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 859-870, 2005.

ERMER, J.; ARTH, C.; RAEVE, P.; DILL, D.; FRIEDEL, H.; HOWER-FRITZEN, H.; KRAMER, M. Precision from drug stability studies. Investigation of reliable repeatability and intermediate precision of HPLC assay procedure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 653-663, 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.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ª ed. São Paulo, SP. Editora Pharmabooks, 2010. 511 p.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S. A. Electrochemical evaluation and determination of antiretroviral drug fosamprenavir using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 189-203, 2010.

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

JUSTESEN, U. S.; PEDERSEN, C.; KLITGAARD. 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.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 1^a ed. Campinas, SP. Editora Rima, 2006. 62 p.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. 1^a ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009. 382 p.

MAUDENS KE, ZHANG GF, LAMBERT WE. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85–92, 2004.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington, 2000.

KOK, W., **Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation, Chromatographia**, Supplement Vol. 51 (2000), Vieweg, Wiesbaden.

KUHR, W. G. Capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**. v. 62, p 403-414, 1990.

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.

REBIERE, H.; MAZEL, B.; CIVADE, C.; ANTOINE, P. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 376-383, 2007.

RENGER, B. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 167-176, 2000.

SAGIRLI O, ERSOY L. An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 809, p.159–165, 2004.

SANTORO, M. I. R.; PRADO, M. S. A. P.; STEPPE, M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, p. 97-110, 2000.

SOTO-CHINCHILLA JJ, GÁMIZ-GRACIA L, GARCÍA-CAMPAÑA AM, IMAI K, GARCÍA-AYUSO LE. High performance liquid chromatography post-column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)phenyl] oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**; v. 1047, p. 60–67, 2005.

SULIMAN F. O.; AL-LAWATI Z. H.; AL-KINDY S. M. Z. A spectrofluorimetric sequential injection method for the determination of penicillamine using fluorescamine in the presence of β -cyclodextrins. **Journal of Fluorescence**, v. 18, p.1131–1138, 2008.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli *et al.* 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v.19, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

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 32: **The United States Pharmacopoeia**. 32 ed. Rockville: Unites States Phamacopeial Convention, 2009.

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

6. CAPÍTULO III

Desenvolvimento e validação de método de dissolução para fosamprenavir comprimidos, baseado em dados *in vivo*.

6.1 INTRODUÇÃO

O teste de dissolução *in vitro* faz parte das especificações farmacopéicas e objetiva avaliar a liberação das substâncias ativas a partir da forma farmacêutica sólida ou semi-sólida. Nas últimas décadas, tem sido utilizado no controle de qualidade visando a assegurar a uniformidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações, assegurar a uniformidade e o desempenho após pequenas alterações pós-aprovação do produto, bem como para detectar problemas que possam alterar a biodisponibilidade do mesmo (FDA, 1997a; AULTON, 2005).

O valor do teste de dissolução, como uma ferramenta para o controle de qualidade e como preditivo do comportamento *in vivo*, é significativamente intensificado 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 sua permeabilidade através da membrana gastrintestinal, além de fornecer bases para ajustar as especificações de dissolução, pode prever quando uma correlação *in vitro-in vivo* pode ser estabelecida.

Considerando que a dissolução é um fator limitante para absorção do fosamprenavir, este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar método para avaliar o perfil de dissolução do fosamprenavir *in vitro*, a partir do Telzir[®] comprimidos, baseado nos dados *in vivo*. Os dados farmacocinéticos médios *in vivo* foram retirados dos estudos previamente realizados por FALCOZ e colaboradores (2002) e RAFFI e colaboradores (2004), após a administração do Telzir[®] a voluntários saudáveis.

A fim de verificar se o método proposto é capaz de detectar mudanças na formulação, comprimidos de Telzir[®] foram submetidos a diferentes temperaturas e umidade, bem como avaliou-se comprimidos com prazo de validade expirado. Para comparação dos perfis obtidos utilizou-se os fatores f_1 (diferença) e f_2 (semelhança). Posteriormente, determinou-se a cinética de dissolução por meio da aplicação dos métodos modelo-dependentes.

6.2 REVISÃO

6.2.1 DISSOLUÇÃO

Dissolução é o processo pelo qual partículas do fármaco se dissolvem em um determinado meio. Para se obter um efeito terapêutico eficaz, todo fármaco deve apresentar solubilidade em água, mesmo que limitada, e independente da via de administração (AULTON, 2005).

Em sistemas biológicos, a dissolução de um fármaco em um meio aquoso é condição imprescindível para sua absorção sistêmica. A velocidade nas quais fármacos com baixa solubilidade se dissolvem a partir de uma forma farmacêutica intacta ou uma forma sólida desintegrada, no trato gastrointestinal, freqüentemente controla a velocidade de absorção sistêmica do fármaco (SHARGEL & YU, 2005).

6.2.1.1 Dissolução e absorção

Para que um fármaco seja absorvido, deve ser dissolvido no fluido do local de absorção. Conforme a partícula sofre dissolução, as moléculas da superfície do fármaco são as primeiras a entrar em solução, criando uma camada do fármaco-solução que envolve a superfície da partícula sólida, denominada de camada de difusão. A partir dessa camada, as moléculas do fármaco passam através do líquido solvente e entram em contato com as membranas biológicas, ocorrendo a absorção (ANSEL *et al.*, 2000).

Se o processo de dissolução de uma partícula de fármaco for rápido, a velocidade em que começa a ser absorvido torna-se primeiramente dependente de sua capacidade de atravessar a membrana gastrointestinal (permeabilidade) e do esvaziamento gástrico. Contudo, se a velocidade de dissolução for lenta, devido às suas características físico-químicas ou da forma

farmacêutica, o processo de dissolução torna-se uma etapa limitante da velocidade de absorção (SIRISUTH & EDDINGTON, 2004; AULTON, 2005; ANSEL *et al.*, 2000).

6.2.1.2 Fatores que afetam a velocidade de dissolução *in vitro*

Noyes, Whitney e outros pesquisadores estudaram a velocidade de dissolução de formas sólidas e estabeleceram a seguinte equação (Equação 6.1) (SHARGEL & YU, 2005):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \times A \times (C_s - C_t)}{h} \quad \text{Equação 6.1}$$

Onde:

- dC/dt = velocidade de dissolução
- C_s = concentração de saturação
- C_t = concentração do fármaco no tempo t
- A = área superficial da partícula
- D = constante de difusão
- h = espessura da camada de difusão

Diversos fatores podem influenciar a velocidade de dissolução de fármacos. Estes fatores podem ser derivados a partir da consideração dos termos que aparecem na equação de Noyes-Whitney e do conhecimento dos fatores que, por sua vez, os afetam, como (AULTON, 2005; SHARGEL & YU, 2005):

- A , área superficial de sólido não-dissolvido: presença de tensoativos, tamanho das partículas sólidas;

- C_s , solubilidade do sólido no meio: hidrossolubilidade, pH, natureza química do sólido e tensoativos;
- C , concentração do soluto na solução: volume de meio;
- D , constante de difusão: viscosidade do meio;
- h , espessura da camada de difusão: velocidade de agitação, da forma e posição do agitador (*in vitro*).

6.2.1.3 Tamanho da partícula

De acordo com a equação de Noyes-Whitney, o aumento na área da superfície total do fármaco em contato com o meio de dissolução provocará um aumento na velocidade de dissolução (BANAKAR, 1992; ANSEL *et al.*, 2000).

Muitos fármacos pouco solúveis são comercializados na forma micronizada, de modo a aumentar a sua superfície de contato e, desta forma, a sua dissolução (SHARGEL & YU, 2005; AULTON, 2005).

6.2.1.4 Tensoativos

A utilização de tensoativos em ensaios de dissolução *in vitro* para fármacos pouco solúveis em água é bem documentada (NOORY *et al.*, 2002). A habilidade dos tensoativos em acelerar a dissolução *in vitro* é atribuída à molhabilidade, solubilização micelar e defloculação (SHAH *et al.*, 1989).

A solubilização micelar ocorre quando o tensoativo está presente em concentrações que excedem a concentração micelar crítica (CMC). O uso de tensoativos em meios de dissolução com concentrações supramicelares melhora a solubilidade de compostos pouco solúveis em água (ROHRS, 2001; SHAH *et al.*, 1989).

A utilização de substâncias tensoativas é fisiologicamente relevante, uma vez que as mesmas estão presentes no trato gastrintestinal, auxiliando na dissolução de fármacos e, desta forma, melhorando a absorção (SHAH *et al.*, 1989).

6.2.1.5 pH

O ajuste do pH do meio de dissolução proporciona um aumento na solubilidade do fármaco, se o composto for ionizável. Para estes compostos, as equações 6.2 e 6.3 governam a solubilidade (ROHRS, 2001).

$$\text{Base livre: } C_{\text{Total}} = C_i \times (1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}) \quad \text{Equação 6.2}$$

$$\text{Ácido livre: } C_{\text{Total}} = C_i \times (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}) \quad \text{Equação 6.3}$$

Onde:

C_{Total} : Solubilidade total

C_i : Solubilidade intrínseca do composto neutro

Assim, para fármacos com propriedade ácida (contendo hidrogênios ionizáveis), à medida que o pH do meio de dissolução aumenta, o equilíbrio químico se desloca no sentido da formação do sal ionizado e, em consequência disto, a solubilidade total aumenta. Do mesmo modo, fármacos com propriedade básica, têm a solubilidade total do composto aumentada à medida que o pH do meio de dissolução diminui (AULTON, 2005; ROHRS, 2001).

6.2.1.6 Velocidade de agitação

A velocidade de dissolução de uma forma farmacêutica está relacionada com as condições do teste de dissolução. Entre essas condições, propriedades hidrodinâmicas, como a intensidade da força de agitação, são fatores determinantes do comportamento de dissolução de formas farmacêuticas sólidas (KAMBA *et al.*, 2003).

A taxa de dissolução é diretamente afetada pela velocidade de agitação, uma vez que a espessura da camada de difusão é inversamente proporcional à velocidade de agitação (BANAKAR, 1992).

KAMBA e colaboradores (2003) investigaram o efeito da força de agitação sobre a dissolução de comprimidos de ácido benzóico, utilizando o equipamento USP-2, e a influência das diferentes posições de afastamento do comprimido em relação ao centro da cuba, uma vez que os comprimidos freqüentemente não ficam corretamente sob o eixo axial da pá, devido à intensidade da força de agitação. Foi verificado um aumento na velocidade de dissolução dos comprimidos com o aumento da velocidade de rotação das pás, bem como com o aumento da distância entre o centro da cuba e a posição do comprimido.

No trato gastrintestinal, a espessura da camada de difusão, h , é afetada pelo nível de agitação a que cada partícula do fármaco é submetida. Por esta razão, o aumento da motilidade gástrica e/ou intestinal pode aumentar a velocidade de dissolução de fármacos escassamente solúveis, devido à redução na espessura da camada de difusão ao redor das partículas do fármaco (AULTON, 2005).

6.2.1.7 Natureza química

Os materiais farmacêuticos sólidos podem ocorrer como substâncias cristalinas puras de estrutura identificável e definida. Algumas substâncias ativas que existem na forma cristalina são capazes de formar diferentes tipos de cristais, dependendo das condições (temperatura, solvente, tempo) sob as quais a cristalização é induzida. Essa propriedade pela qual uma única substância química pode existir em mais de uma forma cristalina é denominada polimorfismo (SHARGEL & YU, 2005; ANSEL *et al.*, 2000).

As formas polimórficas apresentam algumas propriedades físico-químicas diferentes, como solubilidade, dissolução, densidade, ponto de fusão. Sob condições de temperatura e pressão definidas, apenas uma das possíveis formas polimórficas de uma substância pura é estável, sendo as outras formas denominadas metaestáveis, formas que se transformam, a diferentes velocidades, na forma estável (AULTON, 2005).

A presença de polimorfismo em compostos farmacêuticos pode ter um impacto direto sobre a qualidade e o desempenho de fármacos, tais como a estabilidade, a dissolução e a biodisponibilidade do medicamento (RAW *et al.*, 2004; ICH, 2005). O inesperado aparecimento ou desaparecimento de uma forma polimórfica pode produzir sérias conseqüências, resultando em um atraso no desenvolvimento de um produto e na interrupção da produção comercial (RAW *et al.*, 2004).

Além das formas polimórficas, alguns materiais farmacêuticos sólidos podem ocorrer em formas não cristalinas ou amorfas. A forma amorfa de um composto apresenta maior solubilidade em relação à forma cristalina correspondente, uma vez que a estrutura cristalina é mais rígida e termodinamicamente mais estável. Por esta razão, formas amorfas de um fármaco demonstram velocidade de dissolução maior em relação à sua forma cristalina (SHARGEL & YU, 2005).

6.2.2 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Desta forma, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*, garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

O teste de dissolução deve ser um método discriminativo capaz de detectar mudanças na formulação, no processo de fabricação e nas características físico-químicas do fármaco (polimorfismo, estado de hidratação, tamanho de partícula), uma vez que essas alterações podem afetar a solubilidade e o desempenho *in vivo* do produto (PHARM. FORUM, 2004).

O conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética do fármaco deve ser considerado para a definição de especificações de dissolução (FDA, 1997a).

Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), que tem como base a solubilidade e a permeabilidade, os fármacos podem ser classificados como pertencente às seguintes classes (AMIDON *et al.*, 1995; LINDENBERG *et al.*, 2004):

- **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 dissolução. Nestes casos, o fator limitante poderá ser o esvaziamento gástrico e uma CIVIV pode não ser obtida para formas de liberação imediata. O teste de dissolução para formas de liberação imediata das Classes I e III objetiva apenas constatar se o fármaco é

liberado a partir da forma farmacêutica, em meio aquoso moderado, dentro de um determinado tempo (AMIDON *et al.*, 1995; DRESSMAN *et al.*, 1998).

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

Ao contrário da Classe I, para fármacos muito pouco solúveis, a dissolução pode ser o fator limitante da absorção. A limitação pode ser devida a insuficiente quantidade de fluidos no TGI para dissolver a dose, a qual pode ser prevista através da razão dose/solubilidade do fármaco, ou pode ser atribuída a não dissolução total da dose antes de sua passagem pelos sítios de absorção, devido à dissolução demasiadamente lenta do fármaco. Nestes casos, uma boa CIVIV pode ser esperada (AMIDON *et al.*, 1995; DRESSMAN *et al.*, 1998).

- **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 oral (AMIDON *et al.*, 1995; DRESSMAN *et al.*, 1998; FDA, 1997a).

- **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. Neste caso, bem como para os fármacos da Classe II, técnicas de formulação poderiam ser utilizadas para aumentar a velocidade de dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade (AMIDON *et al.*, 1995; DRESSMAN *et al.*, 1998; AULTON, 2005).

De acordo com essa classificação, fármacos que apresentam biodisponibilidade maior que 90% são classificados como sendo altamente permeáveis. Já a solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dose unitária mais elevada em 250 ml de soluções tampão de pH entre 1,0 e 7,5 a 37 °C. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando o resultado, em volume, da relação dose/solubilidade é menor que 250 ml (LINDENBERG *et al.*, 2004).

O SCB pode ser utilizado para determinar as especificações de dissolução *in vitro* e também fornecer as bases para prever quando a correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) pode ser obtida (SIRISUTH & EDDINGTON, 2004).

6.2.3 ESPECIFICAÇÕES DE DISSOLUÇÃO

As especificações de dissolução *in vitro* são estabelecidas para garantir consistência de qualidade lote-a-lote e para indicar problemas potenciais de biodisponibilidade. Três categorias de especificações de dissolução podem ser descritas (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b):

- Especificação de um único ponto

Para formas farmacêuticas de liberação imediata, contendo fármaco altamente solúvel e que se dissolve rapidamente, especificação de um único ponto é adequada para a rotina de testes de controle de qualidade para uniformidade lote-a-lote (PHARM. FORUM, 2004; FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

- Especificação de dois pontos

Esta categoria de dissolução é útil para caracterização da qualidade do medicamento e como um teste de controle de qualidade de rotina para alguns tipos de medicamentos como, por exemplo, fármacos pouco solúveis em água.

- Perfil de dissolução

A avaliação do perfil de dissolução permite visualizar como a dissolução ocorre em função do tempo e, desta forma, é mais conclusiva em relação á dissolução de um único ponto (PHARM. FORUM, 2004).

Esse tipo de ensaio tem sido empregado como ferramenta no desenvolvimento de formulações, uma vez que evidencia diferenças na dissolução causadas por fatores ligados ao fármaco, aos excipientes e à técnica de fabricação empregada (STORPIRTIS *et al.*, 1998).

6.2.4 TIPOS DE EQUIPAMENTOS

Diferentes tipos de equipamentos são preconizados pela USP (The United States Pharmacopeia) e pela Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. IV) para a realização de ensaios de dissolução. A seleção do mais adequado para a realização destes testes depende da forma farmacêutica em que o medicamento foi formulado (USP 32, 2009). A tabela 6.1 apresenta os tipos de equipamentos utilizados para a realização de ensaios de dissolução de acordo com a forma farmacêutica.

Tabela 6.1 – Tipos de equipamentos preconizados.

Equipamento	Forma Farmacêutica
Cestos ^{1, 2}	cápsulas e comprimidos
Pás ^{1, 2}	cápsulas e comprimidos e suspensões
Cilindros Recíprocos ²	formulações do tipo granulo ou pérola, supositórios
Célula de Fluxo ²	princípios ativos com baixa solubilidade em solventes aquosos, supositórios, cápsula mole
Pá sobre disco ²	transdérmicos
Cilindro ²	transdérmicos
Disco Recíproco ²	formas sólidas orais que não desintegram e transdérmicos

¹Pela F. BRAS. IV, ²Pela USP

6.2.5 COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO

A comparação de perfis de dissolução é útil nos casos em que se deseja conhecer o comportamento de dois produtos antes de submetê-los a ensaios de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, para isentar as menores dosagens desses estudos e nos casos de alterações pós-registro (BRASIL, 2004).

Para a avaliação dos perfis de dissolução empregam-se os métodos modelo-independente e modelo-dependente (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b). Os métodos modelo-independente podem ser divididos em procedimentos baseados na ANOVA (análise de variância), testes de razão (razão de porcentagem dissolvida, área sob a curva ou tempo de dissolução médio) ou testes combinados (fatores f_1 e f_2 e índices de Rescigno – ξ_1 e ξ_2). Alguns métodos modelo-dependente aplicáveis à comparação de perfis de dissolução são: ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, Gompertz, Baker-lonsdale e Korsmeyer-Peppas (POLLI, 1996).

6.2.6 CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

A correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) é definida como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma propriedade *in vitro* de uma forma farmacêutica e uma resposta *in vivo* (FDA, 1997b).

A importância de desenvolver e validar um método de dissolução através de uma CIVIV é servir como um substituto da medida da velocidade e extensão da absorção oral, ou seja, da biodisponibilidade *in vivo*. O desenvolvimento de uma CIVIV pode também ser útil para a seleção das melhores condições de um teste de dissolução sendo este, utilizado como um método de controle de qualidade do desempenho do produto (SIRISUTH & EDDINGTON, 2004).

Uma CIVIV é usualmente desenvolvida quando a dissolução do fármaco é a etapa limitante da absorção *in vivo*. Para fármacos de liberação imediata que apresentam alta solubilidade em água (SCB classe 1 e 3), cuja velocidade de dissolução depende apenas da permeabilidade e do tempo de esvaziamento gástrico, nenhuma correlação pode ser estabelecida. Para fármacos pouco solúveis em água, cuja velocidade de dissolução é a etapa limitante da absorção, uma CIVIV pode ser estabelecida (FDA, 1997a; SIRISUTH & EDDINGTON, 2004).

6.2.6.1 Níveis de correlação

Quatro níveis de CIVIV podem ser estabelecidos (UPPOOR, 2001; SIRISUTH & EDDINGTON, 2004; BRASIL, 2002a; FDA, 1997b; SHARGEL & YU, 2005):

— Nível A: representa uma relação ponto a ponto entre os dados de dissolução *in vitro* e os dados de absorção *in vivo*. Geralmente esta correlação é linear, entretanto, correlações não-lineares são aceitáveis. Correlação nível A

é considerada o tipo de correlação mais informativa e 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, obtida pela modelagem matemática, utilizando modelos dependentes como Wagner-Nelson, para um compartimento, ou de Loo-Riegelman se o modelo se ajusta a dois compartimentos, ou ainda, utilizando modelos independentes. A correlação, geralmente linear, 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:

$$y = a.x + b \quad \text{Equação 6.4}$$

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.

— Nível B: este nível de correlação utiliza princípios da análise do momento estatístico. O tempo médio de dissolução é comparado ou com o tempo médio de residência ou com o tempo de dissolução *in vivo*. Este nível de correlação é menor do que o nível A, uma vez que a curva de concentração plasmática versus tempo não é completamente descrita pelo tempo médio de residência.

— Nível C: a correlação nível C é estabelecida através de uma relação entre a quantidade de fármaco dissolvido e parâmetros farmacocinéticos (ASC , t_{max} , C_{max}). É considerado o nível de correlação mais baixo.

— Nível C Múltiplo: é uma correlação que envolve um ou diversos parâmetros farmacocinéticos versus a quantidade de fármaco dissolvido em diversos tempos. Este nível de correlação é mais significativo do que o nível C.

6.2.7 CÍNÉTICA DE DISSOLUÇÃO

Baseia-se em funções matemáticas distintas que, após seleção de uma função adequada, permitem a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyers-Peppas, quadrático, Weibull, entre outros (POLLI, 1996; O'HARA *et al.*, 1998).

(1) Cinética de ordem zero:

As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, constituindo-se como uma das melhores formas de veicular fármacos para liberação controlada (VARELAS, 1995). Este modelo pode ser expresso, de um modo simples, pela equação 6.5:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad \text{Equação 6.5}$$

Onde:

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução (na maioria das vezes, $Q_0 = 0$);

K_0 : a constante de liberação de ordem zero.

(2) Cinética de primeira ordem:

As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade restante no seu interior, por unidade de tempo, de modo que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo (MULYE e TURCO, 1995). Este modelo pode ser expresso pela equação 6.6:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t \quad \text{Equação 6.6}$$

ou em logaritmos decimais através da equação 6.7:

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t / 2,303 \quad \text{Equação 6.7}$$

Onde:

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução (na maioria das vezes, $Q_0 = 0$);

K_1 : a constante de liberação de primeira ordem.

(3) Modelo de Higuchi:

Este modelo descreve a liberação de fármacos, a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada, como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. De modo geral, podemos resumir este modelo à equação 6.8:

$$Q_0 = K_H t^{1/2} \quad \text{Equação 6.8}$$

Onde:

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução;

K_H : constante de liberação de Higuchi;

$t^{1/2}$: raiz quadrada do tempo t .

(4) Modelo de Hixson-Crowell:

Aplica-se aos comprimidos em que a dissolução decorre em planos paralelos à superfície, cujas dimensões do mesmo diminuem proporcionalmente, de modo que a geometria inicial se mantém durante todo o tempo. HIXSON E CROWELL (1931), reconhecendo que a área de uma partícula regular é proporcional à raiz cúbica do seu volume, descreveram um modelo que pode ser descrito pela equação 6.9:

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t \quad \text{Equação 6.9}$$

Onde:

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução;

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

K_s : uma constante que incorpora a relação superfície/volume.

(5) Modelo de Korsmeyers-Peppas:

Foi desenvolvido por Korsmeyers e Peppas para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando o mesmo estiver envolvido em mais de um tipo de liberação (KORSMEYER, PEPPAS, 1981; KORSMEYER *et al.*, 1983). Neste

modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é representada pela equação 6.10:

$$M_t/M_\infty = Kt^n + b \quad \text{Equação 6.10}$$

Onde:

M_t/M_∞ : fração do fármaco liberada ao longo do tempo t ;

K : constante de liberação;

n : expoente de liberação;

b : liberação inicial rápida.

PEPPAS (1985) usou o valor de n para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação, tendo chegado a valores de $n = 0,5$ para a difusão (modelo de Fick) e valores de n mais elevados entre 0,5 e 1,0 num sistema plano, para a transferência de massa, segundo um modelo não-Fickiano. No caso de cilindros (comprimidos) n é 0,45, em vez de 0,5, e 0,89 em vez de 1,0.

Modelos que se fundamentam em estudos da cinética de dissolução possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação, uma vez que permitem conhecer a velocidade do processo; a quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução (O'HARA *et al.*, 1998; POLLI *et al.*, 1996; MOORE E FLANNER, 1996).

6.2.8 PODER DISCRIMINATÓRIO DO MÉTODO

As condições do teste de dissolução devem ser selecionadas de maneira que o teste seja discriminativo, exato, transferível e robusto. Método discriminativo é aquele capaz de detectar mudanças que possam afetar o comportamento *in vivo* do produto (STORPIRTIS, *et al.*, 2009). Um método de dissolução desenvolvido de maneira apropriada vai refletir mudanças na formulação, processo de fabricação ou características físico-químicas do fármaco, as quais podem afetar significativamente a solubilidade e/ou o desempenho *in vivo* do produto (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 ESTUDO *IN VIVO*

Para o desenvolvimento do método de dissolução para o fosamprenavir e o estabelecimento de uma correlação *in vitro-in vivo*, utilizou-se dados *in vivo* relativos à formulação referência (Telzir[®]). Os dados farmacocinéticos *in vivo* foram retirados dos estudos previamente realizados por FALCOZ e colaboradores (2002) e RAFFI e colaboradores (2004), após a administração do Telzir[®] a voluntários saudáveis.

6.3.1.1 Fração absorvida da dose

Os pontos experimentais médios da curva de concentração plasmática *versus* tempo foram obtidos através de modelagem matemática utilizando o programa de regressão não linear Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®]). Foi utilizado modelo de um compartimento aberto descrito pela Equação 6.11 e os parâmetros foram utilizados para estimar os pontos dos dados de concentração plasmáticos intermediários.

$$C = \frac{F.D.Ka}{Vd.(Ka - Ke)} \cdot (e^{-Ke.t} - e^{-Ka.t}) \quad \text{Equação 6.11}$$

A fração absorvida da dose (FA) foi calculada utilizando o método de Wagner-Nelson, de acordo com a Equação 6.12.

$$FA = \frac{C + k \cdot [ASC]_0^t}{k \cdot [ASC]_0^\infty} \quad \text{Equação 6.12}$$

Onde:

C = concentração plasmática

F = biodisponibilidade

D = dose

Ka = constante de absorção

Ke = constante de eliminação

Vd = volume de distribuição

ASC = área sob a curva

6.3.2 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

6.3.2.1 Equipamento de dissolução

Para o desenvolvimento do teste de dissolução para os comprimidos de fosamprenavir utilizou-se o equipamento de dissolução: VANKEL® VK 8000, bomba peristáltica bidirecional VK, circulador/aquecedor VK 750D controlado digitalmente e multi-banho (n = 8) VK 7010 com amostragem múltipla automatizada.

6.3.2.2 Determinação da solubilidade do fosamprenavir em diferentes meios

A solubilidade do fosamprenavir foi determinada nos meios: HCl 0,1 M, HCl 0,01 M, tampão fosfato (pH 6,0) e tampão acetato (pH 4,5).

Transferiram-se 70 mg para um béquer contendo 25 ml do meio, pré-aquecido a 37 °C. As amostras foram agitadas lentamente. Uma alíquota de 5,0 ml foi retirada após 1 e 2 horas e filtrada. Um ml da alíquota filtrada foi transferido para um balão volumétrico de 5 ml, diluída com o próprio meio e injetada no CLAE. As alíquotas foram neutralizadas, quando necessário.

As condições *sink* foram determinadas em cada meio testado. Cada ensaio de solubilidade foi realizado em triplicata.

6.3.2.3 Condições do ensaio de dissolução

Os ensaios de dissolução para os comprimidos contendo fosamprenavir foram desenvolvidos utilizando 900 ml do meio de dissolução a 37 °C ± 0,5. A influência do tipo de equipamento (USP 1 e 2) e velocidade de agitação, meio de dissolução e o uso de filtros e *sinkers* foram avaliados.

Alíquotas de 10,0 ml da amostra foram coletadas nos tempos 5; 15; 20; 30; 40; 50; 60 minutos. O volume do meio de dissolução retirado foi repostado com o próprio meio, a fim de manter um volume constante. Filtros de 30 µm e 0,45 µm foram utilizados para filtrar as amostras durante a coleta.

6.3.2.4 Estabilidade do fosamprenavir nas condições do ensaio

A estabilidade do fosamprenavir nas condições do ensaio foi verificada. Submeteram-se 3 comprimidos de Telzir® ao ensaio de dissolução sob

condições previamente selecionadas. As amostras foram coletadas após 2 h e injetadas nos tempos 0, 12 e 24 horas.

6.3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

O método de dissolução foi validado de acordo com a USP 32 (2009) — <1092>The Dissolution Procedure: Development and Validation

6.3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a validação do método de dissolução, por CLAE, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão e precisão. Os parâmetros cromatográficos utilizados são demonstrados no quadro 6.1.

Quadro 6.1 — Condições cromatográficas para o doseamento do fosamprenavir por CLAE.

Coluna	Vertical [®] C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna Phenomenex [®]
Fase móvel	Tampão acetato de sódio (pH 4,5): acetonitrila (70:30)
Diluyente	metanol
Detecção	Ultravioleta (λ= 264 nm)
Volume de injeção	20 µl
Fluxo	1,2 ml/min

6.3.3.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada utilizando amostras do placebo, sendo este constituído por mistura dos excipientes da formulação. As concentrações de cada excipiente do conteúdo dos comprimidos foram baseadas na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas a partir do peso médio de 20 comprimidos (1,165 g).

Em uma cuba de dissolução contendo 900 ml de meio de dissolução selecionado, pré-aquecido a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, foram adicionados todos os excipientes e agitados por 1 hora a 150 rpm, utilizando o equipamento USP 1. Alíquotas de 8 ml foram coletadas e analisadas por CLAE. As amostras foram preparadas em triplicata.

6.3.3.1.2 Linearidade

Para a construção da curva padrão foi preparada, em metanol, uma solução contendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de fosamprenavir SQR. A partir desta solução, alíquotas de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 ml foram transferidas para balão volumétrico de 10 ml e completado com o meio de dissolução selecionado. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 10, 30, 50, 70 e 90 $\mu\text{g/ml}$. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata.

A curva padrão foi realizada em três dias diferentes e, com a área absoluta média obtida nos diferentes dias, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco ($\mu\text{g/ml}$). Calculou-se a equação da reta através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

6.3.3.1.3 Exatidão e precisão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, onde quantidades de fosamprenavir SQR foram adicionadas ao placebo. A partir de uma solução de 10 mg/ml, alíquotas de 0,5; 1,5 e 2,5 ml foram adicionadas em uma cuba contendo 500 ml do meio de dissolução pré-aquecido a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ e agitadas a 150 rpm por 1 hora. Concentrações finais teóricas de 10 µg/ml, 30 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente, foram obtidas.

Alíquotas de 10,0 ml foram retiradas e analisadas por CLAE. As soluções foram preparadas em triplicata e em diferentes dias. O placebo foi preparado conforme descrito no item 6.3.3.1.1.

As mesmas soluções empregadas no teste de recuperação foram utilizadas para avaliar a precisão do método. A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas baseadas no desvio padrão relativo (DPR) dos resultados.

6.3.4 CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO

Quatro modelos matemáticos foram aplicados na avaliação da cinética de liberação do fármaco: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixon-Crowell. As curvas foram construídas aplicando-se os modelos cinéticos citados, considerando apenas um ponto acima de 80% de fármaco liberado. O modelo matemático que melhor expressou o perfil de liberação dos comprimidos de Telzir[®] foi selecionado com base nos valores do coeficiente de determinação (R^2) e Critério de Seleção do Modelo (MSC), calculado pelo programa Scientist[®] (Micromath, UTAH, E.U.A., v.201)

6.3.5 PODER DISCRIMINATIVO DO MÉTODO

A análise da influência das condições de armazenamento na estabilidade química e/ou física dos comprimidos foi verificada submetendo-se 24 comprimidos de Telzir® a 40 °C e 75% de umidade relativa durante 14 a 28 dias, além de analisar-se a alteração na taxa de liberação dos comprimidos mantidos em condição ambiente, mas com prazo de validade vencido. Submeteu-se 12 comprimidos de Telzir® ao ensaio de dissolução, sob condições previamente selecionadas.

6.3.5.1 Comparação de perfis de dissolução

Método modelo independente empregando fator de diferença (f_1) e fator de similaridade (f_2)

Os perfis obtidos a partir de 12 comprimidos submetidos a diferentes temperaturas e umidade durante duas e quatro semanas e após ter expirado o prazo de validade dos mesmos foram comparados ao perfil obtido dos comprimidos sob condições normais, utilizando o fator de diferença (f_1) e o fator de similaridade (f_2).

Os fatores f_1 e f_2 foram determinados utilizando as seguintes equações:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \quad \text{Equação 6.13}$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{Equação 6.14}$$

Onde:

n = número de tempos de coleta.

T_t = valor de porcentagem dissolvida da formulação alterada, no tempo t .

R_t = valor de porcentagem dissolvida no tempo t , obtido com o medicamento ou com a formulação original.

O critério para que os dois perfis de dissolução fossem considerados semelhantes foram:

$$f_1 = 0 \text{ a } 15$$

$$f_2 = 50 \text{ a } 100$$

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 ESTUDO *IN VIVO*

Os parâmetros farmacocinéticos médios (Quadro 6.2) foram retirados dos estudos previamente realizados por FALCOZ e colaboradores (2002) e RAFFI e colaboradores (2004), após a administração do Telzir® a voluntários saudáveis.

Quadro 6.2— Dados farmacocinéticos médios do fosamprenavir.

Dose	ASC	C _{max}	T _{max}	T _{1/2}	Cl/F
1200 mg	21,5 µg.h/ml	4,61 µg/ml	1,80 h	6,55 h	59,5 l/h

T_{max}: tempo de concentração máxima; C_{max}: concentração máxima; T_{1/2}: tempo de meia vida; ASC: área sob a curva; Cl/F: depuração/biodisponibilidade oral;

6.4.1.1 Modelagem matemática

O corpo pode ser representado como sistemas de compartimentos que se comunicam reversivelmente entre si. O compartimento não é uma região fisiológica ou anatômica, mas representa um tecido ou grupo de tecidos que tem o mesmo fluxo sanguíneo e a mesma afinidade pelo fármaco. O fármaco é distribuído uniformemente dentro de cada compartimento. A distribuição é rápida e homogênea e, desta forma, a concentração medida representa a concentração média (SHARGEL, 2005).

Modelos farmacocinéticos são utilizados para expressar a velocidade dos processos de absorção, distribuição e eliminação do fármaco do organismo. Estes modelos levam a 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 é possível obter uma adequada descrição farmacocinética.

O modelo compartimental para a análise dos dados foi escolhido de acordo com o melhor ajuste gráfico, utilizando o Critério de Seleção do Modelo (MSC), calculado pelo programa Scientist[®] (Micromath, v. 2.0). O modelo que apresentou melhor ajuste para os valores experimentais foi o modelo aberto de um compartimento, descrito pela equação 6.5 do item 6.3.1.1.

6.4.1.2 Fração da dose absorvida

Os dados de concentração plasmática *versus* tempo foram transformados em fração da dose absorvida (FA), utilizando o método proposto por Wagner-Nelson, de acordo com a equação 3.6, descrita no item 6.3.1.1. Na Figura 6.1 pode ser visualizada a curva de percentagem da dose absorvida *versus* tempo (h), obtida a partir da administração de uma dose 700 mg de fosamprenavir (Telzir[®], 700 mg), empregando o método de Wagner-Nelson.

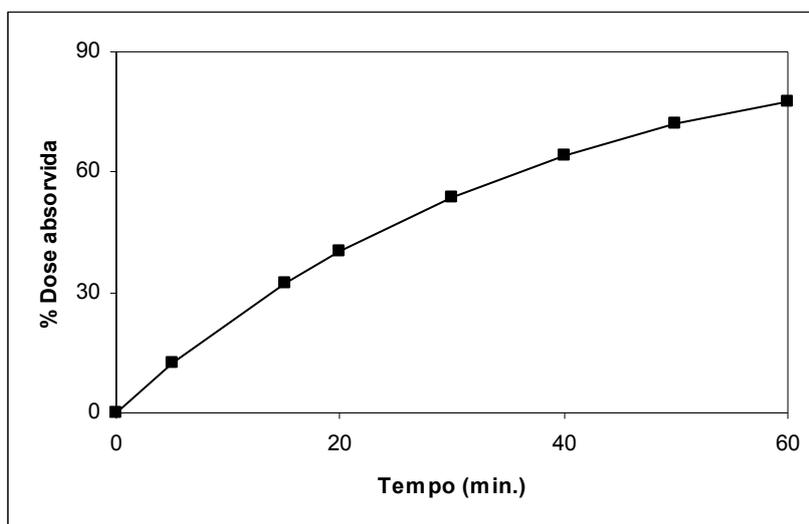


Figura 6.1 — Simulação da percentagem da dose absorvida versus tempo (h) de comprimidos de fosamprenavir (Telzir[®], 700 mg) utilizando o método de Wagner-Nelson.

6.4.2 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A velocidade de dissolução é crítica para a absorção de fármacos administrados por via oral. A determinação da dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas fornece informações importantes que são utilizadas para assegurar a qualidade do produto e a biodisponibilidade do fármaco; auxiliar o desenvolvimento do medicamento e estabelecer correlação *in vivo-in vitro* (STORPIRTIS, 2009).

6.4.2.1 Determinação da solubilidade do fosamprenavir em diferentes meios

Os dados de solubilidade foram utilizados como base para a seleção do meio de dissolução para o fosamprenavir SQR. A solubilidade do fármaco foi determinada em diferentes meios conforme descrito no item 6.3.2.2 e foi expressa através da percentagem dissolvida da dose. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 — Percentagem dissolvida de fosamprenavir SQR em diferentes meios de dissolução.

Meio de Dissolução*	% dissolvida	
	1 hora	2 horas
HCl 0,1 M	80,4	90,6
HCl 0,01 M	92,5	94,1
Tampão fosfato (pH 6,0)	59,8	71,1
Tampão acetato (pH 4,5)	89,4	95,2

* volume de meio: 25 ml

De acordo com os resultados da Tabela 6.2, o fosamprenavir SQR apresentou uma boa solubilidade nos meios HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão

acetato (pH 4,5). Esses dados confirmam os resultados obtidos por FURFINE e colaboradores (2004) onde o fosamprenavir é um fármaco pH-dependente, ou seja, apresenta uma baixa solubilidade em pH 7 (0,3 mg/ml) quando comparada com o pH 3 e 4 (54 mg/ml em pH 3,3). Desta forma, esses meios foram escolhidos para estudos preliminares de ensaio de dissolução, com a finalidade de selecionar as melhores condições para o teste de dissolução para as cápsulas de fosamprenavir.

Baseado nos resultados de seleção do meio de dissolução e considerando a solubilidade e a faixa de dosagem do fármaco, as condições *sink* foram satisfeitas. O termo condição *sink* é definido como sendo pelo menos três vezes o volume do meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (BROWN *et al.*, 2004; ROHRS *et al.*, 2001; PHARM. FORUM, 2004). As condições *sink* devem ser mantidas a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES & BROWN, 2002).

6.4.2.2 Desenvolvimento do teste de dissolução

A partir dos meios pré-selecionados no teste de solubilidade, comprimidos de fosamprenavir (Telzir[®], 700 mg) (n= 6) foram submetidos ao ensaio de dissolução. As condições utilizadas foram: equipamento USP 1 (cestos) e USP 2 (pás) e 900 ml meio de dissolução a 37 °C ± 0,5.

As amostras foram coletadas e analisadas em diversos tempos (0, 5, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutos) a fim de gerar curvas do perfil de dissolução *versus* tempo para cada meio testado. Para assegurar que a forma farmacêutica liberará o fármaco completamente, o FDA geralmente requer, para fármacos de liberação imediata, que 75% a 80% da quantidade declarada seja dissolvida em 1 hora. Porém, este período pode ser ajustado de acordo com os dados de biodisponibilidade disponíveis (SHAH *et al.*, 1989).

- Perfil de dissolução do fosamprenavir — agitação por pás.

Os estudos de dissolução utilizando a agitação através de pás foram realizados utilizando 900 ml meio de dissolução contendo HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio (pH 4,5). O perfil de dissolução obtido é apresentado na Figura 6.2 a seguir.

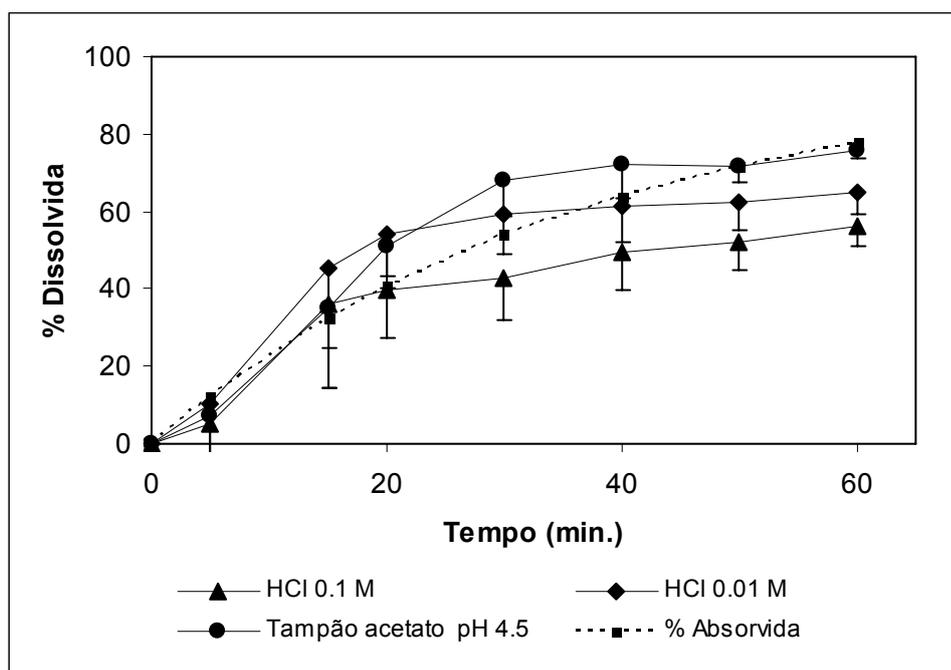


Figura 6.2 — Perfil de dissolução médio de comprimidos de Telzir® (n= 6) nos meios de dissolução HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio utilizando equipamento USP 2 a 50 rpm.

Utilizando a agitação de 50 rpm, a velocidade de dissolução foi similar em todos os meios somente nos primeiros 20 minutos. Após, a velocidade de dissolução no meio HCl 0,1 M foi menor quando comparada com a velocidade de absorção *in vivo*. Os perfis obtidos com os meios HCl 0,01 M e Tampão acetato de sódio (pH 4,5) foram mais similares ao perfil *in vivo*. Porém, em todos os meios testados os resultados obtidos foram altamente variáveis, ou seja, os valores dos DPRs, para o primeiro ponto de amostragem, estão acima dos 20% e nos demais pontos de amostragem, os DPRs foram maiores que

10%. O alto valor de DPR deve-se provavelmente à formação de cone sobre a forma farmacêutica (Figura 6.3), o que afeta a hidrodinâmica do sistema e a dissolução dos comprimidos, resultando em alta variabilidades nos dados de dissolução obtidos. O surgimento de cone sobre a formulação pode ser contornado aumentando-se a velocidade de agitação (MIRZA, 2005; LAGACE, 2004).

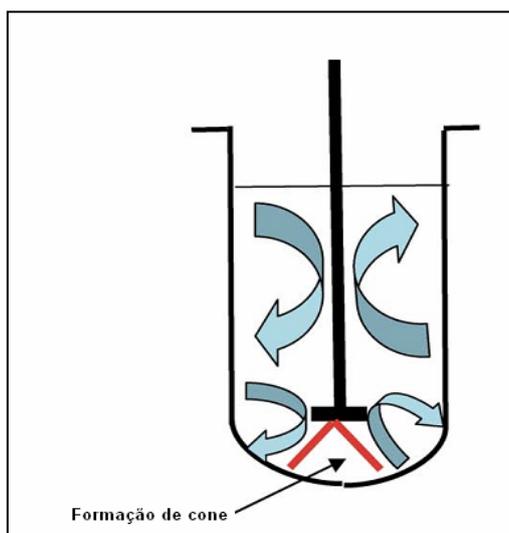


Figura 6.3 – Formação de cone sobre a forma farmacêutica (Adaptado de MIRZA, 2005).

Baseado nestes resultados aumentou-se a velocidade de agitação para 75 rpm (Figura 6.4). Nestas condições, as frações do fosamprenavir dissolvidas assemelham-se aos do estudo *in vivo*, entretanto, os resultados obtidos foram altamente variáveis.

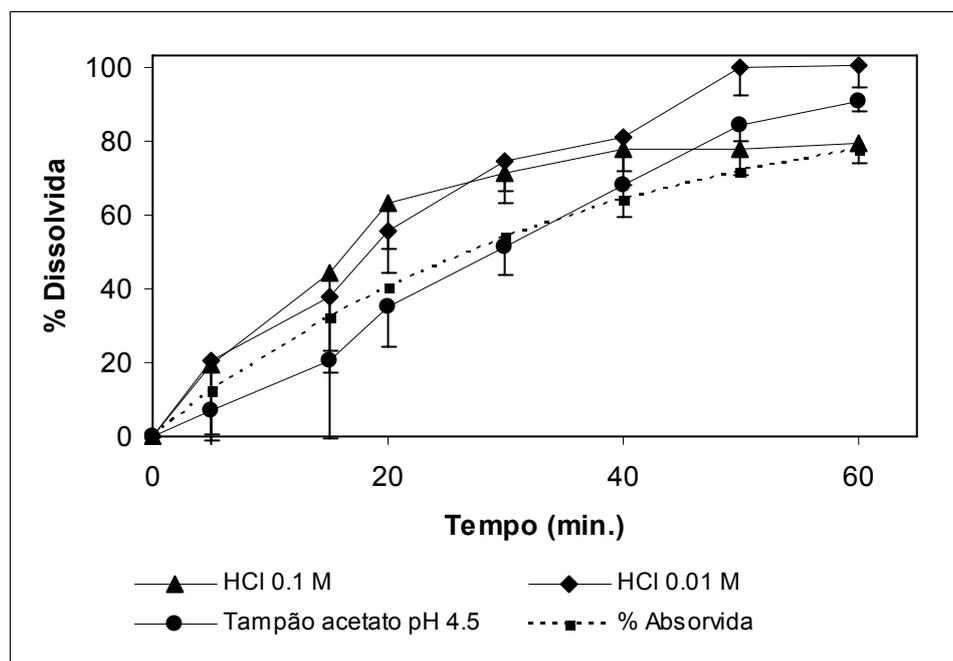


Figura 6.4 — Perfil de dissolução médio de comprimidos de Telzir® (n= 6) nos meios de dissolução HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio utilizando equipamento USP 2 a 75 rpm.

- *Perfil de dissolução do fosamprenavir — agitação por cestos*

Considerando os resultados obtidos utilizando agitação por pás, um novo equipamento USP1 (cestos) foi avaliado (Figura 6.5).

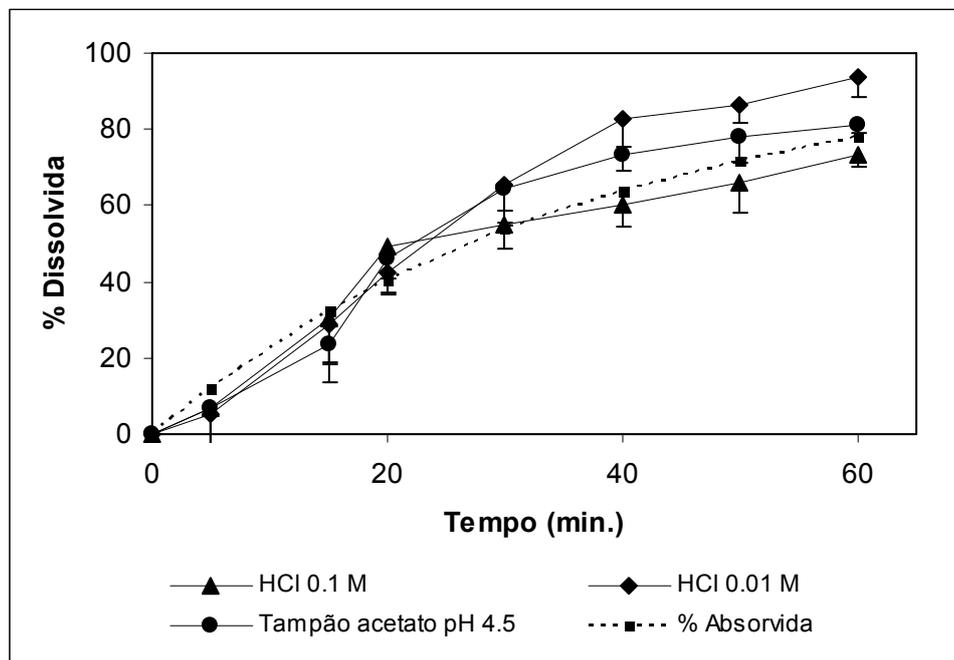


Figura 6.5 — Perfil de dissolução médio de comprimidos de Telzir® (n= 6) nos meios de dissolução HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão acetato de sódio utilizando equipamento USP 1 a 75 rpm.

Os perfis obtidos para os três meios testados foram similares ao perfil de dissolução *in vivo*. Os resultados obtidos foram reprodutíveis sendo que os valores dos DPRs, para o primeiro ponto de amostragem, foram menores que 20% e nos demais pontos de amostragem, os DPRs foram menores que 10%.

Plotando-se a fração absorvida obtida por Wagner-Nelson (FA) versus fração dissolvida (FD) foi construído o gráfico de correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV), conforme demonstrado na Figura 6.6 e a melhor linha de ajuste é demonstrada para cada meio de dissolução.

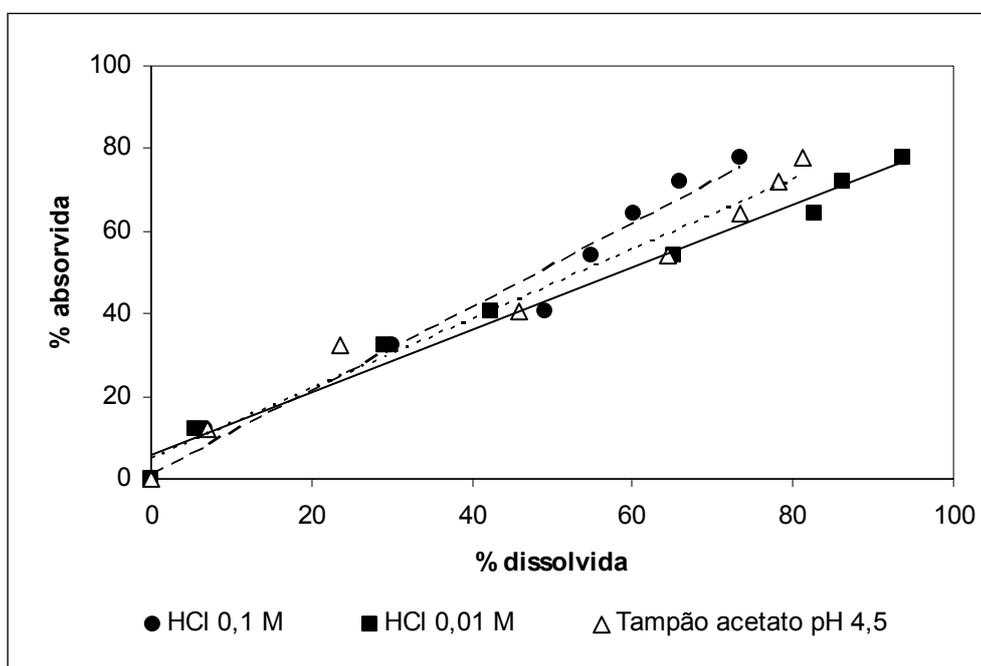


Figura 6.6 — Curva média da porcentagem da dose absorvida *versus* a porcentagem da dose dissolvida para os comprimidos de Telzir®. A melhor linha de ajuste é demonstrada para cada meio de dissolução.

Análise de regressão dos dados (Tabela 6.3) foi obtida a partir dos resultados apresentados na Figura 6.6

Tabela 6.3 — Análise de regressão^a para a CIVIV.

Meio de dissolução	Inclinação (m)	Intercepto (b)	Coefficiente de determinação (R ²)
HCl 0,1 M	1,01	1,1062	0,970
HCl 0,01 M	0,75	5,8912	0,984
Tampão acetado (pH 4,5)	0,84	4,6475	0,973

^a $y = mx + b$

Através da análise de regressão, uma correlação nível A pôde ser estabelecida entre a percentagem absorvida *versus* percentagem dissolvida da dose, para a formulação avaliada. A correlação de nível A é o nível de correlação mais alto que pode 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 (UPPOOR *et al.*, 2001). Ao contrário dos outros níveis de correlação, uma correlação ponto a ponto reflete inteiramente a curva dos níveis plasmáticos (FDA, 1997b).

O meio de dissolução que apresentou melhor CIVIV foi HCl 0,01 M ($R^2= 0,984$), conforme pode ser observado na Tabela 6.3. A composição do meio de dissolução deve ser biorrelevante, ou seja, próxima daquela que ocorre *in vivo* (STORPIRTIS, 2009). Assim, o meio HCl 0,01 M escolhido está na faixa fisiológica de pH (1,0 - 6,8), ou seja, é biorrelevante. A fim de verificar a capacidade tamponante do meio, o pH foi medido no início e no fim do ensaio (USP 32, 2009). Os resultados não demonstraram alterações do pH antes e após o término do teste, evidenciando que a capacidade tamponante do meio selecionado foi suficiente durante todo o ensaio de dissolução proposto.

A necessidade de desaeração do meio foi verificada, não demonstrando mudanças significativas no perfil de dissolução entre meio desaerado e não desaerado. As bolhas de ar podem interferir no perfil de dissolução atuando como barreira à penetração do meio de dissolução, aumentar a flutuação das partículas e facilitar a aderência das partículas às paredes e componentes do sistema de dissolução (USP 32, 2009)

Desta forma, as melhores condições para o ensaio de perfil de dissolução para os comprimidos de Telzir[®] foram selecionadas (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 — Condições selecionadas para o ensaio de perfil de dissolução de comprimidos de Telzir®.

Meio de dissolução	Velocidade de agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Volume de meio (ml)	Tempo (h)
HCl 0,01 M	75	37 ± 0,5	900	1

6.4.2.3 Estabilidade do fosamprenavir nas condições de ensaio

Os resultados de estabilidade do fosamprenavir nas condições de ensaio são apresentados na Tabela 6.5. Conforme pode ser observado o fosamprenavir permaneceu estável durante o período de 24 horas, uma vez que os valores obtidos encontram-se entre 98% a 102% do valor inicial, conforme preconizado pelo PHARM. FORUM (2004) e o USP 32 (2009).

Tabela 6.5 — Estabilidade do fosamprenavir nas condições do ensaio de dissolução.

Tempo (h)	% recuperada*
0	99,2
10	99,7
24	100,0
n= 3	

6.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

Conforme o capítulo geral da ICH (Text on Validation of Analytical Procedures, 2005), o ensaio de dissolução pertence à categoria III — teste de desempenho. Os parâmetros exigidos para a validação deste tipo de ensaio são: precisão, exatidão, especificidade e linearidade.

Desta forma, o método de dissolução foi validado utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com os critérios preconizados para o ensaio de dissolução (USP 32, 2009; PHARM. FORUM, 2004).

6.4.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da análise de interferência dos excipientes, conforme descrito no item 6.3.3.1.1. A Figura 6.7 apresenta os cromatogramas obtidos para a solução dos excipientes, solução padrão (50 µg/ml) e meio de dissolução (branco). Os resultados demonstram que nenhum excipiente interfere no pico de absorção do fosamprenavir. A pureza do pico cromatográfico do fosamprenavir, verificada através do detector de arranjo de diodos, foi superior a 0,999, indicando que o pico de resposta, refere-se à substância de interesse, sem interferentes. Segundo o PHARMACOPEIAL FORUM (2004), a ausência de picos cromatográficos para o placebo, demonstra a especificidade do método.

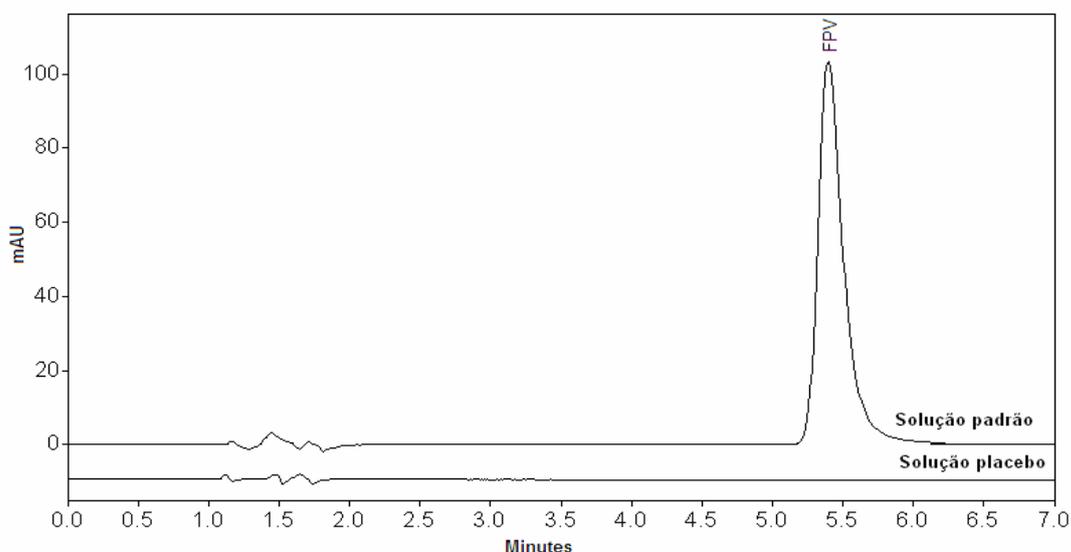


Figura 6.7 — Especificidade: solução de fosamprenavir SQR e solução dos excipientes Condições cromatográficas: coluna vertical C₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 4,5) : ACN (70:30); fluxo de 1,2 ml/min; λ= 264 nm.

6.4.3.2 Linearidade

A linearidade é geralmente estabelecida preparando cinco soluções padrão do fármaco com concentrações variando de $\pm 20\%$ abaixo da concentração mais baixa esperada até $\pm 20\%$ acima da concentração mais alta que pode ocorrer durante a liberação da dose (PHARM. FORUM, 2004; ICH, 2005).

Três curvas padrão da SQR foram construídas contendo cinco níveis de concentração (10, 30, 50, 60 e 90 $\mu\text{g/ml}$), realizadas em dias diferentes. Na Figura 6.8 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de determinação.

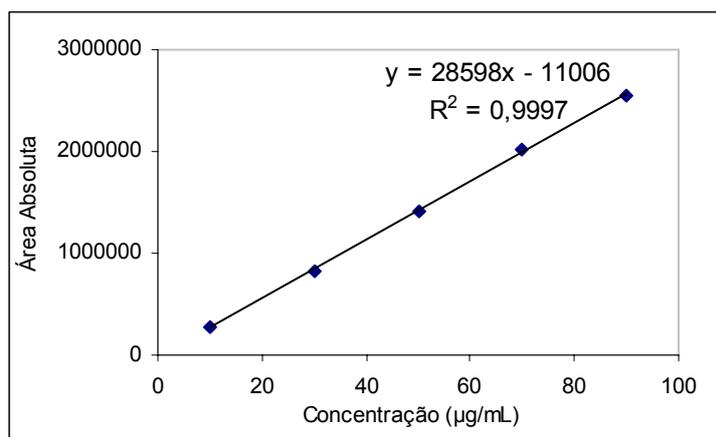


Figura 6.8 — Representação gráfica da curva padrão média do fosamprenavir obtida por CLAE. Condições cromatográficas: coluna vertical C₁₈ (5 μm , 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 4,5) : ACN (70:30); fluxo de 1,2 ml/min; $\lambda = 264 \text{ nm}$.

A linearidade da curva padrão foi avaliada através da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 6.6

Tabela 6.6 – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do fosamprenavir.

FONTEs DE VARIÇÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA	F.C	F.T
Entre	4	9977850469833	2494462617458	13964,42*	3,48
Regressão linear	1	9975983876394	9975983876394	55847,21*	4,96
Desvio de linearidade	3	1866593439	622197813	3,48**	3,71
Resíduo	10	1786299401	178629940		
Total	14	9979636769233			

*Significativo para $p = 0,05$ ** Não significativo para $p = 0,05$

A análise de variância dos resultados demonstra que a curva padrão média obtida para o fosamprenavir apresenta regressão linear significativa ($p=0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados, juntamente com o coeficiente de determinação de 0,9997, demonstram que o método é linear na faixa de concentração de 10 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

6.4.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação. Em geral utilizam-se concentrações de soluções padrão do fármaco variando de $\pm 20\%$ abaixo da concentração mais baixa esperada até $\pm 20\%$ acima da concentração mais alta que pode ocorrer durante a liberação da dose (PHARM. FORUM, 2004).

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na solução dos excipientes, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 6.3.3.1.3.

Os valores experimentais obtidos são apresentados na tabela 6.7. Os resultados apresentados demonstram que o método proposto é exato.

Tabela 6.7 – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o fosamprenavir.

	10 µg/ml	30 µg/ml	50 µg/ml
Dia 1	101,5	99,1	99,1
	102,8	101,9	99,4
	100,8	101,4	98,7
Dia 2	101,9	99,2	100,3
	100,6	102,7	99,1
	101,1	101,3	101,9
Dia 3	99,4	99,8	100,3
	99,0	99,5	102,4
	100,3	99,1	103,7
Média	100,8	100,4	100,5
DP	1,19	1,38	1,74
DPR	1,18	1,38	1,73

6.4.3.4 Precisão

A repetibilidade do método foi avaliada através de três replicatas de soluções da SQR (10 µg/ml, 30 µg/ml e 50 µg/ml) e a precisão intermediária foi determinada em três dias diferentes. Os resultados da precisão do método podem ser visualizados na Tabela 6.8.

Tabela 6.8 – Valores experimentais obtidos no doseamento do fosamprenavir por CLAE, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.

	Concentração µg/ml	Precisão	
		DPR intradia	DPR interdias
Dia 1	10,0	1,00	
Dia 2	10,0	0,67	1,18
Dia 3	10,0	0,65	
Dia 1	30,0	1,48	
Dia 2	30,0	0,35	1,39
Dia 3	30,0	1,74	
Dia 1	50,0	0,35	
Dia 2	50,0	1,68	1,73
Dia 3	50,0	1,40	

n = 3 para cada concentração em cada dia.

Os baixos valores de DPR obtidos para a precisão intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária) demonstram que o método proposto é preciso.

6.4.4 CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO

A cinética de liberação foi avaliada através do perfil de dissolução (Figura 6.5). De acordo com os valores do coeficiente de determinação (R^2) e Critério de Seleção do Modelo (MSC), os perfis de dissolução foram melhor descritos através do modelo de Hixson-Crowell (Tabela 6.9). Este modelo assume que a taxa de liberação é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco, e não pelo processo de difusão, que deve ocorrer por meio da matriz polimérica (COSTA e LOBO, 2001).

Tabela 6.9 – Coeficiente de determinação (R^2) e Critério de Seleção do Modelo (MSC) dos modelos matemáticos.

Modelo matemático	R^2	MSC
Ordem zero	0,9619	3.22
Primeira ordem	0,9762	2.75
Higuchi	0,8897	1.87
Hixson-Crowell	0,9833	3.35

6.4.5 PODER DISCRIMINATIVO DO MÉTODO

As formulações farmacêuticas são sistemas complexos, compostos não apenas pelo fármaco, mas também por vários excipientes. Estes produtos estão sujeitos a sofrer degradação química e física. Geralmente, se aceita que a estabilidade da taxa de dissolução durante o armazenamento à temperatura ambiente não poderia ser prevista a partir do armazenamento a curto prazo sob condições aceleradas de alta temperatura e umidade. Por outro lado, alguns exemplos sugerem que a avaliação da estabilidade por testes acelerados pode ser possível em alguns casos (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

Grandes alterações nas características de dissolução do fármaco, observadas após armazenamento por longos períodos ou em curto prazo sob condições aceleradas de alta temperatura e umidade, indicariam que mudanças funcionais estariam ocorrendo no medicamento e poderiam comprometer seu desempenho *in vivo* (YOSHIOKA e STELLA, 2002). Portanto, um ensaio de dissolução deve ser capaz de detectar mudanças que possam afetar o comportamento *in vivo* do produto, ou seja, ser um método discriminativo (STORPIRTIS, 2009).

Os comprimidos de fosamprenavir exibiram decréscimo na taxa de dissolução após armazenagem a 40 °C e 75% de umidade relativa, durante 14 e 28 dias, assim como os comprimidos armazenadas à temperatura ambiente,

mas com o prazo de validade vencido (Figura 6.9). A fim de comprovar se os perfis obtidos são diferentes, estes foram comparados utilizando método modelo independente empregando fator de diferença (f_1) e fator de similaridade (f_2).

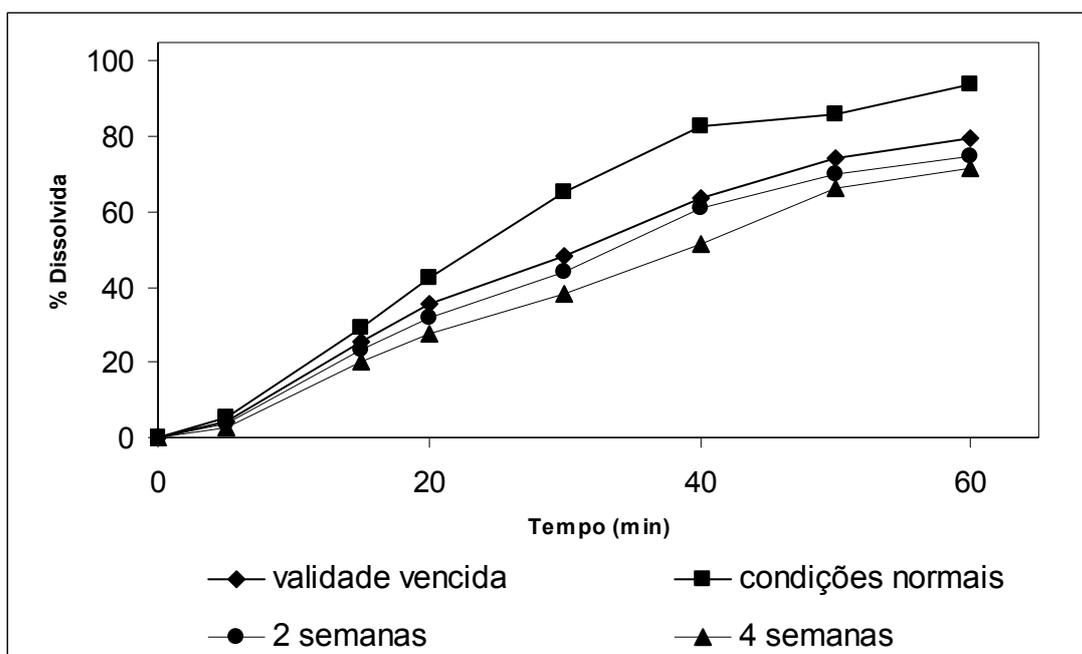


Figura 6.9 — Alterações no perfil de dissolução dos comprimidos de fosamprenavir após o armazenamento (n= 12).

6.4.5.1 Comparação de perfis de dissolução

Método modelo independente empregando fator de diferença (f_1) e fator de similaridade (f_2)

Este modelo emprega um fator de diferença (f_1) e um fator de semelhança (f_2) para comparar perfis de dissolução.

O fator f_1 calcula a porcentagem de diferença entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta e corresponde a uma medida do erro relativo

entre os perfis. O fator f_2 corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

Para a comparação dos perfis de dissolução através do fator de diferença (f_1) e do fator de semelhança (f_2) utilizou-se as equações descritas em 6.3.5.1. Os valores encontrados são apresentados na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 – Comparação dos perfis de dissolução utilizando os fatores de diferença (f_1) e semelhança (f_2).

Parâmetro	Validade expirada	Após 2 semanas (40 °C; 75% UR)	Após 4 semanas (40 °C; 75% UR)
f_1	19,21	24,84	33,65
f_2	46,31	41,34	34,79

O critério para que os dois perfis de dissolução sejam considerados semelhantes são:

$$f_1 = 0 \text{ a } 15$$

$$f_2 = 50 \text{ a } 100$$

Os resultados obtidos demonstram que os perfis de dissolução são considerados diferentes em relação ao perfil obtido de comprimidos sob condições normais. Portanto, o método proposto demonstrou ser discriminativo, ou seja, capaz de detectar mudanças que possam acontecer na formulação.

6.5 CONCLUSÕES

- Uma correlação nível A pôde ser estabelecida entre a percentagem absorvida *versus* percentagem dissolvida ($R^2= 0,984$) para a formulação avaliada, empregando equipamento cestos a 75 rpm, HCl 0,01 M (900 ml) a $37\text{ °C} \pm 0,5$;
- As condições selecionadas para o ensaio de dissolução para o fosamprenavir comprimidos (Telzir[®]) baseada em uma CIVIV podem ser utilizadas como um método de controle de qualidade do desempenho do produto;
- O fosamprenavir demonstrou ser estável por 24 horas nas condições do ensaio de dissolução;
- O ensaio de dissolução por CLAE mostrou-se adequado, pois cumpriu as exigências de especificidade, linearidade, precisão e exatidão;
- De acordo com os valores do coeficiente de determinação (R^2) e Critério de Seleção do Modelo (MSC), a cinética de dissolução foi melhor descrita através do modelo de Hixson-Crowell;
- O método proposto demonstrou ser discriminativo, ou seja, capaz de detectar mudanças que possam acontecer na formulação, decorrentes da temperatura e umidade.

6.6 REFERÊNCIAS

ANSEL, H. A.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6^a ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p. 72-77.

AMIDON, G. L.; LENNERNÃS, 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.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 25; 35-46; 230-284.

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 n° 482 - Guia para estudos de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV). **Diário oficial da união**, Brasília, 19 de março de 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE n° 483 - Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). **Diário oficial da união**, Brasília, 19 de março de 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE n° 310 - Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário oficial da união**, Brasília, 1° de setembro de 2004.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAH, P.A. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, 2004.

COSTA, P. e LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 13, p 123-133, 2001.

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.

FALCOZ, C.; JENKINS, J.M.; BYE, C.; HARDMAN, T.C.; KENNEY, K.B.; STUDENBERG, S.; FUDER, H.; PRINCE, W.T.J. Pharmacokinetics of GW433908, a prodrug of amprenavir, in healthy male volunteers. **Clinical Pharmacology**. v.42, p. 887-898, 2002.

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

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. Rockville, 1997b.

FURFINE, E. S.; BAKER, C. T.; HALE, M. R.; REYNOLDS, D. J.; STUDERNBERG, S. D.; SPALTENSTEIN, A. Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, p. 791-798, 2004.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonised 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.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington, 2000.

LAGACE, M. GRAVALLE, L.; DI MASO, M.; Developing a Discriminating Dissolution Procedure for a Dual Active Pharmaceutical Product with Unique Solubility Characteristics. **Dissolution Technologies**, p. 13-17, 2004.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p. 1-14, 2004.

MARQUES, M.R.C.; BROWN, W. Desenvolvimento de validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**. p. 48-51, 2002.

MIRZA, T.; JOSHI, Y.; LIU, Q.; VIVILECCHIA, R. Evaluation of Dissolution Hydrodynamics in the USP, Peak and Flat-Bottom Vessels Using Different Solubility Drugs. **Dissolution Technologies**, p. 11-16, 2005.

MOORE, J. W.; FLANNER, H. H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**. New York, v. 20 (6), p. 64-74, 1996.

MULYE, N.V.; TURCO, S.J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dehydrate matrices. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 52, p. 236-241, 1963.

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

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare profile data. **Pharmaceutical Sciences and Technology Today**, v.1; n.5, p. 214-223, 1998.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profile. **Drug Information Journal**, v. 30, p. 1113-1120, 1996.

PHARM. FORUM: <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation, v. 30, n. 1, p. 351-363, 2004.

RAFFI F.; WOOD, R.; ARASTEH, K.; STELBRINK, H.; TEOFILO, E.; POLLARD, R.; YEO, J.; WIRE, M.B. Six-week randomized controlled trial to compare the tolerabilities, pharmacokinetics, and antiviral activities of GW433908 and amprenavir in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.48, p.116-123, 2004.

RAW, A. S.; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBE, F. O.; YU, L.X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 397-414, 2004.

ROHRS, B. R. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, v. 8, p. 1-5, 2001.

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

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutical and Pharmacokinetics**. 5th ed., USA: Appleton & Lange, 2005. p. 411-452.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. In-Vitro-In-Vivo Correlation: Definitions and Regulatory Guidance. **International Journal of Generic Drugs**. Disponível em: www.locumusa.com. Acessado em: agosto de 2004.

STORPIRTIS, S.; RODRIGUES, D.; – *In vitro* evaluation of dissolution properties and degradation products of omeprazole in enteric-coated pellets. **Drug Development Industrial Pharmaceutical**, v.24, n.11, p.1101-1107, 1998.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.; CHIANN, C. Biofarmacotécnica. Editora Guanabara, 2009.

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 32: The United States Pharmacopoeia. 32 ed. Rockville: Unites States Phamacopeial Convention, 2009.

VARELAS, C.G.; DIXSON, D.G.; CAROL, S. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Control Release**, v. 82, p. 282-286, 1992.

YOSHIOKA, S. e STELLA, V.J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York, Kluwer Academic Publishers, 2002.

PUBLICAÇÃO

**Development and validation of discriminating method of
dissolution for fosamprenavir tables based on in vivo data.**

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011

doi:10.1016/j.jpba.2010.09.004

ABSTRACT

The aim of this work is to develop and validate a dissolution test for fosamprenavir tablets (Telzir[®]) based on in vivo data. The appropriate conditions were determined after testing sink conditions dissolution medium, rotation speed and stability of the drug. In vivo release profiles were obtained from the literature. The fraction (and percentage) of dose absorbed (FA) was calculated by deconvolution, using Wagner–Nelson method. For this formulation, the best dissolution conditions were achieved using USP apparatus 1, 900 ml of medium containing HCl 0.01 M at a rotation speed of 75 rpm. Under these conditions a significant linear relationship between fraction of drug absorbed versus dissolved was obtained ($R^2 = 0.984$) and a level A IVIVC was established. 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. The discriminatory power of the dissolution method was challenged. The kinetics of dissolution was determined using model-dependent methods. The dissolution profiles were better described by Hixson-Crowell model. The dissolution test was validated and could be applied to evaluate the dissolution profile of fosamprenavir tablets.

Keywords: fosamprenavir, dissolution, validation, in vitro-in vivo correlation.

1. INTRODUCTION

One challenge that remains in Biopharmaceutics research is that of correlating in vitro drug-release profiles with the in vivo pharmacokinetic data [1]. The value of dissolution, as a quality control tool for predicting in vivo performance of a drug product, is significantly enhanced if an in vitro-in vivo (IVIVC) relationship is established [2,3]. IVIVC has been defined as a predictive mathematical model describing the relationship between an in vitro property of a dosage form and an in vivo response [4]. The biological properties most commonly used are one or more pharmacokinetic parameters, such as C_{max} , t_{max} , or AUC, obtained following the administration of the dosage form. The in vitro dissolution behavior of an active pharmaceutical ingredient from a dosage form under a given set of conditions expressed as percent of drug released is the most commonly used physicochemical property. The relationship between the two properties, biological and physicochemical, is expressed quantitatively [5,6,7].

Lack of a relationship between the dissolution test results and in vivo behavior would lead to inappropriate control of the critical production parameters by the test and also confound biopharmaceutical interpretation of the dissolution test results. Therefore, in vitro specification limits should be set according to an established relationship between in vivo and in vitro results, best reached through a well-designed IVIVC [1].

Fosamprenavir calcium (Figure 1) is the phosphate ester prodrug of the human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor amprenavir [8,9,10]. Fosamprenavir was first approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2003 [11] and then by the European Medicines Agency in 2004 [12]. It is presented either as coated tablets or oral suspension [11] and it was developed to overcome adherence barriers with amprenavir formulation, such as pill size and burden, food and water restrictions. Fosamprenavir has poor membrane permeability and it is rapidly converted to amprenavir after oral administration. Dephosphorylation to amprenavir is mediated by intestinal alkaline phosphatase

during gastrointestinal absorption [8,9,10]. According to the Biopharmaceutics Classification System (BCS), fosamprenavir is classified as class II [13]. Class II drugs are those with low solubilities and high permeabilities. Correlation between of in vivo results and dissolution tests is likely to be best for Class II drugs because, in this case, the dissolution rate is the primary limiting aspect to absorption [5].

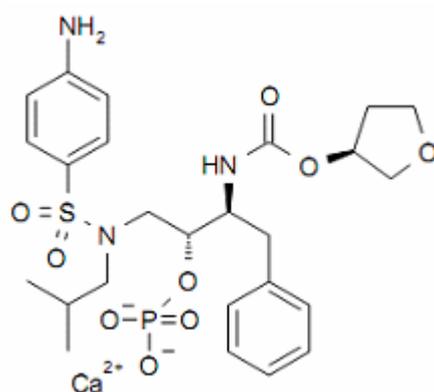


Figure 1 – Fosamprenavir calcium

In this context, the objective of this study is to develop and validate a dissolution test for fosamprenavir (Telzir®) tablets based on IVIVC. The in vivo data was obtained from literature [9,14]. The discriminatory power of the dissolution method was challenged. The kinetics of dissolution was determined using model-dependent approaches.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Fosamprenavir calcium working standard was prepared in our laboratory from a raw material, which was purified and characterized using NMR and IR. The Telzir[®] 700 mg tablets (batch no. R371748) were purchased from the market. The excipients contained in the dosage form (colloidal silicon dioxide, croscarmellose sodium, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, povidone K30, hypromellose, iron oxide red, titanium dioxide, and triacetin) were all of pharmaceutical grade and acquired from different distributors. HPLC grade acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, USA). Sodium acetate was of analytical grade. Ultra-pure water (Millipore[®], Milfor, MA, USA) was used for the dissolution medium and throughout the 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 an one-compartment open model, according to Eq. (1), and the resulting curve and parameters were used to estimate intermediate plasma concentration data points:

$$C = \frac{F.D.k_a}{V_d.(k_a - k_e)} \cdot (e^{-k_e.t} - e^{-k_a.t}) \quad (1)$$

Where, C= plasma concentration at time t; ke= elimination rate constant; ka= absorption rate constant; Vd= volume of distribution; D= dose and F= fraction of the dose absorbed. The percentage of drug absorbed (FA) versus time was calculated using Wagner-Nelson method [15].

2.3 *In vitro* study

2.3.1 *Dissolution test conditions*

The development and validation of the dissolution test was performed using a VANKEL[®] VK 8000 dissolution auto-sampling station consisting of a VK type bidirectional peristaltic pump, VK 750D digitally controlled heater/circulator, VK 7010 multi-bath dissolution testing station (n= 8) with automated sampling manifold. Dissolution was performed using 900 ml of dissolution medium pre-heated at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Influence of rotation speed, filters, dissolution medium and different apparatus (USP basket and paddle) were evaluated. Sample aliquots were withdrawn at 5, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 min and replaced with an equal volume of fresh medium to maintain a constant total volume. An auto sampler was used to withdraw aliquots through a $0.45 \mu\text{m}$ filter. All the dissolution samples were analyzed by HPLC.

2.3.2 *HPLC analysis*

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC model (Kyoto, Japan) composed of a LC-10AD pump, a SPD-M10ADVP photodiode array (PDA) detector, a SLA-10ADVP system controller, a DGU-14A degasser, a column thermostat oven CTO-10AS and an autoinjector SIL-10AD. Data were acquired and processed using CLASS-VP software (version 6.1). Chromatographic analysis was carried out using a Vertical RP-18 column (150 mm x 4.6 mm i.d., particle size $5 \mu\text{m}$), with a Phenomenex[®] Universal C₁₈ guard column. The mobile phase consisted of a mixture of sodium acetate buffer:acetonitrile (75:25, v/v). The flow-rate was $1.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and the injection volume was $20 \mu\text{l}$. The detection of fosamprenavir was accomplished by ultraviolet absorption at 264 nm and all assays were performed at room temperature conditions. A Thornton T50 ultrasonic bath (Metler-Toledo, Bedford, MA) was used for deaeration.

2.3.3 Solubility

Fosamprenavir *sink* conditions were determined in different media. The solubility of the drug was tested using an amount of fosamprenavir equivalent to three times the dose in the pharmaceutical formulation in 900 ml of medium. HCl 0.1 M, HCl 0.01 M, phosphate buffer pH 6.0 and acetate buffer pH 4.5 were tested. Vessels (n= 3) containing 250 ml of medium were pre-heated to 37 °C ± 0.5 before adding one tablet of Telzir® (700 mg). The samples were gently rotated. An aliquot (10 ml) was removed from each vessel after 1 and 2 hours and filtered. 1 ml of the filtered aliquots were pipetted into 50 ml volumetric flask, neutralized, diluted with mobile phase and injected into the HPLC. The solubility in each medium was determined in triplicate.

2.3.4 *In vitro*–*in vivo* correlation

An IVIVC for fosamprenavir was evaluated by plotting the mean percentage of drug absorbed (FA) versus the mean percentage of drug dissolved (FD). Linear regression analysis was used to evaluate the data.

2.4 Validation of the dissolution procedure

The *in vitro* dissolution method developed was validated according to current guidelines [2,16,17]. Specificity, linearity, accuracy and precision were evaluated. The chromatographic parameters monitored were peak retention time, capacity factor, tailing factor and theoretical plate number.

2.4.1 Specificity

Specificity was evaluated by preparing samples of placebo. The placebo consisted of all the excipients (colloidal silicon dioxide, croscarmellose sodium, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, and povidone K30, hypromellose, iron oxide red, titanium dioxide, and triacetin). The estimated concentrations in pharmaceutical formulation (Telzir®) was based on literature data [18] and calculated for a medium weight of content (~ 1.165 mg) for the tablets. The samples of the placebo were transferred to separate vessels (n=

3), filled with 900 ml of dissolution medium at 37 ± 0.5 °C and stirred for 1 hour at 150 rpm using basket (USP Apparatus 1). Aliquots were withdrawn and analyzed by HPLC.

2.4.2 Linearity

A stock solution containing 200 µg/ml of fosamprenavir was prepared in methanol. The linearity of the method was evaluated in the 5.0-90.0 µg/ml range using stock solution and dissolution medium. The solutions were injected in triplicate every day, during three consecutive days. The mean peaks area versus concentration data was treated by least-squares linear regression analysis.

2.4.3 Accuracy/Precision

Accuracy was accomplished by adding known amounts of fosamprenavir reference substance to placebo. Aliquots of 2.7, 4.5 and 6.3 ml of a 10 mg/ml fosamprenavir standard solution dissolved in methanol was added to vessels containing dissolution medium for a final volume of 900 ml (final concentrations were 10.0 µg/ml, 30.0 µg/ml and 50.0 µg/ml, respectively), pre-heated at 37 °C and rotated for 1 hour at 150 rpm. Aliquots were withdrawn and analyzed by HPLC. These studies were performed on three different days and the recovery of the added drug substance (n=9) was determined. Placebo samples were prepared in the same way described in the specificity test.

The same solutions used in the accuracy test were analyzed in order to access the precision of the method. Intra- and inter-day precision were established based on R.S.D. of the results.

2.4.4. Stability studies

Stability of fosamprenavir in the dissolution medium was evaluated using standard and sample. The solutions were kept at 37 ± 0.5 °C for 1h under light shaking, being later left at room temperature for 24 h. The sample solution was stored in glass test tube wrapped securely in paraffin. Aliquots of the samples

were tested at time 0, and after 1 and 24 h. The responses for the aged solutions were evaluated using a freshly prepared standard. The assay was performed in triplicate.

2.5 Evaluation of release kinetic

Four mathematical models were applied to evaluate the kinetics of drug release: zero order, first order, Higuchi and Hixson-Croweel, which equations are represented according to Table 1. The curves were constructed applying the kinetic models cited, considering only one point above 80% of the drug released. The mathematical model that best expressed the dissolution profile of fosamprenavir tablets was selected based on the coefficient of determination (R^2) [16,19]. The suitability of models to experimental data was evaluated using the software ScientistTM (Micromath, EUA), based on the model selection criteria (MSC).

Table 1: Mathematical models used.

Zero order kinetics	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
First order kinetics	$\log Q_t = \log Q_0 + (K_1 t) / 2.303$
Higuchi model	$f_t = K_H t^{1/2}$
Hixson-Crowell model	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$

Q_t = amount of drug dissolved in time t , Q_0 = initial amount of drug in the solution; K_0 and K_1 = zero order and first order release constants, respectively

f_t = amount of drug released in time t by surface unity; K_H = Higuchi dissolution constant

W_0 = initial amount of drug in the pharmaceutical dosage form; W_t = remaining amount of drug in the pharmaceutical dosage form at time t , K_s = a constant incorporating the surface-volume relation

2.6 Discriminating power of the test

The discriminatory power of the proposed dissolution test was challenged. Changes in the biopharmaceutical performance of fosamprenavir tablets caused by aging (validity time expired) and temperature storage and humidity (40 °C and 76% RH for 2 and 4 weeks) were evaluated.

4.6.1 Evaluated of dissolution profiles

The dissolution profiles obtained were compared using model-independent method, in which the two profiles are compared only at the observed time points [20]. The model-independent approach includes the difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2).

The f_1 factor measures the percent error between two curves over all time points (Eq.2):

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (2)$$

where n is the number of time points, R_t and T_t are the percent dissolved of the reference and test product at each time point. The percent error is zero when the test and drug reference profiles are identical and increase proportionally with the dissimilarity between the two dissolution profiles [21].

The f_2 factor is a logarithmic transformation of the sum-squared error of differences between the test and the reference products over all time points (Eq.3):

$$f_2 = 50 \times \log \{[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{0.5} \times 100\} \quad (3)$$

This factor is 100 when the test and reference profiles are identical and tends to 0 as the similarity decreases [21]. According to the FDA, two dissolution profiles are declared similar if f_1 is between 0 and 15 and if f_2 is between 50 and 100 [3].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 *In vivo* study

The pharmacokinetic data used to develop the IVIVC was obtained from the literature [9,14]. Based on these results, the plasma concentration versus time profile curve was transformed into percentage of drug absorbed versus

time, using the Wagner-Nelson method (Figure 2). According to FDA [3], model dependent techniques such as Wagner-Nelson and Loo-Riegelman method or model-independent numerical deconvolution are allowed by to calculate absorption profiles. Wagner-Nelson and Loo-Riegelman methods are both models dependent in which the former is used for a one-compartment model and the latter is for two-compartment systems [22]. 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.

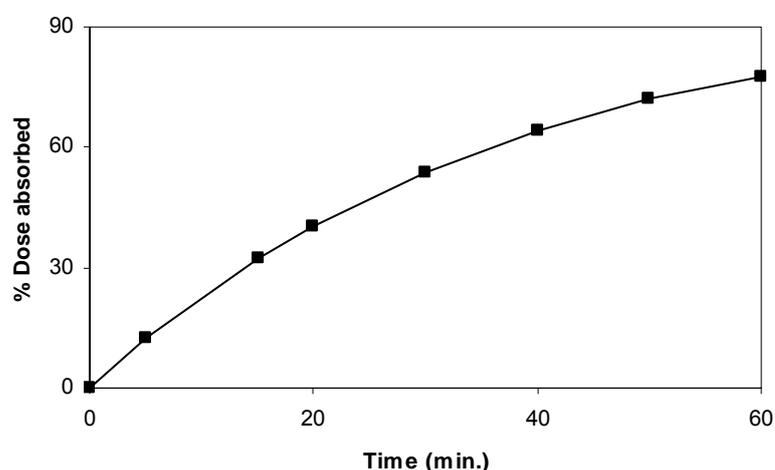


Figure 2 – Percentage of dose absorbed vs. time curve for fosamprenavir tablets using Wagner-Nelson method.

3.2 Solubility determination

The solubility test showed that fosamprenavir was soluble in 0.01 and 0.1M HCl and acetate buffer, pH 4.5. The solubility in water was not tested, since it is not an ideal dissolution medium [2,16]. According Furfine and collaborators, solubility of fosamprenavir calcium is strongly pH dependent. The solubility is very low at pH 7 (0.3 mg/ml) compared with the peak solubility between pH 3 and 4 (54 mg/ml at pH 3.3) [10]. Then, the solubility data obtained were used as the basis for the selection of dissolution medium to

fosamprenavir tablets and also ensured *sink* condition. The term *sink* conditions is defined as the volume of medium at least greater than three times that required to form a saturated solution of a drug substance [2,16].

3.3 Development of the dissolution test

Test conditions were selected based on a screening study with USP apparatus 1 (75 rpm, baskets) and USP apparatus 2 (50 /75 rpm, paddles). The tablets were tested in 900 ml of 0.01 and 0.1M HCl and acetate buffer pH 4.5. Dissolution aliquots were analyzed at several time points (5, 15, 30, 40, 50 and 60 minutes) to generate dissolution profiles in each medium. Each experiment was performance with twelve tablets.

3.3.1 Dissolution profile of fosamprenavir-paddle (USP Apparatus 2)

Dissolution using paddle at 50 and 75 rpm was evaluated. At 50 rpm (Figure 3), the dissolution rate was similar in all media tested only at initial times (20 min.). After 20 minutes the dissolution rate using HCl 0.1M was smaller than the absorption rate. The profiles obtained using HCl 0.01 M and buffer acetate were more similar when compared to the absorption rate and a correlation was established using buffer acetate ($R^2= 0.95$). Using 75 rpm (Figure 4), the in vitro dissolution profiles were similar to the in vivo dissolution profile using buffer acetate and HCl 0.01M ($R^2= 0.96$ and 0.98 , respectively). In HCl 0.1M, fosamprenavir tablets showed a fast dissolution rate.

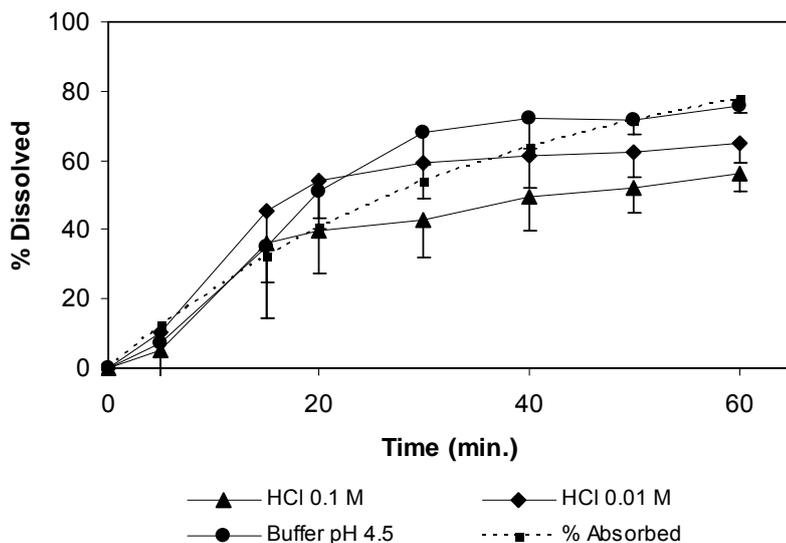


Figure 3 –Mean dissolution profiles of Telzir® tablets (n=12) using 0.1 and 0.01M HCl, acetate buffer pH 4.5 and percentage dissolved, and apparatus 2 rotating at 50 rpm.

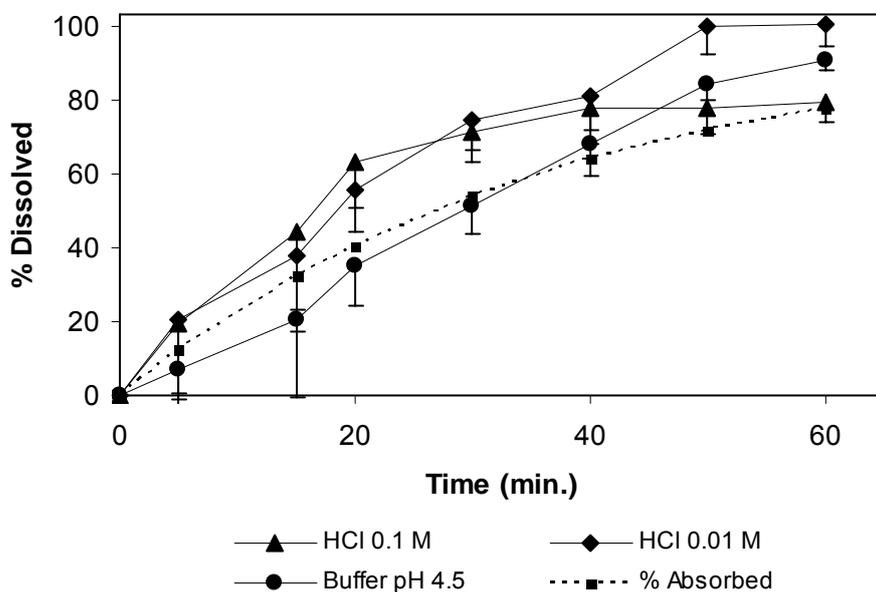


Figure 4 –Mean dissolution profiles of Telzir® tablets (n=12) using 0.1 and 0.01M HCl, acetate buffer pH 4.5 and percentage dissolved, and apparatus 2 rotating at 75 rpm.

Under these conditions, the results were highly variable. The R.S.D. was above 20% in the first time points (10 min.) and above 10% R.S.D. in later time points. This was attributed to uneven distribution of particles throughout the vessel since the film-coated tablets stuck to the vessel. The use of sinkers was evaluated and did not demonstrate to be useful to solve this problem. Due these results, other equipment was evaluated.

3.3.2 Dissolution profile of fosamprenavir-basket (USP Apparatus 1)

In these studie, basket at 75 rpm was evaluated (Figure 5). The results demonstrated that the in vitro dissolution profile was similar to the in vivo dissolution profile in the three media tested and a good correlation was obtained (Table 2). 0.01M HCl demonstrated the best correlation (level A) with the in vivo data (Figure 6).

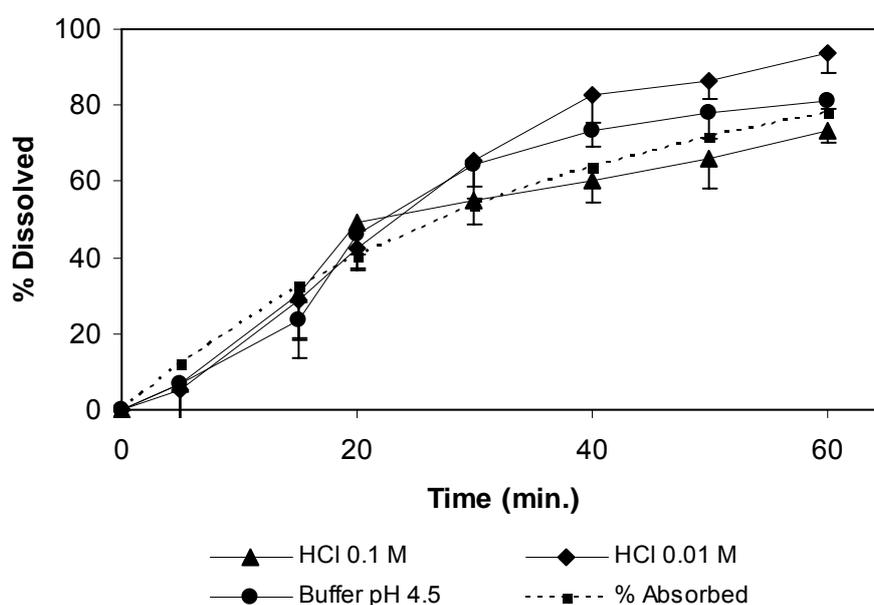


Figure 5 –Mean dissolution profiles of Telzir® tablets (n=12) using 0.1 and 0.01M HCl, acetate buffer pH 4.5 and percentage dissolved, and apparatus 1 rotating at 75 rpm.

Table 2: Regression analysis^a for the IVIVC.

Medium dissolution	Slope (m)	Intercept (b)	Coefficient of determination (R ²)
HCl 0.1 M	1.01	1.1062	0.970
HCl 0.01M	0.75	5.8912	0.984
Buffer acetate pH 4.5	0.84	4.6475	0.973

^a $y = m \cdot x + b$

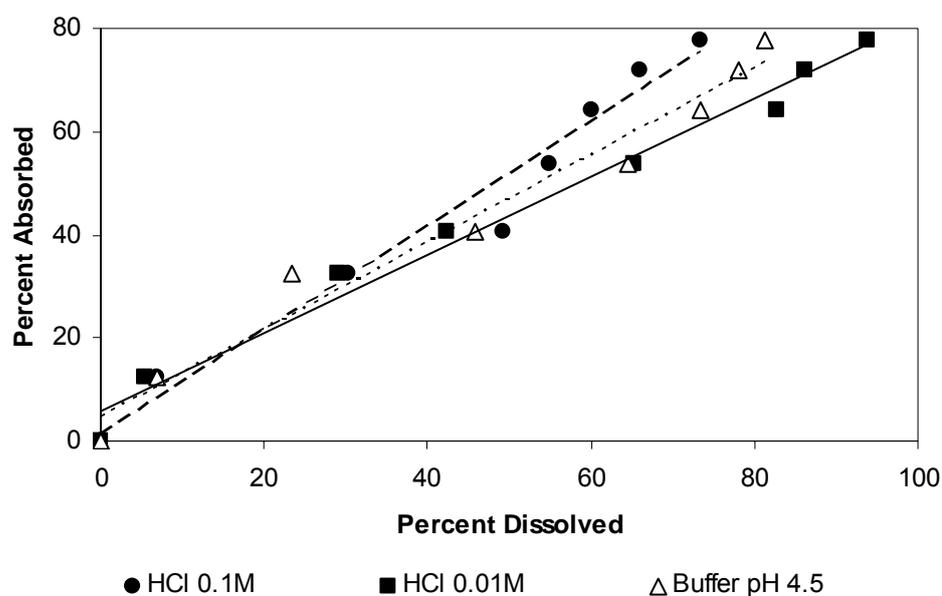


Figure 6 – Plot of mean percentage of dose absorbed versus mean percentage of dose dissolved for Telzir[®]. The line of best fit is shown for each dissolution medium.

The level A correlation was linear and represents a point-to point relationship between in vitro dissolution and the in vivo dissolution rate [6].

The choice of medium will depend on the purpose of the dissolution test. For batch-to-batch quality testing, selection of the dissolution medium is based, in part, on the solubility data and the dose range of the drug product to ensure sink conditions. On the other hand, when the dissolution test is used to indicate the biopharmaceutical properties of the dosage form, it is more important that the proposed biorelevant test closely simulate the environment in the gastrointestinal (GI) tract than necessarily produce sink conditions [2,16,23]. Thus, 0.01 M HCl was chosen as the dissolution medium since it is considered to be biorelevant and the best correlation was obtained using basket at 75 rpm ($R^2= 0.984$).

The drug dissolution results were reproducible. The R.S.D. were smaller than 20% in the first time points (10 min.) and lower than 10% RSD in later time points.

3.4 Validation of dissolution method

3.4.1 Specificity

No chromatographic peak from the placebo formulation was observed with the same retention time for fosamprenavir (Figure 7). The purities of peak was higher than 0.999 and was obtained using a PDA detector. According to the Pharmacopeial Forum and USP 32 [2,16], the lack of chromatographic peaks from the placebo formulation demonstrates the specificity of the method.

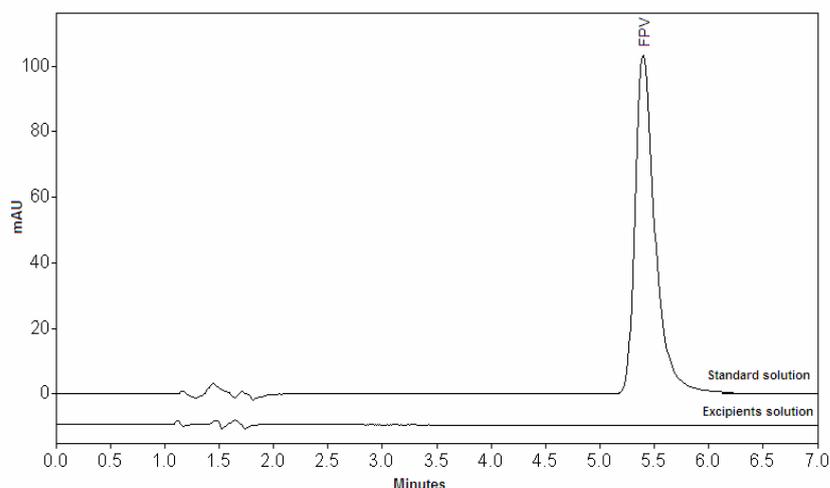


Figure 7 –The specificity of the method show peak of fosamprenavir (FPV) and excipients solution in dissolution medium.

3.4.2 Linearity

The recommended range for the calibration curve is from $\pm 20\%$ below the lowest expected concentration to $\pm 20\%$ above the highest expected concentration of the dissolution test [2,16]. The method showed good linearity at the concentrations range of $5.0\text{--}90.0 \mu\text{g ml}^{-1}$. Correlation coefficient was 0.9998. The slope and intercept obtained was 28623 and -12749. The analysis by ANOVA showed significant linear regression and no significant deviation from linearity ($p < 0.05$). These data indicate that the method is linear for fosamprenavir.

3.4.3 Accuracy/Precision

The accuracy was demonstrated by the recovery of known amounts of fosamprenavir to the dissolution vessels. Percentage recoveries from 95.0% to 105.0% are recommended for the accuracy test [2,16]. In the accuracy test three concentrations were evaluated ($10, 30$ and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and mean recoveries were 100.8 ± 1.18 , 100.4 ± 1.38 and $100.5 \pm 1.73 \%$, respectively, corroborating the accuracy of the method.

Repeatability was determined by triplicate injection of standard solutions (10.0 µg/ml, 30.0 µg/ml and 50.0 µg/ml) and the intermediate precision was evaluated for three days. The low R.S.D. values obtained for repeatability and intermediate precision show the good precision of the method (Table 3).

Table 3: Precision of the dissolution method.

Concentration µg/ml	Precision		
	R.S.D. intra-day	R.S.D. inter-day	
Day 1	10.0	1.00	
Day 2	10.0	0.67	1.18
Day 3	10.0	0.65	
Day 1	30.0	1.48	
Day 2	30.0	0.35	1.39
Day 3	30.0	1.74	
Day 1	50.0	0.35	
Day 3	50.0	1.68	1.73
Day 3	50.0	1.40	

3.4.4 Standard and sample solution stability

Fosamprenavir was found to be stable under dissolution test conditions. There was no evidence of degradation of fosamprenavir under these conditions. The results demonstrated that sample and standard solutions remained at 100.0±2.0% over a period of 24 h.

3.5 Evaluation of release kinetic

Dissolution profile (Figure 4) was used to evaluate the kinetics of drug release. The determination coefficient (R^2) and model selection criteria (MSC) are presented in Table 4. According to the R^2 and MSC, dissolution profiles were better described by Hixson-Crowell model (Table 4). When this model is

used, it is assumed that the release rate is limited by the drug particles dissolution rate and not by the diffusion that might occur through the polymeric matrix [19].

Table 4: Coefficient of determination (R^2) and model selection criteria (MSC) the mathematical models.

Mathematical models	R^2	MSC
Zero order kinetics	0,9619	3.22
First order kinetics	0,9762	2.75
Higuchi model	0,8897	1.87
Hixson-Crowell model	0,9833	3.35

3.6 Discriminating power of the test

The discriminatory power of the dissolution method is the method's ability to detect changes in the drug product [2,16,23]. If large changes in the drug dissolution characteristics on long-term storage of the dosage form are observed, this would indicate that functional changes are occurring in the drug product, and may compromise its performance in vivo [24]. Thus, the dissolution method developed was challenged. The pharmaceutical dosage forms exhibited a decrease in dissolution rate during storage at 40 °C and 75% RH for 2 and 4 weeks, as well as for the tablets with date expired, as shown in Figure 8.

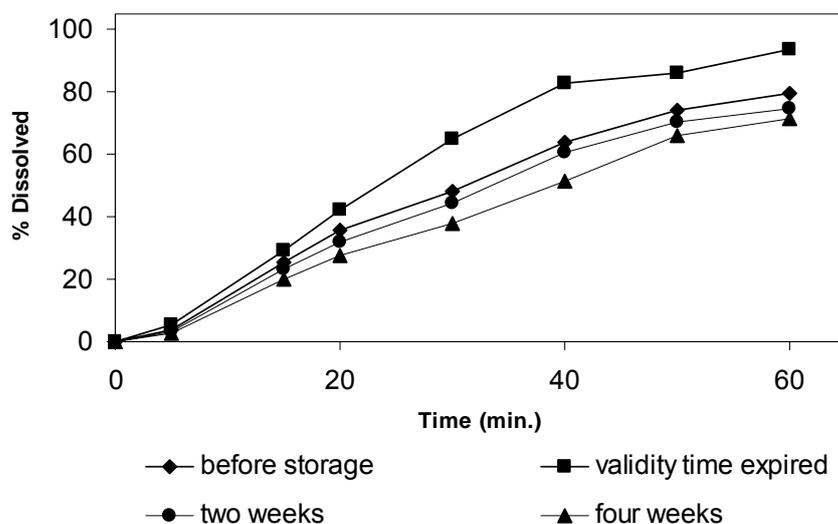


Figure 8 – Changes in the dissolution rate of fosamprenavir tablets after storage and date expired.

The dissolution profiles obtained were compared using difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2). The results confirmed that the profiles obtained are not similar (Table 5).

Table 5: Comparison of tablets dissolution profiles through difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2).

Parameter	Validity time expired	After two weeks	After four weeks
f_1	19.21	24.84	33.65
f_2	46.31	41.34	34.79

CONCLUSIONS

A level-A in vitro–in vivo correlation was established for fosamprenavir tablets (Telzir[®]). The in vitro dissolution profile for fosamprenavir was obtained using 900 ml of dissolution medium containing 0.01M HCl, USP Apparatus 1 at 75 rpm and 37±0.5 °C. Kinetics of drug release was better described by Hixson-Crowell model. The discriminatory power of the dissolution method was challenged and the profiles showed a decrease in dissolution rate during storage at 40 °C and 75% RH for 2 and 4 weeks, as well to the tablets with date expired. 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 fosamprenavir tables.

REFERENCES

- [1] J. Krämer, L.T. Grady, J. Gajendran, Historical Development of Dissolution Testing. In: Dressman, J., Krämer, J. (Eds.), Pharmaceutical Dissolution Testing, Taylor & Francis Group, New York, 2005, pp. 1-38.
- [2] US Pharmacopeial Forum. Pharmacopeial Previews, 2004, Vol. 30, pp. 351-363.
- [3] FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1997a.
- [4] 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, 1997b.
- [5] J.B. Dressman and C. Reppas, In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. Eur. J. Pharm. Sci. 11 (2000) 73-80.

[6] V.R.S. Uppoor, Regulatory perspectives on *in vitro* (dissolution) / *in vivo* (bioavailability) correlations. *J. Control. Release* 72 (2001) 127-132.

[7] J.M. Cardot, E. Beyssac, M. Alric, In vitro-in vivo correlation: importance of dissolution in IVIVC. *Dissolution Technologies* (2007) 15-19.

[8] A.H. Corbett, A.D.M. Kashuba, Fosamprenavir Vertex Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3 (2007) 384-390.

[9] C. Falcoz, J.M. Jenkins, C. Bye, T.C. Hardman, K.B. Kenney, S. Studenberg, H. Fuder, W.T.J. Prince, Pharmacokinetics of GW433908, a prodrug of amprenavir, in healthy male volunteers. *Clin. Pharmacol.* 42 (2002) 887-898.

[10] E.S. Furfine, C.T. Baker, M.R. Hale, D. J. Reynolds, J.A. Salisbury, A.D. Searle, S.D. Studenberg, D. Todd, R. D. Tung, A. Spaltenstein, Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 791-798.

[11] FDA. Food and Drug Administration. Orange Book: Approved Drug Products With Therapeutic Equivalence Evaluations, 2009.

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/obdetail.cfm?Appl_No=021548&TABLE1=OB_Rx.

[12] EMEA, 2009. European Medicines Agency.

<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/telzir/H-534-PI-en.pdf>.

[13] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutical Drug Classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* 12 (1995) 413-420.

[14] R. Wood, K. Arasteh, H. Stelbrink, E. Teofilo, F. Raffi, R. Pollard, J. Yeo, M.b. Wire, Six-week randomized controlled trial to compare the tolerabilities,

pharmacokinetics, and antiviral activities of GW433908 and amprenavir in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 116-123.

[15] L. Shargel, and A.B.C. Yu, *Applied Biopharmaceutical and Pharmacokinetics*, 5th Ed., Appleton & Lange, USA, 2005, pp. 267-269.

[16] US Pharmacopoeia, 32nd ed., NF-25 <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2009.

[17] ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1)*, International Conference on Harmonization, Geneva, 2005.

[18] A.H. Kibbe, *Hand Book of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed. Pharmaceutical Press, Washington, 2000. 665 pp.

[19] P. Costa, J.M.S. Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123-133.

[20] G. Freitag, Guidelines on dissolution profile comparison, *Drug Inf. J.* 35 (2001) 865-874.

[21] V.P. Shah, and J.E. Polli, Methods to compare dissolution profiles, *Drug Inf. J.* 30 (1996) 1113-1120.

[22] F. Emami, In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 9 (2006) 169-189.

[23] C.K. Brown, H.P. Chokshi, B. Nickerson, R.A. Reed, B.R. Rohrs, P.A. Shah, Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm. Technol.* (2004) 56–65.

[24] S. Yoshioka, and V.J. Stella, *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer Academic Publishers, 2002.

7. CAPÍTULO IV

Estudo de estabilidade.

7.1 INTRODUÇÃO

Instabilidades em formulações são freqüentemente detectáveis apenas após consideráveis períodos de armazenamentos sob condições normais. Para avaliar o comportamento do fármaco ou medicamento ao longo do tempo é fundamental a realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

Para determinar a estabilidade de um produto formulado, é comum expô-lo a condições forçadas de armazenamento, ou seja, condições de temperatura, umidade e luz. Condições elevadas de estresse aumentam a deterioração do produto e, conseqüentemente, reduzem o tempo necessário para o teste (AULTON, 2005). Portanto, os testes acelerados de estabilidade são úteis no monitoramento das reações de degradação e também para prever o prazo de validade do produto nas condições normais de armazenamento (BRASIL, 2005).

De acordo com as normas da ANVISA, o estudo de estabilidade para forma farmacêutica sólida, condição de armazenamento 15-30 °C e embalagem impermeável, deve ser realizado nas seguintes condições: 40 ± 2 °C, durante 6 meses, com realização de ensaio de doseamento, quantificação dos produtos de degradação, dissolução e dureza em 0, 3 e 6 meses (BRASIL, 2005).

Assim, o presente capítulo trata do estudo preliminar de estabilidade de soluções dos comprimidos de fosamprenavir frente a diferentes condições, do estudo acelerado para os comprimidos de Telzir[®] e da determinação da cinética de fotodegradação.

7.2 REVISÃO

7.2.1 Estudo preliminar de estabilidade

A avaliação preliminar da estabilidade tem por objetivo determinar quais os fatores capazes de causar alterações na substância em análise. Diversas condições podem afetar a estabilidade de um produto. Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos; ou intrínsecas, quando determinadas por fatores que dependem da natureza química da substância (BRASIL, 2005).

7.2.2 Determinação da cinética de degradação

A cinética é o estudo da velocidade nas quais os processos ocorrem. As reações de degradação de fármacos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Os estudos cinéticos são úteis pois permitem a compreensão dos mecanismos das transformações envolvidos e prever o grau de transformações ocorridas em um dado intervalo de tempo (LACHMAN *et al.*, 2001; AULTON, 2005).

A maioria das reações de degradação é de ordem zero, primeira ordem e de segunda ordem (Tabela 7.1).

Tabela 7.1 – Parâmetros da cinética de zero, primeira e de segunda ordem.

	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
Equação linear	$C = C_o - k \cdot t$	$\ln C = \ln C_o - k \cdot t$	$1/C = 1/C_o + k \cdot t$
Tempo de meia vida ($t_{1/2}$)	$t_{1/2} = C_o / 2 \cdot k$	$t_{1/2} = 0,693 / k$	$t_{1/2} = 1 / (k \cdot C_o)$
$t_{90\%}$	$t_{90\%} = 0,1 \cdot C_o / k$	$t_{90\%} = 0,106 / k$	$t_{90\%} = 1 / (9 \cdot k \cdot C_o)$

A reação é de ordem zero quando a velocidade da reação é independente da concentração da substância ativa, isto é, a velocidade é constante. Portanto, o gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) é uma linha reta (SHARGEL, 2005; LACHMAN *et al.*, 2001; AULTON, 2005).

Quando a velocidade de reação depende da concentração da substância ativa, a reação segue cinética de primeira ordem. Neste tipo de reação a velocidade é diretamente proporcional à concentração do remanescente de fármaco. Desta forma, um gráfico de $\ln C$ versus t resultará em uma linha reta (SHARGEL, 2005; LACHMAN *et al.*, 2001; AULTON, 2005).

Se a velocidade depende da concentração de dois reagentes a reação é dita de segunda ordem e uma linha reta será obtida plotando-se o inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) (SHARGEL, 2005; LACHMAN *et al.*, 2001; AULTON, 2005).

7.2.2 Estabilidade de inibidores da protease

A maioria dos novos fármacos são congêneres de moléculas de fármacos já existentes e, para um novo congênere 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 (BAKSHI e SINGH, 2002).

TAN e colaboradores (2003) estudaram os efeitos do pH (2,0; 4,0; 5,0 e 7,0), temperatura, antioxidante e diferentes veículos em suspensões extemporâneas de saquinavir, obtidas através da extração do saquinavir das cápsulas moles do Fortovase[®]. Foi constatado maior degradação do saquinavir com o aumento do pH, principalmente acima de 4,0. A estabilidade do saquinavir melhorou com a adição de antioxidante e pH ajustado para 4,0, nas temperaturas de 5 e 25 °C, quando comparado com outras condições.

Estudo realizado por PAU e colaboradores (2005) avaliaram a estabilidade físico-química da associação lopinavir/ritonavir, a 35 e 45 °C,

Embora as cápsulas demonstrassem estabilidade química durante 4 semanas a 35 °C, em 45 °C e após 7 dias as cápsulas encontravam-se aderidas umas as outras.

Outro trabalho realizado por DONATO e colaboradores (2006) para a associação ritonavir/lopinavir demonstrou que a temperatura é um fator que degrada o ritonavir e, a velocidade de degradação é favorecida pelo aumento da temperatura. O lopinavir, na forma farmacêutica cápsulas, demonstrou ser estável frente à temperatura, à hidrólise alcalina e à oxidação e instável frente à hidrólise ácida.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1 Estudo preliminar de estabilidade

O estudo preliminar foi realizado nos meios ácido, básico, oxidativo (peróxido de hidrogênio - 3%), temperatura e luz, empregando-se soluções metanólicas dos comprimidos de fosamprenavir - Telzir® (400 µg/ml).

As condições de estresse às quais o fármaco foi submetido e o preparo das soluções analisadas são descritos a seguir.

a) Degradação alcalina

Soluções dos comprimidos de fosamprenavir (100 µg/ml) em NaOH 1 M foram mantidas à temperatura ambiente durante 72 horas. Após este período, transferiram-se 2,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 5 ml, neutralizou-se a solução com HCl 1 M e completou-se o volume com metanol (40 µg/ml). Preparou-se um branco sob as mesmas condições.

b) Degradação ácida

Soluções dos comprimidos de fosamprenavir (100 µg/ml) em HCl 1 M foram mantidas à temperatura ambiente durante 72 horas. Após este período, transferiram-se 2,0 ml desta solução resultante para um balão volumétrico de 5 ml, neutralizou-se a solução com NaOH 1 M e completou-se o volume com metanol (40 µg/ml). Preparou-se um branco sob as mesmas condições.

c) Degradação Oxidativa

Soluções dos comprimidos de fosamprenavir (100 µg/ml) em H₂O₂ 3%, foram expostas à temperatura ambiente durante 72 horas. Após este período, transferiu-se 2,0 ml desta solução resultante para um balão volumétrico de 5 ml

e completou-se o volume com metanol (40 µg/ml). Um branco foi preparado sob as mesmas condições.

d) Degradação Fotoquímica

Transferiu-se 1,0 ml da solução dos comprimidos de fosamprenavir (400 µg/ml) para uma cubeta de quartzo (UV-CUVETTE, MICRO-BRAND). Deixou-se em repouso por 90 min exposto à lâmpada de radiação UV 254 nm, em câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm).

Após este período, transferiu-se toda a solução, quantitativamente, para um balão volumétrico de 10 ml. Preparou-se uma outra amostra da mesma forma, que foi submetida às mesmas condições, porém protegida da ação da luz com papel alumínio.

e) Hidrólise neutra a 60 °C

Soluções dos comprimidos de fosamprenavir (100 µg/ml) foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60 °C e deixadas em repouso por 10 dias. Após este período, aferiu-se novamente a solução com diluente devido à evaporação de certa quantidade do diluente. Transferiu-se 2,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 5 ml e completou-se o volume com o diluente (40 µg/ml).

7.3.2 Estudos de estabilidade acelerada

7.3.2.1 Condições

Os comprimidos de fosamprenavir (Telzir[®]) foram mantidos em sua embalagem primária e colocados em estufa a temperatura de 40 °C por seis meses. Após três e seis meses, três comprimidos foram retirados, triturados separadamente e quantificados por CLAE, conforme condições descritas no

item 4.2.4.3 do capítulo I. Outros 3 comprimidos foram retirados e foi avaliado o perfil de dissolução.

7.3.3 Estudo da cinética de fotodegradação

7.3.3.1 Preparo da solução amostra dos comprimidos

Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a 10 mg de fosamprenavir para um balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com metanol (400 µg/ml). A solução foi agitada por 10 minutos e filtrada. Posteriormente, transferiu-se, quantitativamente, 1,0 ml para cubetas de quartzo (UV-CUVETTE, MICRO-BRAND). Essas cubetas foram colocadas em câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm) por 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 min expostas à lâmpada de radiação UV 254 nm. Em cada intervalo de tempo foram retiradas 3 cubetas contendo as amostras. Transferiu-se quantitativamente, 1,0 ml para balões volumétricos de 10 ml, a fim de obter concentração final de 40 µg/ml.

Preparou-se outra amostra da mesma forma descrita acima, submetida às mesmas condições, porém protegida da ação da luz com papel alumínio.

Para a determinação quantitativa foram utilizadas as condições cromatográficas descritas no item 3.2.4.3.

7.3.3.2 Avaliação da cinética de degradação

Conforme descrito em 7.2.2.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1 Estudo preliminar de estabilidade

Os cromatogramas obtidos por CLAE para amostras de fosamprenavir submetidas às condições de degradação são apresentados na Figura 7.1.

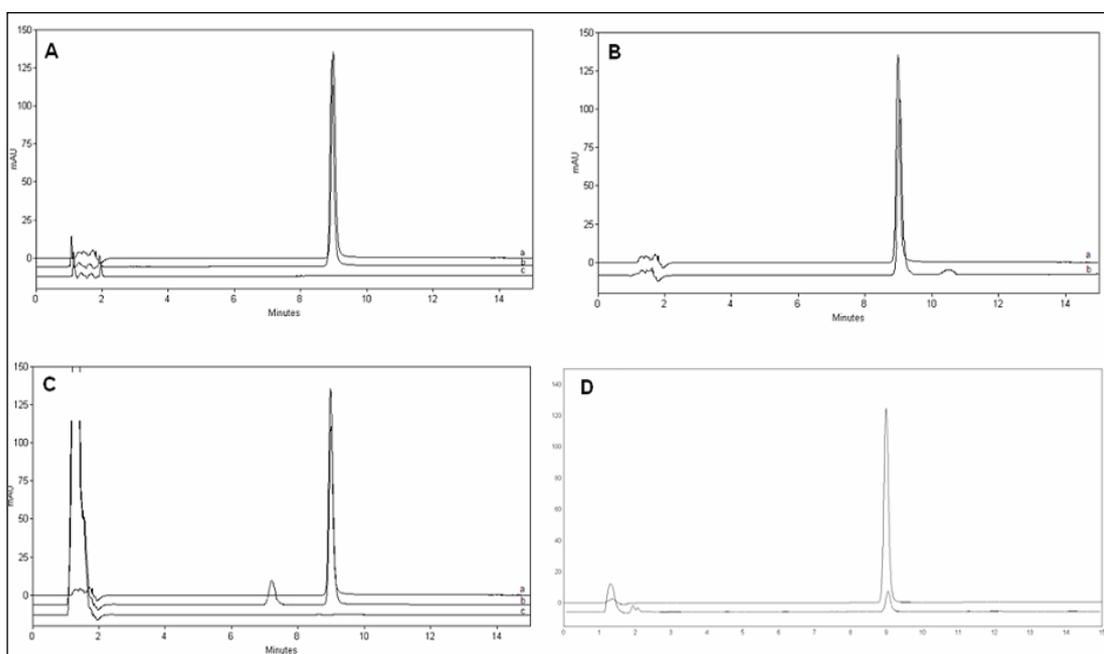


Figura 7.1 – Cromatogramas obtidos do FPV (40,0 µg/ml): A – hidrólise básica 0 h (a), 72 h (b) e branco (c); B – hidrólise ácida 0 h (a) e 72 h; C – oxidação 3% H₂O₂, 0 h (a), 72 h (b) e branco (c); D – fotodegradação 254 nm 0 h (a) e 90 min (b);

A avaliação da estrutura química de um fármaco pode indicar as possíveis rotas de degradação que a mesma pode sofrer. Segundo FESSENDEN e FESSENDEN (1994) compostos que contenham na sua estrutura química grupamento carbamato ou sulfonamida podem sofrer hidrólise ácida e alcalina nesta porção da molécula, conforme demonstrado na Figura 7.2.

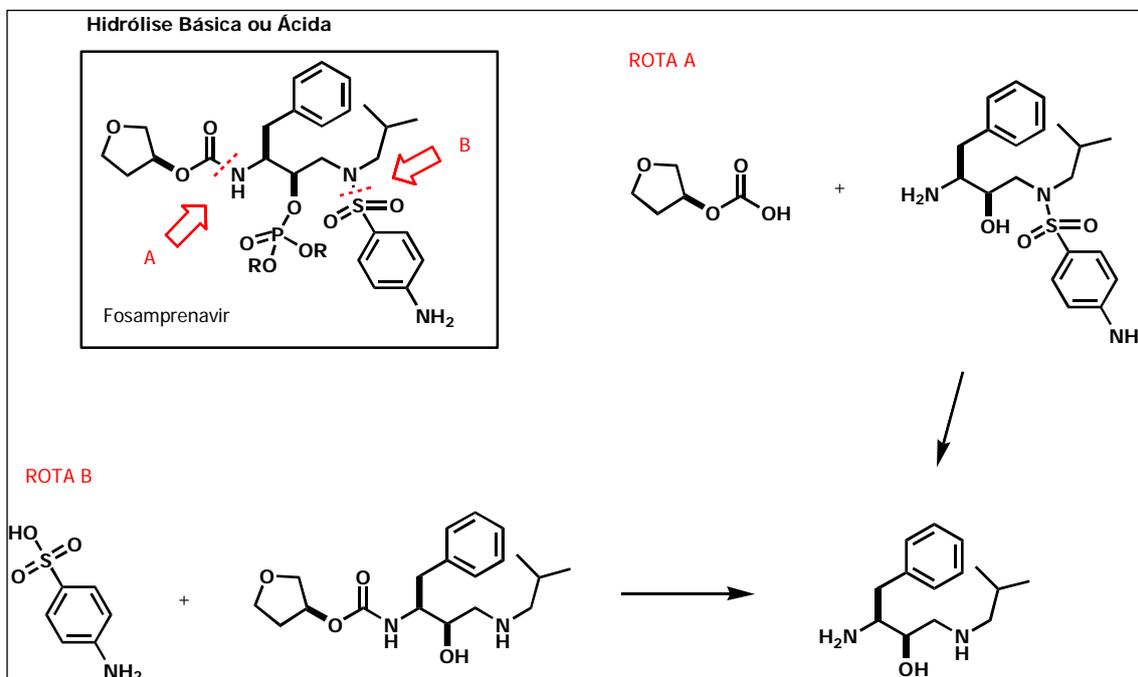


Figura 7.2 – Provável rota de degradação do fosamprenavir (pró-fármaco amprenavir) em meio ácido e básico (FESSENDEN e FESSENDEN, 1994).

Sob condições oxidantes, os grupamentos álcool secundário e amina aromática podem reagir, resultando na formação de cetona e nitrocomposto respectivamente (FESSENDEN e FESSENDEN, 1994).

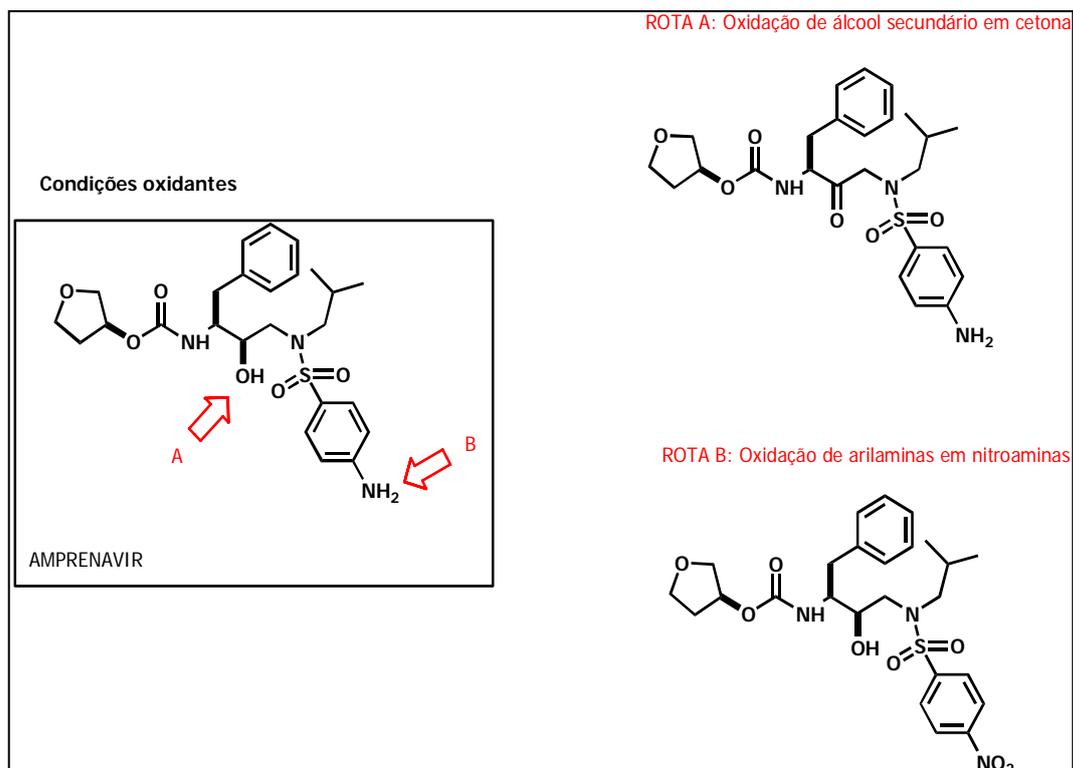


Figura 7.3 — Provável rota de degradação do fosamprenavir (pró-fármaco amprenavir) em meio oxidativo (FESSENDEN e FESSENDEN, 1994).

Os resultados do estudo preliminar de estabilidade demonstraram que o fosamprenavir não degrada frente ao meio alcalino, uma vez que não houve redução no teor ou formação de picos secundários. Quanto à hidrólise ácida e oxidativa ocorreu uma diminuição de 14,5 e 20,1% do teor, respectivamente, bem como o aparecimento de picos secundários.

Os testes de estresse por fotólise (254 nm) demonstraram uma acentuada degradação do fosamprenavir (90,3%) em 90 min e o surgimento de potenciais produtos de degradação. A solução adquiriu coloração levemente amarelada. A luz é um fator ambiental capaz de fornecer energia necessária para desencadear reações de degradação de acordo com o comprimento de onda (λ) emissor da radiação luminosa. Quanto menor o λ da radiação, maior

energia é absorvida por mol de reagente e, com isso, mais rápida a degradação (LACHMAN *et al.*, 2001).

7.2.2 Estudo de estabilidade acelerado

Estes estudos são utilizados para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto saneante em condições de estocagem forçadas. Os dados assim obtidos, combinados com aqueles dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar alterações a longo prazo em condições não aceleradas, bem como o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas em rotulagem (BRASIL, 2005).

Os resultados obtidos após o estudo de estabilidade acelerada dos comprimidos de fosamprenavir a 40 °C durante 6 meses são mostrados na tabela 7.2.

Tabela 7.2 — Percentagens obtidas após a exposição dos comprimidos ao calor (40 °C).

Tempo (meses)	% de Fosamprenavir
0	100,2± 0,98
3	98,5±1,04
6	97,1± 0,53

Os perfis de dissolução dos comprimidos submetidos ao teste de estabilidade são apresentados na Figura 7.4.

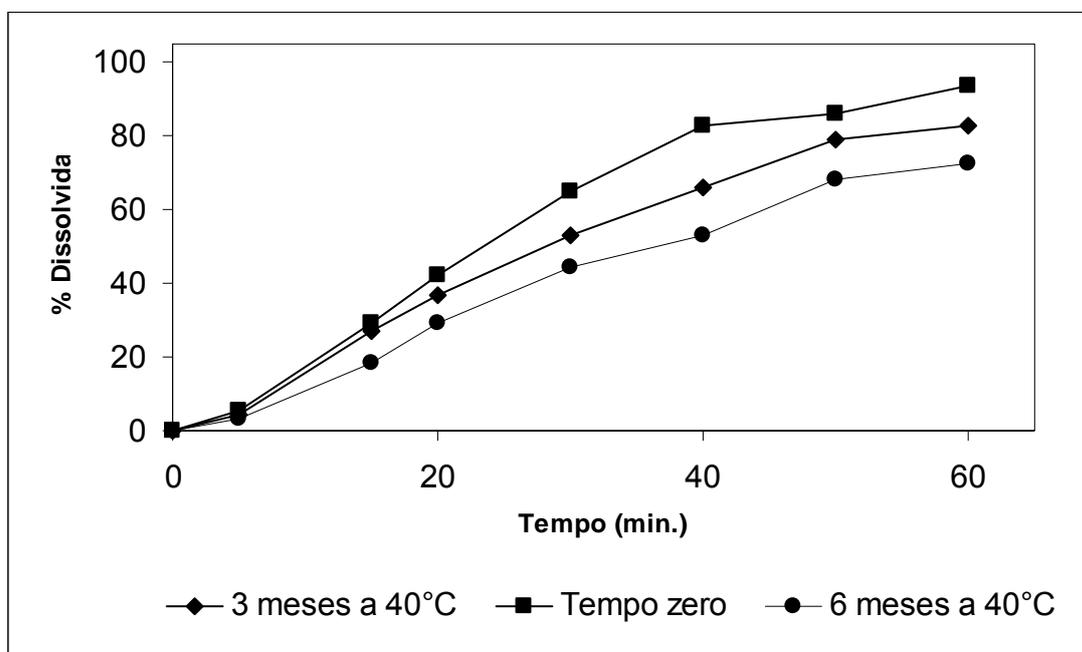


Figura 7.4 — Alterações no perfil de dissolução dos comprimidos de fosamprenavir após estudo de estabilidade frente ao calor.

Os resultados obtidos não demonstraram uma redução significativa do teor dos comprimidos após o período de 6 meses bem como não foram observados o surgimento de picos secundários.

Os perfis obtidos nos ensaios de dissolução demonstraram uma redução na percentagem dissolvida quando comparado com o perfil obtido no tempo zero.

Estudo realizado por VIDAL e colaboradores (2010), para avaliação do efeito de condições aceleradas de armazenamento sobre comprimidos de ciprofloxacino, demonstraram uma diminuição da percentagem dissolvida quando submetidos a uma temperatura de 40 °C a 75% de umidade relativa durante um período de 3 e 6 meses, sem efeito significativo sobre a estabilidade química.

O efeito do envelhecimento dos comprimidos de compressão direta utilizando como matriz fosfato de cálcio dissódico foi investigado por LAUSIER e colaboradores (1977). Os comprimidos foram submetidos a 25 °C a 50% de umidade relativa e 45 °C a 75% de umidade relativa. Comprimidos armazenados a 25 °C e 50% de umidade relativa apresentaram um aumento linear no tempo de desintegração e dissolução com mais de 16 semanas, sem outras mudanças significativas. Armazenamento em 45 °C e 75% de umidade relativa resultou em mudanças significativas nos ensaios de desintegração e dissolução sendo essa mudanças relacionadas a perda de água de hidratação.

7.4.3 Avaliação da cinética de fotodegradação

Os cromatogramas sobrepostos das soluções amostra dos comprimidos contendo fosamprenavir no tempo zero (sem exposição) e expostas à radiação UV (254 nm) por 15 e 90 min estão apresentados na Figura 7.5.

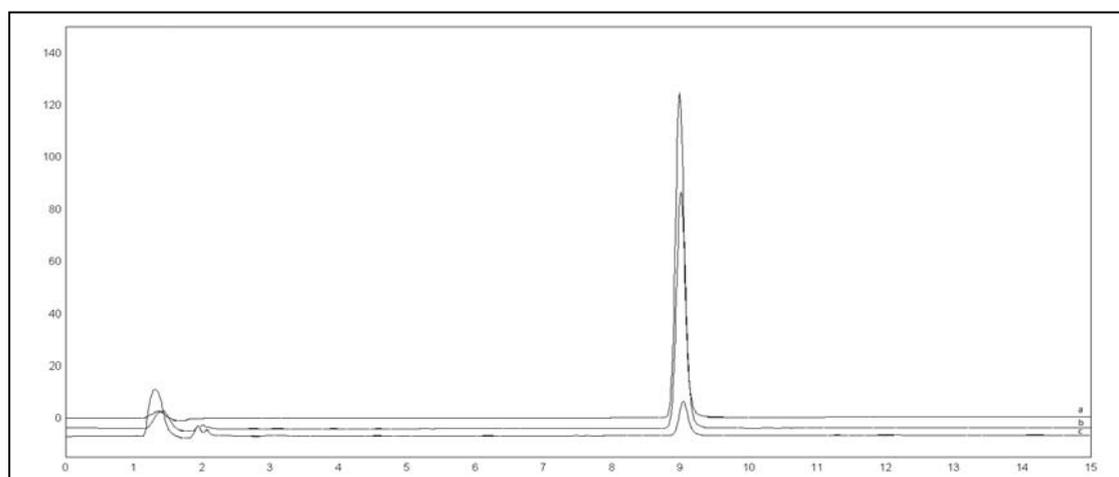


Figura 7.5— Cromatogramas da solução amostra dos comprimidos contendo fosamprenavir submetidas à fotólise 254 nm: tempo zero (a), 15 minutos (b) e 90 minutos (c) Condições cromatográficas: coluna Vertical C₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: tampão acetato de sódio: acetonitrila; fluxo de 1,2 ml/min; λ= 264 nm.

A Tabela 7.3 apresenta os valores de concentrações, logaritmo da concentração (Log C) e inverso da concentração (1/C).

Tabela 7.3 — Valores dos estudos de fotoestabilidade para o fosamprenavir, obtidos por CLAE, para as três diferentes ordens de reações.

Tempo	Concentração	log C	1/C
0	40,0450	1,6025	0,0250
5	34,9026	1,5429	0,0287
10	32,1606	1,5073	0,0311
20	23,4626	1,3704	0,0426
30	22,7140	1,3563	0,0440
40	17,3267	1,2387	0,0577
50	14,0353	1,1472	0,0712
60	11,4870	1,0602	0,0871
90	4,4440	0,6478	0,2250
120	2,7771	0,4436	0,3601

O gráfico construído plotando-se o resultado do logaritmo das concentrações remanescentes em função do tempo apresentou a melhor linha de ajuste para os dados conforme apresentado na Figura 7.6.

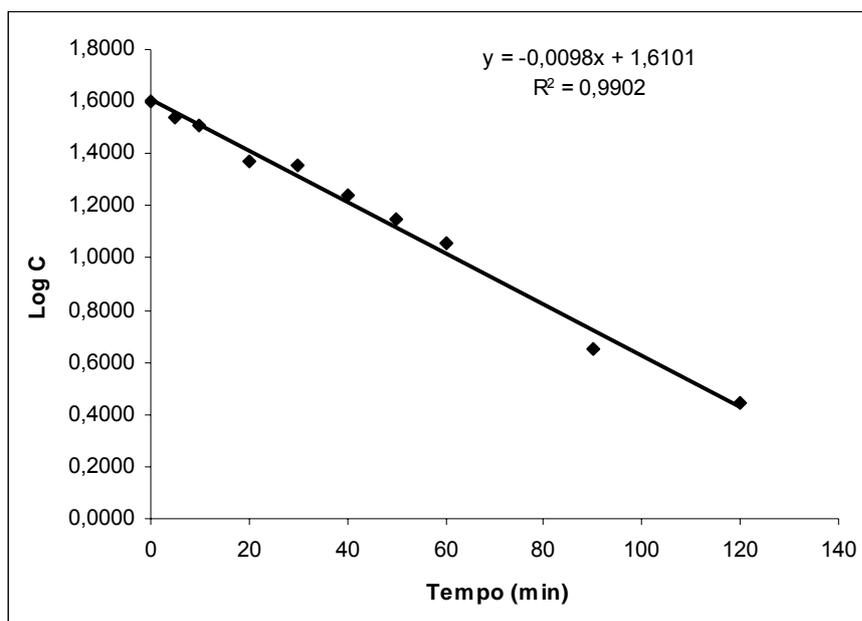


Figura 7.6— Representação gráfica da degradação da solução amostra dos comprimidos contendo fosamprenavir obtida por CLAE considerando reação de primeira ordem.

Desta forma, a degradação do fosamprenavir, obedeceu a uma cinética de primeira ordem, ou seja, a degradação do fosamprenavir é dependente da concentração. Mesmo que muitos fármacos se degradem por mecanismos complexos, a maioria das degradações ocorrem de acordo com reações de ordem zero, primeira ordem ou pseudo primeira ordem (LACHMAN *et al.*, 2001).

7.5 CONCLUSÕES

- O estudo preliminar de estabilidade demonstrou que o fosamprenavir é instável frente a luz (254 nm) e a hidrólise ácida e oxidativa;
- O estudo de estabilidade acelerada indica que os comprimidos de fosamprenavir (Telzir[®]) são estáveis a 40 °C por 6 meses;
- Foi observada uma diminuição na percentagem dissolvida dos comprimidos quando submetidos a temperatura de 40 °C por 3 e 6 meses;
- O fosamprenavir obedeceu a uma cinética de fotodegradação de primeira ordem, ou seja, a degradação do fosamprenavir é dependente da concentração.

7.6 REFERÊNCIAS

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 25; 35-46; 230-284.

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.

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.

DONATO, E. D.; DIAS, C. L.; ROSSI, R. C.; VALENTE, R. S.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. LC Method for Studies on the Stability of Lopinavir and Ritonavir in Soft Gelatin Capsules. **Chromatographia**, v. 63, p. 437-443, 2006.

FESSENDEN, R. J. FESSENDEN, J. S. **Organic Chemistry**. 5 ed. Books Publishing Company, 1997.

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.

LAUSIER, J. M.; CHIANG, C.; ZOMPA, H. A.; RHODES, C. T. Aging of tablets made with dibasic calcium phosphate dihydrate as matrix. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, p. 1636-1637, 1977.

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 (resumo).

SHARGEL, L. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p.411-450.

TAN, L.K.; THENMOZHIAL, J.C.; HO, P. C. Stability of extemporaneously prepared saquinavir formulations. **Journal of Chemical Pharmacy and Therapeutics**, v. 28, p.457-463, 2003.

VIDAL, N. L.; BREVEDAN, M. I.; VARILLAS, M. A.; SIMIONATO, L. D. PIZZORNO, M. Effect of Accelerated-Aging Conditions on the Dissolution Stability of Ciprofloxacin Tablets. **Dissolution Technologies**, p. 23-29, 2010.