



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA (PPGIT)

MARCOS VICTOR GREGÓRIO DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE E PREDIÇÃO DO PRAZO
DE VALIDADE DE COMPRIMIDO ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO
DE HIV**

RECIFE, 2020

MARCOS VICTOR GREGÓRIO DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE E PREDIÇÃO DO PRAZO
DE VALIDADE DE COMPRIMIDO ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO
DE HIV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

RECIFE,2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Oliveira, Marcos Victor Gregorio de.

Otimização de Método Indicativo de Estabilidade e predição do Prazo de Validade de Comprimido Associação Dose Fixa para o Tratamento de HIV / Marcos Victor Gregorio de Oliveira. - Recife, 2020.

113p : il., tab.

Orientador(a): Pedro José Rolim Neto

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2020.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Estabilidade de Medicamentos. 2. Degradação Térmica. 3. Doseamento por HPLC. 4. HIV. 5. Método Indicativo de Estabilidade. 6. Degradação Forçada. I. Neto, Pedro José Rolim. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARCOS VICTOR GREGÓRIO DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE E PREDIÇÃO DO PRAZO
DE VALIDADE DE COMPRIMIDO ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO
DE HIV**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Aprovada em: ____/____/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo César Dantas da Silva
Universidade Estadual da Paraíba

Prof^ª. Dr^ª. Larissa Morgana dos Santos Mendes
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A promoção do acesso ao tratamento antirretroviral pelos pacientes infectados pelo HIV é uma prioridade de saúde pública mundial, já que sem o medicamento adequado os pacientes tornam-se altamente vulneráveis a infecções. Dessa forma, é necessário viabilizar alternativas que aumentem a adesão e conseqüentemente a eficácia terapêutica. Uma das estratégias utilizadas é a simplificação do regime terapêutico, por meio da associação de fármacos em uma única forma farmacêutica. Sendo assim, pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco desenvolveram comprimido Associação Dose Fixa contendo zidovudina, lamivudina e efavirenz sem, no entanto, ter sido realizado o estudo de estabilidade completo para estabelecer o prazo de validade. Assim, o presente estudo objetivou a otimização de método indicativo de estabilidade (MIE) por cromatografia líquida de alta eficiência para o comprimido em associação dose fixa (ADF) e predição do prazo de validade deste comprimido por meio de técnicas tradicionais e inovadoras, como por cinética térmica de degradação. Para o desenvolvimento do MIE foram testadas diferentes condições de gradiente, fluxo (0,6, 0,5 e 0,4 mL.min⁻¹), temperatura (30 e 40°C), tempo de análise 50 e 65 minutos. O melhor resultado foi obtido a partir de método gradiente utilizando água e acetonitrila, a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura de 30°, tempo de análise de 65 min, estes sendo realizados em coluna Supelco® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A validação do método foi realizada, bem como os doseamentos dos comprimidos submetidos a estabilidade acelerada em câmara climática e estudo térmico para cálculo por meio da equação de Arrhenius, utilizando energia de ativação dos fármacos em diferentes razões de aquecimento. As razões utilizadas foram de 2,5°, 5°, 10°, 15° e 20° C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio num intervalo de temperatura de 25°C a 600°C em amostras de 5mg ± 0,5mg em suporte de platina. O doseamento dos comprimidos submetidos a estabilidade acelerada demonstrou uma diminuição mínima de teor dos IFA's dentro da faixa de erro do método, mas se mantendo sempre superior a 90% valor mínimo de teor para o teste proposto. Os estudos de degradação térmica com predição de prazo de validade pelo método proposto determinaram que o comprimido produzido possui prazo de validade de 540 dias, demonstrado que os insumos juntos de alguma forma contribuem de forma sinérgica para estabilidade dos fármacos em conjunto.

Palavras-chave: Estabilidade de Medicamentos; Método Indicativo de Estabilidade; Efavirenz; Lamivudina; Zidovudina; Degradação Térmica.

ABSTRACT

Promoting access to antiretroviral treatment by HIV-infected patients is a worldwide public health priority, since without adequate medication, patients become highly vulnerable to infections. Thus, it is necessary to enable alternatives that increase therapeutic compliance and, consequently, therapeutic efficacy. One of the strategies used is the simplification of the therapeutic regimen, through the association of drugs in a single pharmaceutical form. Therefore, researchers from drug technology laboratory developed an FDC tablet containing zidovudine (AZT), lamivudine (3TC) and efavirenz (EFV) was developed however, without having performed its complete stability study to establish the expiration date. The present study aimed at the optimization of the stability indicating method (SIM) by high-performance liquid chromatography for the tablet in fixed dose combination (FDC) and prediction of the shelf life of this tablet through traditional and innovative techniques such as thermal kinetics of degradation. Different conditions of gradient, flow (0.6, 0.5 and 0.4 mL.min⁻¹), temperature (30 and 40 ° C), analysis time, 50 and 65 minutes were tested for the development of the MIE. The best result was obtained using a gradient method using water and acetonitrile, flow of 0.6 mL.min⁻¹, at 30 ° C, analysis time of 65 min, on a Supelco® C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm). The validation of the method was carried out, as well as the dosages of the tablets submitted to accelerated stability in a climatic chamber and thermal study for calculation using the Arrhenius equation, using the activation energy of the drugs in different heating rates. The ratios used were 2.5°, 5°, 10°, 15° and 20° C.min⁻¹, under dynamic nitrogen atmosphere in a temperature range of 25°C to 600°C in samples of 5mg ± 0.5mg in platinum support. The dosage of tablets subjected to accelerated stability demonstrated a minimum decrease in IFA's content within the error range of the method, but always remaining above 90% minimum content value for the proposed test. The thermal degradation studies with predicted expiration date by the proposed method determined that the produced tablet has an expiration date of 540 days, demonstrating that the inputs together somehow contribute synergistically to the stability of the drugs together.

Keywords: Drug Stability; Stability Indicating Method; Efavirenz; Lamivudine. Zidovudine, Thermal Degradation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do Vírus HIV.....	20
Figura 2 - Número de previsto de novas infecções ao longo dos anos.....	21
Figura 3 - Prevenção Combinada	22
Figura 4 - Evolução da carga viral no hospedeiro.	23
Figura 5 - Ciclo de infecção do HIV a uma célula hospedeira.....	25
Figura 6 - Fórmula estrutural da Lamivudina.....	31
Figura 7 - Fórmula estrutural da Zidovudina.....	32
Figura 8 - Estrutura molecular do Efavirenz.	33
Figura 9 - Lamivudina em pó.	55
Figura 10 - Curvas DSC e TG da Lamivudina.	55
Figura 11 - Espectro Infravermelho da Lamivudina.	56
Figura 12 Comparação dos espectros de infravermelho de Lamivudina em diferentes lotes. .	57
Figura 13 - Espectro UV-Vis da Lamivudina.....	58
Figura 14 - Zidovudina em pó.	59
Figura 15 - Curva TG/DSC da zidovudina.	60
Figura 16 - Espectro infravermelho da zidovudina.	61
Figura 17 - Comparação de espectros de infravermelho de diferentes lotes de zidovudina	62
Figura 18 – Espectro UV-Vis da Zidovudina.....	62
Figura 19 - Efavirenz em pó.	63
Figura 20 - Curva DSC do Efavirenz lote: LT0482/2015	64
Figura 21 - Espectro Infravermelho do Efavirenz LT 04892/2015	65
Figura 22 - Comparação de Espectros de infravermelho de diferentes lotes de efavirenz.....	66
Figura 23 - Espectro de absorção UV do Efavirenz	66
Figura 24 - Cromatograma referente a análise de comprimido associação dose fixa obtido por método de Soares, 2011	68
Figura 25 - Cromatograma referente a análise de comprimido associação dose fixa degradado obtido por método de Rosa, 2019.....	70
Figura 26 - Cromatograma teste de temperatura 40°C comparado com teste a 30°C.....	70
Figura 27 - Cromatograma obtido a partir de análise de comprimido associação dose fixa produzido em 2019 com fluxo de fase móvel de 0,6 ml.min ⁻¹	71
Figura 28 - Teste de Gradiente utilizando lamivudina pura.	72
Figura 29 - Teste de alteração de Gradiente Tipo 1 utilizando comprimido ADF.....	73

Figura 30 Teste de preparo de amostras de comprimido associação dose fixa utilizando apenas acetonitrila.	74
Figura 31 – Cromatograma obtido através do método escolhido.....	75
Figura 32 - Curva de calibração da Lamivudina (3TC) obtida com análise de variância das amostras estudadas.	77
Figura 33 - Curva de calibração do Zidovudina (AZT) obtida com análise de variância das amostras estudadas.	78
Figura 34 - Curva de calibração do Efavirenz (EFV) obtida com análise de variância das amostras estudadas.	79
Figura 35 - Decaimento de teor dos IFA's em comprimidos ADF ao longo do tempo.	87
Figura 36 - Curva de Teor (%) do comprimido ADF.....	87
Figura 37 - Termograma da lamivudina em diferentes fluxos de aquecimento.	90
Figura 38 - Conversão alfa da lamivudina a uma razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	90
Figura 39 - Curvas de conversão alfa vs Temperatura (K) da lamivudina.	91
Figura 40 - Gráfico das paralelas da lamivudina.	92
Figura 41 - Energia de ativação da degradação da lamivudina.	93
Figura 42 - Termograma de Zidovudina em diferentes fluxos de aquecimento.....	94
Figura 43 - Curvas de conversão alfa vs Temperatura (K) da zidovudina.	94
Figura 44 - Gráfico das paralelas do primeiro evento de degradação da zidovudina.....	95
Figura 45 - Energia de ativação do primeiro evento de degradação da zidovudina.....	95
Figura 46 - Termograma de Efavirenz em diferentes fluxos de aquecimento.....	96
Figura 47 - Conversão alfa vs temperatura em K do efavirenz.	96
Figura 48 - Gráfico das paralelas do Efavirenz.	97
Figura 49 - Energia de ativação do evento de degradação do Efavirenz.....	97
Figura 50 - Termograma do comprimido ADF em diferentes fluxos de aquecimento.	98
Figura 51 - Gráfico de Paralelas do comprimido ADF 2019.	99
Figura 52 - Energia de ativação do evento térmico de degradação do comprimido ADF 2019	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente utilizado como fase móvel (Tipo 1).	49
Tabela 2 - Gradiente utilizado como fase móvel (Tipo 2).....	49
Tabela 3 - Ativos utilizados na produção do comprimido ADF.....	54
Tabela 4 - Resumo de especificações e conformidade da lamivudina lote LT135512018	58
Tabela 5 - Resumo de especificações e conformidade da zidovudina lote LT 037382017.....	63
Tabela 6 - Resumo de especificações e conformidade do Efavirenz lote LT 0482/2015	67
Tabela 7 - Parâmetros de controle de qualidade de comprimidos ADF.....	67
Tabela 8 – Gradiente para MIE de comprimido ADF	68
Tabela 9 - Metodologia proposta por Rosa, 2019	69
Tabela 10 - Parametros utilizados no método otimizado.	75
Tabela 11 - Dados Cromatográficos obtidos com a alteração de método para comprimido associação dose fixa combinada.	75
Tabela 12 - Valores obtidos para cada curva de calibração da Lamivudina contida no comprimido ADF.....	77
Tabela 13 - Valores obtidos para cada curva de calibração da Zidovudina contida no comprimido ADF.....	78
Tabela 14- Valores obtidos para cada curva de calibração do efavirenz contido no comprimido ADF.	79
Tabela 15 - Valores de repetibilidade obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (3TC).	80
Tabela 16 - Valores de precisão intermediária obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (3TC).	81
Tabela 17 - Valores de repetibilidade obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (AZT).....	81
Tabela 18 - Valores de precisão intermediária obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (AZT).....	82
Tabela 19 - Valores de repetibilidade obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (EFV).....	83
Tabela 20 - Valores de precisão intermediária obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (EFV).....	83
Tabela 21 - Dados de Teor e DPR referentes ao doseamento dos IFA's presentes nos comprimidos ADF de 2019 e 2011.....	86

Tabela 22 - Valores de temperatura e perda de massa referentes ao primeiro evento de degradação térmica dos fármacos isolados.....	88
Tabela 23 - Valores de temperatura e perda de massa referentes ao primeiro evento de degradação térmica do comprimido associação dose fixa.....	89
Tabela 24 - Valores de Energia de Ativação (Ea) obtido através do modelo de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) para os insumos ativos isolados.....	98
Tabela 25 - Valores de Energia de Ativação (Ea) obtido através do modelo de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) para o comprimido associação dose fixa.	100
Tabela 26 - Parâmetros termodinâmicos dos farmacos estudas e do comprimido ADF 2019.	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Terapia Antirretroviral de Alta atividade inicial.	28
Quadro 2 Insumos utilizados na elaboração do comprimido ADF.	44
Quadro 3 - Formulação utilizada para preparação dos comprimidos ADF.....	46
Quadro 4 - Quadro de modificações realizadas na otimização da metodologia.....	49
Quadro 5 - Condições de estudo de estabilidade acelerada.....	52
Quadro 6 - Resultados das alterações no método indicativo de estabilidade	76
Quadro 7 - Características analíticas obtidas pelo método proposto para Lamivudina.	77
Quadro 8 - - Características analíticas obtidas pelo método proposto para Zidovudina.	78
Quadro 9 - Características analíticas obtidas pelo método proposto para Efavirenz.	79
Quadro 10 - Parametros avaliados na robustez.	84
Quadro 11 - Valores de desvio padrão relativo obtidos após avaliação de robustez do método.	85
Quadro 12 - Aspecto visual dos comprimidos ao longo das coletas.	85
Quadro 13 - Aspectos visuais e físicos dos comprimidos associação dose fixa submetidos a estudo de estabilidade acelerada.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ADF	Associação Dose Fixa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZT	Zidovudina
ATR	Reflectância total atenuada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio Padrão
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EFV	Efavirenz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MIE	Método Indicativo de Estabilidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
PDA	<i>Photodiode Array</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UHPLC	<i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>
UPLC	<i>Ultra-performance liquid chromatography</i>
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
Vis	Visível
TG	Termogravimetria
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	18
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo geral.....	18
1.2.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	VIRUS DA IMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)	20
2.1.1	Breve histórico e evolução da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ..	20
2.1.2	Ciclo viral	23
2.2	TRATAMENTO: TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV).....	25
2.2.1	Inibidores de transcriptase reversa análogos do nucleosídeo (ITRN).....	26
2.2.2	Inibidores de transcriptase reversa não-análogos do nucleosídeo (ITRNN) 26	
2.2.3	Inibidores de Protease (IP)	27
2.2.4	Inibidores de Fusão (IF).....	27
2.2.5	Antagonistas CCR5	27
2.2.6	Inibidores de integrase (II)	27
2.2.7	Plano Terapêutico atual	28
2.3	ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA	30
2.4	FÁRMACOS DE ESCOLHIDOS PARA A ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA	31
2.4.1	Lamivudina	31
2.4.2	Zidovudina	32
2.4.3	Efavirenz	33
2.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA.....	34
2.5.1	Análise Térmica	34
2.5.2	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 35	
2.5.3	Espectrofotometria na absorção do Ultravioleta.....	35
2.6	ESTUDOS DE ESTABILIDADE	36
2.6.1	Estudo térmico de estabilidade.....	37
2.6.1.1	Método Flynn, Wall e Ozawa (FWO)	39
2.6.2	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).....	40
2.7	MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE).....	41
2.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	42
2.8.1	Exatidão.....	42
2.8.2	Precisão (Reprodutibilidade).....	43

2.8.3	Seletividade	43
2.8.4	Limite de detecção e quantificação	43
2.8.5	Linearidade	43
2.8.6	Robustez	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	MATERIAL	44
3.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS INSUMOS ATIVOS	44
3.2.1	Análise Térmica	44
3.2.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	45
3.2.3	Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta	45
3.3	PRODUÇÃO DOS COMPRIMIDOS	45
3.4	CONTROLE DE QUALIDADE DOS COMPRIMIDOS ADF	46
3.4.1	Determinação de peso	47
3.4.2	Teste de Dureza	47
3.4.3	Teste de Friabilidade	47
3.4.4	Teste de desintegração	48
3.5	OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE EM UPLC	48
3.5.1	Preparo de amostras	50
3.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	50
3.6.1	Exatidão	50
3.6.2	Precisão (Reprodutibilidade)	50
3.6.3	Seletividade	51
3.6.4	Limite de detecção e quantificação	51
3.6.5	Linearidade	51
3.6.6	Robustez	51
3.7	ESTUDO DE ESTABILIDADE	51
3.8	DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE POR ESTUDO TÉRMICO	52
3.8.1	Termogravimetria não isotérmica – Degradação Térmica	52
3.8.2	Termogravimetria Isotérmica	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	CONTROLE DE QUALIDADE DOS INSUMOS ATIVOS	54
4.1.1	Lamivudina	54
4.1.1.1	Análise Térmica	55
4.1.1.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	56
4.1.1.3	Espectrofotometria de absorção na Região Ultravioleta	57
4.1.1.4	Resumo de especificações	58

4.1.2	Zidovudina	59
4.1.2.1	Análise Térmica	59
4.1.2.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	61
4.1.2.3	Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	62
4.1.2.4	Resumo de especificações.....	63
4.1.3	Efavirenz	63
4.1.3.1	Análise Térmica	64
4.1.3.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	65
4.1.3.3	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta.....	66
4.1.3.4	Resumo de especificações.....	67
4.2	PRODUÇÃO E CONTROLE DOS COMPRIMIDOS	67
4.3	OTIMIZAÇÃO DE MIE	68
4.4	VALIDAÇÃO DE MIE	76
4.4.1	Linearidade	76
4.4.1.1	Lamivudina	77
4.4.1.2	Zidovudina	78
4.4.1.3	Efavirenz	79
4.4.2	Precisão e Exatidão.....	79
4.4.2.1	Lamivudina	80
4.4.2.2	Zidovudina	81
4.4.2.3	Efavirenz	83
4.4.3	Robustez	84
4.5	ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DE COMPRIMIDOS ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA.....	85
4.5.1	Avaliação das características organolépticas e físicas dos comprimidos ADF 85	
4.5.2	Cálculo de teor dos comprimidos associação dose fixa de comprimidos submetidos ao estudo de estabilidade acelerada.....	86
4.6	ESTUDO TÉRMICO DE ESTABILIDADE	88
4.6.1	Curvas de termogravimetria não-isotérmica dos insumos ativos isolados..	89
4.6.1.1	Lamivudina	89
4.6.1.2	Zidovudina	94
4.6.1.3	Efavirenz	96
4.6.1.4	Comprimido Associação Dose Fixa 2019.....	98
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
5.1	CONCLUSÃO	101

REFERENCIAS102

1 INTRODUÇÃO

Mesmo com o grande desenvolvimento científico e tecnológico aplicado à saúde experimentado pela humanidade nas últimas décadas, as infecções permanecem sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade da população. As infecções virais protagonizam nesse quadro, composto por diversos patógenos que mesmo hoje em dia amedrontam a sociedade. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a consequente síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) são um exemplo de que a constante busca por novos insumos farmacêuticos ativos (IFA) e associações destes são imprescindíveis para a manutenção da sociedade (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; GHOSN et al., 2018a; UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2017; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2016).

A AIDS tem como principal sintoma o aparecimento de doenças por infecções oportunistas e neoplasias que, devido à imunodepressão do indivíduo, encontram uma conjuntura favorável para seu desenvolvimento. Sem o tratamento, o paciente fica vulnerável a diversas enfermidades que podem levá-lo a óbito. Estima-se que haja 36 milhões de mortes relacionadas ao HIV no mundo desde o início da epidemia na década de 80. Dados de 2016 mostram que existem aproximadamente 36,7 milhões de infectados no mundo sendo que quase 50% desses recebem o tratamento (SANKOH et al., 2014; UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2017). No Brasil, a estimativa é de que 830 mil vivam com HIV/AIDS, com 55% em tratamento com antirretrovirais, quantidade proporcionalmente maior que a média mundial (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2017). Desde 1996, o país se destaca nesse cenário, por ter sido o primeiro país em desenvolvimento a adotar políticas públicas de prevenção e combate ao HIV/AIDS, com diagnóstico e tratamento gratuitos (RODRIGUES; SOLER, 2009).

O tratamento farmacológico consiste no uso de terapia antirretroviral de alta atividade que tem como objetivo a diminuição da carga viral e baseia-se na combinação de três fármacos, sendo dois inibidores de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, associados a uma outra classe de antirretrovirais (inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo, inibidor de protease com reforço de ritonavir ou inibidor de integrase). Devido à complexidade do regime terapêutico ser um dos grandes fatores de comprometimento da adesão do paciente, novas formas farmacêuticas têm sido desenvolvidas em regime de associação dose fixa (ADF) (ADAMSON; FREED, 2010).

Segundo o protocolo proposto pelo Ministério da Saúde (MS) em suas diretrizes de 2013, a primeira linha de tratamento é composta por uma associação envolvendo lamivudina, tenofovir e efavirenz. Esta associação apresenta um perfil de toxicidade favorável quando comparada a zidovudina. A diretriz ainda coloca como terapia de segunda linha a terapia a associação, Zidovudina, lamivudina e efavirenz (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2013).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Com objetivo de simplificar o regime terapêutico, um comprimido com a combinação de três destes fármacos foi desenvolvido em 2012, no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em parceria com o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). Entretanto, antes que a produção deste comprimido possa ser disponibilizada para alguma indústria farmacêutica vinculada ao Ministério da Saúde, faz-se necessário a realização dos testes de estabilidade preconizados pela ANVISA (FONTES, 2012; SOARES, 2011). O presente estudo propôs a produção de novo lote de comprimidos em associação dose fixa, otimização de método indicativo de estabilidade, validação deste método indicativo de estabilidade e realização de estudo de estabilidade térmica dos comprimidos produzidos com cálculo matemático da predição de tempo de prateleira deste.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Avaliar a estabilidade de comprimidos associação dose fixa para o tratamento de HIV.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e realizar o controle de qualidade dos comprimidos ADF contendo AZT, 3TC e EFV;
- Otimização e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade de comprimidos ADF (AZT, 3TC e EFV);

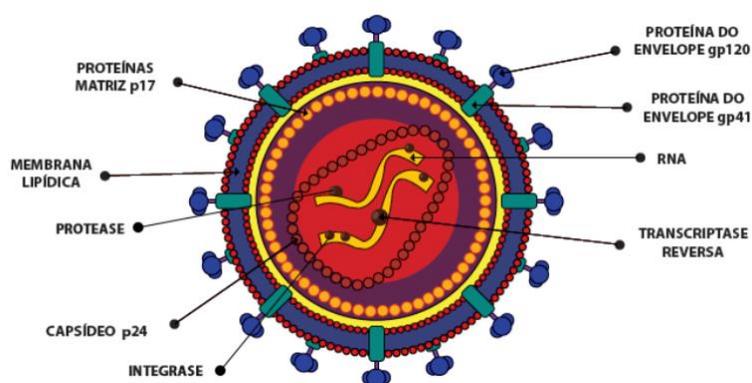
- Executar estudos de estabilidade acelerada de comprimidos ADF contendo os fármacos AZT, 3TC, EFV;
- Realizar a predição do prazo de validade por estudo térmico de comprimido ADF (AZT, 3TC e EFV).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VIRUS DA IMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) se caracteriza pela ocorrência de infecções por micro-organismos oportunistas e neoplasias, devido à imunodepressão causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (Figura1). Sem o tratamento adequado, o paciente facilmente sucumbe em decorrência das várias enfermidades que adquire (BHATTACHARYA, 2014).

Figura 1 - Estrutura do Vírus HIV.



Fonte: Telelab, Diagnóstico do HIV, 2014

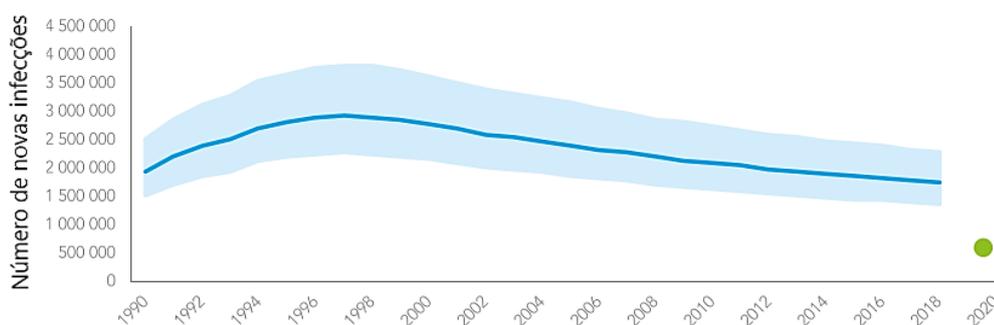
2.1.1 Breve histórico e evolução da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Em 2016, existiam 36,7 milhões de infectados no mundo, mas apenas 49,6% recebiam tratamento (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2017). No Brasil, a estimativa é de que 830 mil vivam com HIV, sendo que 64% estavam em tratamento com antirretrovirais, quantidade maior que a média mundial (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2017). Nesse cenário, o Brasil se destaca desde 1996, por ter sido o primeiro país em desenvolvimento a adotar políticas públicas de prevenção e combate ao HIV/AIDS, a diagnosticar e distribuir medicamentos gratuitamente (GALINDO BEDOR, 2011; MBUAGBAW et al., 2016; RODRIGUES; SOLER, 2009).

Segundo relatórios mais recentes da UNAIDS, cerca de 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com a síndrome até o final de 2018, um incremento de mais de 1 milhão de pessoas quando comparado com o último estudo (Figura 2). Na América Latina estima-se que

100.000 pessoas adquiriram HIV, um aumento de 7% comparado aos estudos de 2010. A elevação foi induzida pelos aumentos que ocorreram no Chile (34%), Bolívia (22%) e Brasil (21%). Nos quais 40% das novas infecções foram entre homens gays ou homens que tiveram sexo com outro homem. Entretanto, o balanço anual de mortes por doenças associadas a AIDS na América Latina teve um declínio de 14% entre 2010 e 2018, estimando-se que 35.000 pessoas tenham perdido a vida devido a doenças associadas com a AIDS (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2019).

Figura 2 - Número de previsto de novas infecções ao longo dos anos.



Fonte: UNAIDS, 2019

Proporcionalmente, especula-se que dentre os 1,9 milhões de pessoas que vivem com HIV, 80% sabem seu estado. Quando comparado com os últimos resultados de 2017, um aumento de 10% é observado. Aumento similar foi observado no percentual de pessoas com HIV que tem acesso a terapia antirretroviral e entre aqueles que tem o vírus suprimido. Entretanto, nenhum país da América Latina alcançou os três alvos do 90-90-90, a supressão viral no Brasil alcançou em 2018 níveis de 94% da população infectada. As metas propostas pela ONU foram ambiciosas, mas eram alcançáveis. Para o ano de 2020 as metas eram que 90% das pessoas vivendo com o HIV saberiam que têm o vírus, 90% das pessoas diagnosticadas com o HIV estariam recebendo a terapia antirretroviral e 90% das pessoas recebendo a terapia estariam em supressão viral (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2019). A nível mundial, o total de pessoas vivendo com HIV que estavam diagnosticadas e conheciam seu estado sorológico era de 79%, e 78% tinham acesso ao tratamento. Em média no mundo, 86% das pessoas com acesso ao tratamento estavam com carga viral suprimida ou indetectável (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2019).

Figura 3 - Prevenção Combinada



Fonte: Ministério da Saúde (2018)

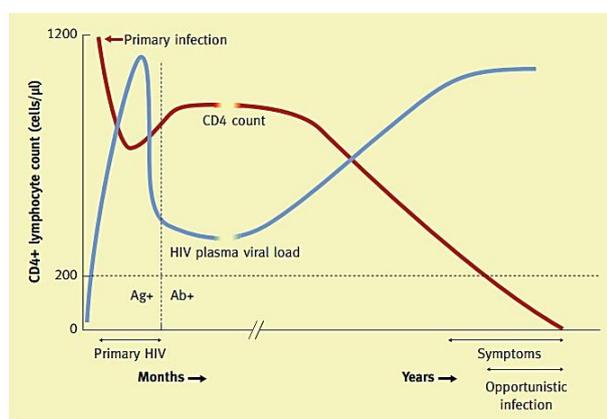
O HIV é um lentivirus, que faz parte da família Retroviridae, transmissível por sangue ou por fluidos corporais. Diversos fatores convergem para o grande risco desse vírus, a alta e contínua replicação e a destruição das células chave do sistema imune, os linfócitos CD4. Com o tempo, esse declínio no número de linfócitos leva a infecções oportunistas que definem a AIDS (MELHUIH; LEWTHWAITE, 2018). Pode-se observar que o HIV passou por três grandes revoluções no campo terapêutico desde o seu isolamento em 1983. A primeira grande revolução foi em 1996 com a introdução da terapia HAART, terapia antirretroviral, que é utilizada até hoje. A segunda revolução foi a inclusão do PEP e PrEP, profilaxia pós exposição e pré-exposição, a partir de estudos observacionais. A última e mais recente revolução é a descoberta do benefício da terapia combinada em um tratamento precoce (GHOSN et al., 2018a).

O HIV foi isolado pela sua primeira vez em 1983 por Luc Montagnier e seu trabalho foi continuado pelo laboratório de Robert Gallo e só foi aceito como agente causador da AIDS em 1984. Diversos fatores incluindo doenças fúngicas e autoimunes ou fatores químicos eram consideradas possíveis causas da AIDS, mas em 1970 Temin e Baltimore descobriram a enzima transcriptase reversa, presente em todos os retrovírus que pavimentaram o caminho para evidencia a verdadeira causa da AIDS (MELHUIH; LEWTHWAITE, 2018). Por volta de 1984, com o sequenciamento do genoma, o entendimento da patogênese, teste de sangue e o desenvolvimento da zidovudina levaram a uma expectativa de que a AIDS seria erradicada (MELHUIH; LEWTHWAITE, 2018). Não obstante por volta dos anos 90 ficou claro que se uma vacina não fosse desenvolvida o HIV se tornaria uma infecção perene na espécie humana. O uso de diversas rotinas terapêuticas estendeu de forma significativa a instalação sintomática

da AIDS, o que, no entanto, não representa a cura definitiva da doença. Até que uma vacina seja descoberta a produção de fármacos que combatam o HIV, que possam inibir de forma significativa a replicação e reduzam a carga viral é vital para retardar a taxa de mortalidade dessa doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016).

A infecção pelo HIV, mostra um grande espectro de apresentações clínicas, de sua fase aguda até a fase avançada da doença. Em indivíduos não tratados, estima-se que o tempo médio entre o contágio e o aparecimento da doença esteja em torno de dez anos, como mostra a Figura 5 (MELHUIISH; LEWTHWAITE, 2018).

Figura 4 - Evolução da carga viral no hospedeiro.



Fonte: Lewthwaite, 2018.

Assim como outras infecções virais agudas, o HIV é acompanhado por um conjunto de manifestações clínicas, denominado Síndrome Retroviral aguda (SRA). Os principais achados clínicos de SRA incluem febre, sudorese e linfadenomegalia. A SRA é autolimitada e a maior parte dos sintomas aparecem em três a quatro semanas (PAREDES; CLOTET, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016). Na fase de latência clínica, o exame físico costuma ser normal, exceto pela linfadenopatia, mas os exames laboratoriais podem sofrer por alterações, sendo um achado comum a plaquetopenia, e anemia (normocrômica e normocítica) e leucopenia leves (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; MICROMEDEX, 2018).

2.1.2 Ciclo viral

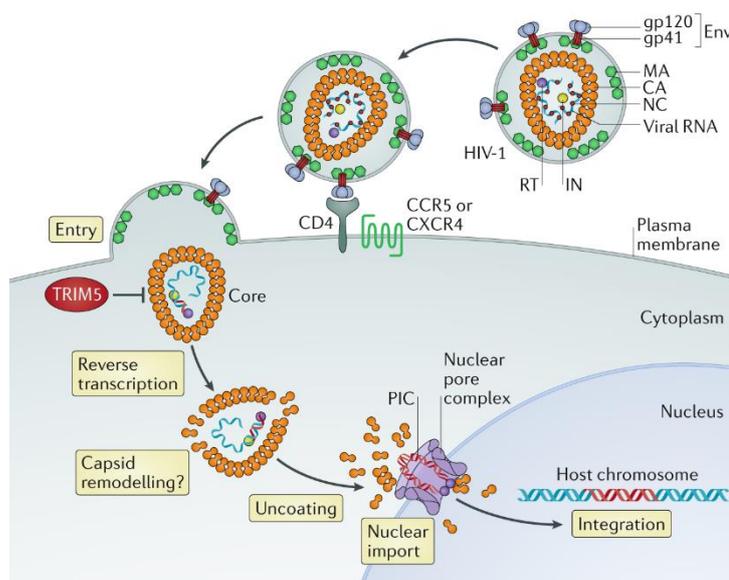
Dois subtipos do HIV foram sequenciados, o HIV-1, cujo reservatório primata é o chimpanzé, e o HIV-2 encontrado em macacos *Cercocebus*. O HIV-1 é difundido globalmente, e se não tratado quase sempre se desenvolve para AIDS. Tem 4 divisões genéticas, M, N, O e P. O grupo M é responsável pela pandemia e foi mais dividido em

classes e subtipos. Cada subtipo é correlacionado a diferentes zonas geográficas por exemplo o subtipo B predomina nas américas, Austrália e oeste europeu, enquanto o subtipo C, responsável por 50% das infecções por HIV, predominando na África do sul e Índia (GHOSN et al., 2018b; MICROMEDEX, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016; ZHANG; WANG, 2017).

O HIV causa profundo colapso do sistema imune do hospedeiro. O ciclo da doença é influenciado pelos sítios celulares anatômicos da replicação do HIV (Figura 5), pela habilidade do vírus em estabelecer um reservatório no hospedeiro e pela eficácia da terapia antirretroviral em diminuir a carga viral (HALLENGÄRD et al., 2011). O vírus se estabelece no corpo como parasitas intracelulares e a relação hospedeiro-vírus é particularmente complexa e não tão bem estabelecida. O HIV tem a capacidade de se direcionar, infectar e incapacitar as células que fazem a papel principal na defesa contra microrganismos, os linfócitos TCD₄⁺ que tem seus níveis diminuídos por diferentes fatores independente do efeito citopático do HIV. A destruição das células TCD₄⁺ está relacionada a síndrome posteriormente instalada (GHOSN et al., 2018a).

Dada a infecção, diversos eventos ocorrem e a partir desses eventos a terapia é direcionada. Inicialmente, a partícula viral (vírion) se liga as células do hospedeiro. A ligação ocorre quando uma proteína da superfície viral se anexa ao receptor e ao co-receptor da célula TCD₄⁺ do hospedeiro. As proteínas transmembrana se encarregam de mediar a fusão da membrana viral com a membrana celular humana, enquanto a ligação com os receptores facilita a transferência do RNA viral para o citoplasma da célula humana. A transcriptase reversa viral produz o DNA viral de fita dupla em 3 passos: o genoma do RNA viral é copiado dentro do DNA, e o DNA híbrido é clivado e usado para síntese da DNA pro-viral, este é transportado para dentro do núcleo celular for facilitação da integrase é então incorporado ao DNA humano. O genoma integrado do HIV então usa a maquinaria celular para a produção de novos RNAm, que então produz as várias proteínas virais entre elas o Rev (regulador da expressão de vírions) (GHOSN et al., 2018b; MELHUISH; LEWTHWAITE, 2018).

Figura 5 - Ciclo de infecção do HIV a uma célula hospedeira.



Fonte: Micromedex (2019)

2.2 TRATAMENTO: TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)

A infecção por HIV não é considerada uma condição curável, pois a erradicação ainda não foi alcançada com a terapia antirretroviral (TARV) disponível. O tratamento é direcionado para a diminuição do impacto da infecção do HIV na morbimortalidade, aumentando qualidade de vida, prevenindo a transmissão do vírus e mantendo a função imune por uma supressão efetiva da carga viral (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2016).

Uma vez iniciado, o tratamento geralmente é contínuo. A decisão de iniciar a terapia é baseada nos níveis de contagem de TCD_4^+ , da presença ou ausência de AIDS, sintoma severos de infecção por HIV e da carga viral. A iniciação da TARV é fortemente recomendada a todos os pacientes infectados com o HIV que tenham contagem de TCD_4^+ inferior a 500 células/mm^3 . Evidências sugerem que a inflamação crônica resultante da presença do HIV aumenta o risco de complicações a longo prazo e que a utilização do TARV reduz taxas de transmissão de HIV. Adicionalmente, a exposição a alta carga viral e à replicação viral foi identificada como fatores de risco para morte (BRASIL, 2014; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019).

A introdução da terapia antirretroviral teve um profundo efeito na clínica do HIV/AIDS, transformou uma condição definitivamente mortal em uma que pode, em grande maioria dos casos, se tornar crônica e estável (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018;

MICROMEDEX, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Existem seis possíveis mecanismos de ação explorados pelo TARV geralmente utilizados:

- Inibidores de transcriptase reversa análogos do nucleosídeo (ITRN)
- Inibidores de transcriptase reversa não-análogos do nucleosídeo (ITRNN)
- Inibidores de Protease (IP)
- Inibidores de Fusão (IF)
- Antagonistas CCR5
- Inibidores de integrase (II)

2.2.1 Inibidores de transcriptase reversa análogos do nucleosídeo (ITRN)

Os ITRN inibem a síntese do DNA pela transcriptase reversa, que é uma enzima viral que copia o RNA viral no DNA da célula infectada do hospedeiro. Eles possuem estrutura similar aos componentes naturais do DNA, incluindo os nucleosídeos purínicos adenosina e guanósina e as pirimidinas timidina e citosina. A transcriptase reversa é incapaz de diferenciar o ITRN fosforilado de seus homólogos e tenta utilizar as ITRN na síntese do DNA viral (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; MICROMEDEX, 2018).

Alguns exemplos de Inibidores de transcriptase reversa análogo do nucleosídeo são:

- Abacavir
- Emtricitabina
- Lamivudina
- Estavudina
- Tenofovir
- Zidovudina

2.2.2 Inibidores de transcriptase reversa não-análogos do nucleosídeo (ITRNN)

Os Inibidores de transcriptase reversa não análogos do nucleosídeo também previnem a síntese de DNA viral, mas seu mecanismo de ação é se ligar a transcriptase reversa de uma maneira que a atividade enzimática é inibida (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; MICROMEDEX, 2018). Como exemplos temos:

- Efavirenz
- Nevirapina

- Rilpirivina

2.2.3 Inibidores de Protease (IP)

Os inibidores de protease se vinculam ao sítio ativo da protease viral, e essa ação inibe o vírus de processar polipeptídios virais em proteínas funcionais. A inibição de protease previne o desenvolvimento de partículas virais maduras capazes de infectar novas células. Os agentes inibidores de protease incluem (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018):

- Atazanavir
- Inidinavir
- Ritonavir

2.2.4 Inibidores de Fusão (IF)

Inibidores de fusão são capazes de prevenir a penetração do vírus nas células alvo. Eles se ligam no envelope proteico gp41 do HIV e bloqueia a interação entre as regiões do gp41. Isso permite que os IF interfiram no dobramento do envelope proteico que é requerido para a fusão viral com a membrana da célula alvo. O único inibidor de fusão aprovado é o Enfuvirtide. (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019)

2.2.5 Antagonistas CCR5

Inibidores do Receptor CCR5 são uma nova classe de medicamentos que tem como mecanismo o impedimento da entrada do HIV nas células de defesa do organismo hospedeiro. A ação se baseia no bloqueio dos receptores CCR5, proteínas que estão localizadas na superfície dos macrófagos, impedindo a infecção dos mesmos pelo vírus (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019).

2.2.6 Inibidores de integrase (II)

Inibidores de integrase agem na interação do vírus HIV com os correceptores presentes na superfície das células dos hospedeiros, na integração do DNA pro-viral nos cromossomos do hospedeiro, e interrompe os passos de maturação do vírion. Em suma os inibidores de integrase

previnem a incorporação do DNA viral em fita dupla no DNA alvo no núcleo da célula. São moléculas relativamente novas e as que estão em uso no Brasil são (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2013):

- Dolutegravir
- Raltegravir

2.2.7 Plano Terapêutico atual

A terapia inicial deve sempre incluir combinações de três antirretrovirais, sendo dois ITRN associados a uma outra classe de antirretrovirais (ITRNN, IP ou II) conforme descrito no quadro 1. No ano de 2018 as novas diretrizes colocaram como TARV inicial preferencial a associação de lamivudina (3TC) e tenofovir, associados ao inibidor de integrase, dolutegravir. Exceção a esse esquema deve ser observada para os casos de coinfeção com tuberculose, mulheres vivendo com HIV e gestantes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Quadro 1 Terapia Antirretroviral de Alta atividade inicial.

Situação	TARV	Dose Diária
Adultos em início de tratamento	Tenofovir / Lamivudina + Dolutegravir	(300mg/300mg) + 50 mg 1x/dia
Coinfeção TB-HIV	Tenofovir / 3TC / EFV	(300mg/300mg/600mg) – ADF 1x/dia

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2018)

Pacientes coinfectados Tuberculose-HIV (TB-HIV) que iniciaram o tratamento com esquema contendo RAL ou EFV após o término do tratamento da tuberculose, podem realizar o *switch* para o dolutegravir, seguindo recomendações gerais de esquema inicial preferencial para adultos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; CHOI; BRITIGAN; NARAYANASAMY, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016).

Diversas associações são utilizadas na diretriz, entre elas podemos citar a associação já utilizada Zidovudina + lamivudina (AZT/3TC), essa associação é uma das mais estudadas em ensaios clínicos randomizados, apresenta eficácia e segurança equivalentes a outras combinações de dois ITRN, sendo habitualmente bem tolerada. É disponível em coformulação. Entretanto tem como efeitos adversos acidose láctica, hiperlactatemia, toxicidade mitocondrial e

lipoatrofia responsável pelo comprometimento da adesão (BRODER, 2010; CORDEIRO et al., 2011; ENGLAND, 2003; GALLANT et al., 2006).

Os esquemas estruturados com ITRNN e 2 ITRN, com uso do EFV, possuem melhor perfil de toxicidade, maior comodidade posológica, maiores taxas de adesão ao tratamento em longo prazo, elevada potência de inibição da replicação viral, maior efetividade e maior durabilidade da supressão viral quando comparados a esquemas estruturados com inibidores de protease (BRODER, 2010; JOCHMANS, 2008; MENÉNDEZ-ARIAS; BERKHOUT, 2008; MICROMEDEX, 2018).

Outros tipos de esquemas terapêuticos também são propostos na diretriz brasileira entre esses temos a Profilaxia pós-exposição (PEP) e a Profilaxia pré-exposição (PrEP). A profilaxia pós-exposição de risco ou PEP, é uma medida de prevenção de urgência, devido a exposição ao vírus. A PEP consiste no uso de medicamentos para redução de risco de adquirir doenças sexualmente transmissíveis e deve ser utilizada sempre após alguma situação em que há o risco de contágio, situações de violência sexual, relação sexual sem uso de preservativo ou com rompimento deste e acidentes ocupacionais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018). A PEP utiliza medicamentos antirretrovirais para redução do risco a infecção e por se tratar de urgência médica deve ser iniciada o mais rápido possível preferencialmente nas 2 horas seguidas da exposição e em até 72 horas, o tratamento tem duração de 28 dias e serve não apenas para prevenção de infecção por HIV mas como também para prevenção de hepatites virais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018).

A profilaxia pré-exposição de risco à infecção pelo HIV consiste no uso preventivo por grupos de risco de medicamentos antirretrovirais antes da exposição sexual ao vírus, tem como objetivo a redução da probabilidade de infecção pelo HIV e promoção de uma vida sexual mais saudável (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018). Entre o grupo de risco podemos destacar, profissionais do sexo e casais sorodiferentes (onde um dos envolvidos possui o vírus) que praticam relações sexuais sem o uso de preservativos ou que tenham utilizado a PEP repetidamente (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018).

A associação em dose fixa combinada contemplando os medicamentos AZT+3TC+EFV é colocada como primeira opção de terapia alternativa pela OMS, podendo ser usada nos casos em que a terapia de primeira linha não está disponível, não é eficaz ou em casos de coinfeção com tuberculose (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018).

2.3 ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA

A combinação de produtos, também conhecida como associação dose fixa ou dose fixa combinada, são combinações de dois ou mais ativos em uma única dosagem. O *Food Drug Administration* (FDA) define a associação dose fixa (ADF) como um produto composto por qualquer combinação de uma IFA com outro IFA ou com um produto biológico. É bem difundido que a maioria dos IFA devem ser formulados como produtos simples, entretanto a combinação de dois ou mais IFA's com o objetivo de atingir certo sinergismo no efeito benéfico já é algo bastante praticado. A dose fixa combinada é aceitável apenas quando a dose de cada ingrediente atende aos requisitos de um grupo populacional definido e quando a combinação comprovadamente tem vantagem, frente aos insumos isolados, em efeito terapêutico, segurança e conformidade (FDA, 2006; MCGETTIGAN et al., 2015; OO; SY, 2018).

Segundo o guia para registro de novas associações em dose fixa lançado pela vigilância sanitária brasileira, associação em dose fixa nada mais é do que uma combinação de dois ou mais princípios ativos em uma razão fixa de dose em uma mesma forma farmacêutica finalizada. Para o registro são aceitos no máximo 3 princípios ativos na mesma formulação oral, ou quatro, caso um deles seja a cafeína (ANVISA, 2010; ZHANG, 2018).

Os dados de eficácia e segurança de uma associação podem ser obtidos a partir de estudos clínicos realizados com medicamentos contendo os ativos isolados administrados concomitantemente ou com a ADF desses princípios ativos. O suposto benefício de uma ADF deve ser confirmado por meio de estudos clínicos. E seus riscos e benefícios não podem ser baseado apenas em conjecturas ou extrapolações. Toda a associação em dose fixa deve apresentar uma justificativa de racionalidade, incluindo considerações acerca das questões farmacocinéticas, farmacodinâmicas e terapêuticas do uso concomitante dos princípios ativos (BARTLETT; PRATT; ROUGHEAD, 2018; PAN; CHERNEW; FENDRICK, 2008).

As questões farmacocinéticas devem ser descritas conforme o tipo de associação. Quando uma das justificativas de racionalidade de associação é a ocorrência de interação farmacocinética. Como nos casos em que um ativo aumenta a biodisponibilidade do outro, essa interação deve estar bem descrita e os possíveis riscos e benefícios dessa interação devem ser adequadamente demonstrados (ANVISA, 2010). Em resumo a racionalidade dos ADF devem ser baseadas em alguns aspectos dentre eles podemos destacar:

- Os fármacos em combinação devem seguir diferentes mecanismos
- A farmacocinética não deve ser muito divergente

- A combinação não deve incrementar a toxicidade dos insumos.

A relação nacional de medicamentos dispõe em sua lista algumas combinações em dose fixa como:

- Sulfametoxazol + Trimetropima
- Rifampicina + Isoniazida + Pirazinamida
- Zidovudina + Lamivudina

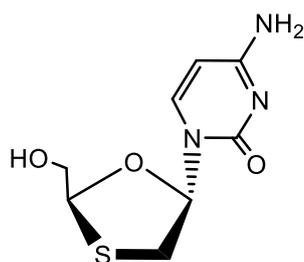
Dentre os benefícios das ADF's podemos citar em um ponto de vista terapêutico, o incremento da adesão dos pacientes ao tratamento visto que o número de comprimido é diminuído. A prescrição também é simplificada visto que as doses já estão ajustadas, diminuindo riscos de erro médico. Melhor estocagem, logística e distribuição visto que em lugar de termos 3 medicamentos separados teremos apenas 1 produto. Dentre os benefícios econômicos as ADF por si só já é uma redução dos custos de produção, manejo entrega e distribuição e diminuição dos custos de manutenção e de inserção de registros nas autoridades (FDA, 2006; GAUTAM; SAHA, 2008; MCGETTIGAN et al., 2015).

2.4 FÁRMACOS DE ESCOLHIDOS PARA A ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA

2.4.1 Lamivudina

Lamivudina, (-)-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (figura 6), chamada de 3TC é o primeiro ITRN utilizado no estudo, também é utilizado no tratamento crônico de hepatite B, com efeito sobre as duas formas do HIV, o HIV-1 e HIV-2, está entre a lista de drogas essenciais da OMS (INDURI et al., 2011).

Figura 6 - Fórmula estrutural da Lamivudina



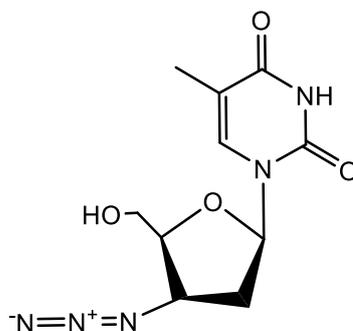
Fonte: Autoria Própria

A lamivudina se apresenta na forma de pó cristalino branco com massa molecular de 229,256 mg/ mol e fórmula molecular $C_8H_{11}N_3O_3S$, e com ponto de fusão segundo literatura em faixa de $176^{\circ}C - 178^{\circ}C$ (ANVISA, 2019a; CORDEIRO et al., 2011; FERREIRA et al., 2017). A Lamivudina é um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, sendo o único fármaco aprovado pelo FDA com atividade comprovada contra o HIV-1, HIV-2 e hepatite B (INDURI et al., 2011)

2.4.2 Zidovudina

AZT, 3'-azido-3'-deoxythymidine (figura 7), também chamada de zidovudina, é uma dos ativos utilizados no estudo, pertence ao grupo das ITRNs, que torna deficiente a cadeia de DNA que o vírus cria dentro das células de defesa do organismo. Foi o primeiro desses IFA's a ser aprovado pelo FDA em 1987 com o objetivo de aumentar a expectativa de vida de pacientes com AIDS (ANVISA, 2019a; ARAÚJO, 2003; SANTOS; CARVALHO; PINA, 2008).

Figura 7 - Fórmula estrutural da Zidovudina



Fonte Autoria Própria (2020)

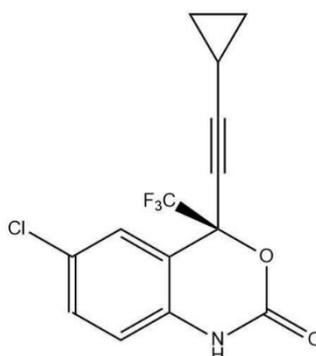
Apesar de ser aprovada como monoterapia, a AZT é bastante usada em combinação na terapia antirretroviral e foi aprovada na prevenção de transmissão materno-fetal. Os primeiros agentes ainda desempenham um papel importante como ingredientes de combinações de terapia antirretroviral de alta atividade. Ativos pioneiros, como a zidovudina, quebraram a barreira e iluminaram o caminho para o desenvolvimento de outros IFA's. No ano de 1984 a linha de frente de combate ao HIV era a proteção das células não infectadas bloqueando a infecção viral, com esse impedimento era de se esperar uma recuperação da função imune ou

pelo menos evitar a crescente queda dos níveis de TCD_4^+ (SANTOS; CARVALHO; PINA, 2008; SHAMSIPUR et al., 2013).

2.4.3 Efavirenz

O terceiro ativo é o EFV, (S)-6-chloro-4-cyclopropylethynyl-4-trifluoromethyl-1,4-dihydro-benzo[d][1,3]oxazin-2-one (figura 8), o efavirenz, na associação é do grupo dos ITRNNs. O desenvolvimento do efavirenz se deu por pesquisas pela empresa DuPont Merck Pharmaceutical, sob os cuidados da equipe de Lilian RADESCA no ano de 1996, sendo seus cristais patenteados (RADESCA et al., 2004) Aprovado em 1998 pelo FDA, teve sua licença compulsória obtida pelo governo brasileiro em 2007 o que permitiu à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) produzir este importante antirretroviral (HIV/AIDS: PRODUÇÃO DO EFAVIRENZ COMPLETA 11 ANOS, [s.d.]; SOUZA, 2015). Apesar de estar saindo da primeira linha de tratamento para a doença no Brasil, atualmente, o efavirenz é usado por 55,4 mil pacientes que vivem com HIV/Aids no país (ADKINS; NOBLE, 1998; RODRIGUES; SOLER, 2009)

Figura 8 - Estrutura molecular do Efavirenz.



Fonte: Autoria própria (2020)

O efavirenz é encontrado na forma de pó branco e possui peso molecular de 315,675 mg/ mol, fórmula molecular $C_{14}H_9ClF_3NO_2$, possui um ponto de fusão na faixa de 139°C a 141°C, tem baixa solubilidade em água, se tornando um fármaco bastante complicado de ser trabalhado (RADESCA et al., 2004). O EFV é um inibidor da transcriptase reversa não nucleotídeo e teve seu uso aprovado em 1998 pela vigilância sanitária americana para o tratamento de pacientes adultos infectados com o HIV. Com o passar dos anos foi

reconhecido como uma das primeiras escolhas na terapia antirretroviral de alta atividade (HAART, tradução livre) utilizado na primeira linha da terapia. A escolha se deu visto resultados de eficácia em estudos clínicos randomizados e de coorte (FANDARUFF et al., 2015; MARTINEZ-PICADO; MARTÍNEZ, 2008).

O efavirenz apresenta posologia confortável de um comprimido ao dia, promove supressão da replicação viral por longo prazo e possui perfil de toxicidade favorável. As principais desvantagens do efavirenz são a prevalência de resistência primária em pacientes iniciais ao tratamento e a baixa barreira genética para o desenvolvimento de resistência, essa resistência completa a todos os ITRNN pode ocorrer com apenas uma única mutação viral para a classe (BASTOS et al., 2016; COSTA et al., 2015; PAGE; TAYLOR, 2018).

2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA

A caracterização físico-química dos insumos pode ser realizada através de diversas técnicas analíticas, que no geral são especificadas na monografia de cada fármaco disponível na farmacopeia. Dentre elas podemos citar a análise térmica por meio de varredura diferencial de calorimetria e técnicas espectrométricas como o ultravioleta e a espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (ANVISA, 2019b).

A identificação de diversas substâncias de interesse farmacêutico pode ser feita utilizando regiões do ultravioleta, visível, infravermelho médio e próximo. De maneira geral, a espectrofotometria nas regiões UV/Vis requer soluções na ordem dos 10 mg/mL, enquanto que as soluções utilizadas no MIR ou NIR são necessárias concentrações na ordem de 100 mg/mL no caso do infravermelho médio as medidas realizadas utilizando os modos de reflexão (difusa e total atenuada) fornecem informação espectral equivalente àquela obtida pelo modo de transmissão (ANVISA, 2019b; BARAKH ALI et al., 2019; DA TRINDADE; KOGAWA; SALGADO, 2018; SOUZA, 2015).

2.5.1 Análise Térmica

As técnicas de análise térmica, como o DSC e a Termogravimetria (TG) são técnicas rápidas que podem ser aplicadas sem tratamento prévio das amostras. Elas são utilizadas na rotina em insumos e no estudo de polimorfismos. Na pesquisa farmacêutica, é uma importante ferramenta para identificação e teste de pureza de ativos e competente em elucidar incompatibilidades e seus efeitos na estabilidade térmica. É um teste rápido e prático,

entretanto causa destruição da amostra visto que pode atingir temperaturas maiores que 600°C (DE SOUZA et al., 2003; SOUZA, 2008a; SOVIZI; HOSSEINI, 2013).

2.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho próximo é a análise da luz infravermelha interagindo com uma molécula. Pode ser analisada de três maneiras, medindo a absorção, emissão e reflexão. O principal uso desta técnica é na química orgânica e inorgânica para determinação de grupos funcionais presentes nas moléculas analisadas. O espectrômetro infravermelho afere as vibrações dos átomos, e baseado nisso pode determinar os grupos funcionais. O espectrômetro infravermelho por transformada de Fourier é o mais utilizado e é amplamente utilizado nas sínteses orgânicas, na indústria farmacêutica e análise de alimentos (BARAKH ALI et al., 2019; CARVALHO et al., 2016; SHI et al., 2017; SOARES et al., 2011). A espectrofotometria MIR (Infravermelho médio) é um ensaio de identificação por excelência, capaz de identificar diferenças estruturais entre as substâncias. Das três regiões do infravermelho, a região média, entre 4000 a 400 cm^{-1} é a mais empregada (ANVISA, 2019b).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformação axiais (estiramentos) e deformações angulares. Os estiramentos são alterações da distância, tanto de afastamento quanto de aproximação, intra-núcleo dos átomos de determinada ligação. As deformações angulares podem consistir de uma mudança no ângulo de ligação com um grupo de átomos em relação ao restante da molécula. As deformações angulares são provenientes de mudança nos ângulos de ligação com um grupo de átomos em relação ao restante da molécula, são chamadas de bandas de absorção e são produzidas em consequência da interação da radiação emitida pela vibração no momento dipolar da ligação com as ondas infravermelho. Os espectros de transmissão de amostras sólidas em pó podem ser obtidos por utilização de haletos de potássio ou sódio ou por reflexão total atenuada quando o acessório está disponível. A amostra em forma de pó é disposta sobre cristal de alto índice de refração e submetida a contato com radiação infravermelha não sendo requisitado o preparo da amostra (WU; YOU; WANG, 2018).

2.5.3 Espectrofotometria na absorção do Ultravioleta

A espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS) utiliza a faixa da luz visível, do ultravioleta próximo e do infravermelho próximo, faixas em que ocorrem as transições

eletrônicas moleculares. Cada gráfico de UV/VIS é considerando um *fingerprint* de cada moléculas mantendo absorções máximas em determinado comprimento e onda e perfil de absorção individualizado (ALVES et al., 2010; ANVISA, 2019b; FUCINA et al., 2012).

2.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estabilidade farmacêutica é capacidade de um produto farmacêutico manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante o seu tempo de prateleira (ALVES DE CASTRO; CHINCHILLA, 2005; MORAES DO CARMO; PEREIRA; GRATIERI, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2003). Segundo a RDC nº. 318, de 2019, a estabilidade destes produtos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (ANVISA, 2019c).

Os últimos compêndios descrevem várias maneiras de avaliar a estabilidade de um produto farmacêutico. Estudos de estabilidade são realizados com o intuito de avaliar as alterações químicas e físicas que podem ocorrer ao longo do tempo de vida de prateleira. Os estudos de estabilidade são projetados para testar e prover evidência à variação da qualidade do medicamento em função do tempo e sob influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, bem como avaliar outros fatores relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e química dos IFA's e dos excipientes farmacêuticos, bem como da forma farmacêutica, do processo de fabricação, do tipo e propriedades dos materiais de embalagem para estabelecimento de prazo de validade do medicamento (ALVES DE CASTRO; CHINCHILLA, 2005; ANVISA, 2019c; GIRON, 2002; SOUZA, 2015).

Os estudos de estabilidade dos medicamentos e insumos farmacêuticos ativos devem ser realizados sempre antes da liberação para venda no Brasil, para peticionamento de registro no momento do protocolo devem ser apresentados estudos de estabilidade de longa duração em andamento com resultados de no mínimo 12 meses, acompanhados de estudos de estabilidade acelerados concluídos (ALVES DE CASTRO; CHINCHILLA, 2005; ANVISA, 2015a).

A RDC 318/2019 define 4 tipos de estudos de estabilidade: Acelerado, Acompanhamento, de Longa duração e em uso. O estudo de estabilidade acelerado foi projetado para avaliar possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas dos medicamentos, em condições forçadas de armazenamento, visando avaliar o efeito de curtas excursões fora dos cuidados de conservação preconizados (ANVISA, 2019c). O estudo de acompanhamento tem como objetivo monitorar e confirmar o prazo de validade definido pelo teste de estabilidade acelerado. A estabilidade de longa duração verifica assim como a estabilidade acelerada características físicas, químicas e microbiológicas dos medicamentos, mas em condições normais não forçadas de armazenamento, tem período mínimo de 12 meses, podendo se prolongar para 18 e 24 meses. Em última estância, a estabilidade em uso foi projetada para avaliação de medicamentos acondicionados em embalagens multidose, com a finalidade de prover informação inicial e final que comprove que durante o período proposto pelos testes anteriores o produto final mantém sua estabilidade, após sua abertura e subsequentes reaberturas da embalagem primária em armazenamento nas condições determinadas pelo período de utilização (ANVISA, 2019c).

2.6.1 Estudo térmico de estabilidade

Uma técnica que pode trazer informações sobre a estabilidade é a análise térmica, que há muito tempo é utilizada para caracterizar substâncias com interesse farmacêutico, identificando e resolvendo problemas na área de tecnologia farmacêutica e revelando informações valiosas quanto às propriedades físicas dos materiais. Através dessa tecnologia, também é possível verificar modificações no intervalo de fusão, degradação térmica e na energia envolvida nesses processos (DE GOMES et al., 2013).

Os dados de cinética térmica correspondem aos da reação de decomposição, estes podendo ser calculados a partir dos resultados de análise térmica, o que torna possível a determinação de parâmetros importantes do comportamento térmico de drogas, como taxa de decomposição, os possíveis mecanismos e alguns valores de termocinética e termodinâmica. Os parâmetros termodinâmicos correspondem aos da ativação da reação de decomposição térmica de drogas no estado sólido, sendo úteis para informar sobre as reações de decomposição de ativos (DE GOMES et al., 2013; GIRON; GOLDBRONN, 1997)

A cinética de degradação térmica é utilizada na avaliação de estabilidade de fármacos e de formulações terapêuticas e podem ser determinadas tanto por termogravimetria dinâmica quanto por termogravimetria isotérmica. A termogravimetria é usada na determinação da

perda por secagem e o método é validado nos termos de precisão, acurácia, robustez e limite de quantificação. É uma técnica muito eficiente para a validação de secagem, moagem, e para análise de estabilidade tendo em vista a grande taxa de transferência das tecnologias modernas (GIRON, 2002; GIRON; GOLDBRONN, 1997).

Um aspecto importante dos estudos de cinética é a predição de comportamento cinético sob condições que não sejam as utilizadas no experimento original de estimação de prazo de validade em condições normais de armazenamento e de testes de estabilidade acelerada. A cinética química tem suas bases fundamentadas na dependência da velocidade de reação com a concentração das entidades químicas envolvidas no processo, bem como na observação da interferência da temperatura, do campo elétrico e da radiação (GIRON, 2002).

Segundo dados experimentais, um dos fatores que influenciam a velocidade de reação é a temperatura e isto ocorre porque para reagir uma molécula necessita de uma determinada energia de ativação. O aumento de temperatura poderia então fornecer uma quantidade de energia suficiente para que a molécula possa reagir. Outro fator importante é que segundo Boltzmann apenas uma região mínima da molécula é capaz de absorver calor podendo ser calculada pela distribuição de Boltzmann. Então seguindo os princípios acima descritos, podemos racionalizar que quanto maior a necessidade de energia de ativação, menor o número de moléculas que absorvem esta energia e mais lenta a velocidade de reação em uma determinada temperatura (GAISFORD et al., 2006; TIȚA; FULIAȘ; TIȚA, 2011).

Em 1889, Arrhenius apresentou a seguinte equação para relação entre a temperatura e a cinética de reação:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{\Delta E}{2,303} R * \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 * T_1} \right)$$

Para os cálculos de degradação foi utilizado o modelo proposto em 1966 de Flynn e Wall (TIMÓTEO et al., 2019). Dos dados obtidos através das curvas TG/DTG, é possível realizar o estudo de decomposição térmica do material, através da determinação tripla de Arrhenius. Na termogravimetria a curva gerada pela variação da massa em função do tempo e temperatura é chamada de fração de conversão de massa (α) determinada pela equação 1 (TIȚA; FULIAȘ; TIȚA, 2011):

$$\alpha = \frac{m_0 - m_t}{m_0 - m_f} * 100$$

Onde m_0 representa a massa inicial na temperatura em que foi lançado o teste, e m_f a massa ao final do experimento. Em condições não isotérmicas, a equação geral que descreve a taxa de conversão é, em cinéticas no estado sólido, representada pela equação 2 :

$$\frac{d\alpha}{dt} = k * f(\alpha)$$

Onde α representa a fração de conversão de massa, k representa a constante de proporcionalidade dada pela expressão empírica de Arrhenius e $f(\alpha)$ a função de conversão de massa fornecendo indícios de como ocorre o processo de degradação. A equação 3 a seguir expressa a o perfil cinético de degradação, onde A representa o total de colisões entre as moléculas e E_a a energia de ativação capaz de quebrar um mol de ligações entre os átomos das moléculas. Os parâmetros R e T representam a constante dos gases (8,31451 J/mol.K) e temperatura absoluta em Kelvin respectivamente.

$$\frac{d\alpha}{dT} \beta = A \left(\exp - \frac{E_a}{RT} \right) * f(\alpha)$$

Baseado na equação acima, diversos métodos foram desenvolvidos para análise do perfil cinético de degradação térmica dos materiais. Os parâmetros cinéticos incluem um método chamado modelo de análise livre, como o de Fredman e Flynn Wall-Ozawa (TIȚA; FULIAȚ; TIȚA, 2011). O método de Flynn Wall-Ozawa foi proposto como um método independente com uso da aproximação de Doyle.(DOYLE, 1965) Obtemos então a equação 4 a partir das substituições das equações acima e da aproximação de Doyle.

$$\log \beta = \log \frac{A \cdot E_a}{Rg(a)} - 2,315 - \left(0,4567 - \frac{E_a}{RT} \right)$$

2.6.1.1 Método Flynn, Wall e Ozawa (FWO)

O método Flynn-Wall-Ozawa é mais utilizado adequadamente para o uso em sistemas onde muitas reações estão ocorrendo, de modo que a energia de ativação varia com o tempo. No entanto é o método pode falhar em reações amplamente diferentes (portanto com energias de ativação muito diferentes) quando ocorrem simultaneamente. Reações competitivas

também tornam o método inaplicável (FANDARUFF et al., 2014; TIȚA; FULIAȘ; TIȚA, 2011).

Este método foi proposto de forma independente de Flynn, Wall e Ozawa com o uso da aproximação de Doyle:

$$p(x) = \exp(-0,4567 \cdot x - 2,315)$$

Com a integração da equação de perfil cinético (3) podemos obter a equação da seguinte forma:

$$\log \beta = \frac{\log(AEa)}{Rg(\alpha)} - 2,315 - 0,4567 \frac{Ea}{RT}$$

Assim, quando $\alpha = \text{constante}$, o gráfico $\log \beta$ vs $1/T$ obtidos a partir dos termogramas realizados em diferentes razões de aquecimentos e com níveis de conversão entre 5% e 95%, é possível a obtenção do coeficiente angular, o cálculo da energia de ativação é possível (SILVA, 2019; TIMÓTEO et al., 2019).

2.6.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Estudos de estabilidade são realizados com o intuito de avaliar as alterações químicas e físicas que podem ocorrer ao longo do tempo de vida de prateleira. Nos estudos, são detectados e quantificados todos os produtos de degradação que possam ser gerados durante o decorrer do prazo de validade por meio de método indicativo de estabilidade (MIE). As técnicas mais comumente utilizadas são cromatográficas como CLAE, UPLC, UHPLC e eletroforese capilar (KURMI et al., 2018; SINGH et al., 2013).

A cromatografia líquida de alta performance é um dos métodos analíticos mais utilizados no mundo na quantificação e análise de IFA's. A separação de impurezas e outros analitos é dada pelas interações específicas e inerentes de cada substância com as fases móveis líquida e estacionária. A CLAE foi rapidamente desenvolvida com a introdução de novos métodos de bombeamento, colunas mais sofisticadas e detectores de ampla faixa de detecção. A reprodutibilidade ficou facilitada e o desenvolvimento de métodos embora seja ainda bastante dispendioso se tornou mais acessível com a automatização da amostragem,

separação, detecção e cálculo dos resultados (KUMAR; DWIVEDI; KUSHNOOR, 2011; KURMI et al., 2018; SINGH et al., 2013).

A cromatografia líquida oferece uma ampla escolha de métodos de separação desde a fase reversa à normal e com os diferentes solventes utilizados como fase móvel técnicas de eluição por gradiente de solventes ou por fluxo isocrático podem ser utilizados. Diversos detectores estão disponíveis para uso como os detectores eletroquímicos, refrativos, fluorescentes, radio-químicos, de massa e ultravioleta (SAHU et al., 2018).

Para o desenvolvimento de novos métodos de quantificação de fármacos no CLAE é necessário o conhecimento prévio de peso molecular, polaridade, pK_a , comprimento de onda de melhor absorção, pureza e solubilidade (SAHU et al., 2018). A partir de testes preliminares, identificaram-se as condições iniciais mais relevantes para a determinação dos IFAs. A escolha das melhores condições cromatográficas, fase estacionária, tipo de eluição, composição de fase móvel, vazão da fase móvel. Diversos parâmetros podem ser observados na determinação do melhor método, entre estes podemos citar a resolução e o número de pratos teóricos

A resolução é um fator que reflete a separação entre dois picos adjacentes, valores esperados de resolução denotam 1,5 x o tempo de retenção de um pico para outro. O número de pratos teóricos avalia o grau de alargamento do pico, em outras palavras reflete a interação do analito com a fase estacionária. Valores esperados para esse parâmetro são superiores a 2000 (RIBANI, 2004).

2.7 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)

Os métodos indicativos de estabilidade são métodos analíticos quantitativos validados, capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas do medicamento, ou que sejam capazes de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência (BLESSY et al., 2014; SINGH et al., 2013). No seu geral utilizam métodos de separação acoplados a aparelho de quantificação com alta sensibilidade. A aparelhagem mais utilizada para definição de MIE é o HPLC por englobar os requisitos de separação e quantificação de insumos (EL-GHOBASHY et al., 2018). A utilização de estudos de estabilidade é compulsório para novas drogas antes da submissão do dossiê de registro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2019; ANVISA, 2015b; SILVA et al., 2009; SOUZA, 2015).

Os estudos de estabilidade incluem estudos de estabilidade de longa duração e acelerado. Os estudos acelerados podem ser realizados em condições forçadas de temperatura e umidade, os produtos de degradação oriundos desses testes devem ser separados, identificados e quantificados. Para o desenvolvimento do método se faz necessário a utilização de estudos de degradação forçada para gerar os analitos necessários ao método (ANVISA, 2015b; BLESSY et al., 2014).

As condições utilizadas para os estudos de degradação forçada, são previstas pelo ICH, conselho internacional para harmonização de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano (MORAES DO CARMO; PEREIRA; GRATIERI, 2018). A degradação forçada é levada a produzir amostras representativas para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para ativos e produtos de ativos (BLESSY et al., 2014). A escolha dos fatores de estresse deve ser consistente tendo em vista a os parâmetros inerentes aos produtos a serem testados. Dentre os fatores sugeridos para os estudos de degradação forçada podemos citar, hidrólises ácida, neutra e básica, degradação térmica, fotólise e oxidação e pode incluir fases de aquecimento e resfriamento (KONARI; JACOB, 2016; MORAES DO CARMO; PEREIRA; GRATIERI, 2018).

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação de um método analítico deve demonstrar que este produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina de forma documentada e mediante critérios objetivos (ANVISA, 2017). Os parâmetros típicos a serem analisados dependem do tipo de método a ser validado e estão descritos a seguir.

2.8.1 Exatidão

A exatidão de um método analítico é obtida por meio da determinação do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo frente a resultados aceitos como verdadeiros. Para determinação da exatidão são realizados ensaios em triplicata, em três níveis de diluição do método indicativo de estabilidade utilizado. Após o término dos ensaios são calculados os valores percentuais correspondentes aos níveis de concentração das amostras avaliadas (ANVISA, 2017).

2.8.2 Precisão (Reprodutibilidade)

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme o método escolhido (ANVISA, 2017).

2.8.3 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio de sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes interferentes que pudessem estar presentes na amostra (ANVISA, 2017).

2.8.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é demonstrado pela obtenção da menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado sob condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis em condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

2.8.5 Linearidade

É a faixa no qual o sinal analítico é expresso. É dado por meio de função matemática e também é conhecida como curva de calibração. Os dados utilizados para cálculo de função são o sinal analítico (y) ou variável dependente, e concentração (x) ou variável independente. É determinada pela análise de 5 concentrações diferentes, e devem seguir um intervalo de 80% a 120% da concentração teórica do teste (ANVISA, 2017).

2.8.6 Robustez

A robustez tem o objetivo de averiguar se o método é capaz de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, experimentando a qualidade do método sob a influência de fatores. Uma vez confirmada a robustez o método pode ser executado em outros laboratórios e é propício a fornecer resultados confiáveis (ANVISA, 2019c).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Os insumos ativos utilizados foram obtidos através de doação da indústria farmacêutica Cristália, os demais itens foram fornecidos pelo laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da UFPE (LTM/UFPE). Seguem no Quadro 2 os insumos e lotes utilizados na elaboração do comprimido ADF para o tratamento de HIV.

Quadro 2 Insumos utilizados na elaboração do comprimido ADF.

Classe	Componente	Fornecedor - Lote
Ativo	Efavirenz	Cristalia – LT0482/2015
Ativo	Zidovudina	Cristalia - LT037382017
Ativo	Lamivudina	Cristalia - LT135512018
Diluyente	Celulose Microcristalina 101	Blanver - LT155012092
Desagregante	Croscarmelose Sódica	Blanver - 802705
Agregante	Polivinilpirrolidona	ISP- L055001138511V06
Lubrificante	Estearato de Magnésio	Op. Fenix 2009121200
Deslizante	Dióxido de Silício Coloidal	Degussa - 3158071326
Surfactante	Lauril Sulfato de Sódio	Vetec - 1008436

Fonte: Dados da pesquisa

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS INSUMOS ATIVOS

3.2.1 Análise Térmica

As curvas DSC foram obtidas mediante o emprego de uma célula calorimétrica, modelo DSC-60, da marca Shimadzu®, a uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), intervalo máximo de temperatura de 25°C a 300°C . Para a realização dos ensaios foram utilizadas massa de amostras de $2,00 \pm 0,10\text{mg}$ em cadinhos de alumínio fechado. Antes dos ensaios, foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha de base do sistema. Para a calibração da célula do DSC, foi empregado o índio metálico ($T_{\text{fusão}}=156,6^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusão}}=28,7\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) com pureza de 99,99%.

Nos ensaios de Termogravimetria foi empregada uma termobalança, modelo TGA-60 da marca Shimadzu®. As curvas TG/DTG foram obtidas a uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), intervalo máximo de

temperatura de 30°C a 600°C. Para a realização dos ensaios foram utilizadas massa de amostras de $5,00 \pm 0,5\text{mg}$ em suporte de amostras de platina. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha de base do sistema. A calibração dos equipamentos foi realizada na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, com o padrão de oxalato de cálcio.

3.2.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo ATR sendo o resultado obtido da média de varreduras. Os espectros foram obtidos de 4000 a 650 cm^{-1} na resolução de 4cm^{-1} .

3.2.3 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta

O espectro UV foi obtido após análise em espectrofotômetro UV-Vis Mettler Toledo. As soluções estoque e trabalho foram preparadas segundo método farmacopêico, de modo que a concentração final a ser utilizada foi de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, utilizando-se como solvente água ultra purificada, metanol e etanol a depender do analito. A análise foi realizada em triplicata e os espectros foram obtidos com auxílio de software compatível. Com o uso da Lei de Lambert-Beer foi possível determinar a absorvidade molar de determinada amostra, a partir de determinada concentração, temperatura e solventes definidos (VIGILÂNCIA, 2019).

$$A = a * b * C$$

A absorvância (A) é diretamente proporcional aos valores de concentração de amostra (C) em mol L^{-1} , caminho ótico (cm) e absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). A relação linear entre A e C é válida quando feitas em um caminho ótico pré-definido e constante.

3.3 PRODUÇÃO DOS COMPRIMIDOS

Os comprimidos foram obtidos por granulação por via úmida, segundo método utilizado por Fontes (2012) e Soares (2011), e caracterizados por testes de controle de

qualidade compendiais, como teor, friabilidade, desintegração, dissolução, dureza, peso médio e uniformidade de doses unitárias (ANVISA, 2019b; FONTES, 2011; SOARES, 2011). A formulação proposta se baseava em uma granulação por via úmida, seguindo as seguintes proporções (Quadro 3):

Quadro 3 - Formulação utilizada para preparação dos comprimidos ADF.

	Componentes	Percentual no lote (%)	Quantidade em cada comprimido (mg)
Fase interna do grânulo	Efavirenz	33,30%	299,7
	Zidovudina	33,30%	299,7
	Lamivudina	16,70%	150,3
	Celulose Microcristalina 101	10,70%	96,3
	Croscarmelose Sódica	1%	9
	Polivinilpirrolidona (sol. Hidroalcoólica 50:50)	0,50%	4,5
Fase Externa do grânulo	Estearato de Magnésio	1,00%	9
	Dióxido de Silício Coloidal	1,50%	13,5
	Croscarmelose Sódica	1%	9
	Lauril Sulfato de Sódio	1%	9
Total		100%	900 mg

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Após pesagem e mistura dos insumos de fase interna, partiu-se para o processo de granulação dos pós através da molhagem com o agente agregante disperso em solução hidroalcoólica utilizando a concentração de 0,5% de polivinilpirrolidona em solução hidroalcoólica a 50%. O processo de uniformização foi realizado de maneira manual e com adição de pequenas quantidades de agente agregante para obtenção de massa com umidade desejada. Em seguida levou-se a massa umidificada para estufa de circulação a uma temperatura de 40° C por 2 horas, efetuando aferições de umidade, com auxílio de termo higrômetro até uma umidade de 1,5% (relativa ao ar). O produto adquirido foi submetido a passagem por malha de 0,5 µm para uniformização de tamanho de partículas. A fase externa foi adicionada, homogeneizada e colocada em compressora semi-industrial.

3.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS COMPRIMIDOS ADF

Os comprimidos obtidos seguiram para os testes de controle de qualidade compendiais, como teor, friabilidade, desintegração, dissolução, dureza, peso médio e uniformidade de doses unitárias (ANVISA, 2019b; FONTES, 2011; SOARES, 2011).

3.4.1 Determinação de peso

Teste aplicado a formas farmacêuticas sólidas em dose unitária, os testes devem ser aplicados em balanças de sensibilidade adequada. O procedimento consiste em pesar, individualmente 20 comprimidos e determinar o peso médio. Pode-se tolerar, em comprimidos com mais de 250 mg uma variação de $\pm 5\%$ em relação ao peso médio. O teste possibilita verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso (ANVISA, 2019b).

3.4.2 Teste de Dureza

O teste de Dureza possibilita determinar a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade (ANVISA, 2019b). A aparelhagem realiza tensão mecanicamente ou manualmente. À medida que a pressão aumenta, um êmbolo, uma placa ou um pistão aplica determinada força sobre o comprimido, apoiado em base fixa. O aparelho é calibrado com precisão de 1N. O teste é realizado com 10 comprimidos, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Os comprimidos são testados, individualmente, obedecendo sempre à mesma orientação.

3.4.3 Teste de Friabilidade

O teste de friabilidade possibilita determinar resistência dos comprimidos a abrasão, quando submetidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica (ANVISA, 2019b). O teste consiste em pesar com exatidão, um número determinado de comprimidos, submetê-los a ação do aparelho e retirá-los depois de efetuadas 100 rotações. Após remover os resíduos de pó os comprimidos são novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e final representa a friabilidade, medida em função da porcentagem de pó perdido.

3.4.4 Teste de desintegração

O teste de desintegração possibilita verificar se comprimidos se desintegram dentro do limite de tempo especificado, quando seis unidades do lote são submetidas à ação de aparelhagem específica sob condições experimentais descritas(ANVISA, 2019b)(ANVISA, 2019b)(ANVISA, 2019b)(ANVISA, 2019b)(ANVISA, 2019b)(ANVISA, 2019b)(ANVISA, 2019a)(ANVISA, 2019a). A desintegração é definida, como o estado no qual nenhum resíduo das unidades permanece na tela metálica do aparelho de desintegração, salvo fragmentos insolúveis do comprimido (ANVISA, 2019b).

O aparelho utilizado é chamado de desintegrador e consiste em sistema de cestas e tubos, de recipiente apropriado para o líquido de imersão, de um termostato e um mecanismo que movimenta a cesta verticalmente, com frequência constante e percurso específico. O volume do líquido de imersão deve ser suficiente para o comprimido ficar fora do líquido no momento em que a movimentação da cesta atinja a distância máxima do final da cesta (ANVISA, 2019b).

Para o teste de desintegração utilizam-se 6 comprimidos. Coloca-se cada comprimido em um dos seis tubos da cesta, adiciona-se um disco a cada tubo e aciona-se o aparelho utilizando água mantida a 37°C como líquido de imersão. Ao final do primeiro intervalo de tempo (30'), o aparelho é desligado para observação da cesta. Todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados. Se os comprimidos não se desintegrarem devido à aderência aos discos, repetir o teste com seis outros comprimidos omitindo os discos.

3.5 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE EM UPLC

O método indicativo de estabilidade foi desenvolvido e otimizado em equipamento UPLC Shimadzu® equipado com sistema binário de bombas modelo LC – 20AD, degaseificador modelo DGU – 20A₃, detector PDA modelo SPD – M20A, forno modelo CTO – 20A, injetor automático modelo SIL - 20AC-HT e controlador modelo SCL – 20AVP, sendo os dados tratados pelo *software* LC solution 1.0 Shimadzu®.

Na otimização do método, escolheu-se coluna Ascentis (C18 250 x 4,6 mm, 5 µm) do fabricante Supelco®. A coluna foi mantida em temperaturas de 30 a 40°C e fase móvel no modo gradiente utilizando acetonitrila e água ultrapurificada (miliQ).

Utilizou-se planilha para organização de alterações no método para melhor aproveitamento dos dados. O Quadro 4 abaixo mostra o modelo utilizado, onde as

modificações ocorreram tanto no método utilizado quanto no preparo da amostra. As alterações no método passaram por ajustes na temperatura (40°C e 30°C), fluxo de solvente (0,5 ml/min, 0,4 ml/min e 0,6 ml/min) e nas misturas de solventes (Fase móvel) utilizados durante a eluição cromatográfica (Tipo 1 e tipo 2).

Quadro 4 - Quadro de modificações realizadas na otimização da metodologia.

Alteração	Modificação do Parâmetro	Cod
Método	Temperatura	T40
		T30
	Fluxo	0,5
		0,4
		0,6
	Mistura Isocrática	Tipo 1
Tipo 2		
Preparo	Mudança na proporção do diluente	100% ACN
		70/30
		50/50

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Os gradientes utilizados foram modificados quanto a comportamento de polaridade dos solventes, no Tipo 1 mantivemos uma polaridade relativamente alta na fase móvel, pois se fazia necessária uma maior interação da Lamivudina com a coluna.

Tabela 1 - Gradiente utilizado como fase móvel (Tipo 1).

Tempo (min)	H₂O (ultra purificada) (%)	ACN (%)
0,01	90	10
15	90	10
50	10	90
55	90	10
65	STOP	STOP

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 2 - Gradiente utilizado como fase móvel (Tipo 2).

Tempo (min)	H₂O (ultra purificada) (%)	ACN (%)
0,01	90	10
10	80	20
50	10	90
55	90	10
65	STOP	STOP

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

3.5.1 Preparo de amostras

As amostras foram preparadas segundo metodologia já empregada, solubilizando 75 mg de comprimido ADF em balão volumétrico de 25 mL contendo 100% de solvente orgânico (acetonitrila) ou 50:50 solvente orgânico : água ultrapura, e sonicando por 10 min. Após aferição em balão volumétrico, a solução obtida foi filtrada em papel de filtro faixa preta, sendo 0,4 mL do filtrado transferidos para um balão de 10 mL para diluição em soluções de 100% solvente orgânico ou água ultrapura ou em soluções em proporção de 50:50 solvente orgânico : água ultrapura. A solução obtida foi filtrada em membrana de 0,2 μm e transferida para *vials*.

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

O MIE foi desenvolvido em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando fase móvel composta por acetonitrila e água ultrapura no modo gradiente e fase estacionária coluna Ascentis (C18 250 x 4,6 mm, 5 μm). Este método foi validado de acordo com a RDC N°166 de 2017, cujas recomendações incluem a avaliação da interferência de produtos de degradação por meio de condições de degradação forçada e a adequação aos seguintes parâmetros descritos a seguir e calculados com auxílio de análise de variância segundo planilha pré-elaborada por Morano, 2008 (MORANO et al., 2008)

3.6.1 Exatidão

Para determinação da exatidão foram realizados ensaios em triplicata em três níveis de diluição do método indicativo de estabilidade utilizado seguindo (12,5 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, para a lamivudina e 25 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ e 60 $\mu\text{g/ml}$ para zidovudina e efavirenz.) . Após o término dos ensaios foram calculados os valores percentuais correspondentes aos níveis de concentração das amostras avaliadas.

3.6.2 Precisão (Reprodutibilidade)

Cada *batch* programado contemplava no mínimo 3 *vials* nas mesmas concentrações. Após o término dos ensaios foram calculados os valores percentuais correspondentes aos níveis de concentração das amostras avaliadas.

3.6.3 Seletividade

Por se tratar de um método utilizado para indicação de estabilidade, utilizamos comprimido produzido pelo estudo anterior, do ano de 2011, devido ao tempo de elaboração do comprimido, a degradação de certos componentes era esperada. Foi utilizado o mesmo método de preparo para os comprimidos.

3.6.4 Limite de detecção e quantificação

Os mesmos foram calculados por meio de projeção em cálculos de análise de variância com apoio de planilha desenvolvida por MORANO em 2008 (MORANO et al., 2008).

3.6.5 Linearidade

Os dados utilizados para cálculo de função são o sinal analítico (y) ou variável dependente, e concentração (x) ou variável independente. É determinada pela análise de 5 concentrações diferentes, e devem seguir um intervalo de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

3.6.6 Robustez

Os resultados de robustez foram calculados com auxílio de planilhas pré-elaboradas. Utilizando como parâmetros, alteração de fluxo, temperatura e preparo de amostra.

3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade acelerada foi realizado segundo resolução nº 318 de 6 de novembro de 2019, que estabelece os critérios de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2019). Os procedimentos de amostragem foram feitos de forma a assegurar homogeneidade do lote de comprimidos de ADF.

Foram utilizados 3 grupos contendo 30 comprimidos de associação dose fixa para o tratamento de HIV, que foram acondicionados em frascos de PVC com tampa e colocados em

câmara climática para observação de teor e produtos de degradação segundo método indicativo de estabilidade. Os parâmetros sob os quais os comprimidos foram submetidos seguiram RDC nº 318/2019, demonstrados segundo Quadro 5.

Quadro 5 - Condições de estudo de estabilidade acelerada.

Condições de estudo de estabilidade acelerada	
Produtos a serem acondicionados em Temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C)	Temperatura: 40°C ± 2°C Umidade: 75% UR ± 5% UR Duração: 6 meses

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Os comprimidos foram submetidos ao longo do teste de estabilidade a análises de aspecto, dureza e foram realizados os doseamentos por UPLC com método desenvolvido.

3.8 DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE POR ESTUDO TÉRMICO

3.8.1 Termogravimetria não isotérmica – Degradação Térmica

As curvas Termogravimétricas (TG/DTG) foram obtidas em um Analisador Térmico, marca Shimadzu, modelo TGA-60 sob atmosferas de nitrogênio e ar sintético, com fluxo 100 mL.min⁻¹, nos seguintes modos de aquecimento: não-isotérmico (dinâmico) e isotérmico, nas razões de aquecimento de 2,5, 5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹, com faixa de temperatura de 30° a 600° C, massa de 5,0 ± 0,5 mg de pó de comprimido, utilizando-se cadinhos de platina, com o intuito de se estudar a estabilidade dos princípios ativos, dos excipientes e dos medicamentos comerciais, bem como determinar os parâmetros cinéticos das reações de decomposições.

Para os cálculos de degradação foi utilizado o modelo proposto em 1966 de Flynn e Wall (TIMÓTEO et al., 2019). Dos dados obtidos através das curvas TG/DTG, é possível realizar o estudo de decomposição térmica do material, através da determinação tripla de Arrhenius.

3.8.2 Termogravimetria Isotérmica

As curvas termogravimétricas isotérmicas dos princípios ativos foram obtidas com o intuito de verificar o perfil da decomposição térmica, compará-los com o perfil não-isotérmico e determinar o provável mecanismo do processo de decomposição térmica, utilizando-se a razão de aquecimento 10°C.min⁻¹. A temperatura da isoterma foi determinada baseadas no intervalo de decomposição térmica indicado nas curvas não-isotérmicas. Com

relação ao programa de aquecimento no início da análise, a amostra foi introduzida no forno à temperatura ambiente, em seguida foi submetida a uma razão de aquecimento elevada, determinada pela programação do equipamento, até atingir a temperatura desejada, permanecendo então, nesta temperatura no tempo de 300 min, tempo necessário para que ocorra perda de massa que irá possibilitar a determinação da constante de velocidade de decomposição térmica.

A avaliação da estabilidade do fármaco e da formulação foi realizada por estudos de cinética de degradação não isotérmica, obtendo-se valores de energia de ativação a partir de modelos térmicos. Para o cálculo do tempo de meia vida foi aplicada a equação proposta por Dobkowski e Rudnik (SILVA, 2019):

$$T_{90\%} = \left(\frac{1}{A}\right) \exp \frac{Ea}{RT} \quad (7)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE DOS INSUMOS ATIVOS

Para cada insumo ativo adquirido foram escolhidos 3 métodos analíticos para comprovação de qualidade dos ativos. Os métodos utilizados são os de praxe em diversos laboratórios no Brasil e no mundo. A calorimetria exploratória diferencial pode determinar pureza e ponto de fusão das amostras, os espectros de absorção na região do infravermelho revelam a presença de grupamentos químicos característicos de cada substância e por fim a varredura em espectro Ultravioleta pode determinar absorvidade molar, que é individual a cada substância (GIRON, 2002; SIDDIQUI et al., 2013; THAKRAL et al., 2018). Avaliações corriqueiras como solubilidade e aspecto físico também foram realizados bem como doseamento de insumo por CLAE utilizando-se o método desenvolvido para indicação de estabilidade (INDURI et al., 2011).

Os resultados de cada caracterização foram comparados com a literatura disponível, estudos anteriores do grupo, dados presentes nas monografias presentes nas farmacopeias americana e brasileira, e nas fichas técnicas dos insumos obtidos quando disponível. Na tabela abaixo estão descritos os ativos, fabricantes e lotes da matéria prima a ser validada.

Tabela 3 - Ativos utilizados na produção do comprimido ADF

	Descrição	Fabricante / Lote
Ativo	Efavirenz	Cristalia – LT0482/2015
Ativo	Zidovudina	Cristalia - LT037382017
Ativo	Lamivudina	Cristalia - LT135512018

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.1 Lamivudina

A lamivudina se apresenta na forma de pó cristalino branco com massa molecular de 229,256 mg/ mol e fórmula molecular $C_8H_{11}N_3O_3S$, e com ponto de fusão segundo literatura em faixa de 176°C – 178°C (ANVISA, 2019a; CORDEIRO et al., 2011; FERREIRA et al., 2017). O lote analisado se mostrou conforme às especificações da literatura.

Figura 9 - Lamivudina em pó.

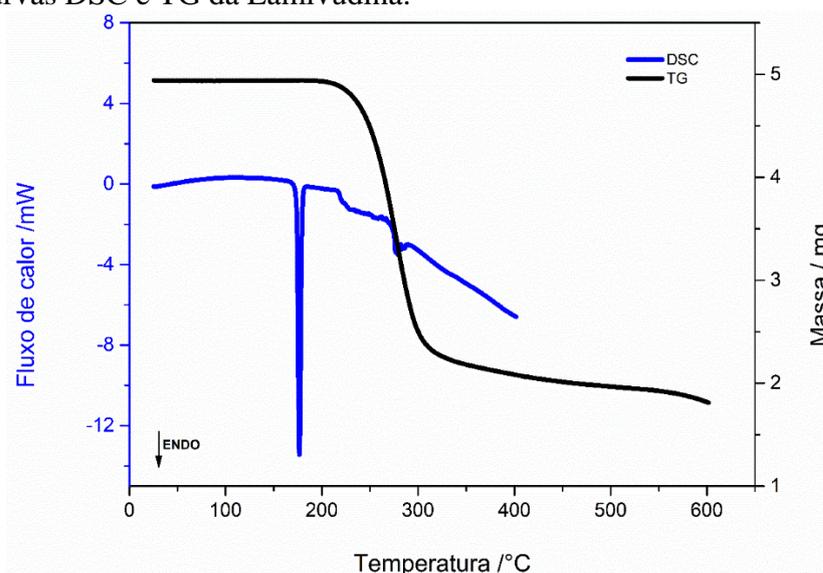


Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.1.1 Análise Térmica

As curvas TG e DSC da lamivudina estão apresentadas na Figura 10. A curva DSC da lamivudina mostra que a substância é estável até a temperatura de 174,43°C. Podemos observar a presença de 3 grandes eventos térmicos, o primeiro ocorre em uma pequena faixa de temperatura entre 174,43-176,23°C, uma segunda que se inicia na faixa 196,76°C-198°C em conjunto com a perda de massa na curva TG e tem por fim com outro pico endotérmico por volta de 256,73°C refletindo um segundo evento de degradação. O pico endotérmico acentuado correspondente à fusão do IFA ocorre a uma temperatura de 175,34°C e com comparação frente à curva TG não foi observada alteração de massa no primeiro evento.

Figura 10 - Curvas DSC e TG da Lamivudina.



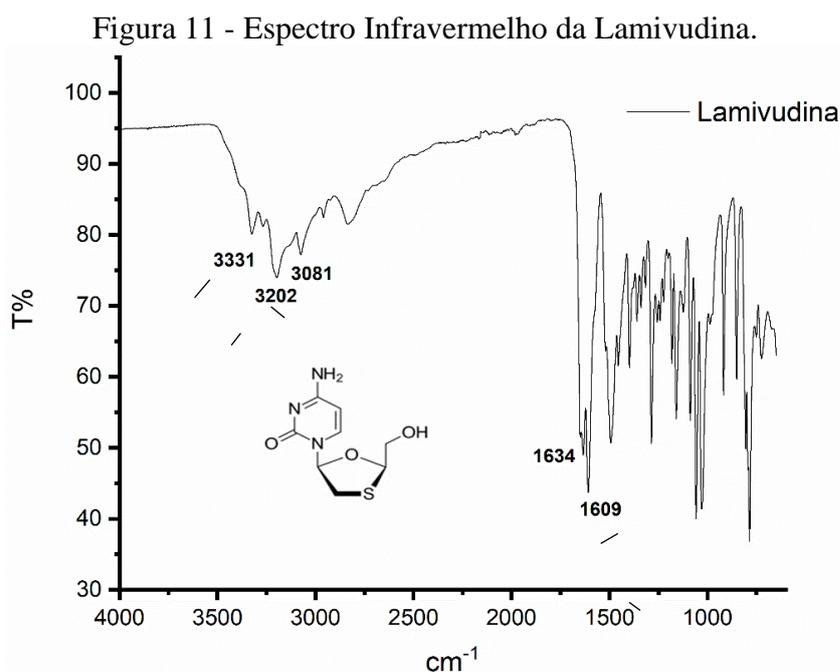
Fonte: Dados da Pesquisa

Os eventos térmicos observados na curva DSC do insumo ativo, como dito anteriormente, estão de acordo com os demonstrados nas curvas TG onde foram detectados 2 eventos endotérmicos, o primeiro ocorre $T_{\text{onset}} = 174,43 \text{ }^\circ\text{C}$ até $T_{\text{endset}} = 176,23 \text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{\text{peak}} = 175,34 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H = -154,73 \text{ J/g}$), sem apresentar nenhuma variação de massa, após isso outro evento endotérmico característico da decomposição do Lamivudina ocorre $T_{\text{onset}} = 196,66 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo confirmado por compêndios farmacopeicos e trabalhos na literatura que citam a faixa de 196-198° como evento principal de degradação da lamivudina (COSTA et al., 2013; MARU et al., 2011; SOUZA, 2008b). A pureza calculada pelo equipamento foi de 99,08%.

A curva DSC/TG obtida foi comparada com as curvas realizadas em outros estudos do grupo e da literatura disponível, se mostrou compatível para a amostra analisada (COSTA et al., 2013; DE GOMES et al., 2013; MARU et al., 2011; SOARES, 2011; SOUZA, 2008a).

4.1.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

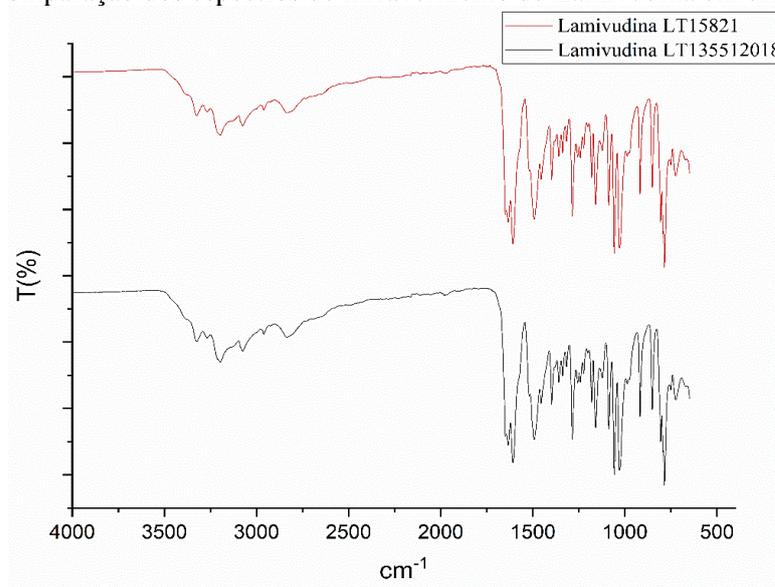
A Figura 11 mostra o espectro infravermelho obtido por dispositivo de reflectância total atenuada, é possível observar-se as bandas referentes ao desdobramento N-H em 1609 cm^{-1} , o estiramento vibracional 1634 cm^{-1} referente ao grupamento imina e os estiramentos relativos aos grupamentos amina e hidroxila na faixa de $3080 \text{ a } 3331 \text{ cm}^{-1}$.



Fonte: Dados da Pesquisa (2020)

O espectro obtido condiz com o encontrado em algumas literaturas e em diferentes lotes do produto disponíveis. e os picos são característicos aos grupos funcionais presentes na molécula (CORDEIRO et al., 2011; DE GOMES et al., 2013; SOARES, 2011).

Figura 12 Comparação dos espectros de infravermelho de Lamivudina em diferentes lotes.

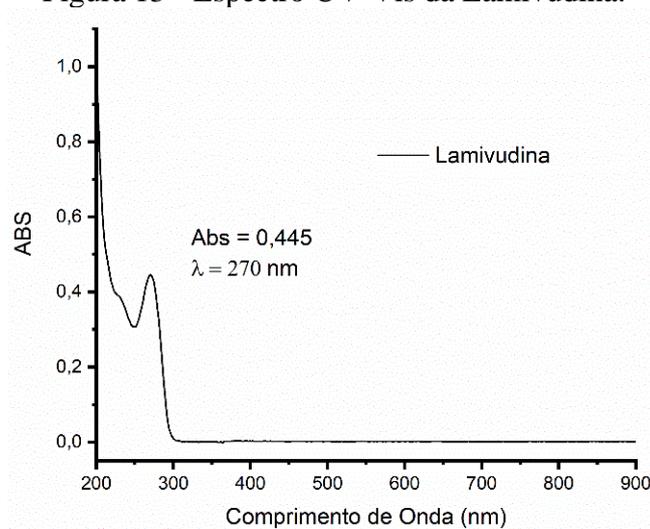


Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.1.3 Espectrofotometria de absorção na Região Ultravioleta

As soluções mãe e filhas foram preparadas segundo método farmacopêico, de modo que a concentração final e a ser utilizada ficou de 10 µg/mL utilizando-se como solvente água ultra purificada. A análise foi realizada em triplicata e os espectros obtidos com auxílio de software compatível. Os espectros UV foram comparados aos obtidos por UPLC em estudos anteriores do grupo e tanto o perfil quanto picos de absorção foram condizentes com estes estudos e com a monografia do fármaco na farmacopeia brasileira.

Figura 13 - Espectro UV-Vis da Lamivudina.



Fonte: Dados da Pesquisa (2020)

Com o uso da Lei de Lambert-Beer calculamos a absorvidade molar de determinada amostra, a partir de determinada concentração, temperatura e solvente (ALVES et al., 2010; FUCINA et al., 2012).

$$0,445 = \epsilon * 1 * 10 \text{ ug/mL}$$

A absorvidade calculada foi de $0,0445 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. E o valor é referente a luz absorvida no comprimento de onda de 270 nm, a uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ preparada em água ultrapurificada.

4.1.1.4 Resumo de especificações

Tabela 4 - Resumo de especificações e conformidade da lamivudina lote LT135512018

Parâmetros	Especificações (USP e/ou FB)	Resultado
<i>Características físicas</i>	Pó cristalino branco a branco amarelado	Conforme
<i>Solubilidade</i>	Facilmente solúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol e etanol e insolúvel em acetona	Conforme
<i>Doseamento por CLAE</i>	98% a 102%	98,7%
<i>Infravermelho</i>	Não especificado	Conforme
<i>Ponto de Fusão (Faixa de Fusão)</i>	176°C a 178°C	175,34°C
<i>Varredura UV - Absortividade</i>	Não especificado	$0,0445 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \lambda 270\text{nm}$

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.2 Zidovudina

A zidovudina possui massa molecular de 267,2413 mg/mol e fórmula molecular $C_{10}H_{13}N_5O_4$ e se apresenta na forma de pó branco ou acastanhado com ponto de fusão de 120-124°C (ARAÚJO, 2003), sendo levemente solúvel em água e solúvel em etanol (ANVISA, 2019a).

Figura 14 - Zidovudina em pó.

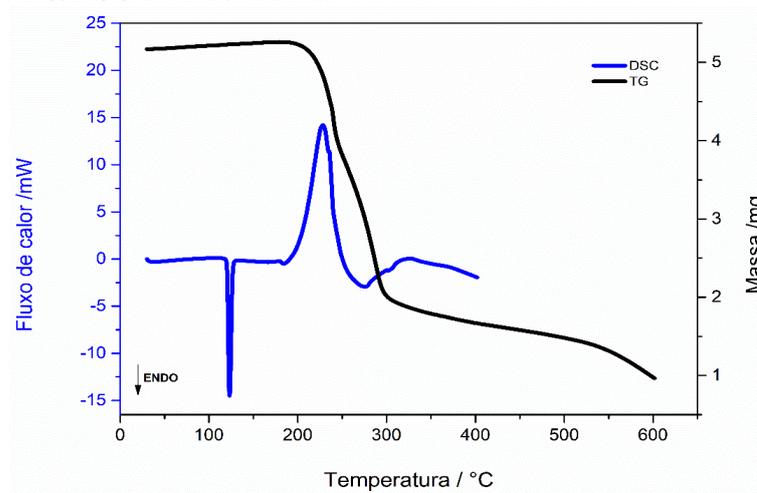


Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.2.1 Análise Térmica

As curvas TG e DSC da Zidovudina estão apresentadas na Figura 14. A curva DSC da zidovudina mostra que a substância é estável até a temperatura de 121,86°C sem apresentar nenhuma variação de massa. Podemos observar a presença de 3 eventos térmicos principais, o primeiro ocorre em uma pequena faixa de temperatura entre 120,34-123,05°C, uma segunda que se inicia na faixa 193,30°C-216,62°C em conjunto com a perda de massa na curva TG e tem por fim com outro pico endotérmico por volta de 224,44-251,72°C refletindo um segundo evento de degradação. O pico endotérmico acentuado correspondente à fusão do IFA ocorre a uma temperatura de 121,86°C e em comparação frente à curva TG não foi observada alteração de massa no primeiro evento.

Figura 15 - Curva TG/DSC da zidovudina.



Fonte: Dados da Pesquisa (2020)

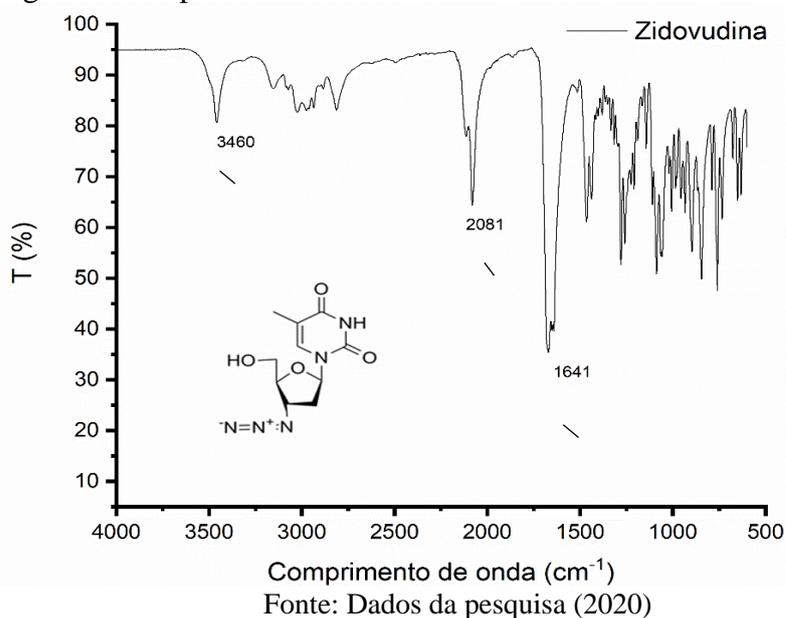
Os eventos térmicos observados na curva DSC do insumo ativo, como dito anteriormente, estão de acordo com os demonstrados nas curvas TG/DSC, onde foram visualizados 3 eventos 2 endotérmicos e 1 exotérmico o primeiro ocorre T_{onset} : 120,34°C até T_{endset} : 123,05°C (T_{peak} = 121,86°C, ΔH = -181,35 J/g) e demonstra um pico endotérmico que corresponde a faixa de fusão da zidovudina. Após esse evento também foram observados mais 2 eventos um exotérmico e outro endotérmico, na faixa de 193,30-216,62°C (ΔH = 1,17 kJ/g) e 224,44-251,72°C (ΔH = -203,97 J/g), respectivamente, referentes ao início da degradação térmica da zidovudina. A pureza calculada para o analito foi de 98,7%.

A curva obtida foi comparada com lotes diferentes de estudos anteriores do grupo e com a literatura disponível. A faixa de fusão e os eventos térmicos analisados foram condizentes com o descrito nestes (ANVISA, 2019b; ARAÚJO, 2003; SOARES, 2011).

4.1.2.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

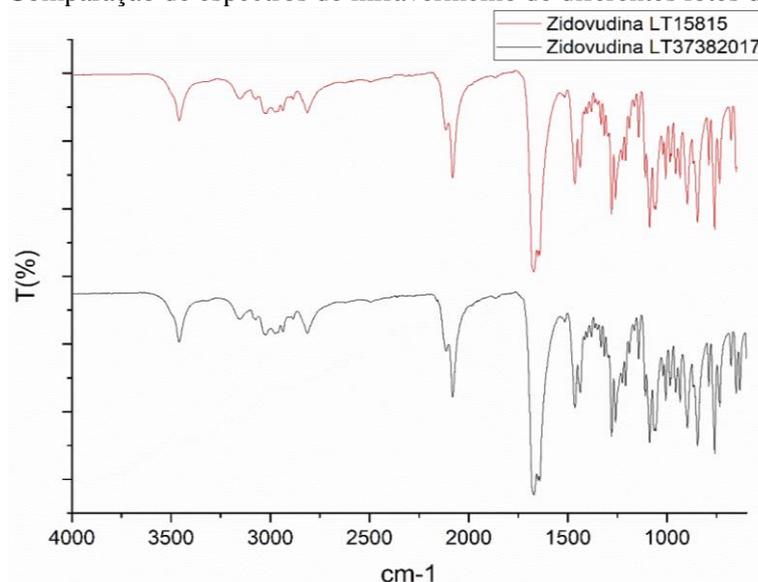
O espectro de Infravermelho da zidovudina mostra bandas de estiramentos na região de 3500-3200 cm^{-1} característicos de ligações O-H, o estiramento na região de 2081 próprio do grupamento azida (C=N=N=N), banda nas região de 1630-1600 cm^{-1} característicos de ligações de grupamento hidroxila.

Figura 16 - Espectro infravermelho da zidovudina.



O *fingerprint* obtido é próximo dos obtidos na literatura disponível, e está conforme com os espectros de diferentes lotes anteriormente obtidos (figura 17) (ANVISA, 2019b; ARAÚJO, 2003; SOARES, 2011).

Figura 17 - Comparação de espectros de infravermelho de diferentes lotes de zidovudina

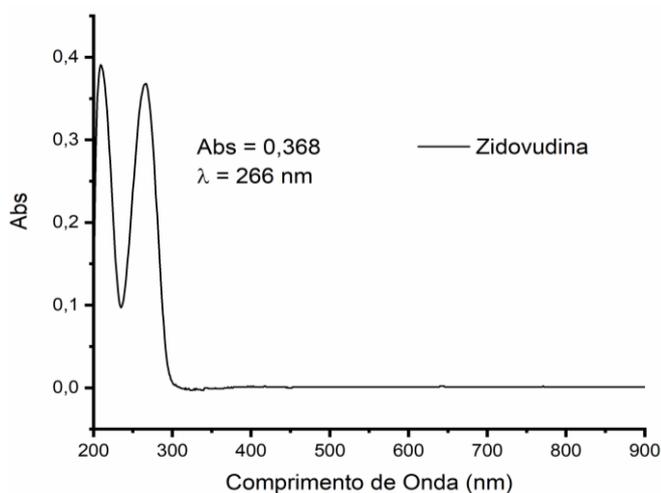


Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.2.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Para a zidovudina seguiu-se metodologia exposta na farmacopeia brasileira onde soluções mãe e filhas foram preparadas na concentração final de 10 µg/mL utilizando-se como solvente álcool etílico absoluto PA. A análise foi realizada em triplicata e os espectros obtidos analisados e plotados no aplicativo origin. Os espectros UV foram comparados aos obtidos por UPLC em estudos anteriores do grupo e tanto o perfil quanto picos de absorção foram condizentes com estes estudos e com a monografia do fármaco na farmacopeia brasileira.

Figura 18 – Espectro UV-Vis da Zidovudina



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

A absorvidade calculada foi de $0,0368 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. E o valor é referente a a luz absorvida no comprimento de onda de 266 nm, a uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ preparada em etanol absoluto.

4.1.2.4 Resumo de especificações

Tabela 5 - Resumo de especificações e conformidade da zidovudina lote LT 037382017

Parâmetros	Especificações (USP ou FB)	Resultado
Características físicas	Pó branco ou acastanhado	Conforme
Solubilidade	Levemente solúvel em água, solúvel em etanol	Conforme
Doseamento por CLAE	98% a 102%	99,5%
Infravermelho	O-H/C-N=N=N/C-OH/C=O	Conforme
Ponto de Fusão (Faixa de Fusão)	120-124°C	121,86°C
Varredura UV - Absortividade	Não especificado	$0,0368 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \lambda 266\text{nm}$

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

4.1.3 Efavirenz

O efavirenz é encontrado na forma de pó branco e possui peso molecular de 315,675 mg/ mol, formula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{C}_1\text{F}_3\text{NO}_2$ e possui um ponto de fusão na faixa de 139°C a 141°C, tem baixa solubilidade em água, se tornando um fármaco bastante complicado de ser trabalhado (RADESCA et al., 2004) . As características do pó analisado estavam de acordo com o relatado na literatura.

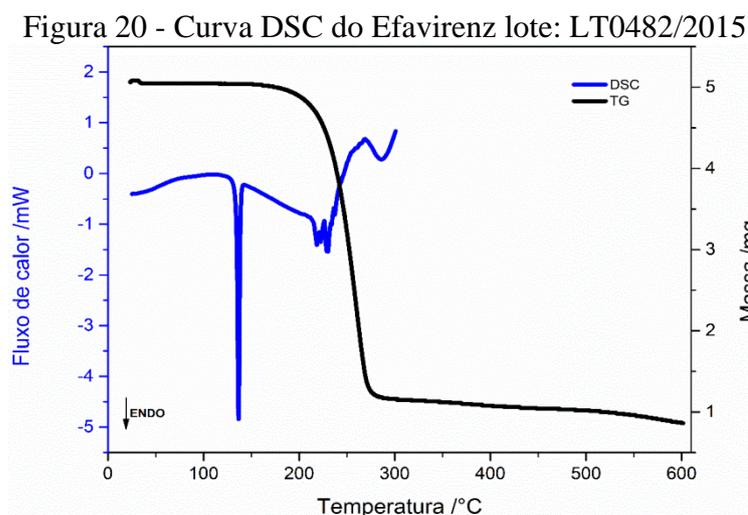
Figura 19 - Efavirenz em pó.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.1.3.1 Análise Térmica

As curvas TG e DSC do Efavirenz estão apresentadas na Figura 18. A curva DSC do efavirenz mostra que a substância é estável até a temperatura de 134,83°C sem apresentar nenhuma variação de massa. Podemos observar a presença de 3 eventos térmicos principais, sendo que apenas 2 são de interesse, o primeiro ocorre em uma pequena faixa de temperatura entre 134,83-136,66°C, um segundo que se inicia na faixa 191°C-211,03°C em conjunto com a estabilização da linha de base e início da perda de massa na curva TG e tem por fim com outro pico exotérmico posto como referente a degradação térmica do efavirenz por volta de 255,82-294,72°C refletindo o evento de degradação. O pico endotérmico acentuado correspondente à fusão do IFA ocorre a uma temperatura de 136,04°C e em comparação frente à curva TG não foi observada alteração de massa no primeiro evento.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

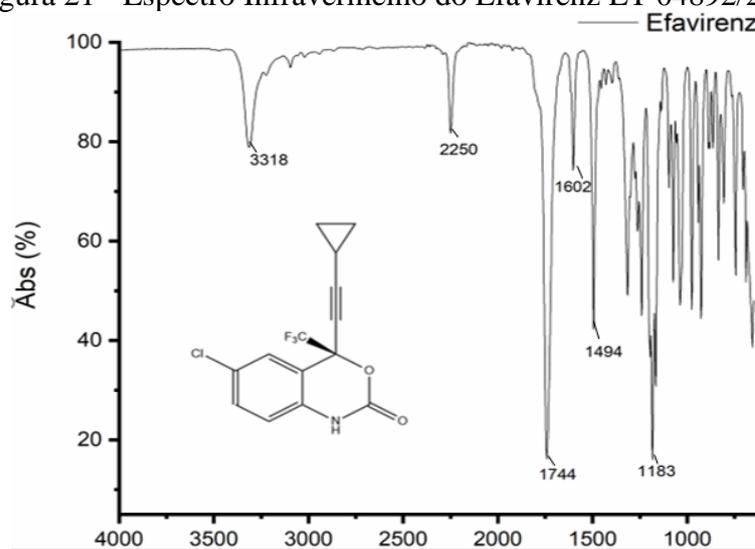
A curva DSC do efavirenz foi realizada com o objetivo de verificar a faixa de fusão do EFV na razão de 10°C.min⁻¹, os eventos térmicos observados na curva DSC do insumo ativo, como dito anteriormente, estão de acordo com os demonstrados nas curvas TG, onde foram visualizados 3 eventos 2 endotérmicos e 1 exotérmico o primeiro ocorre T_{onset}: 134,83°C até T_{endset}: 136,66°C (T_{peak} = 136,04°C, ΔH = -25,58 J/g) e demonstra um pico endotérmico que corresponde a faixa de fusão do efavirenz. Após esse evento também foram observados mais 2 eventos um exotérmico e outro endotérmico, o evento exotérmico segundo a literatura é o responsável pela degradação do efavirenz e ocorre na faixa de 275,82-383,54°C (ΔH=

770,50J/g). A pureza calculada do efavirenz lote 0482/2015 foi de 99,69%. A partir de 191°C até valores de 211,03°C são condizentes com os dados do TG para a degradação térmica do efavirenz. Nesta mesma faixa foram observados valores de em média 73% de perda de massa.

4.1.3.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

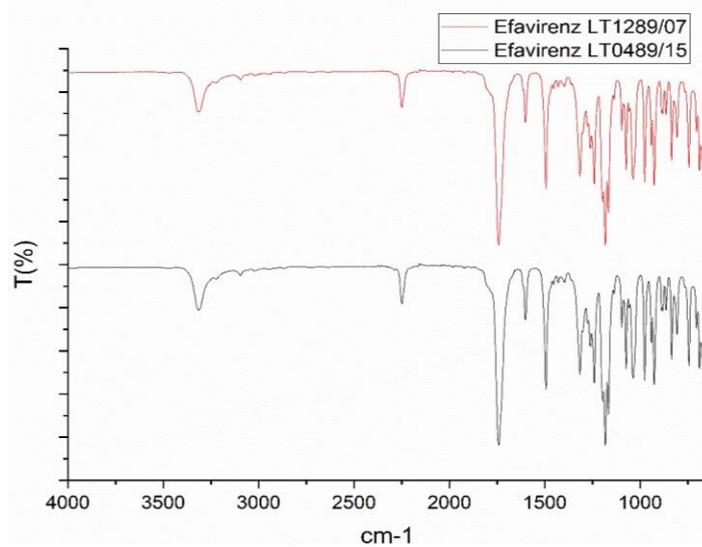
No espectro IV do efavirenz (Figura 21) é possível se observar as deformações inerentes a estrutura molecular do fármaco, era necessária a observação das deformações referentes ao grupamento carbonila, amida 1 e 2, as ligações coordenadas na cadeia lateral, e o CF₃ ligado ao anel aromático (1183 cm⁻¹), foi possível observar a presença das bandas características ao efavirenz como às referentes ao estiramento N-H (3318 cm⁻¹), Vibração do estiramento de alquino (2250 cm⁻¹), o estiramento característico de carbonilas (1744 cm⁻¹) e os estiramentos dos alcenos do anel aromático (1494 e 1604 cm⁻¹).

Figura 21 - Espectro Infravermelho do Efavirenz LT 04892/2015



O espectro foi comparado com os estudos de Soares, e a semelhança entre os resultados valida o *fingerprint* da molécula com os estiramentos próprios do efavirenz (KURMI et al., 2018; SOARES, 2011).

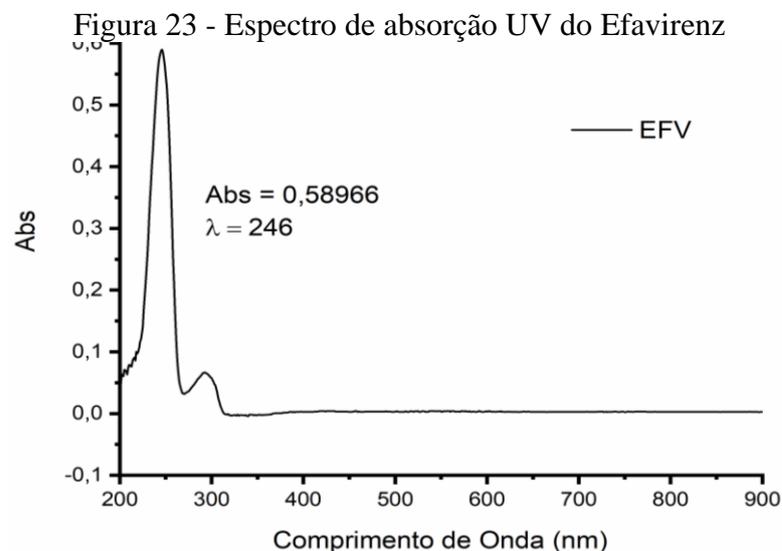
Figura 22 - Comparação de Espectros de infravermelho de diferentes lotes de efavirenz.



Fonte: Dados da Pesquisa

4.1.3.3 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Procedeu-se conforme descrito em Espectrofotometria de absorção no ultravioleta na farmacopeia brasileira. Pesou-se, com exatidão, 50 mg de amostra e solubilizou-se em álcool metílico. Completar o volume para 50 mL com o mesmo solvente. Diluiu-se, sucessivamente, em álcool metílico, até concentração de 0,001% (p/v), ou 10 μ g/mL. Realizou-se a análise da solução amostra resultante, em 247 nm, utilizando álcool metílico para ajuste do zero.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

A absorvidade calculada foi de $0,58966 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. E o valor é referente a a luz absorvida no comprimento de onda de 246 nm, a uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ preparada em metanol PA.

4.1.3.4 Resumo de especificações

Tabela 6 - Resumo de especificações e conformidade do Efavirenz lote LT 0482/2015

<i>Parâmetros</i>	Especificações (USP ou FB)	Resultado
<i>Características físicas</i>	Pó branco a levemente róseo	Conforme
<i>Solubilidade</i>	Praticamente insolúvel em água, solúvel em metanol	Conforme
<i>Doseamento por CLAE</i>	98% a 102%	99%
<i>Infravermelho</i>	Não especificado	Conforme
<i>Ponto de Fusão (Faixa de Fusão)</i>	136°C-141°C	136,04 °C
<i>Varredura UV - Absortividade</i>	Não especificado	$0,58966 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.2 PRODUÇÃO E CONTROLE DOS COMPRIMIDOS

Os ensaios de produção e controle foram realizados no laboratório de tecnologia de medicamentos LTM. Os resultados dos controles de qualidade aplicados ao produto acabado estão apresentados na tabela abaixo, confirmando adequação do comprimido às especificações farmacopeicas.

Tabela 7 - Parâmetros de controle de qualidade de comprimidos ADF.

<i>Controles de Qualidade</i>	Especificação	Resultado
Peso Médio (Farmacopeia Brasileira 6ª edição)	900mg - Faixa de aceitação ($\pm 5\%$) 855 a 945 mg	Média: 923,495mg DP: 0,1393 mg CV: 1,51%
Dureza (Farmacopeia Brasileira 6ª edição)	-	Média: $14,042 \pm 1,30$
Friabilidade (Farmacopeia Brasileira 6ª edição)	$\leq 1,5\%$	0,139%
Desintegração (Farmacopeia Brasileira 6ª edição)	$\leq 30\text{min}$	20-22min
Doseamento (CLAE – MIE)	100% ($\pm 10\%$)	Zidovudina - $95\% \pm 0,16$ Lamivudina - $91,7\% \pm$

		0,69
		Efavirenz- 97% ± 0,36

Fonte: Dados da pesquisa (2020). Legenda: DP = desvio padrão absoluto; CV = coeficiente de variação.

4.3 OTIMIZAÇÃO DE MIE

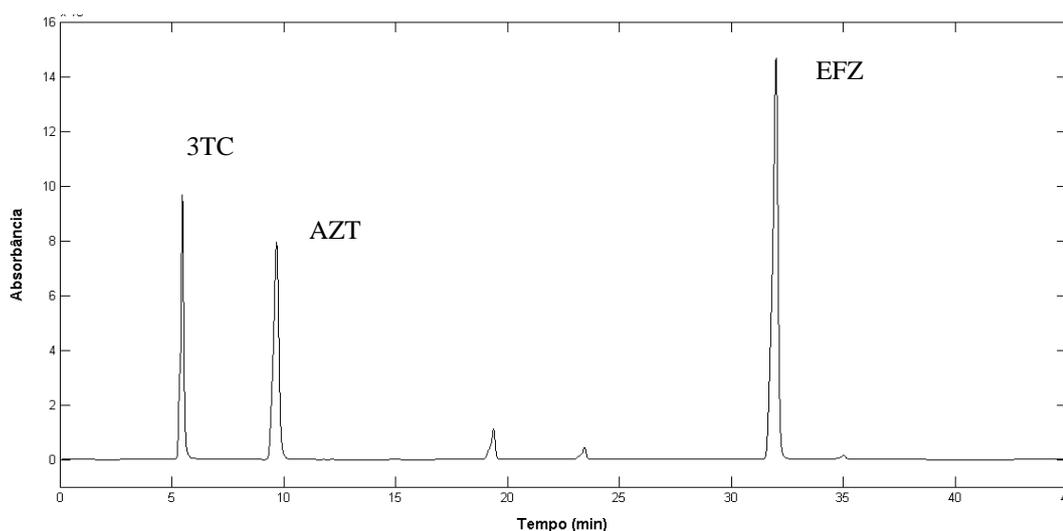
Ao longo do processo de otimização do método indicativo de estabilidade, diversas alterações do método original foram testadas. Abaixo seguem especificações do método iniciado por Soares (2011) apresentado na tabela 8, e melhorado ao longo do trabalho.

Tabela 8 – Gradiente para MIE de comprimido ADF

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)	Fluxo (mL/min)
0	20	80	1,2
11	80	20	1,2
12	80	20	1,5
28	50	50	1,5
30	20	80	1,0
35	20	80	1,0

Fonte: Soares (2011)

Figura 24 - Cromatograma referente a análise de comprimido associação dose fixa obtido por método de Soares, 2011



Fonte: Soares, 2011

O uso deste método não demonstrou capacidade de reprodução, visto que os picos obtidos ao longo dos testes não reproduziam tempo de retenção, sendo necessário inicialmente uniformizar o fluxo da fase móvel durante toda a análise.

Com a troca do aparelho utilizado para um cromatógrafo líquido de ultra eficiência, a conformação do fluxo para $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi realizada, e posteriormente por estudo anterior reduzida novamente para $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Com a mudança do fluxo um novo tempo de análise foi requerido este aumentando para um tempo de 45min conforme tabela 9 apresentando gradiente e fluxo utilizados por Rosa (2019).

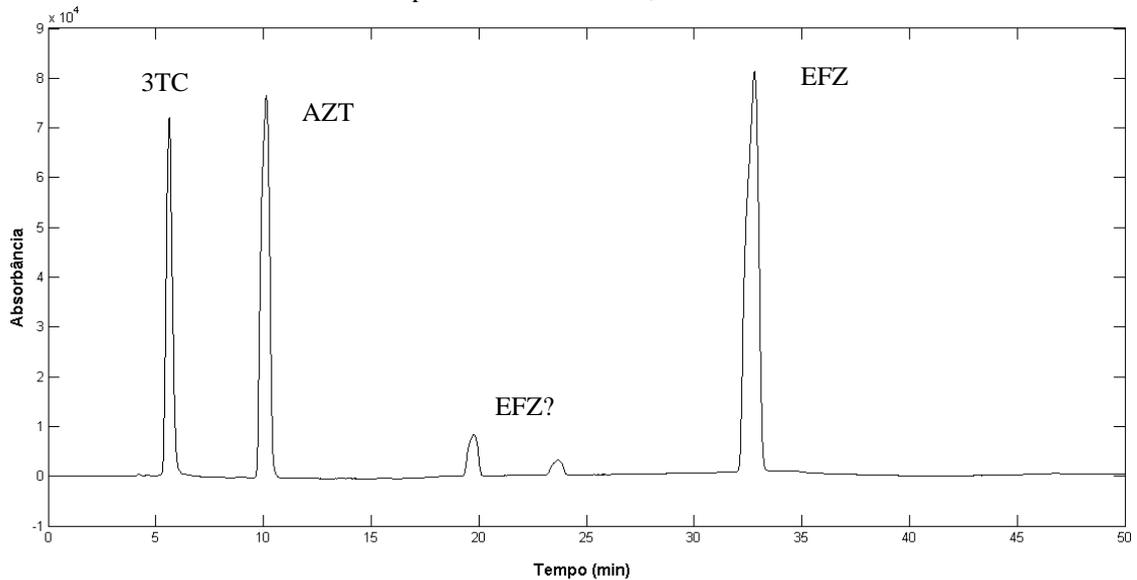
Tabela 9 - Metodologia proposta por Rosa, 2019

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)	Fluxo (mL/min)
0	20	80	0,5
30	80	20	0,5
40	20	80	0,5
45	20	80	0,5
STOP	20	80	0,5

Fonte: Rosa, 2019

A partir da metodologia proposta por Rosa, 2019 um novo cromatograma foi obtido. Na avaliação da adequabilidade do método desenvolvido, os parâmetros de fator de cauda e desvio padrão (DP) relativo estão dentro dos limites especificados, mas os parâmetros de resolução e fator de separação para o pico situado em 5,632 min estão abaixo do recomendável, variando de 0 a 3,4 e de 0 a 1,7, respectivamente. Segundo o Guia de Validação de Métodos Cromatográficos (USA, 1994), os parâmetros de fator de separação (acima de 2), resolução (acima de 2), desvio padrão relativo (menor ou igual a 1% para $n \geq 5$) e fator de cauda (menor ou igual a 2) são recomendados para teste de adequabilidade do sistema para métodos indicativos de estabilidade.

Figura 25 - Cromatograma referente a análise de comprimido associação dose fixa degradado obtido por método de Rosa, 2019

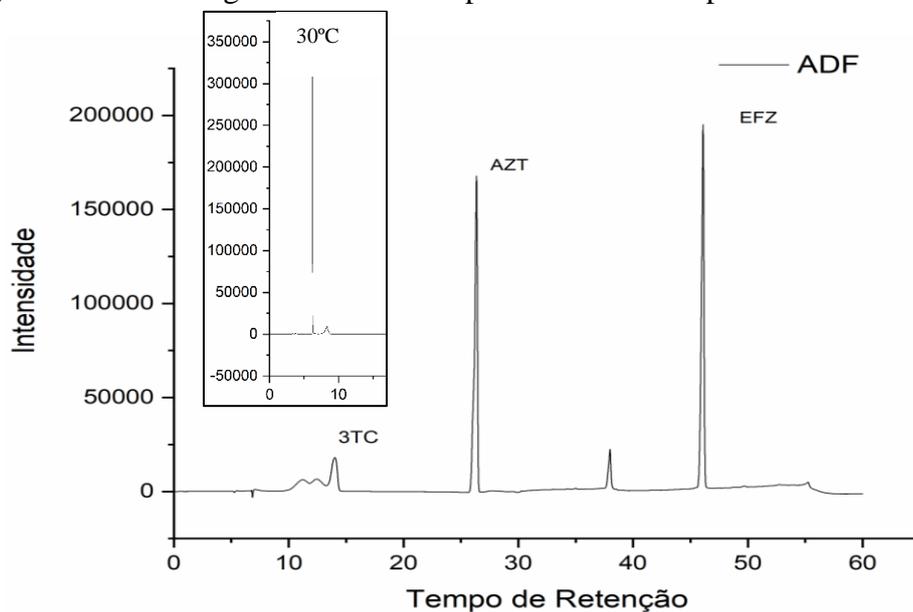


Fonte: Rosa,2019

Seguindo-se planejamento de otimização de método começamos as alterações nas temperaturas de forno, a temperatura no forno da coluna altera maleabilidade das ligações de carbono presentes na fase estacionária da coluna. Por muitas vezes o aumento de temperatura do forno é utilizado para recuperação de colunas visto que é um bom mecanismo para “afrouxar” as ligações e retirar resíduos não esperados da coluna.

No desenvolvimento do método a presença do fator calor alterou a saída (Figura 26) dos ativos de forma que picos que dantes se mostravam uniformes começaram a sair de forma abaulada, com áreas de absorção fora do contexto da análise. O uso de temperatura controlada de 30° demonstrou ser o de melhor empregabilidade para o MIE visto que com maior maleabilidade dos carbonos das colunas melhor a seletividade.

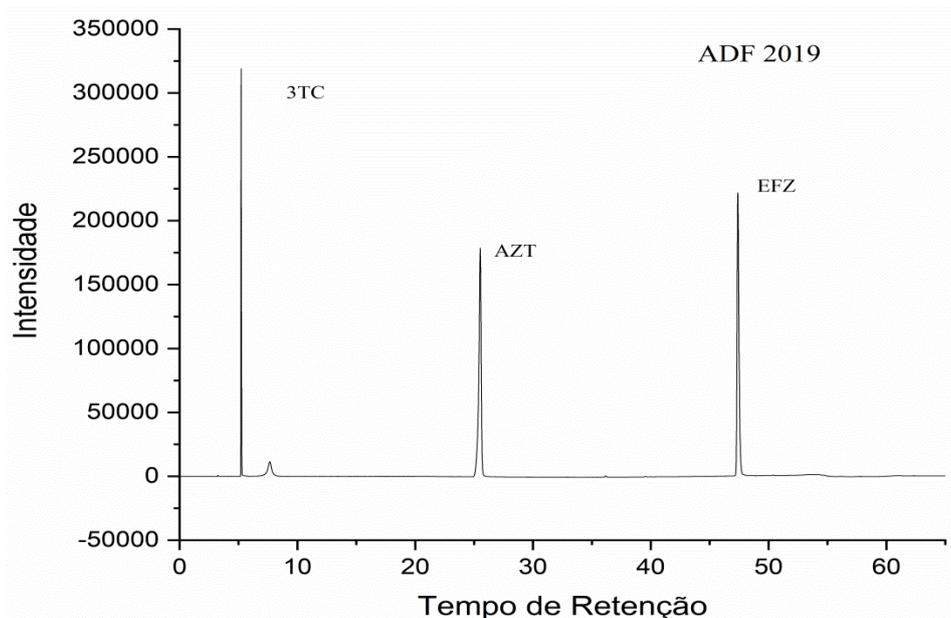
Figura 26 - Cromatograma teste de temperatura 40°C comparado com teste a 30°C



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Durante o processo de otimização outro parâmetro alterado foi o fluxo de fase móvel na coluna, o fluxo consiste em quanto de mistura de solventes por minuto passará pela coluna, alterações nesse parâmetro costumam alterar parâmetros como pressão, em fluxos mais elevados a pressão costuma (a depender do gradiente de fases) se elevar. Com aumento do fluxo o esperado é antecipação, melhora na simetria e repetibilidade de picos. Um problema a ser observado seria a sobreposição destes, alterando pureza de um determinado pico. O fluxo de $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ se mostrou o melhor por manter picos bem separados e simétricos conforme figura 25.

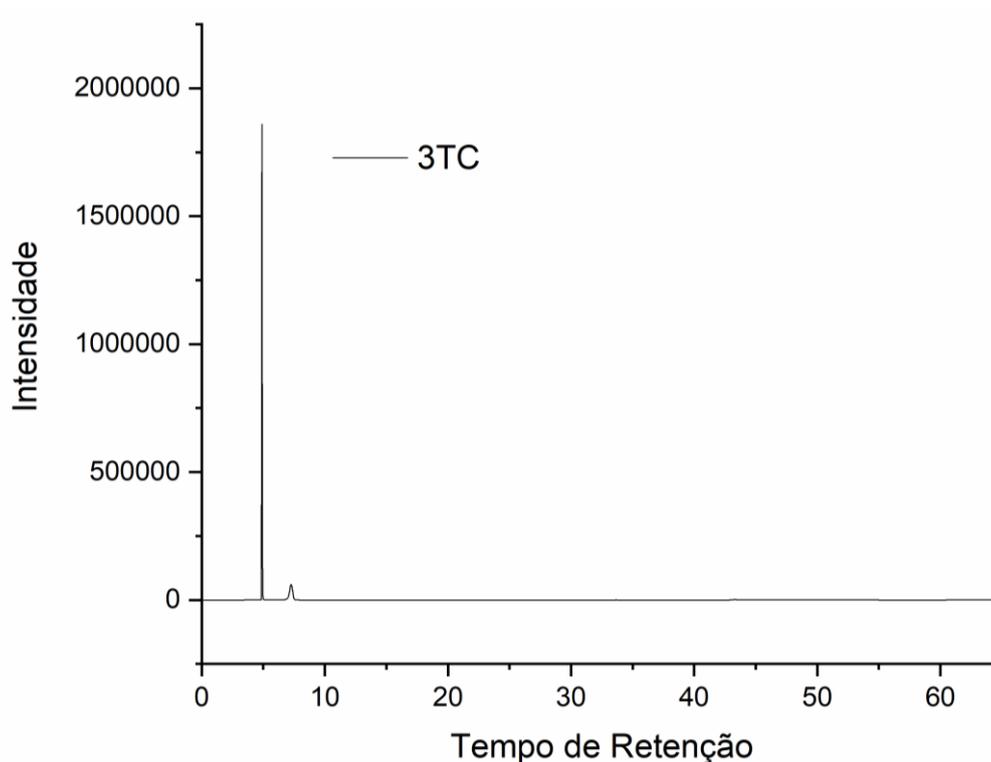
Figura 27 - Cromatograma obtido a partir de análise de comprimido associação dose fixa produzido em 2019 com fluxo de fase móvel de $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$



Fonte: Dados da Pesquisa (2019)

As mudanças no gradiente foram realizadas para melhora de pureza do pico de Lamivudina, em um primeiro momento diversos testes foram realizados com o insumo puro para doseamento do mesmo para outras etapas da dissertação. Quando posto de forma isolada e utilizando-se do mesmo método de preparo de amostra, a Lamivudina se comportava de forma reprodutível com picos simétricos e bem delineados mas impuros, entretanto como os testes eram realizados em triplicata por *vial*, na segunda coleta se observa o surgimento de outro pico próximo a lamivudina.

Figura 28 - Teste de Gradiente utilizando lamivudina pura.

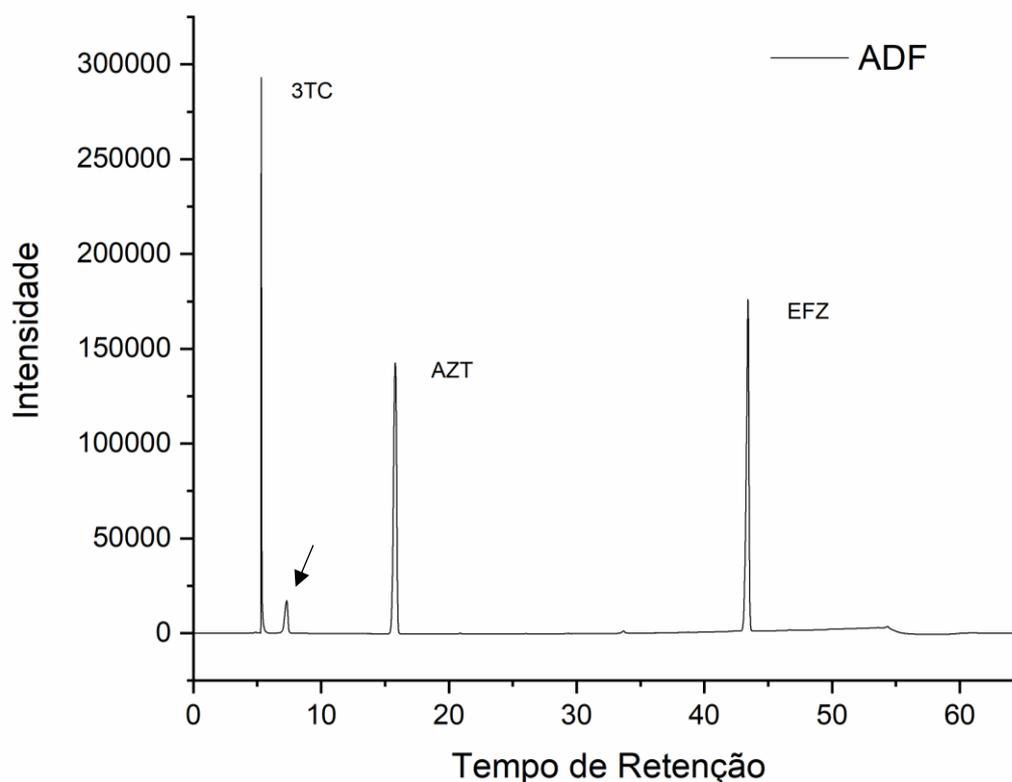


Fonte: Dados da pesquisa (2019)

As avaliações de teor de amostra foram realizadas a um fluxo de $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e seguindo gradiente sugerido “tipo 1” com fase móvel mais apolar, após cálculos matemáticos avaliou-se por UPLC que a pureza da lamivudina, como dito anteriormente era de aproximadamente 98,7%.

A mudança de gradiente de fase móvel visou principalmente a separação deste pico (Figura 23). Em todas as alterações na primeira análise o pico se mantinha único e com pureza de $0,9997 \pm 0,0005$, cogitou-se degradação por hidrólise da Lamivudina, mas a literatura disponível para estudos de degradação forçada não indicavam sinais de degradação por hidrólise em temperatura ambiente, apenas alterações na pureza do pico e instabilidades na linha de base em análises realizadas após 72h a 80°C , e estudos mais recentes já falam da instabilidade desse ativo em solução aquosa acidificada e básica (KONARI; JACOB, 2016). De toda a forma o presente estudo não se propôs a avaliar as mudanças de pH durante a otimização de método indicativo de estabilidade, se abstendo da realização de aferição de pH com o intuito de avaliar possível degradação em solução. Ademais a pureza de pico e perfil de absorção atestavam que o ponto era relativo a lamivudina.

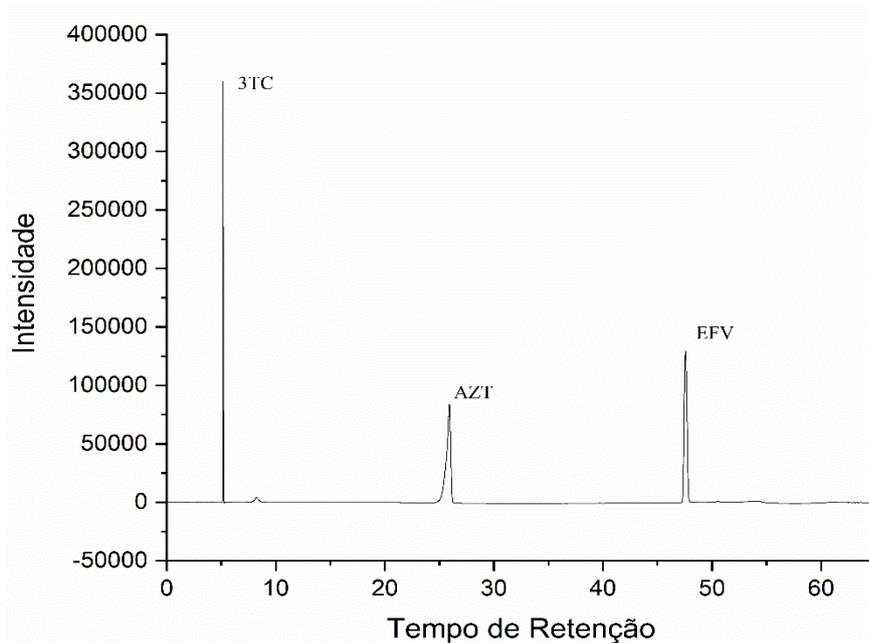
Figura 29 - Teste de alteração de Gradiente Tipo 1 utilizando comprimido ADF.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

A alteração no preparo da amostra visou diminuir instabilidades e possíveis degradações por hidrólise neutra. Como evidenciado anteriormente, a Lamivudina apresentou impurezas quando passava longos tempos em solução. O preparo da amostra utilizando menores quantidades de água foi realizado, em um primeiro momento preparou-se completamente a amostra em ACN conforme figura 29, esta demonstrou uma boa estabilidade, mas por ser altamente volátil nos testes de duplicata de *vial* observou-se alteração na intensidade de absorção. Com cálculo proporcional de intensidade de Pico principal de lamivudina *versus* pico adjacente, a proporção era de 1,63% do total do pico proposto para a lamivudina. A intensidade de absorção é o parâmetro analítico mais delicado e um dos mais importante para quantificação e validação do método, quando este sofria alguma alteração na mudança do método esta era descartada. Mesmo com uma maior instabilidade da lamivudina em meios aquosos na presença de outros ativos, optou-se por manter o preparo utilizando-se mistura de ACN:H₂O (50:50).

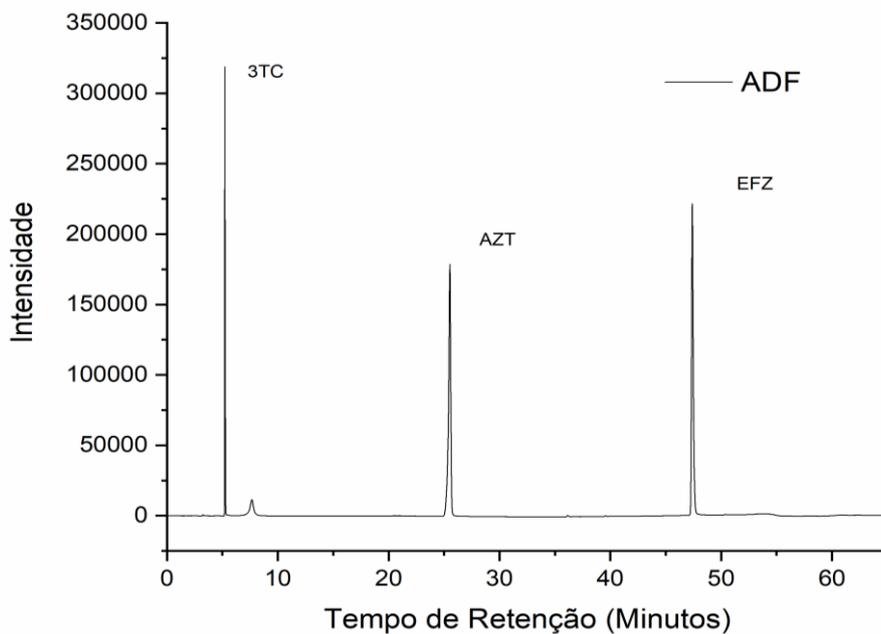
Figura 30 Teste de preparo de amostras de comprimido associação dose fixa utilizando apenas acetonitrila.



Fonte: Dados da pesquisa (2019)

O cromatograma obtido (Figura 29) com o método escolhido apresentou boa separação entre os ativos, com pureza de pico estimada de 0,9998 para Lamivudina e 1,000 para Efavirenz e Zidovudina, o número de pratos teóricos, que afere a interação de cada analito com a coluna, de cada pico ficou dentro do esperado (Tabela 11). O método utilizou como parâmetros o preparo de amostra como descrito em metodologia (Tabela 10), fase móvel gradiente tipo 2, fluxo de $0,6\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, e temperatura de forno de 30°C , totalizando um tempo de 65 min de análise.

Figura 31 – Cromatograma obtido através do método escolhido



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 10 - Parametros utilizados no método otimizado.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)	Fluxo (mL/min)	Temperatura
0	10	90	0,6	30°C
15	10	90	0,6	
50	90	10	0,6	
55	10	90	0,6	
65	10	90	0,6	

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 11 - Dados Cromatográficos obtidos com a alteração de método para comprimido associação dose fixa combinada.

	Volume de injeção	Tempo de Retenção	Área	Pureza de Pico	Pratos Teóricos	Resolução
Lamivudina	20µl	5,219 min	926306	0,9995 ±0,0005	53843	2.229
Zidovudina	20µl	25,518 min	2469656	1,0000	88896	1.216
Efavirenz	20µl	47,388 min	2411107	1,0000	426195	1.091

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Ademais, o Quadro 6 resume as avaliações que foram feitas de cada alteração nos métodos testados e demarcação (em negrito) dos parâmetros escolhidos.

Quadro 6 - Resultados das alterações no método indicativo de estabilidade

Alteração	Parâmetro modificado	Código	Resultado	Desfecho
Método	Temperatura	T40	Negativo	Abaulamento de pico
		T30	Igual	Parâmetro inicial
	Fluxo	0,5	Igual	Parâmetro inicial
		0,4	Negativo	Maior tempo de análise necessário
		0,6	Positivo	Melhor separação e seletividade
	Mistura Isocrática	Tipo 1	Positivo	Melhor seletividade
		Tipo 2	Igual	Parâmetro inicial
Preparo	Proporção do diluente	100% ACN	Positivo	Melhora na intensidade de pico
		50/50	Igual	Parâmetro inicial

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.4 VALIDAÇÃO DE MIE

A validação de métodos é a forma colocada pelos órgãos reguladores para assegurar que determinado método possui credibilidade ou não. É definido como o processo que fornece evidência documentada de que o método fornece aquilo que é proposto e indicado a fazer. Para tal, foram realizados os testes referentes aos parâmetros estabelecidos pela resolução disponibilizada pela ANVISA (RDC 166/2017).

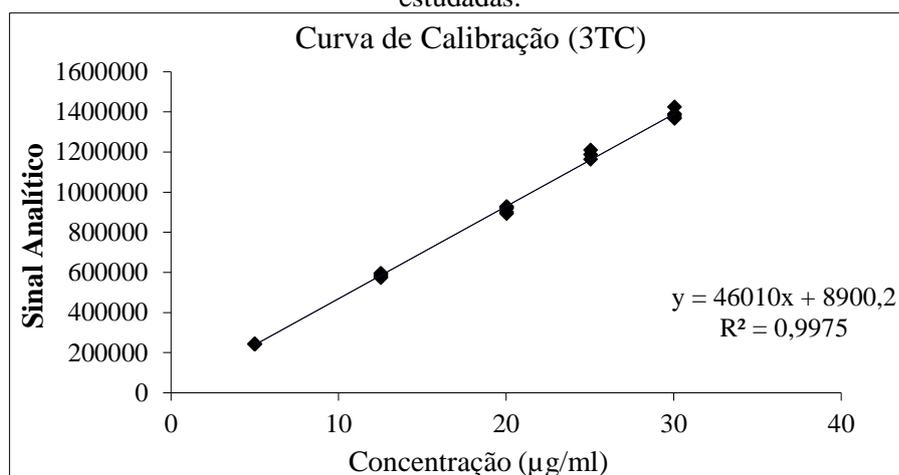
4.4.1 Linearidade

O procedimento da RDC preconiza a obtenção da curva de calibração com pelo menos cinco pontos, em triplicata, para a verificação do comportamento linear. Pode-se observar que quanto maior a concentração das amostras, maior a integral de área do pico dos ativos, como exposto nas figuras 30, 31 e 32 através da média das três curvas obtidas (Tabelas 12,13 e 14), comprovando a linearidade do método e sendo possível a obtenção da equação da reta e o valor de R^2 para cada fármaco avaliado. Estando os resultados de acordo com o preconizado pela ANVISA, que determina um valor de r^2 igual ou acima de 0,99 e os valores do Desvio Padrão Relativo (DRP) até 5% (Tabela 12) (ANVISA, 2017).

Adicionalmente, foram obtidos os limites de detecção e quantificação, que correspondem à menor concentração capaz de detectar e quantificar os IFA no método validado nestas condições (Quadros 7,8 e 9).

4.4.1.1 Lamivudina

Figura 32 - Curva de calibração da Lamivudina (3TC) obtida com análise de variância das amostras estudadas.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 12 - Valores obtidos para cada curva de calibração da Lamivudina contida no comprimido ADF

		Concentrações (µg/ml)				
		5,01	12,525	20,04	25,05	30,06
Sinal analítico	Curva 1	244907	578803	894586	1211752	1384700
	Curva 2	243208	575188	901754	1164753	1368250
	Curva 3	244057	596865	920287	1188252	1390767
	Desvio Padrão	849,50	9155,51	15589,87	23499,50	22656,67
	DPR (%)	0,35	1,56	1,70	1,98	1,63

Fonte: Dados da pesquisa (2020). Legenda: DPR= Desvio Padrão Relativo.

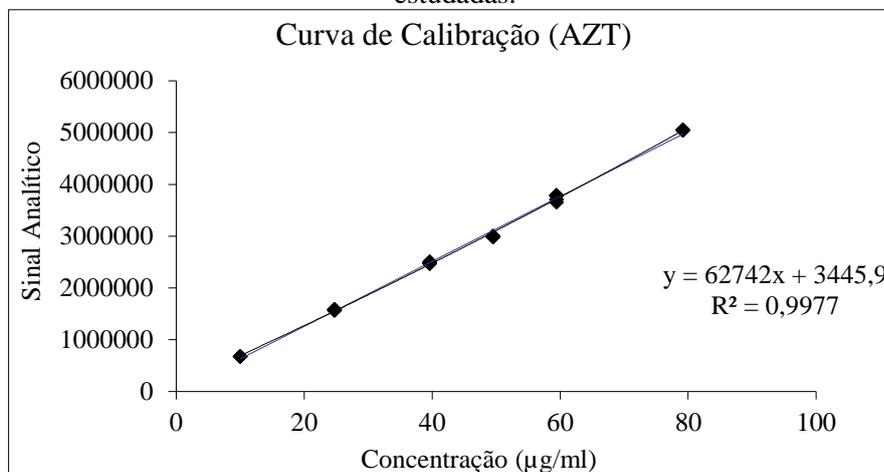
Quadro 7 - Características analíticas obtidas pelo método proposto para Lamivudina.

Parâmetros	
a₀ – Coeficiente Linear	8900,16
a₁ – Coeficiente Angular	46010,31
R²	0,9975
Limite de Detecção (LD)	3,6782 µg/ml
Limite de Quantificação (LQ)	4,0486 µg/ml

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.4.1.2 Zidovudina

Figura 33 - Curva de calibração do Zidovudina (AZT) obtida com análise de variância das amostras estudadas.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 13 - Valores obtidos para cada curva de calibração da Zidovudina contida no comprimido ADF.

	Concentração (µg/ml)						
	9,99	24,75	39,64	49,5	59,4	79,2	
Sinal analítico	Curva 1	671736	1566933	2469656	2998318	3775043	5049598
	Curva 2	674161	1562712	2469597	2999058	3782880	5041324
	Curva 3	672948	1590069	2486682	2988141	3655487	5045461
	Desvio Padrão	1212,50	11007,30	16460,66	9865,48	57745,61	4137,00
	DPR (%)	0,18	0,70	0,66	0,33	1,54	0,08

Fonte: Dados da pesquisa (2020); DPR: Desvio Padrão Relativo

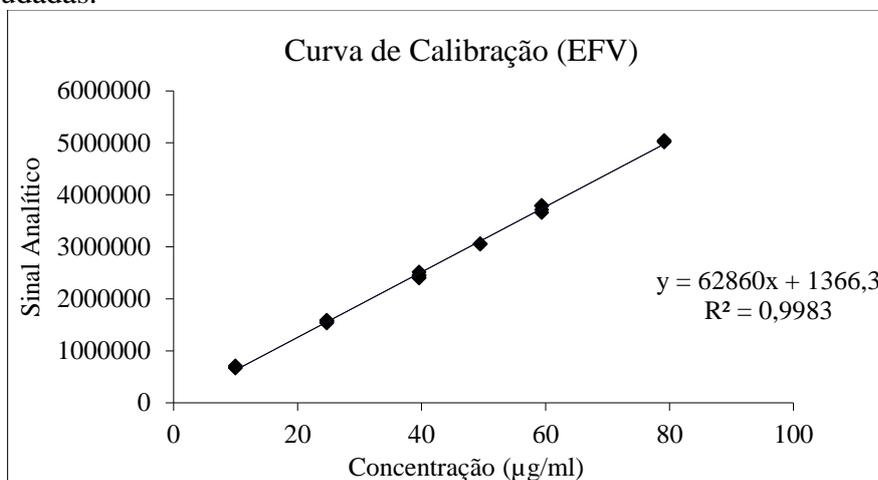
Quadro 8 - - Características analíticas obtidas pelo método proposto para Zidovudina.

Parâmetros	
a₀ – Coeficiente Linear	3445,90
a₁ – Coeficiente Angular	62741,57
R²	0,9977
Limite de Detecção (LD)	7,88 µg/ml
Limite de Quantificação (LQ)	8,842 µg/ml

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.4.1.3 Efavirenz

Figura 34 - Curva de calibração do Efavirenz (EFV) obtida com análise de variância das amostras estudadas.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 14- Valores obtidos para cada curva de calibração do efavirenz contido no comprimido ADF.

	Concentração (µg/ml)						
	9,99	24,75	39,64	49,5	59,4	79,2	
Sinal analítico	Curva 1	707217	1544722	2411107	3048267	3780185	5014938
	Curva 2	667903	1535017	2399329	3058107	3802117	5048244
	Curva 3	687557	1581388	2513510	3053187	3655487	5031591
	Desvio Padrão	19657,00	22625,63	44845,55	4920,00	62255,56	16653,00
	DPR (%)	2,86	1,45	1,83	0,16	1,66	0,33

Fonte: Dados da pesquisa (2020). Legenda: DPR= Desvio Padrão Relativo.

Quadro 9 - Características analíticas obtidas pelo método proposto para Efavirenz.

Parâmetros	
a₀ – Coeficiente Linear	1366,31
a₁ – Coeficiente Angular	62860,50
R²	0,9983
Limite de Detecção (LD)	6,8720 µg/ml
Limite de Quantificação (LQ)	7,6577 µg/ml

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.4.2 Precisão e Exatidão

A precisão analítica é avaliada a partir da realização de ensaio referentes à repetibilidade e precisão intermediária, que devem expressar a proximidade dos resultados

obtidos nas mesmas condições e equipamento e por dois analistas em dias diferentes, para contemplar a questão da precisão dos resultados. A repetibilidade é descrita como a capacidade do método em responder de forma constante à diversas análises, sob as mesmas condições e parâmetros.

As amostras foram analisadas consecutivamente, em triplicata, oriundas de diferentes soluções de trabalho, utilizando a concentração de trabalho (40µg/ml) e os pontos próximos (25µg/ml e 60 µg/ml). Como resultados analíticos (Tabelas 15-18), foram avaliadas as concentrações de Lamivudina, Zidovudina e Efavirenz correlacionadas com a área obtidas para a obtenção dos valores de concentração requerida versus a de referência. Estando os resultados obtidos de acordo com a resolução 166/2017.

Determinou-se a exatidão dos resultados analíticos em três diferentes concentrações (menor: 25 µg/mL, intermediária: 40 µg/mL e maior 60 µg/mL), escolhidas em relação a curva de calibração, descrita no item referente a linearidade. Nas tabelas de 15 a 18 é possível visualizar os valores de exatidão, DP, DPR%. Para atestar a exatidão de um método analítico, usa-se a comparação entre o resultado de referência e aquele obtido na prática (concentração predita), permitindo comprovar a proximidade destes valores. Os valores de exatidão sempre se mantiveram no limite máximo estabelecido exceto em duas curvas de precisão intermediária onde valores de exatidão de 12% foram obtidos, o fato pode ter ocorrido por erros de manipulação ou pesagem, tornando-se necessária novos doseamentos de precisão intermediária.

4.4.2.1 Lamivudina

Tabela 15 - Valores de repetibilidade obtidos para os três níveis de concentrações (µg/ml) de comprimido associação dose fixa (3TC).

Repetibilidade			
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Exatidão (%)
1	13,2195	12,5250	5,5448
2	12,6394	12,5250	0,9131
3	12,7559	12,5250	1,8436
4	12,7559	12,5250	1,8436
5	12,8427	12,5250	2,5363
Média	12,8427		
DP	0,22		
DPR(%)	1,73		
1	19,3615	20,0200	-3,2892
2	19,5179	20,0200	-2,5082
3	20,4473	20,0200	2,1343

4	20,1262	20,0200	0,5307
5	20,0634	20,0200	0,2169
Média	19,9033		
DP	0,45		
DPR(%)	2,27		
1	29,8490	30,0600	-0,7019
2	30,8825	30,0600	2,7362
3	29,6354	30,0600	-1,4125
4	29,8490	30,0600	-0,7019
5	30,0540	30,0600	-0,0200
Média	30,0540		
DP	0,49		
DPR(%)	1,62		

Dados da Pesquisa (2020). Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 16 - Valores de precisão intermediária obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (3TC).

Precisão Intermediária			
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Exatidão (%)
1	11,0120	12,5250	-12,0795
2	12,3140	12,5250	-1,6846
3	11,2541	12,5250	-10,1469
Média	11,5267		
DP	0,69		
DPR(%)	6,01		
1	19,1592	20,0200	-4,2999
2	19,9854	20,0200	-0,1730
3	19,5723	20,0200	-2,2364
Média	19,5723		
DP	0,41		
DPR(%)	2,11		
1	27,7855	30,0600	-7,5665
2	29,5414	30,0600	-1,7252
3	27,9075	30,0600	-7,1605
Média	28,4115		
DP	0,98		
DPR(%)	3,45		

Fonte: Dados da Pesquisa (2020). Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo.

4.4.2.2 Zidovudina

Tabela 17 - Valores de repetibilidade obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (AZT).

Repetibilidade			
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Exatidão (%)
1	25,1291	24,9750	0,6170

2	25,2882	24,9750	1,2542
3	25,1499	24,9750	0,7002
4	24,8522	24,9750	-0,4917
5	25,1395	24,9750	0,6586
Média	25,1118		
DP	0,16		
DPR(%)	0,63		
1	39,5790	39,9600	-0,9536
2	39,4159	39,9600	-1,3617
3	39,9334	39,9600	-0,0665
4	39,3074	39,9600	-1,6330
5	39,3065	39,9600	-1,6354
Média	39,5084		
DP	0,26		
DPR(%)	0,66		
1	59,9210	59,9400	-0,0317
2	59,4524	59,9400	-0,8135
3	60,8973	59,9400	1,5970
4	59,9210	59,9400	-0,0317
5	60,0479	59,9400	0,1801
Média	60,0479		
DP	0,53		
DPR(%)	0,88		

Fonte: Dados da Pesquisa (2020). Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 18 - Valores de precisão intermediária obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (AZT).

Precisão Intermediária			
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Exatidão (%)
1	23,2153	24,7830	-6,3255
2	24,5710	24,7830	-0,8554
3	23,3302	24,7830	-5,8621
Média	23,7055		
DP	0,75		
DPR(%)	3,17		
1	39,2088	39,6528	-1,1197
2	41,1807	39,6528	3,8533
3	40,1948	39,6528	1,3668
Média	40,1948		
DP	0,99		
DPR(%)	2,45		
1	55,9686	59,4792	-5,9023
2	58,9670	59,4792	-0,8611
3	55,7019	59,4792	-6,3507
Média	56,8791		
DP	1,81		
DPR(%)	3,19		

Fonte: Dados da pesquisa (2020) Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo.

4.4.2.3 Efavirenz

Tabela 19 - Valores de repetibilidade obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (EFV).

Repetibilidade			
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Exatidão (%)
1	24,5540	24,7500	-0,7920
2	24,4004	24,7500	-1,4126
3	25,1343	24,7500	1,5526
4	25,2292	24,7500	1,9363
5	24,8441	24,7500	0,3803
Média	24,8324		
DP	0,36		
DPR(%)	1,44		
1	38,9000	39,6528	-1,8985
2	38,9400	39,6528	-1,7976
3	39,9000	39,6528	0,6234
4	38,8972	39,6528	-1,9054
5	38,9472	39,6528	-1,7795
Média	39,4253		
DP	0,54		
DPR(%)	1,37		
1	59,0146	59,4792	-0,7811
2	58,1311	59,4792	-2,2665
3	60,2420	59,4792	1,2825
4	59,0146	59,4792	-0,7811
5	59,1006	59,4792	-0,6366
Média	59,1006		
DP	0,75		
DPR(%)	1,27		

Fonte: Dados da Pesquisa (2020). Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo.

Tabela 20 - Valores de precisão intermediária obtidos para os três níveis de concentrações de comprimido associação dose fixa (EFV).

Precisão Intermediária				
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)
1	23,2153	24,7830	-1,5677	-6,3255
2	23,4451	24,7830	-1,3379	-5,3986
3	23,3302	24,7830	-1,4528	-5,8621
Média	23,3302			

DP	0,11			
DPR(%)	0,49			
1	39,2088	39,6528	-0,4440	-1,1197
2	41,1807	39,6528	1,5279	3,8533
3	40,1948	39,6528	0,5420	1,3668
Média	40,1948			
DP	0,99			
DPR(%)	2,45			
1	55,9686	59,4792	-3,5106	-5,9023
2	55,7019	59,4792	-3,7773	-6,3507
3	55,7019	59,4792	-3,7773	-6,3507
Média	55,7908			
DP	0,15			
DPR(%)	0,28			

Fonte: Dados da Pesquisa (2020). Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo

4.4.3 Robustez

A robustez avalia a capacidade do método de resistir à pequenas e deliberadas variações para os parâmetros analíticos, como parâmetro de confiabilidade para sua utilização, de acordo com as possíveis modificações nas respostas analíticas. Pode-se alterar diversos parâmetros e foram escolhidos para avaliação neste tópico os descritos no quadro.

Quadro 10 - Parametros avaliados na robustez.

Parâmetros	Condição Inicial	Condição Modificada
Composição Fase Móvel	10:90 (ACN:H ₂ O)	20:80 (ACN:H ₂ O)
Temperatura	30°C	40°C
Fluxo	0,6 ml.min ⁻¹	0,5 ml.min ⁻¹

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Dessa forma, podemos constatar através da tabela 14 os valores de DRP obtidos pelas médias das amostras analisadas. Sendo este dentro do padrão permitido, sendo considerado o método robusto.

Quadro 11 - Valores de desvio padrão relativo obtidos após avaliação de robustez do método.

Parâmetros	DPR(%) – 3TC/AZT/EFV
Varição Composição Fase Móvel	5,80% / 1,451 / 0,414
Temperatura	8,74% / 0,789 / 0,434
Fluxo	4,741% / 0,987 / 1,27

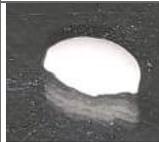
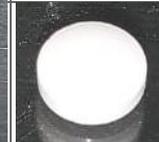
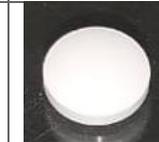
Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DE COMPRIMIDOS ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA

4.5.1 Avaliação das características organolépticas e físicas dos comprimidos ADF

As características organolépticas são de suma importância na avaliação primária da estabilidade de preparações farmacêuticas, mesmo desprovidas de avaliação analítica robusta e depender de avaliações subjetivas são necessárias nos estudos de estabilidade. Durante o tempo total de estudo mesmo com as adversidades, os comprimidos produzidos e submetidos a avaliação mantiveram características visuais semelhantes ao tempo “0” sendo um sinal de estabilidade do produto.

Quadro 12 - Aspecto visual dos comprimidos ao longo das coletas.

Parâmetros	1 ^a	2 ^a	3 ^a *	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Data Coleta	27/08/2019	20/09/2019	21/10/2019	23/11/2019	20/12/2019	05/02/2020
Aspecto	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
						

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Outro parâmetro avaliado, foi a dureza dos comprimidos. Por se tratar de um teste acelerado com umidade relativa do ar superior a 70%, a chance de infiltração de umidade no comprimido o tornando mais friáveis e susceptíveis a quebra. Segundo o quadro 12 podemos observar que a dureza se manteve ao decorrer do estudo acelerado.

Quadro 13 - Aspectos visuais e físicos dos comprimidos associação dose fixa submetidos a estudo de estabilidade acelerada.

Parâmetros	1 ^a	2 ^a	3 ^{a*}	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Data Coleta	27/08/2019	20/09/2019	21/10/2019	23/11/2019	20/12/2019	05/02/2020
Aspecto	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Dureza	15	12,9	15,3	17,166	15,125	17,8

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

4.5.2 Cálculo de teor dos comprimidos associação dose fixa de comprimidos submetidos ao estudo de estabilidade acelerada

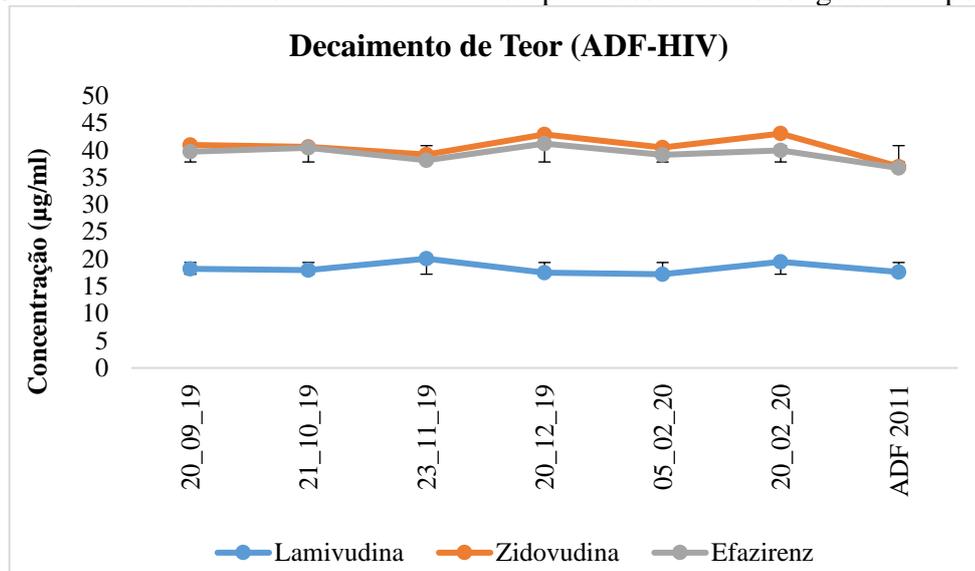
O método gráfico foi utilizado pra o estudo de teor dos comprimidos e avaliação da possível degradação dos IFA's presentes nos comprimidos submetidos às condições de estudo acelerado. As análises foram realizadas com doseamento de 2-3 comprimidos, pesados na forma de pó e/ou pedaços de comprimido e preparados 3 *vials* da mesma solução. Nos resultados obtidos foi realizado doseamento do teor do comprimido produzido por Soares em 2011, os resultados também estão apresentados de forma gráfica e tabela.

Tabela 21 - Dados de Teor e DPR referentes ao doseamento dos IFA's presentes nos comprimidos ADF de 2019 e 2011.

Data Coleta	Lamivudina		Zidovudina		Efavirenz	
	Teor (µg/ml) - Média	DPR (%)	Teor (µg/ml) - Média	DPR (%)	Teor (µg/ml) - Média	DPR (%)
20/09/2019	18,23	1,34	41,00	0,5828	39,77	0,3451
21/10/2019	17,95	0,07	40,63	0,7057	40,43	1,144
23/11/2019	20,02	0,71	39,23	0,1226	38,19	0,4345
20/12/2019	17,52	0,02	42,89	0,0443	41,24	0,04
05/02/2020	17,22	0,2391	40,50	-	39,1567	1,16
20/02/2020	17,28	0,1524	43,07	0,174	40,00	0,3039
ADF 2011	17,61	0,55	37,0256	1,2965	36,75	1,27

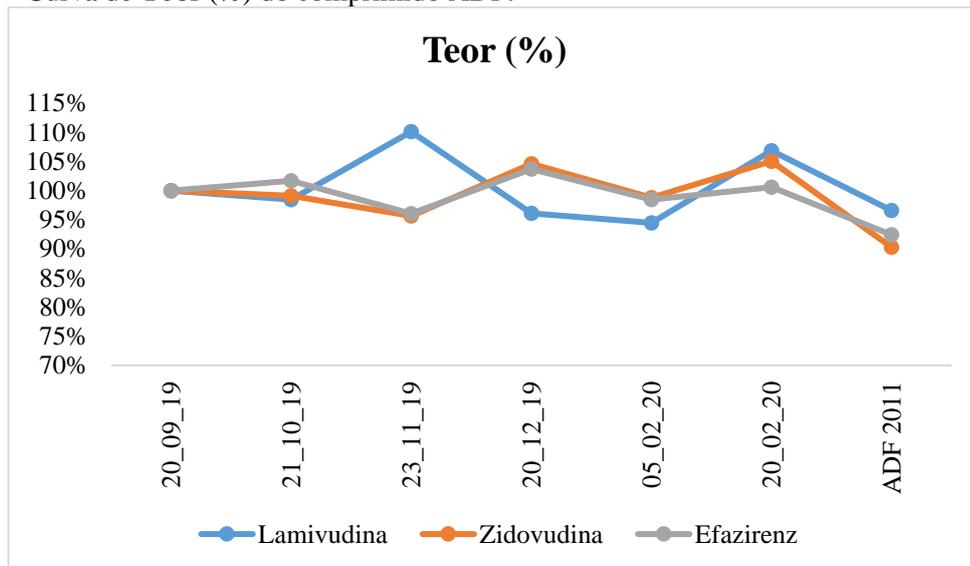
Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 35 - Decaimento de teor dos IFA's em comprimidos ADF ao longo do tempo.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 36 - Curva de Teor (%) do comprimido ADF.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

A partir dos resultados apresentados, os valores de teor não decaíram de forma elevada, na verdade o menor valor obtido de teor foi referente a lamivudina em sua penúltima coleta com valor de 94% de Teor presente no comprimido com relação aos valores obtidos no dia 20/09/19, demonstrando um prazo de validade em condições normais de pelo menos 2 anos visto que na estabilidade forçamos condições para a degradação do comprimido.

Ademais, os valores de teor do comprimido associação dose fixa de 2011, mantiveram valor de teor superiores a 90%, o doseamento do mesmo foi realizado em 2020, somando 9 anos de distância em condições de sala (Umidade 40-60% e temperatura de 20-30°C).

4.6 ESTUDO TÉRMICO DE ESTABILIDADE

Foram obtidas as curvas TG dos insumos farmacêuticos ativos e de comprimido ADF em diferentes razões de aquecimento (RZ). Devido a sua maior significância, a cinética foi obtida a partir do primeiro evento térmico, escolha baseada nas informações presentes na Tabela 22 que evidencia a temperatura inicial (Tonset) e final (Tendset) de degradação além do percentual de massa da amostra envolvido em cada razão testada. O estudo de estabilidade térmico foi realizado com os insumos isolados e em comprimido ADF produzido no ano de 2019.

Tabela 22 - Valores de temperatura e perda de massa referentes ao primeiro evento de degradação térmica dos fármacos isolados.

Evento 1				
	Fluxo de Calor (°C.min ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	Massa (%)
Lamivudina	Rz 2,5			
	Rz 5	243,24	275,59	50,092
	Rz 10	248,02	293,58	50,671
	Rz 15	263,64	299,26	52,61
	Rz 20	267,89	306,05	52,556
Zidovudina	Rz 2,5			
	Rz 5	213,05	231,44	34,973
	Rz 10	230,50	240,37	22,49
	Rz 15	226,63	247,35	23,91
	Rz 20	232,27	253,06	22,84
Efavirenz	Rz 2,5			
	Rz 5	221,42	255,17	74,48
	Rz 10	236,81	270,57	74,75
	Rz 15	242,74	278,67	74,176
	Rz 20	249,92	285,68	76,628

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 23 - Valores de temperatura e perda de massa referentes ao primeiro evento de degradação térmica do comprimido associação dose fixa.

Evento 1				
	Fluxo de Calor (°C.min ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	Massa (%)
ADF 2019	Rz 2,5	248,79	264,94	51,50
	Rz 5	251,62	287,97	48,91
	Rz 10	261,39	298,57	60,76
	Rz 15	271,36	309,79	56,99
	Rz 20	270,66	318,95	57,90

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

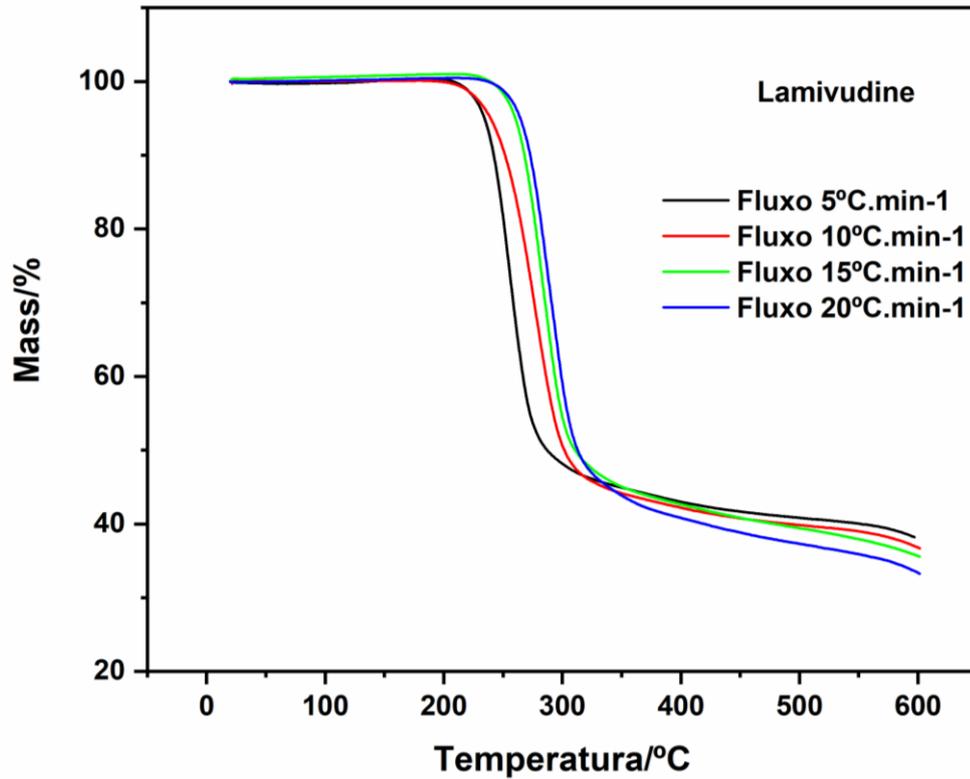
4.6.1 Curvas de termogravimetria não-isotérmica dos insumos ativos isolados.

Como disposto na metodologia foram realizadas curvas termogravimétricas em diferentes razões de aquecimento, sendo estas 2,5, 5, 10, 15, 20 °C.min⁻¹ para cada ativo isolado e para o comprimido ADF.

4.6.1.1 Lamivudina

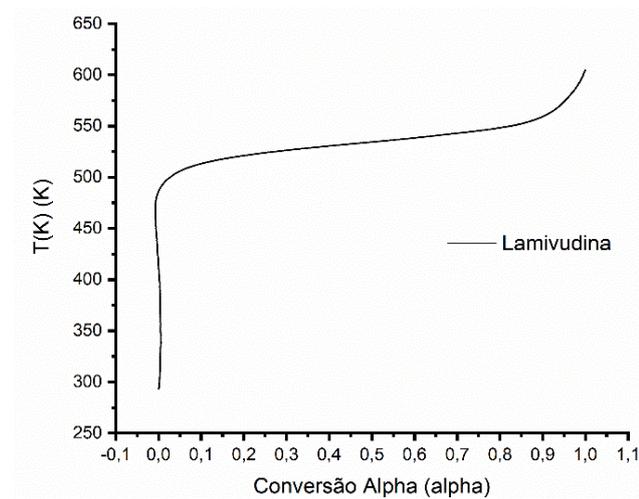
A partir da curva de TG da Lamivudina (Figura 37) e dos resultados demonstrados por ela, com o auxílio do DTA localizamos o início do evento térmico e calculamos a conversão α do ativo. A conversão alfa revela o quanto alteração ocorreu em relação a temperatura.

Figura 37 - Termograma da lamivudina em diferentes fluxos de aquecimento.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 38 - Conversão alfa da lamivudina a uma razão de aquecimento de 5°C.min⁻¹



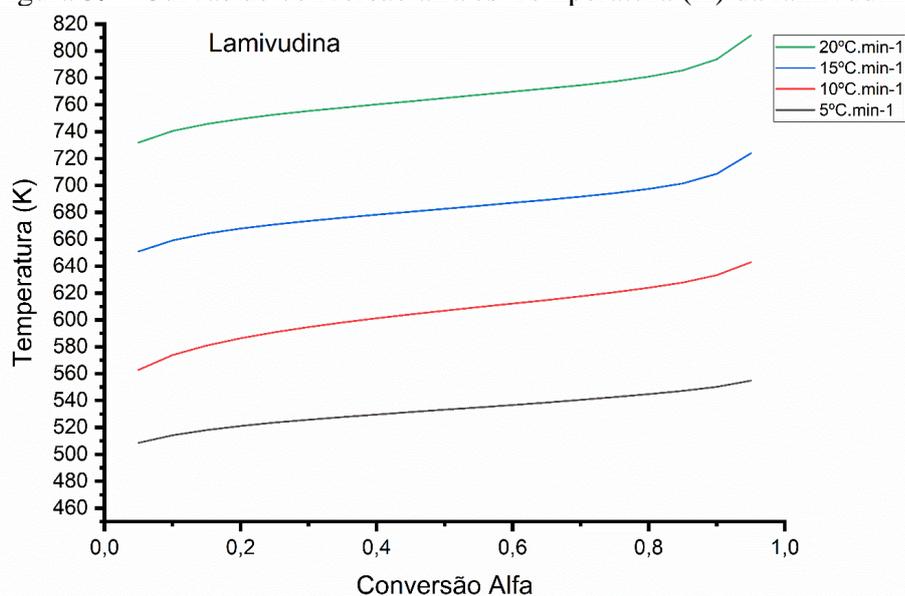
Fonte: Dados da Pesquisa (2020)

Utilizando-se de cálculos de projeção por interpolação foi possível a obtenção dos valores de temperatura relacionados a determinado grau de conversão. O resultado foi calculado e posto em matriz numérica com os resultados nas outras razões de aquecimento.

A partir deste ponto, para os modelos cinéticos foram utilizadas a primeira etapa de decomposição atribuída na TG para o processo de degradação dos insumos farmacêuticos ativos. O estudo cinético foi realizado com a primeira etapa de decomposição, utilizando grau de conversão entre 0,05 e 0,95. Os dados das curvas TG foram obtidos em cinco razões de aquecimento diferentes ($\beta = 2,5, 5, 10$ e 15 e 20 Cmin⁻¹)

A escolha da razão de aquecimento é uma etapa importante para o planejamento e execução destas análises, visto que esta apresenta influência qualitativa na curva TG. À medida que se aumenta a razão perde-se a definição de alguns eventos, podendo induzir a sobreposições e até mesmo gerar dificuldades na identificação do início e término do mesmo. Em contrapartida, quanto menor ela for, mais demoradas e dispendiosas se tornam as análises.

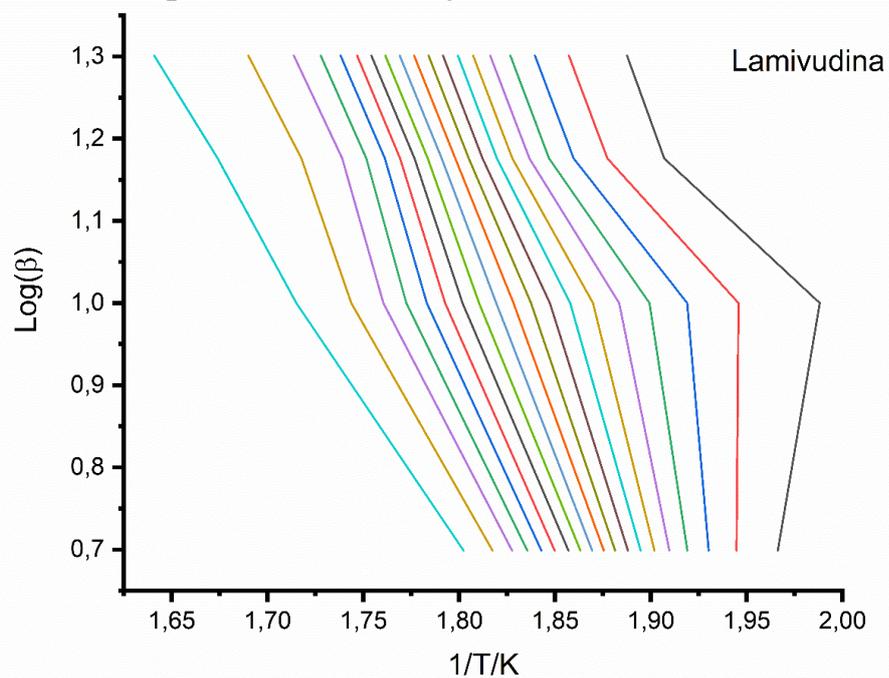
Figura 39 - Curvas de conversão alfa vs Temperatura (K) da lamivudina.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Para determinação da cinética de degradação não isotérmica as curvas a diferentes razões de fluxo proporcionou a correlação de $\log\beta$ vs $1.K^{-1}$. Assim, foi possível a obtenção dos valores da Energia de ativação (E_a) envolvida. Flynn-Wall-Ozawa definem que a fração de conversão que melhor descreve o processo é aquela que apresenta o coeficiente de relação linear (R^2) mais próximo de 1.

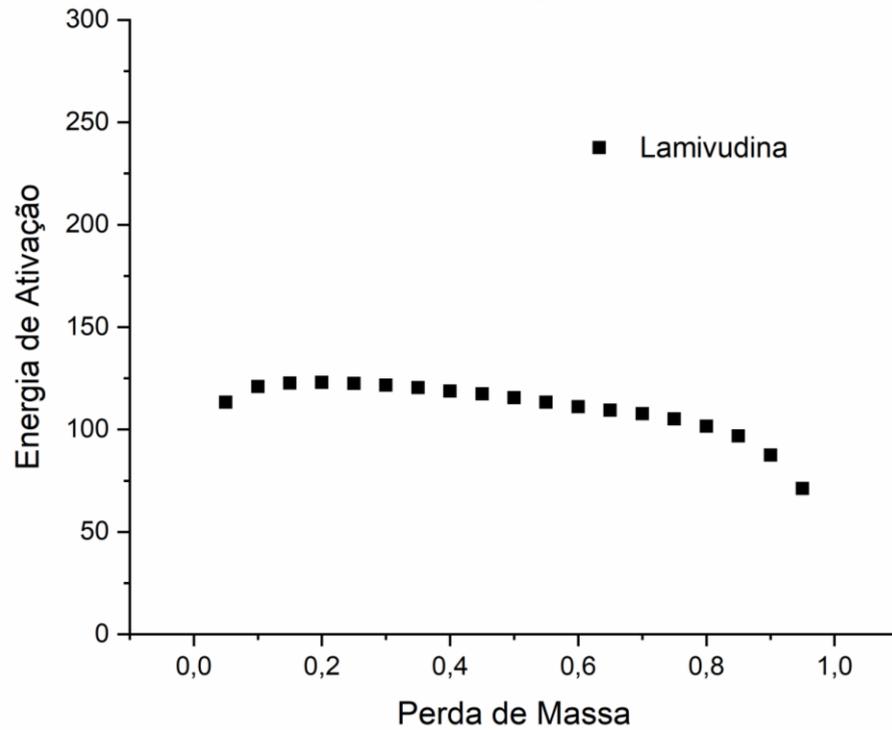
Figura 40 - Gráfico das paralelas da lamivudina.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Dentre os parâmetros obtidos através desta abordagem, a E_a é o de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos Tabela 24. Podendo ser utilizada para o estabelecimento de um perfil comparativo de estabilidade entre vários fármacos e suas associações, onde quanto maior a E_a , maior a estabilidade térmica do composto. As figuras 41, 45 e 49 mostram a relação entre a E_a e a fração de conversão (α) para a amostra de Lamivudina, Zidovudina e Efavirenz.

Figura 41 - Energia de ativação da degradação da lamivudina.

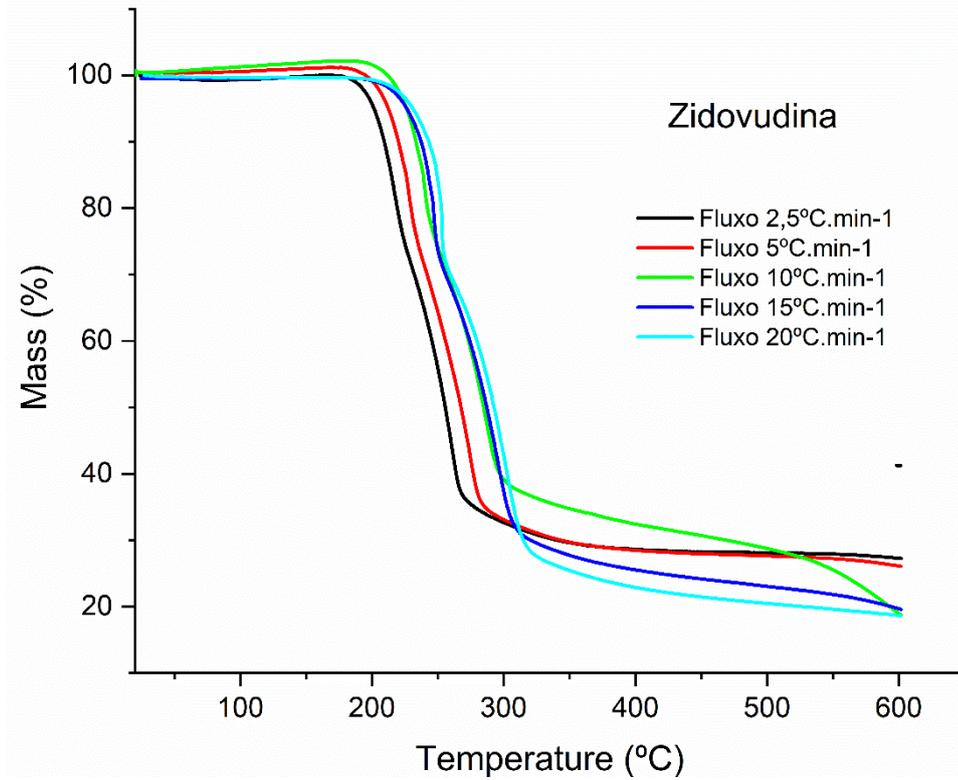


Fonte: Dados da pesquisa (2020)

O mesmo tipo de raciocínio foi seguido para o tratamento de dados dos outros IFA's e para o comprimido associação dose fixa. Com os dados de energia de ativação, e temperatura de pico de degradação foi possível o cálculo de fator de Arrhenius (A) e com isso o T%₉₀ de cada um e do comprimido conforme tabela 26.

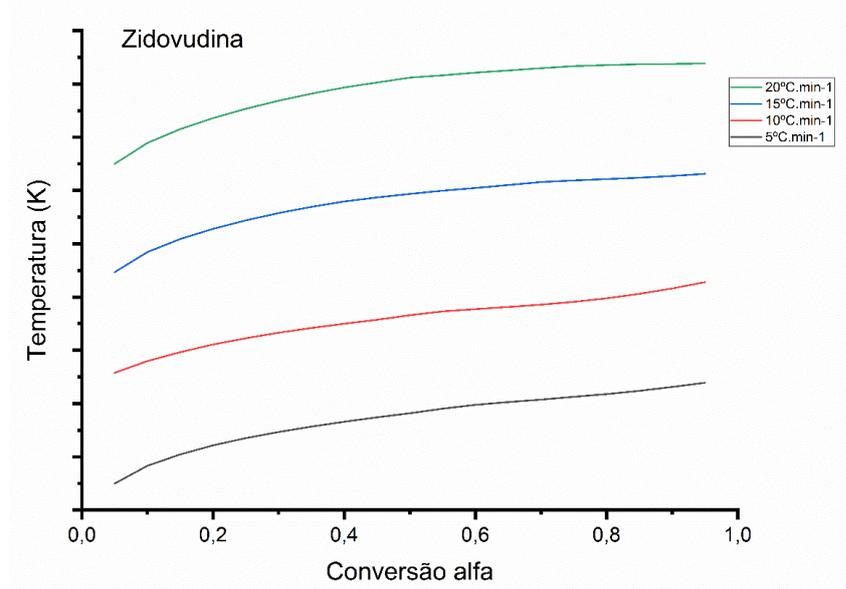
4.6.1.2 Zidovudina

Figura 42 - Termograma de Zidovudina em diferentes fluxos de aquecimento.



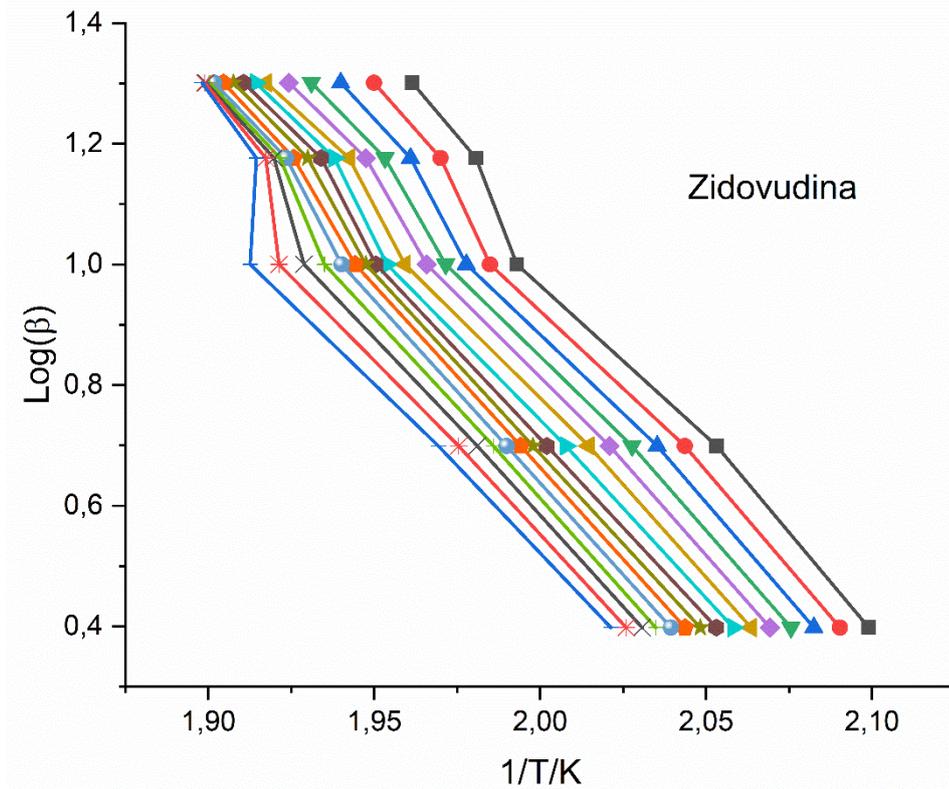
Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 43 - Curvas de conversão alfa vs Temperatura (K) da zidovudina.



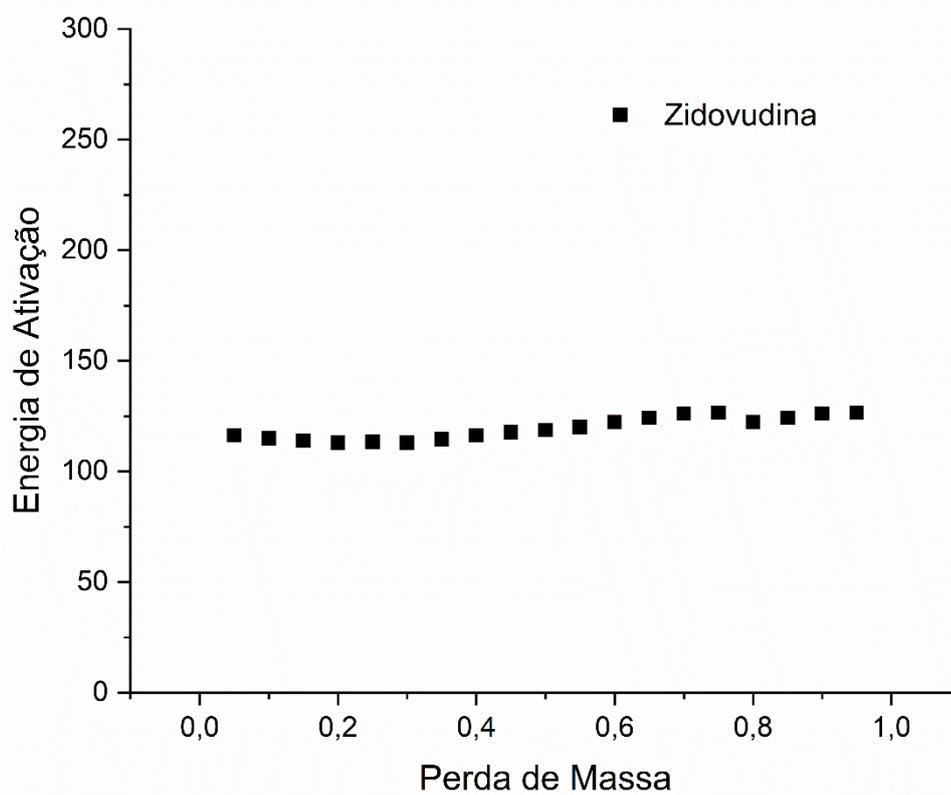
Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 44 - Gráfico das paralelas do primeiro evento de degradação da zidovudina



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

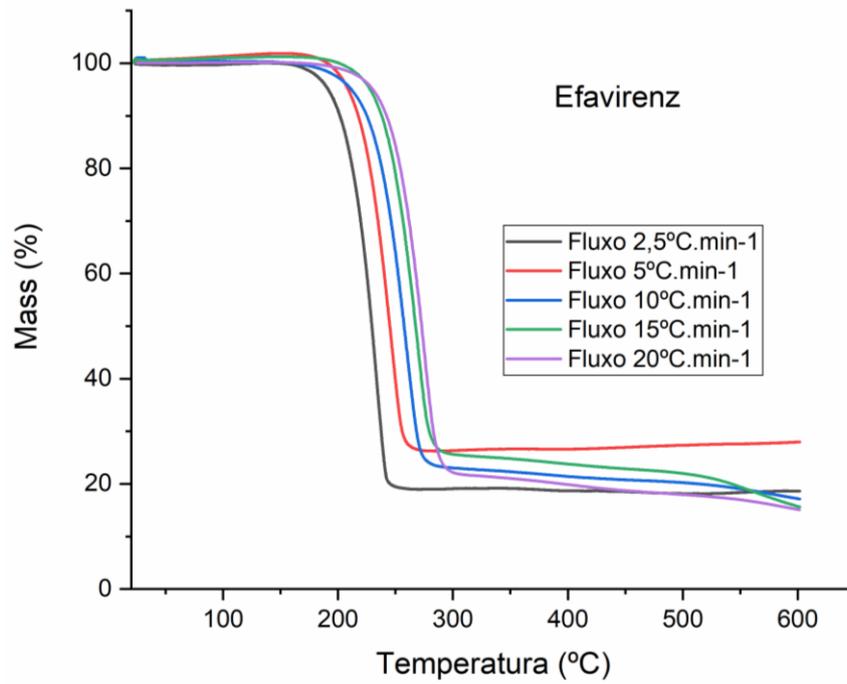
Figura 45 - Energia de ativação do primeiro evento de degradação da zidovudina.



Fonte: Dados da Pesquisa (2020)

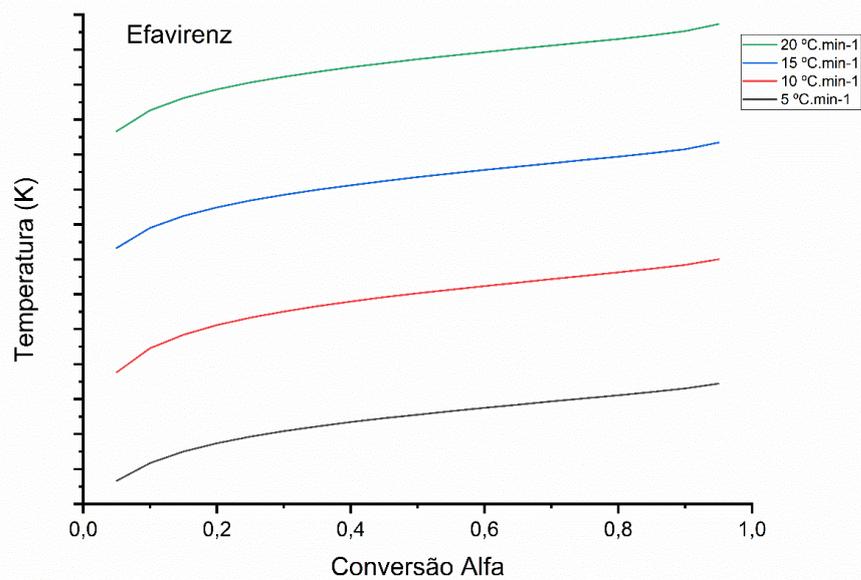
4.6.1.3 Efavirenz

Figura 46 - Termograma de Efavirenz em diferentes fluxos de aquecimento.



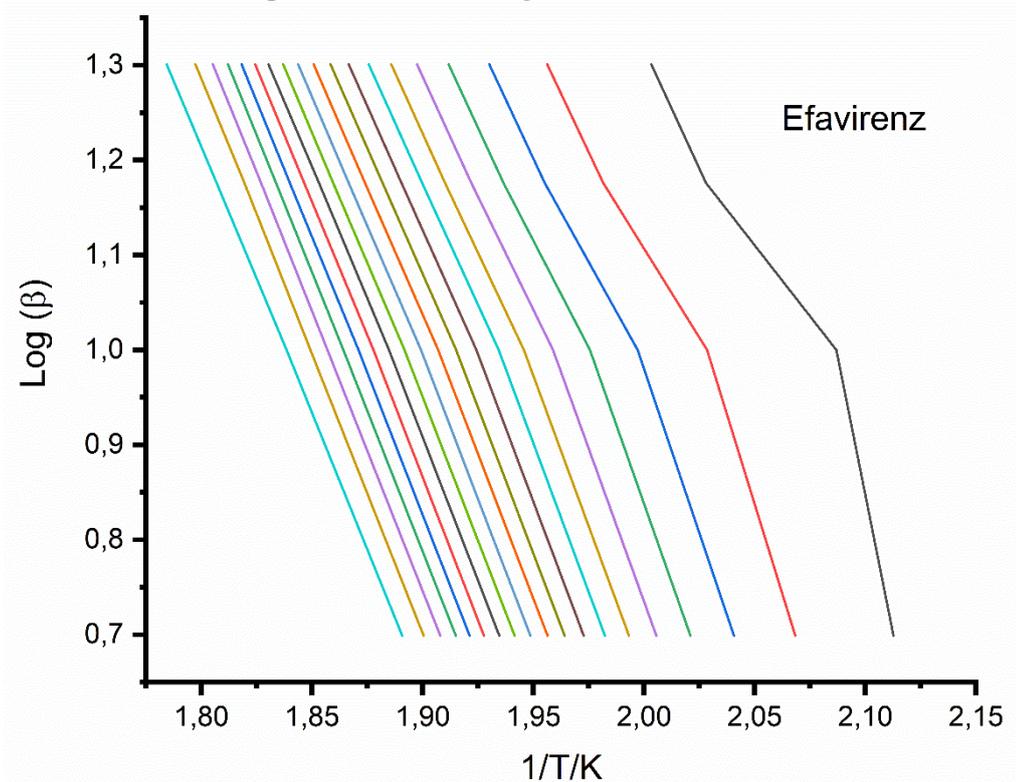
Fonte: Dados da Pesquisa (2020)

Figura 47 - Conversão alfa vs temperatura em K do efavirenz.



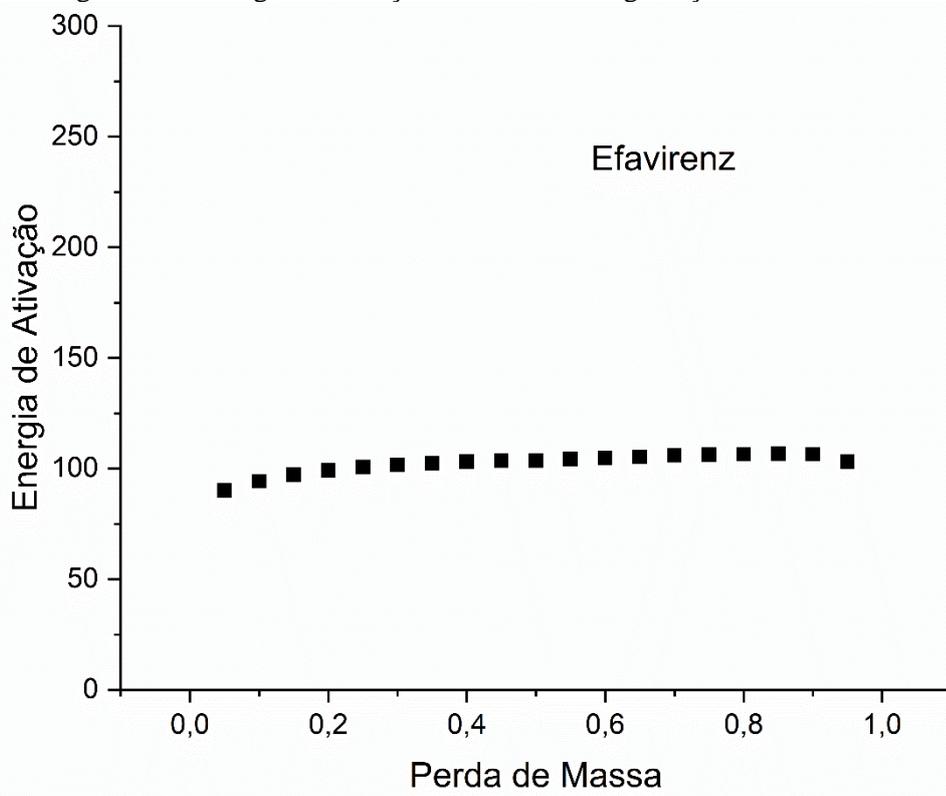
Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 48 - Gráfico das paralelas do Efavirenz.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 49 - Energia de ativação do evento de degradação do Efavirenz.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 24 - Valores de Energia de Ativação (E_a) obtido através do modelo de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) para os insumos ativos isolados.

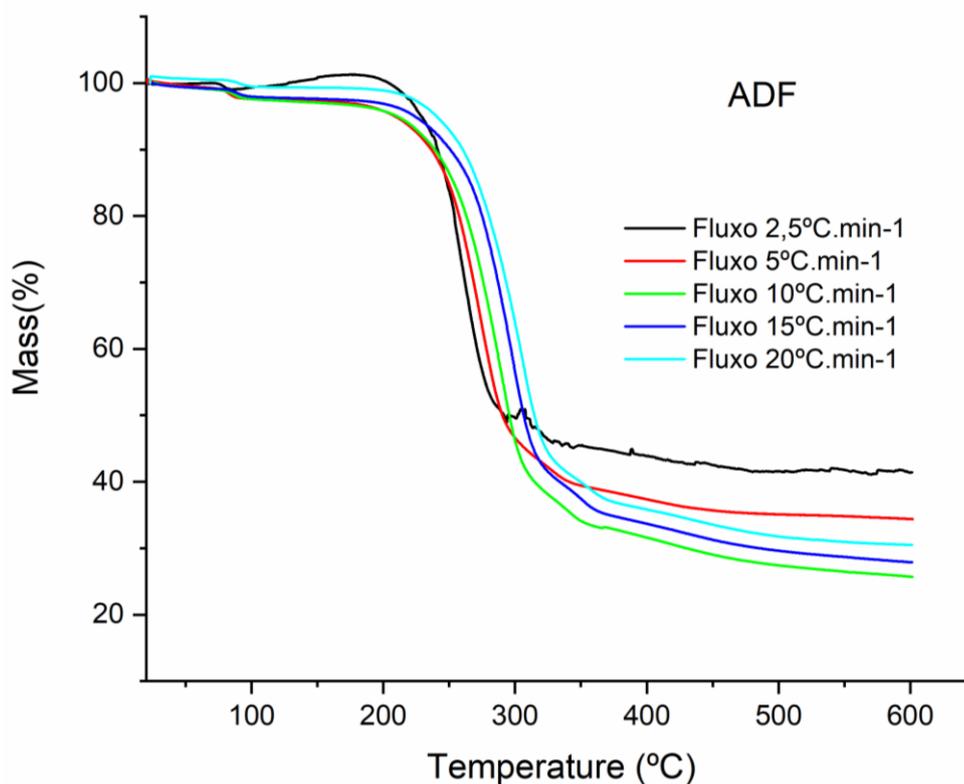
3TC	Grau de conversão (α)									E_a kJ mol ⁻¹	
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	M±DP	
FWO	120,87	123,02	121,71	118,83	115,60	111,08	107,65	101,68	87,56	110,54	13,57
AZT	Grau de conversão (α)									E_a kJ mol ⁻¹	
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	M±DP	
FWO	114,89	113,05	112,91	116,21	118,66	122,28	126,14	122,28	126,14	119,45	5,11
EFV	Grau de conversão (α)									E_a kJ mol ⁻¹	
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	M±DP	
FWO	100,09	101,32	102,79	103,58	103,98	103,98	104,16	103,92	101,63	102,57	1,9709

Fonte: Dados da pesquisa (2020), DP: Desvio padrão

4.6.1.4 Comprimido Associação Dose Fixa 2019

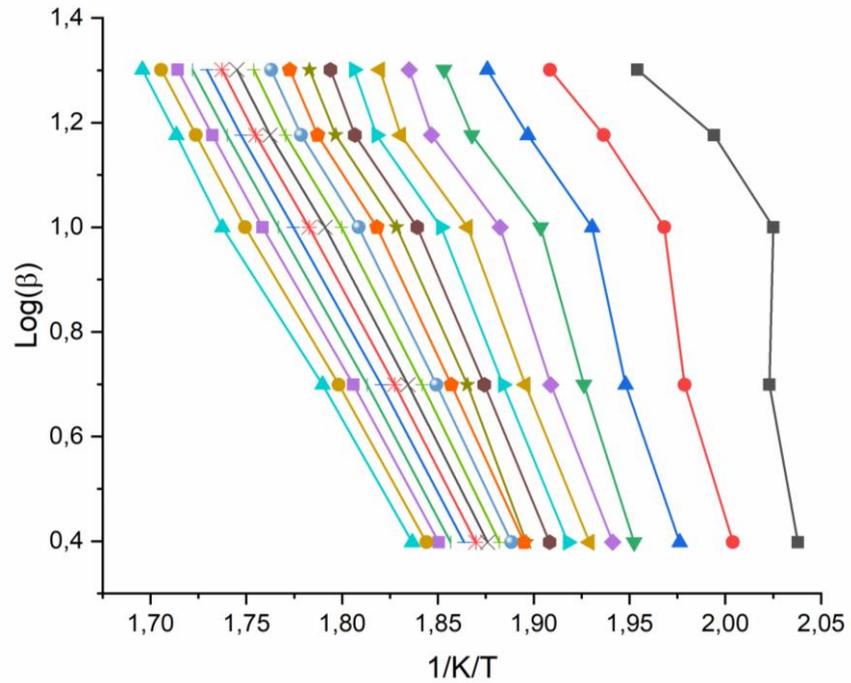
Os mesmos estudos de cinética de degradação foram realizados com o comprimido ADF, nos mesmos parâmetros de pesquisa.

Figura 50 - Termograma do comprimido ADF em diferentes fluxos de aquecimento.



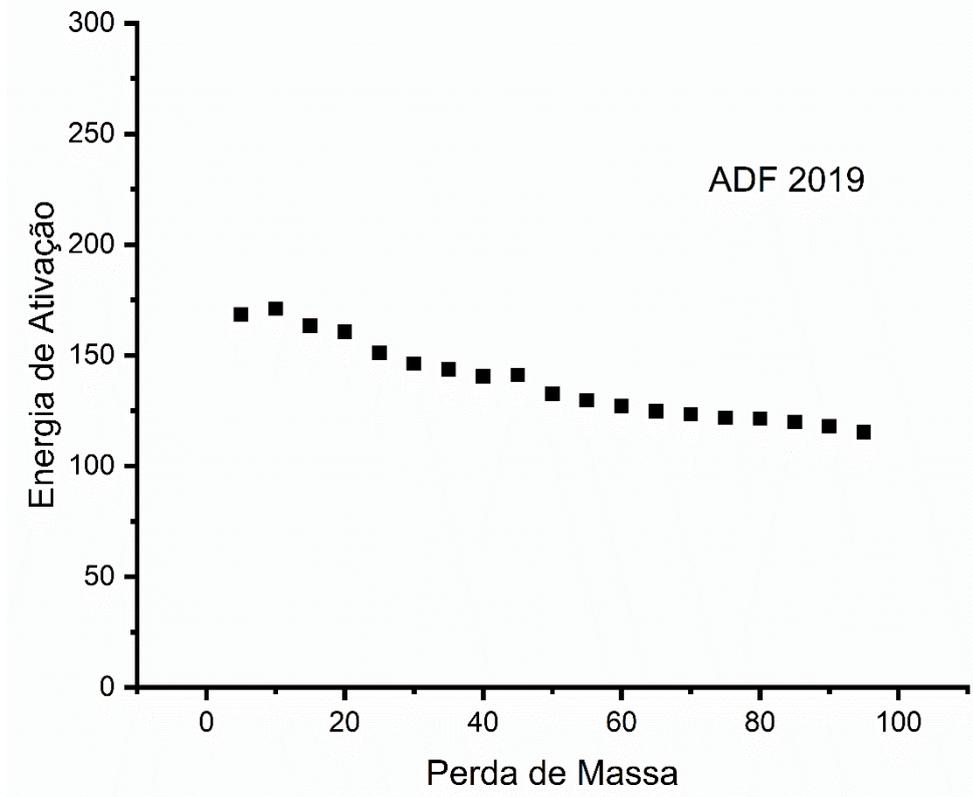
Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 51 - Gráfico de Paralelas do comprimido ADF 2019.



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Figura 52 - Energia de ativação do evento térmico de degradação do comprimido ADF 2019



Fonte: Dados da pesquisa (2020)

Tabela 25 - Valores de Energia de Ativação (E_a) obtido através do modelo de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) para o comprimido associação dose fixa.

ADF 2019	Grau de conversão (α)									E_a kJ mol ⁻¹	
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	M \pm SD	
FWO	171,00	160,63	146,26	140,48	132,54	127,04	123,33	121,39	117,92	137,86	18,01

Fonte: Dados da pesquisa (2020)

O tempo de meia-vida ou prazo de validade consiste no tempo necessário, que o fármaco requer para atingir os níveis limítrofes de degradantes. A partir dos resultados apresentados foi possível o cálculo de prazo de validade por cinética térmica.

Tabela 26 - Parâmetros termodinâmicos dos farmacos estudas e do comprimido ADF 2019.

IFA	E_a (kJ.mol-1)	Constante de Arrhenius (A)	T90%
3TC	120,87	0,0005993	1639,14 dias
AZT	114,89	0,000672552	1557,41dias
EFV	100,09	0,0006560	1587,002 dias
ADF 2019	171,00	0,00043248	2297,65 dias

Fonte: Dados da pesquisa (2020); E_a : energia de ativação, T_{90%} = *Shelf-life* em dias.

Segundo resultados obtidos foram calculados, o tempo necessário para degradação de 10% de cada ativo do comprimido de forma isolada e em associação dose fixa. Observou-se que as interações entre os ativos prolongaram o shelf-life do comprimido ADF de forma a quase dobrar o tempo de validade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÃO

- Foram produzidos comprimidos ADF contendo Lamivudina, Zidovudina e Efavirenz, estes tiveram seus insumos caracterizados e aprovados segundo farmacopeia vigente.
- Os comprimidos produzidos também foram testados frente os parâmetros descritos na farmacopeia brasileira.
- Este trabalho conseguiu otimizar metodologia analítica para doseamento de efavirenz, lamivudina e zidovudina ao mesmo tempo com uso em estudos de estabilidade de comprimido associação dose fixa, bem como validou método segundo parâmetros vigentes para validação de método analítico expostos pela RDC 166 de 2017.
- Realizou-se estudos de estabilidade acelerada em câmara climática, bem como coleta de dados referentes às diferentes coletas ao longo do tempo de estudo, foram analisados parâmetros como aspecto visual dos comprimidos, dureza e teor de fármacos com possíveis degradações do comprimido associação dose fixa. Os dados apresentados demonstraram estabilidade dos comprimidos condizentes com o prazo de validade mínimo de 2 anos.
- Os estudos de predição de prazo de validade por estudo térmico também foram realizado em diferentes fluxos de calor, os prazos de validade para os insumos ativos isolados e em associação dose fixa foram calculados e se mostraram condizentes com o apresentado por estudo tradicional.

REFERENCIAS

ADAMSON, Catherine S.; FREED, Eric O. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 119–141, 2010. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.09.009.

ADKINS, J. C.; NOBLE, S. Efavirenz. **Drugs**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 1055–1064, 1998. DOI: 10.2165/00003495-199856060-00014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019**. Brasília - DF. Disponível em: www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805.

ALVES DE CASTRO, Polianna; CHINCHILLA, Izabela. ESTUDO DE ESTABILIDADE PARA PEDIDO DE REGISTRO E PÓS-REGISTRO DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS E SIMILARES Polianna. [S. l.], 2005.

ALVES, Lariza Darlene Santos; ROLIM, Larissa Araújo; FONTES, Danilo Augusto Ferreira; ROLIM-NETO, Pedro José; SOARES, Mônica Felts de La Roca; SOARES SOBRINHO, José Lamartine. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 1967–1972, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000900026. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000900026&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

ANVISA. Guia para registro de novas associações em dose fixa. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, [S. l.], p. 20, 2010.

ANVISA. Guia Nº 4 da ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, [S. l.], p. 1–22, 2015. a.

ANVISA. **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degradação+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902>.

ANVISA. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, [S. l.], v. 2017, p. 1–21, 2017.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira - Insumos Farmacêuticos e Especialidades. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**, [S. l.], v. 2, p. 1–112, 2019. a.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**, [S. l.], v. 1, p. 60–69, 72–85, 2019. b. DOI: 10.1590/S0102-33062006000100002.

ANVISA. **Resolução RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019**. Brasília - DF.

ARAÚJO, A. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 260, n. 2, p. 303–314, 2003. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00288-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517303002886>.

BARAKH ALI, Sogra F.; RAHMAN, Ziyaur; DHARANI, Sathish; AFROOZ, Hamideh; KHAN, Mansoor A. Chemometric Models for Quantification of Carbamazepine Anhydrous and Dihydrate Forms in the Formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 108, n. 3, p. 1211–1219, 2019. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.10.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.023>.

BARTLETT, Louise E.; PRATT, Nicole; ROUGHEAD, Elizabeth E. Does a fixed-dose combination of amlodipine and atorvastatin improve persistence with therapy in the Australian population? **Current Medical Research and Opinion**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 305–311, 2018. DOI: 10.1080/03007995.2017.1384375. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/03007995.2017.1384375>.

BASTOS, Mônica M.; COSTA, Carolina C. P.; BEZERRA, Talitha C.; DA SILVA, Fernando De C.; BOECHAT, Núbia. Efavirenz a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of first-generation: Approaches based on its medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 108, p. 455–465, 2016. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.11.025.

BHATTACHARYA, Shiv Sankar. Process Validation of Ceftriaxone and Sulbactam Dry Powder Injection. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, [S. l.], v. 5, n. 6, 2014. DOI: 10.4172/2157-7048.1000211.

BLESSY, M.; PATEL, Ruchi D.; PRAJAPATI, Prajesh N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas Para

Adultos Vivendo Com Hiv / Aids. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, [S. l.], v. Versão pre, p. 1–75, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. [S. l.], v. 1, p. 412, 2018. DOI: 10.1016/j.bone.2016.04.028. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em crianças e adolescentes. **Dtr2001.Saude.Gov.Br**, [S. l.], p. <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/>, 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manejo da infecção pelo hiv em adultos**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/j.bone.2016.04.028.

BRODER, Samuel. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 1–18, 2010. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.002.

CARVALHO, Erika Martins De; SANTOS, Tereza Cristina Dos; SOUSA, Eduardo Gomes Rodrigues De; SAN GIL, Rosane Aguiar da Silva; ELLENA, Javier; SANTOS-FILHO, Osvaldo Andrade; BORRÉ, Leandro Bandeira. Solution and Solid State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Characterization of Efavirenz. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 9, p. 2656–2664, 2016. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.10.006.

CHOI, Seoung-ryoung; BRITIGAN, Bradley E.; NARAYANASAMY, Prabakaran. Treatment of Virulent Mycobacterium tuberculosis and HIV Coinfected Macrophages with Gallium Nanoparticles Inhibits Pathogen Growth and Modulates Macrophage Cytokine Production. **mSphere**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1128/msphere.00443-19.

CORDEIRO, Gilcélia A.; NAGATA, Noemi; MESSERSCHMIDT, Iara; PERALTA-ZAMORA, Patricio; RODRIGUES, Letícia N. C. Multivariate spectroscopic determination of the lamivudine-zidovudine association. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 337–343, 2011. DOI: 10.1590/S0103-50532011000200020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532011000200020&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

COSTA, Carolina C. P.; BOECHAT, Núbia; SILVA, Fernando C. Da; ROSARIO, Sandra L.; BEZERRA, Talitha C.; BASTOS, Mônica M. The Efavirenz: Structure-Activity Relationship and Synthesis Methods. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1347–1370, 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150074. Disponível em:

<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20150074>.

COSTA, Salvana Priscylla Manso; DA SILVA, Keyla Emanuelle Ramos; DE MEDEIROS, Giovanna Christinne Rocha; ROLIM, Larissa Araujo; DE OLIVEIRA, Jamerson Ferreira; DE LIMA, Maria Do Carmo Alves; GALDINO, Suely Lins; PITTA, Ivan Da Rocha; NETO, Pedro Jose Rolim. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, [S. l.], v. 562, p. 29–34, 2013. DOI: 10.1016/j.tca.2013.03.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2013.03.003>.

DA TRINDADE, Mariana Teixeira; KOGAWA, Ana Carolina; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Metformin: A Review of Characteristics, Properties, Analytical Methods and Impact in the Green Chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 66–72, 2018. DOI: 10.1080/10408347.2017.1374165.

DE GOMES, Elionai C. L.; MUSSEL, Wagner N.; RESENDE, Jarbas M.; FIALHO, Silvia L.; BARBOSA, Jamile; YOSHIDA, Maria I. Chemical interactions study of antiretroviral drugs efavirenz and lamivudine concerning the development of stable fixed-dose combination formulations for AIDS treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 573–579, 2013. DOI: 10.5935/0103-5053.20130071.

DE SOUZA, Nadábia A. B.; MEDEIROS, Ana C. D.; SANTOS, Ana F. O.; MACÊDO, R. O. Thermal stability of metronidazole drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 535–538, 2003. DOI: 10.1023/A:1024569414701.

DOYLE, CHARLES D. Series Approximations to the Equation of Thermogravimetric Data. **Nature**, [S. l.], v. 207, n. 4994, p. 290–291, 1965. DOI: 10.1038/207290a0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/207290a0>.

EL-GHOBASHY, Mohamed Refaat; YEHIA, Ali Mohamed; HELMY, Aya Helmy; YOUSSEF, Nadia Fayek. Forced degradation of gliquidone and development of validated stability-indicating HPLC and TLC methods. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1590/s2175-97902018000317223.

ENGLAND, The New. Indinavir , and Indinavir Plus Zidovudine and Lamivudine in the Treatment of Hiv-1 Infection in Adults. [S. l.], p. 1865–1873, 2003.

FANDARUFF, C.; ARAYA-SIBAJA, A. M.; PEREIRA, R. N.; HOFFMEISTER, C. R. D.; ROCHA, H. V. A.; SILVA, M. A. S. Thermal behavior and decomposition kinetics of efavirenz under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 2351–2356, 2014. DOI: 10.1007/s10973-013-3306-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-013-3306-x>.

FANDARUFF, Cinira; SCARDI, Paolo; REBUFFI, Luca; AZANZA RICARDO, Cristy Leonor; DE SANTANA, Davi Pereira; CUFFINI, Silvia Lucia; GALINDO BEDOR, Danilo Cesar; ROCHA, Helvécio Vinícius Antunes; SEGATTO SILVA, Marcos Antônio. Correlation between microstructure and bioequivalence in Anti-HIV Drug Efavirenz. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 91, p. 52–58, 2015. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.01.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.020>.

FDA. Guidance for industry. Nonclinical safety evaluation of drug or biologic combinations. **Guidance**, [S. l.], n. March, p. 1–13, 2006.

FERREIRA, B. D. L.; ARAUJO, B. C. R.; SEBASTIÃO, R. C. O.; YOSHIDA, M. I.; MUSSEL, W. N.; FIALHO, S. L.; BARBOSA, J. Kinetic study of anti-HIV drugs by thermal decomposition analysis: A multilayer artificial neural network propose. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 127, n. 1, p. 577–585, 2017. DOI: 10.1007/s10973-016-5855-2.

FONTES, Danilo Augusto Ferreira. **DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDO ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA PARA TRATAMENTO DA AIDS**. 2011. Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2011.

FUCINA, Giovana; BLOCK, Luciana Catia; BACCARIN, Thaisa; RIBEIRO, Thiago Ruiz Gutierrez; QUINTÃO, Nara Lins Meira; FILHO, Valdir Cechinel; SILVA, Ruth Meri Lucinda; BRESOLIN, Tania Mari Bellé. Development and validation of a stability indicative HPLC-PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae. **Talanta**, [S. l.], v. 101, p. 530–536, 2012. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.09.024.

GAISFORD, Simon; O'NEILL, Michael; THOMPSON, Lucy; CHAN, Kai Loke. Shelf-life prediction of intravenous busulfan by isothermal calorimetry. **Hospital Pharmacist**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 295–298, 2006.

GALINDO BEDOR, Danilo Cesar. **Avaliação biofarmacotécnica do Efavirenz um fármaco classe II (SCB)**. 2011. Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2011.

GALLANT, Joel E. et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 354, n. 3, p. 251–260, 2006. DOI: 10.1056/NEJMoa051871.

GAUTAM, Chandler S.; SAHA, Lekha. Fixed dose drug combinations (FDCs): Rational or

irrational: A view point. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 795–796, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2007.03089.x.

GHOSN, Jade; TAIWO, Babafemi; SEEDAT, Soraya; AUTRAN, Brigitte; KATLAMA, Christine. HIV (Seminar Lancet 2018). **The Lancet**, [S. l.], 2018. a. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31311-4.

GHOSN, Jade; TAIWO, Babafemi; SEEDAT, Soraya; AUTRAN, Brigitte; KATLAMA, Christine. Seminar HIV. **The Lancet**, [S. l.], 2018. b. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31311-4. GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 335–357, 2002. DOI: 10.1023/A:1016015113795.

GIRON, D.; GOLDBRONN, C. Use of DSC and TG for identification and quantification of the dosage form. **Journal of Thermal Analysis**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 473–483, 1997. DOI: 10.1007/BF01979494.

HALLENGÄRD, David; HALLER, B. Kristian; PETERSSON, Sarah; BOBERG, Andreas; MALTAIS, Anna Karin; ISAGULIANTS, Maria; WAHREN, Britta; BRÅVE, Andreas. Increased expression and immunogenicity of HIV-1 protease following inactivation of the enzymatic activity. **Vaccine**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 839–848, 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.10.083.

HIV/Aids: produção do Efavirenz completa 11 anos. [s.d.]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/hivaids-producao-do-efavirenz-completa-11-anos>. Acesso em: 4 nov. 2019.

INDURI, Madhusudhanareddy; BHAGAVAN RAJU, M.; RAJENDRA PRASAD, Y.; PAVANKUMAR REDDY, K.; CH, Sarva Raidu. Simultaneous quantification of efavirenz and lamivudine in tablet dosage form by liquid chromatography. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 305–309, 2011.

JOCHMANS, Dirk. Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Virus Research**, [S. l.], v. 134, n. 1–2, p. 171–185, 2008. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.01.003.

KONARI, Sarif Niroush; JACOB, Jane T. Stability indicating validated UPLC technique for the simultaneous analysis of raltegravir and lamivudine in pharmaceutical dosage forms. **HIV and AIDS Review**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 161–169, 2016. DOI: 10.1016/j.hivar.2016.11.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hivar.2016.11.005>.

KUMAR, Pradeep; DWIVEDI, S. C.; KUSHNOOR, Ashok. Validation and stability of RP-

HPLC method for the determination of efavirenz as bulk drug and in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 220–231, 2011.

KURMI, Moolchand; SAHU, Archana; SINGH, Dilip Kumar; SINGH, Inder Pal; SINGH, Saranjit. Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 8: Characterization and in-silico toxicity prediction of degradation products of efavirenz. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 148, p. 170–181, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.09.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.029>.

MARTINEZ-PICADO, Javier; MARTÍNEZ, Miguel Angel. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: A view from the clinic and ex vivo. **Virus Research**, [S. l.], v. 134, n. 1–2, p. 104–123, 2008. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.12.021.

MARU, Shital M.; DE MATAS, Marcel; KELLY, Adrian; PARADKAR, Anant. Characterization of thermal and rheological properties of zidovudine, lamivudine and plasticizer blends with ethyl cellulose to assess their suitability for hot melt extrusion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 471–478, 2011. DOI: 10.1016/j.ejps.2011.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.003>.

MBUAGBAW, Lawrence; MURSLEEN, Sara; IRLAM, James H.; SPAULDING, Alicen B.; RUTHERFORD, George W.; SIEGFRIED, Nandi. Efavirenz or nevirapine in three-drug combination therapy with two nucleoside or nucleotide-reverse transcriptase inhibitors for initial treatment of HIV infection in antiretroviral-naïve individuals. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], v. 2016, n. 12, 2016. DOI: 10.1002/14651858.CD004246.pub4.

MCGETTIGAN, Patricia; RODERICK, Peter; MAHAJAN, Rushikesh; KADAM, Abhay; POLLOCK, Allyson M. Use of Fixed Dose Combination (FDC) Drugs in India: Central Regulatory Approval and Sales of FDCs Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), Metformin, or Psychotropic Drugs. **PLoS Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1–28, 2015. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001826.

MELHUIISH, Anne; LEWTHWAITE, Penny. Natural history of HIV and AIDS. **Medicine (United Kingdom)**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 356–361, 2018. DOI: 10.1016/j.mpmed.2018.03.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.03.010>. MENÉNDEZ-ARIAS, Luis; BERKHOUT, Ben. Retroviral reverse transcription. **Virus Research**, [S. l.], v. 134, n. 1–2, p. 1–3, 2008. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.01.009.

MICROMEDEX. **HIV infection; AIDS**. [s.l: s.n.].

MORAES DO CARMO, Ana Cerúlia; PEREIRA, Raphael Sanches; GRATIERI, Tais.

Brazilian requirements for stability indicating methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 98, p. 58–63, 2018. DOI: 10.1016/j.trac.2017.10.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.017>.

MORANO, Sandra Campilongo; RODRIGUES, Lucimara; SCHNEIDER, Peter; BIOMÉDICAS, Instituto De Ciências; PAULO, Universidade De São; SP, São Paulo. PLANILHA DE VALIDAÇÃO: UMA NOVA FERRAMENTA PARA ESTIMAR FIGURAS DE MÉRITO NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS UNIVARIADOS Fabiana Alves de Lima Ribeiro e Márcia Miguel Castro Ferreira*. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

OO, Charles; SY, Sherwin K. B. Fixed-dose combinations: a potential means to boost drug development for selected drugs. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 457–459, 2018. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.001>.

PAGE, Matthew; TAYLOR, Stephen. Antiretroviral pharmacology. **Medicine (United Kingdom)**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 287–292, 2018. DOI: 10.1016/j.mpmed.2018.02.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.02.006>.

PAN, Feng; CHERNEW, Michael E.; FENDRICK, A. Mark. Impact of fixed-dose combination drugs on adherence to prescription medications. **Journal of General Internal Medicine**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 611–614, 2008. DOI: 10.1007/s11606-008-0544-x.

PAREDES, Roger; CLOTET, Bonaventura. Clinical management of HIV-1 resistance. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 245–265, 2010. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.09.015.

RADESCA, LA L. A.; MAURIN, MB M. B.; RABEL, S. R. SR; MOORE, J. R. Crystalline Efavirenz. **US Patent 6,673,372**, Canada, 2004. Disponível em: <http://www.google.com/patents?hl=en&lr=&vid=USPAT6673372&id=ZrwCAAAAEB&oi=fnd&dq=Crystalline+Efavirenz&printsec=abstract>.

RIBANI, Marcelo; Carla Beatriz Grespan Bottoli; Carol H. Collins; Isabel Cristina Sales Fontes. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, William C. V.; SOLER, Orenzio. Licença compulsória do efavirenz no Brasil em 2007: contextualização. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 553–559, 2009. DOI: 10.1590/s1020-49892009001200012.

SAHU, Prafulla Kumar; RAMISETTI, Nageswara Rao; CECCHI, Teresa; SWAIN, Suryakanta; PATRO, Chandra Sekhar; PANDA, Jagadeesh. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 147, p. 590–611, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>.

SANKOH, Osman; ARTHUR, Samuelina; NYIDE, Bongiwe; WESTON, Mark. Prevention, treatment and future challenges of HIV/AIDS: A decade of INDEPTH research. **HIV and AIDS Review**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1016/j.hivar.2014.06.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hivar.2014.06.004>.

SANTOS, Jucimary V.; CARVALHO, Luís A. E. Batista De; PINA, Maria E. S. R. .. O papel da Zidovudina na Erradicação da Transmissão Vertical da SIDA. **Latin American Journal of Pharmacy**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 303–313, 2008.

SHAMSIPUR, Mojtaba; POURMORTAZAVI, Seied Mahdi; BEIGI, Ali Akbar Miran; HEYDARI, Rouhollah; KHATIBI, Mina. Thermal stability and decomposition kinetic studies of acyclovir and zidovudine drug compounds. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 287–293, 2013. DOI: 10.1208/s12249-012-9916-y.

SHI, Beijia; ZHAO, Jinqi; ZHANG, Xiaoxia; ZHOU, Xiaohua; LUO, Xuefang; WANG, Juanjuan; GUO, Canyon. Quantitative analysis of binary polymorphs mixtures of fusidic acid by diffuse reflectance FTIR spectroscopy, diffuse reflectance FT-NIR spectroscopy, Raman spectroscopy and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 140, p. 130–136, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.02.053. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.053>.

SIDDIQUI, Akhtar; RAHMAN, Ziyaur; SAYEED, Vilayat A.; KHAN, Mansoor A. Chemometric evaluation of near infrared, fourier transform infrared, and raman spectroscopic models for the prediction of nimodipine polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 102, n. 11, p. 4024–4035, 2013. DOI: 10.1002/jps.23712.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, Pedro José. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SILVA, Paulo César Dantas. **ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA EM ASSOCIAÇÃO DOSE FIXA PARA O TRATAMENTO DE FILARIOSE**. 2019. [S. l.], 2019. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

SINGH, Saranjit; JUNWAL, Mahendra; MODHE, Gajanan; TIWARI, Harsita; KURMI, Moolchand; PARASHAR, Neha; SIDDURI, Padmaja. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 49, p. 71–88, 2013. DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.006>.

SOARES, Itânia Pinheiro; RUSSO, Renato Monteiro de Oliveira; PRATES, Ravi Govinda Dardot; AUGUSTI, Rodinei; FORTES, Isabel Cristina Pereira; PASA, Vânia Márcia Duarte. Avaliação da eficiência das técnicas ESI-MS e ATR/FTIR na determinação de adulteração de BX com querosene e óleo residual. **Química Nova**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1439–1442, 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000800024. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000800024&lng=pt&nrm=iso&tlng=en.

SOARES, MONICA FELTS DE LA ROCA. **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE COMPRIMIDO ANTIRRETROVIRAL EM ASSOCIAÇÃO DOSE FICA DE ZIDOVUDINA, LAMIVUDINA E EFAVIRENZ**. 2011. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3069>.

SOUZA, Karina Rocha De. **Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização como padrão secundário**. 2015. Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ, [S. l.], 2015.

SOUZA, Marcos Antonio Feitosa De. **Avaliação Termoanalítica e Cinética de Medicamentos Antiretrovirais (Estavudina , Lamivudina , Zidovudina)**. 2008a. Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2008.

SOUZA, Marcos Antonio Feitosa De. **Avaliação Termoanalítica e Cinética de Medicamentos Antiretrovirais (Estavudina , Lamivudina , Zidovudina) e síntese de novos produtos derivados dos antiretrovirais**. 2008b. Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2008.

SOVIZI, Mohammad Reza; HOSSEINI, Seyed Ghorban. Studies on the thermal behavior and decomposition kinetic of drugs cetirizine and simvastatin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 111, n. 3, p. 2143–2148, 2013. DOI: 10.1007/s10973-012-2651-5.

THAKRAL, Naveen K.; ZANON, Roger L.; KELLY, Ron C.; THAKRAL, Seema. Applications of Powder X-Ray Diffraction in Small Molecule Pharmaceuticals: Achievements and Aspirations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 12, p. 2969–2982, 2018. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.08.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.08.010>.

TIMÓTEO, Taysa Renata Ribeiro et al. Layered double hydroxides of CaAl: A promising drug delivery system for increased dissolution rate and thermal stability of praziquantel. **Applied Clay Science**, [S. l.], v. 180, n. March, p. 105197, 2019. DOI: 10.1016/j.clay.2019.105197. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105197>.

TIȚA, Dumitru; FULIAȘ, Adriana; TIȚA, Bogdan. Thermal stability of ketoprofen-active substance and tablets: Part 1. Kinetic study of the active substance under non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 105, n. 2, p. 501–508, 2011. DOI: 10.1007/s10973-010-1187-9.

UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Estatísticas globais sobre HIV - Resumo Informativo. **Un aids**, [S. l.], p. 1–8, 2017. Disponível em: https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR_FactSheet.pdf.

UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Global AIDS UPDATE. **Un aids**, [S. l.], v. 1, p. 1–316, 2019.

VIGILÂNCIA, SANITARIA AGENCIA NACIONAL De. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**, [S. l.], v. 1, p. 60–69, 72–85, 2019. DOI: 10.1590/S0102-33062006000100002.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: Chapter 4.1: Clinical guidelines: Antiretroviral therapy. [S. l.], p. 480, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/chapter4.pdf?ua=1>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infections in infants: towards universal access (2006 version). [S. l.], p. 1–92, 2006. DOI: 9241594667.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations, twenty-fourth Report. World Health Organization Technical Report Series. World Health Organization, Geneva, Switzerland (available from American Public Health Association, Inc., 1015. **WHO**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 348, 2003. DOI: 10.1002/jps.2600620248.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Clinical Guidelines: Antiretroviral Therapy. **Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach.**, [S. l.], n. Second Edition, p. 129, 2016. DOI: 10.1108/13673271211218843.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Update of first and second line antiretroviral regimens. **Who**, [S. l.], n. July, 2019.

WU, Chengjie; YOU, Jinzong; WANG, Xuejie. Thermal decomposition mechanism and kinetics of gemcitabine. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S. l.], v. 130, n. January, p. 249–255, 2018. DOI: 10.1016/j.jaap.2018.01.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.01.019>.

ZHANG, Jian; WANG, Yong. Synthetic Development of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) as Anti-HIV Drugs: Efavirenz and its Derivatives. **Current Organic Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 21, p. 2196–2206, 2017. DOI: 10.2174/1385272821666170420180122.

ZHANG, Xingquan. Anti-retroviral drugs: current state and development in the next decade. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 131–136, 2018. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.01.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.012>.