



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JÉSSICA PRISCILA AVELINO SILVA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR: UMA
ABORDAGEM INTEGRADA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTO**

**RECIFE
2014**

JÉSSICA PRISCILA AVELINO SILVA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR: UMA
ABORDAGEM INTEGRADA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque

**RECIFE
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e Silva, Jéssica Priscila Avelino.
Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento / Jéssica Priscila Avelino Silva. – Recife: O autor, 2014.
107 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências e anexos.

1. Antirretroviral. 2. Estabilidade de medicamentos. 3. Higroscopicidade. 4. Excipientes. 5. Hidrólise. I. Soares Sobrinho, José Lamartine (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-161)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 28 de Fevereiro de 2014

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Jéssica Priscila Avelino Silva** defendida nesta data e **APROVADA**, por decisão unânime, pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
(Depto. De Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
(Depto. De Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Piauí-UFPI)

Assinatura: _____

Prof. Dr^a. Magaly Andreza de Lyra
(Depto. De Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite

AGRAD

Ao meu amor Douglas Tavares de Albuquerque, por
todas as palavras de carinho, amor e incentivo.

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, e por toda sabedoria e conforto nos momentos de angústia durante esta jornada.

Ao meu orientador, **José Lamartine Soares Sobrinho**, pelo apoio técnico-científico, oportunidade, incentivo, compreensão, amizade e acima de tudo pelo otimismo e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha co-orientadora, **Miracy Muniz de Albuquerque**, por sua disponibilidade sempre que necessário.

A minha família por todo apoio e amor em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês!

A professora, **Larissa Rolim**, por todos os ensinamentos e contribuições. Muito Obrigada!

A minha companheira de experimentos e amiga, **Camila Bezerra Melo Figueirêdo**, por todo apoio imensurável durante todo o período da execução deste trabalho. Miloca você foi fundamental, sem você eu não conseguiria... Muito obrigada!

A minha amiga, **Amanda Carla Quintas de Medeiros Vieira**, por toda contribuição e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

A **Felipe de Albuquerque Marinho e Victor Matheus Souza**, por toda dedicação e desempenho durante a execução do trabalho.

Ao Nucleo de Controle de Qualidade de Medicamento e Correlatos (NCQMC) pelo desenvolvimento deste trabalho, em destaque professora **Mônica Soares**, e a todos os integrantes e amigos de convivo diário, **Cybelle Marques, Marciana Cordeiro, Maria Luiza, Suellen Cavalcanti, André Nascimento, Graziella Macêdo, Camila Barros, Diórgenes Oliveira, Bruno Aires, Rosário e Luiz**.

Ao **Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM)** pela oportunidade de realizar parte deste trabalho e **aos seus integrantes**, em especial ao professor **Pedro José Rolim Neto, Lariza Alves, Salvana Priscyla, Magaly Lyra, Graziella Marques, Ricardo Tadeu e Caio Cezar**.

As minhas amigas **Tarcyla de Andrade, Janessa Domingos, Grace Cordeiro, Isabelle Violet**. Obrigada pelo carinho e amizade de sempre. Amo vocês!

E a **todos** aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu
tamanho original”*

(Albert Einstein)

RESUMO

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (FTD) é um antirretroviral utilizado contra o HIV/Aids, que apresenta uma estabilidade crítica, visto o grande número de impurezas reconhecidas pelas Farmacopeias e a grande susceptibilidade à degradação nos meios hidrolíticos, oxidativo e fotolítico descrita na literatura. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de pré-formulação do FTD visando avaliar sua estabilidade física e química, enquanto fator de importância para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados com a qualidade do medicamento. O estudo abrangeu a caracterização físico-química do FTD através da Difração de Raios-X (DRX), Espectrofotometria no infravermelho (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e análise térmica, assim como o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente e cinéticas de degradação térmica. Paralelamente foi realizada a avaliação da higroscopicidade do FTD para avaliar a sua influência na estabilidade e, uma vez confirmada esta característica, foi realizado o estudo de degradação forçada sob condições de hidrólise ácida, básica e neutra, como também de oxidação, monitorando o FTD pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A pureza confirmada por análise térmica foi de 98,28%, fusão em 117,53°C ($\Delta H = -70 \text{ J. g}^{-1}$), com pico característico de um típico padrão cristalino, confirmado por DRX. O composto manteve-se estável até 146,49°C, onde iniciou perda de 77,53% da sua massa. A cinética não-isotérmica indicou energia de ativação (E_a) de 87,86 kJ/mol, com $n = 1$ e $A = 5,511 \times 10^9 \text{ min}^{-1}$ e a isotérmica apresentou E_a de 132,76 KJ. mol⁻¹. O estudo de compatibilidade com os excipientes da formulação comercial Viread® evidenciou possíveis interações químicas entre o FTD com o estearato de magnésio e a lactose, confirmadas por FTIR que apresentou deslocamento de 13cm⁻¹ e de 44,14cm⁻¹ respectivamente. O teste de higroscopicidade demonstrou a característica higroscópica do fármaco devida a absorção de água superior a 1%, sobretudo sob 96% de umidade relativa, sendo as condições de hidrólise com HCl 0,05M, NaOH 0,03 M, oxidativa com H₂O₂ 15% em 0 min, e água à 80°C em 24h; as quais degradaram 10 a 30% do fármaco. A execução deste trabalho permitiu estabelecer as condições de estabilidade térmica e química do FTD, além de conhecer as características peculiares do FTD, críticas para o desenvolvimento de formulações com este fármaco.

Palavras-chave: Antirretroviral. Estabilidade de medicamentos. Higroscopicidade. Excipientes. Hidrólise.

ABSTRACT

The tenofovir disoproxil fumarate (FTD) is an antiretroviral used against HIV / AIDS, which presents a critical stability, given the large number of impurities Pharmacopoeias and recognized by the marked susceptibility to degradation in hydrolytic, oxidative and photolytic means described in the literature. The objective of this work was to study pre-formulation of FTD to evaluate their physical and chemical stability, while of importance for evaluation, prediction and prevention of problems related to drug quality factor. The study covered the physicochemical characterization of FTD by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and thermal analysis, as well as the drug-excipient compatibility study and kinetic Thermal degradation. Parallel evaluation of hygroscopicity of FTD was performed to assess its influence on the stability and once confirmed this characteristic, the forced degradation study was conducted under conditions of acidic, basic and neutral hydrolysis as well as oxidation by monitoring the FTD technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The purity was confirmed by thermal analysis of 98.28%, melting at 117.53 ° C ($\Delta H = -70 \text{ J K}^{-1}$), a typical characteristic peak of crystalline pattern was confirmed by XRD. The compound was stable up to 146.49 ° C, where he began losing 77.53% of its mass. The non-isothermal kinetics indicated activation energy (E_a) of 87.86 kJ / mol, with $n = 1$ and $A = 5,511 \times 10^9 \text{ min}^{-1}$ and E_a presented isotherm of 132.76 KJ. mol⁻¹. The study of the compatibility of the formulation excipients commercial Viread ® showed possible chemical interactions between the FTD with magnesium stearate and lactose and confirmed by FTIR showed that displacement of 13cm⁻¹ and 44.14 cm⁻¹ respectively. The test showed hygroscopicity of the hygroscopic characteristics of the drug due to absorption of more than 1% water, especially under 96% relative humidity, under conditions of hydrolysis with 0.05 M HCl, 0.03 M NaOH, H₂O₂ 15% oxidative at 0 min and water at 80 ° C for 24 hours; which degraded 10 to 30% of the drug. The execution of this work allowed us to establish the conditions for thermal and chemical stability of FTD, and we understand the peculiar features of FTD, critical to the development of formulations with this drug.

Keywords: Antiretroviral. Stability of drugs. Hygroscopicity. Excipients. Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Fumarato de Tenofovir Desoproxila	32
Figura 2 - Etapas da síntese clássica do fumarato de tenofovir desoproxila	32
Figura 3 - Impureza chave da primeira etapa de síntese do FTD	33
Figura 4 - Impurezas chave da 3ª etapa da síntese do FTD	33
Figura 5 - Ilustração da proteção conferida pelo RPC à adenina	34
Figura 6- Mecanismo de ação do tenofovir como um nucleotídeo inibidor da transcriptase reversa.	35
Figura 7 - Fluxograma para a avaliação da estabilidade térmica do FTD	55
Figura 8 - Espectro de absorção de Infravermelho do FTD	59
Figura 9 - Curva DSC do FTD obtida com massa de 2mg, sob atmosfera de N ₂ em fluxo de 50mL/min e razão de aquecimento 10°C/min ⁻¹	61
Figura 10 - Curva de DSC do FTD obtida na razão de 0,5°C/min sob atmosfera de N ₂ 50 mL /min ⁻¹ .	62
Figura 11 - Curvas TG, DTG e DTA do FTD obtida em atmosfera dinâmica de N ₂ 50mL /min ⁻¹ e razão de aquecimento 10°C/min ⁻¹	63
Figura 12 - Curvas TG e o gráfico de Ozawa do FTD obtidos em quatro razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não isotérmico	64
Figura 13 - Curvas isotérmicas do FTD em diferentes temperaturas na atmosfera de N ₂ .	65
Figura 14 - Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1/T, para a decomposição térmica das amostras de FTD	66
Figura 15 - As curvas de sorção de umidade do FTD.	67
Figura 16 - DRX e MEV do FTD após 28%, 75% e 96% de UR, respectivamente	68
Figura 17 - Curvas TG e DTA do FTD protegido da umidade e do FTD após 96% de UR, em atmosfera dinâmica de N ₂ 50 mL /min ⁻¹ e razão de aquecimento 10°C/min ⁻¹	69
Figura 18 - Cromatogramas obtidos com o FTD (matéria-prima) e com o FTD frente às condições de hidrólise ácida (HCl 0,05M, 0 min.), básica (NaOH 0,03M, 0 min.), neutra (água à 80° C, 24h); e oxidação (H₂O₂ 15%, 0 min.), com decaimento registrado de 20,55%, 10,76%, 30,01% e 24,01%, respectivamente.	70
Figura 18 - Cromatogramas obtidos com o FTD (matéria-prima) e com o FTD frente às condições de hidrólise ácida (HCl 0,05M, 0 min.), básica (NaOH 0,03M, 0 min.), neutra (água à 80° C, 24h); e oxidação (H₂O₂ 15%, 0 min.), com decaimento registrado de 20,55%, 10,76%, 30,01% e 24,01%, respectivamente.	70

Figura 19- Possível rota degradativa por hidrólise ácida e básica do FTD	72
Figura 20- Possível rota da degradação oxidativa do FTD	73
Tabela 4 - Dados termoanalíticos do FTD e das MB com excipientes	74
Figura 21 - Curvas DSC do FTD e dos excipientes obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹) e razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹	76
Figura 22 - Curvas TG obtidas a 10°C.min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de N ₂ das amostras de: (a) EMg, (b) MB de FTD + EMg, (c) Viread e (d) FTD	77
Figura 23 - Difratoograma de Raios X do FTD, Estearato de Mg, FTD+ Estearato de Mg (1:1) e FTD + Estearato de Mg (1:1) após aquecimento à 100°C	79
Figura 24 - Difratoograma de Raios X do FTD, Lactose monohidratada, FTD+ Lactose monohidratada (1:1) e FTD + Lactose monohidratada (1:1) após aquecimento à 140°C	80
Figura 25 - Espectro na região do IV do FTD, EMg, FTD + Estearato de Mg (1:1) e FTD + Estearato de Mg (1:1) após aquecimento à 100°C	81
Figura 26 - Espectro na região do IV do FTD, da lactose monohidratada e das MB 1:1 FTD + Lactose (25° C) e FTD + Lactose após aquecimento a 140° C	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espectro de absorção do Infravermelho do FTD	60
Tabela 2 - Correlação entre a ordem de reação do FTD	64
Tabela 3 - Teor, número de pratos teóricos (N) e pureza do pico do tenofovir desoproxila na matéria-prima e nas amostras estressadas	70
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos obtidos através do método não-isotérmico nas razões 5, 10, 20 e 40°C.min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Terapia Antirretroviral
ATR	Reflectância Total Atenuada
CMIC	Carbonato de Clorometilisopropil
CV	Coefficiente de Variação
DAD	Detector Espectrofotometrico de Arranjo de Diodos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios - X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
ETGF	Estimada Taxa de Filtração Glomerular
FDA	Food and Drug Administration
FTD	Fumarato de Tenofovir Desoproxila
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HCL	Ácido Clorídico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	International Conference and Harmonization
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IF	Inibidores de Fusão

Ii	Inibidores da integrase
IP	Inibidores da Protease
ITRNNs	Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos
ITRNs	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos
ITRNt	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleotídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
TD	Tenofovir Difosfato
TG	Termogravimetria
TGF	Taxa de Filtração Glomerular
TMSBR	Bromotrimetilsilano
UR	Umidade Relativa
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔH	Variação de Entalpia
®	Marca Registrada
%	Percentual
°	Grau
θ	Diâmetro
±	Mais ou menos
C	Celsius
C	Concentração
cm	Centímetro
Co	Concentração Inicial
J	Joule
EMg	Estearato de Magnésio
K	Kelvin
k	Constante de velocidade
R	Constante Real dos Gases
KJ	Quilojoule
Log	Logarítimo
Ea	Energia de ativação
T _o	Temperatura de Fusão Inicial
T _s	Temperatura de Fusão
g	Grama

min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Milímetro
U	Água absorvida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.9 IMPUREZAS (IMPS) E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO (PDS)	27
3.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA	27
3.1 HIV/AIDS	27
3.2 TERAPIA ANTIRRETROVITAL	29
3.3 FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA	31
3.4 ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO	37
3.5 ANÁLISE TÉRMICA	37
3.6 ANÁLISE TÉRMICA NO ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO/ EXCIPIENTE	39
3.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA	40
3.8 TESTES DE ESTABILIDADE	40
3.9 IMPUREZAS (IMPS) E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO (PDS)	43
3.10 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	43
3.10.1 Hidrólises	45
3.10.2 Oxidação	46
3.10.3 Fotólise	47
3.11 ESTUDO DAS CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 PARTE I: ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR FRENTE À UMIDADE E AO ESTRESSE HIDROLÍTICO E OXIDATIVO	50
4.1.1 Material	50
4.1.2 Métodos	50

4.1.2.1 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	50
4.1.2.2 Difração de Raios-X (DRX)	50
4.1.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
4.1.2.4 Análise Térmica	51
4.1.2.5 Obtenção das cinéticas de decomposição não-isotérmica e isotérmica	51
4.1.2.6 Determinação de água por Karl Fischer	52
4.1.2.7 Estudo de higroscopicidade	52
4.1.2.8 Estudo de degradação forçada sob condições hidrolíticas e oxidativa	53
4.2 PARTE II: ESTUDO DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO NÃO-ISOTÉRMICA DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR COM ADJUVANTES FARMACÊUTICOS	54
4.2.1 Material	54
4.2.2 Métodos	54
4.2.2.1 Estudo de compatibilidade utilizando Análise Térmica	55
4.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	56
4.2.2.3 Termogravimetria (TG/DTG)	56
4.2.2.3 Difração de raios X (DRX)	56
4.2.2.4 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	57
4.2.2.5 Estudo cinético de decomposição não-isotérmica	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 PARTE I: ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR FRENTE À UMIDADE E AO ESTRESSE HIDROLÍTICO E OXIDATIVO	59
5.1.1 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	59
5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial	60
5.1.3 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial	62
5.1.4 Estudo das cinéticas de decomposição não-isotérmica e isotérmica	63
5.1.5 Estudo de higroscopicidade do FTD	66
5.1.6 Teste de estresse	69

5.2 PARTE II. ESTUDO DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO NÃO- ISOTÉRMICA DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR COM ADJUVANTES FARMACÊUTICOS	74
5.2.1 Estudo de compatibilidade do FTD com excipientes utilizando análise térmica	74
5.2.2 Estudo de compatibilidade do FTD com excipientes utilizando DRX e FTIR	79
5.2.3 Estudo cinético de decomposição não-isotérmica	82
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	85
7 REFERÊNCIAS	86
8 ANEXOS	104

INTRODUÇÃO

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (PINNA, 2012). O agente causal desta epidemia é o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que sem a capacidade de autorreplicação, atua como parasita, invadindo as células que possuem o receptor CD4. Trata-se de um vírus de RNA com propriedade de fazer a transcrição reversa a partir do seu RNA genômico, formando assim o seu DNA (MOGENSEN et al., 2010).

A terapia antirretroviral (ARV) combinada, iniciada a partir de 1996, contribuiu com a redução da morbimortalidade, pois permitiu a reconstituição do sistema imunológico do paciente infectado pelo HIV (GASPARIN, 2009). Esses regimes terapêuticos têm demonstrado a capacidade de diminuir ou mesmo de tornar indetectável a carga viral do HIV (BONOLO, 2007). Nesse sentido, a terapia ARV possibilita o aumento significativo na expectativa e na qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV (POLEJACK, 2010).

Atualmente, estão disponíveis para a realização do esquema medicamentoso cinco classes de ARV: os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ ITRNt), os inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (ITRNN), os inibidores da protease (IP), os inibidores de fusão (IF) e os inibidores da integrase (Ii). Dentre essas classes de ARV, o Ministério da Saúde disponibiliza 21 medicamentos, os quais agem de forma distinta conforme a ação do HIV no seu ciclo (BRASIL, 2012).

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (FTD) é o único ARV pertencente à classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (ITRNt), cuja aplicação na clínica médica se destina ao tratamento do HIV e hepatite B (HBV) (HONGTHANAKORN, 2010), por isso é frequentemente administrado em pacientes com co-infecção HIV-1 e HBV (SORIANO et al., 2010). Trata-se de um pró-fármaco que é convertido *in vivo* em difosfato de tenofovir e exerce ação ARV ao inibir a atividade da transcriptase reversa do HIV-1 (DRUGBANK, 2013). Quimicamente se trata de um análogo da adenosina 5' –monofosfato (DELAHUNTY et al, 2006), com capacidade de ser metabolizado por células em repouso. Este acúmulo em células em repouso repercute na capacidade do fármaco de inibir o HIV em células latentes, característica ausente nos ITRNs, como a zidovudina ou estavudina

(KEARNEY et al., 2004). O medicamento encontra-se comercialmente disponível na forma de comprimido (150, 200, 250 e 300 mg) (GUIDELINE, 2013).

Em se tratando das suas características físico-químicas, o FTD é descrito como um pó cristalino branco a branco-amarelado, sem odor, com massa molecular de 635, $51\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (USP, 2011). Além disso, para este pró-fármaco são descritas 13 impurezas na Farmacopeia Internacional (WHO, 2009) e 8 impurezas na Farmacopeia Americana (USP, 2011), incluindo impureza enantiomérica, e os relatos oriundos dos estudos de estresse encontrados na literatura apontam para a grande susceptibilidade do FTD frente à hidrólise ácida, básica, neutra e oxidativa (ASHENAFI et al., 2010; HAVELE, HANESHWAR, 2012a; HAVELE, DHANESHWAR, 2012b). Ademais, as monografias oficiais para o FTD recomendam seu armazenamento sob proteção da luz e com temperatura entre 2°C e 8°C (WHO, 2009; IP, 2007; USP, 2011). Todos esses fatores fazem, portanto alusão à instabilidade deste fármaco, que podem promover desde alterações na aparência física à perda da potência do fármaco, além de prejuízo a segurança do produto (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Paralelamente, a ingestão prolongada de fármacos pode levar ao seu acúmulo no organismo, podendo este sofrer uma série de reações inesperadas em condições orgânicas, tais como oxidação, hidrólises ácidas, básicas ou neutras. Estas possíveis reações podem ser mimetizadas pelo “stress testing”, que é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas (ROLIM, 2010).

Assim, diante dos fatores mencionados, ressalta-se a importância de realizar um estudo de pré-formulação com o ARV em questão, com ênfase na avaliação da sua estabilidade térmica e química, os quais irão fornecer uma visão integrada para nortear o desenvolvimento de medicamentos à base de FTD. A caracterização da matéria-prima permitirá conhecer fisicamente e quimicamente o material, além de avaliar o comportamento dessas propriedades frente às condições de umidade comumente encontradas. O teste de higroscopicidade será corroborado com a realização das degradações em meio hidrolítico e oxidativo. Por fim, a caracterização térmica do material, com elaboração das cinéticas de degradação e o estudo termoanalítico de compatibilidade envolvendo o fármaco, e os componentes da sua formulação irão contribuir para a abordagem supracitada.

OBJETIVOS

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

2 OBJETIVOS

Os objetivos que norteiam este trabalho são apresentados abaixo subdivididos em objetivo geral e específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar estudo de pré-formulação do Fumarato de Tenofovir Desoproxila visando à avaliação da sua estabilidade, enquanto fator fundamental para o desenvolvimento de medicamentos com este princípio ativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização físico-química da matéria prima Fumarato de Tenofovir Desoproxila utilizando Difração de Raios-X (DRX), estudo de higroscopicidade, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), e análise térmica;
- Avaliar estabilidade térmica do princípio ativo por meio de cinéticas de degradação não-isotérmica e isotérmica utilizando Termogravimetria (TG/DTA);
- Desenvolver estudo de compatibilidade fármaco-excipiente por análise térmica e confirmar as interações detectadas utilizando FTIR, DRX e cinética de degradação não-isotérmica;
- Conduzir estudo de avaliação da higroscopicidade do fármaco em diferentes condições de umidade e, uma vez confirmada esta característica, realizar estudo de degradação hidrolítica e oxidativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

REVISÃO DA LITERATURA

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para o fundamentação do trabalho foi realizada uma revisão da literatura sobre o HIV/AIDS, terapia antiretroviral, fumarato de tenofovir desoproxila, estudos de pré-formulação, análise térmica, estudo de compatibilidade fármaco/ excipiente, cinética de degradação térmica, testes de estabilidade, impurezas (IMPS) e produtos de degradação (PD) e a importância dos estudos de degradação forçada e o estudo das cinéticas de degradação.

3.1 HIV/AIDS

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a doença por ele provocada, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), têm sido intensa e amplamente estudadas desde o aparecimento dos primeiros casos, no final da década de 70 (ACURCIO, 1999). Ela configura um dos mais sérios problemas contemporâneos de saúde pública, apresentando alto grau de morbimortalidade e perspectivas de um contínuo crescimento e propagação em todos os continentes (CECATO, 2004). Segundo dados publicados pela *World Health Organization* (WHO) em 2010, 34 milhões de pessoas no mundo vivem com HIV. No Brasil, de 1980 a junho de 2011 foram notificados 608.230 casos de AIDS (MS, 2012). No ano de 2012 foram notificados 39.185 casos e este valor vem mantendo-se estável nos últimos 5 anos. A taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul, 30,9/100.000 habitantes, seguida pela Região Norte (21,0), Região Sudeste (20,1), Região Centro-Oeste (19,5), e Região Nordeste (14,8) (MS, 2013). O HIV causa no organismo disfunção imunológica crônica e progressiva devido ao declínio nos níveis de linfócitos T CD4⁺. O período entre a contaminação pelo HIV e a manifestação da AIDS pode durar alguns anos (CANINI, 2004).

O HIV é derivado da família dos vírus *retroviridae* e é um membro do gênero *lentivirus*. Duas espécies deste retrovírus são conhecidas na infecção de humanos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1, originado dos chimpanzés, é mais virulento que o HIV-2 e é responsável pela maior parte das infecções pelo HIV. O HIV-2, originado do macaco Sooty Mangabay, é menos virulento e está mais restrito à África Ocidental. O HIV-1 ainda pode ser subdividido

em quatro grupos principais e em diversos subgrupos geneticamente distintos (AVERT, 2012).

Esta grande variabilidade genética entre os subtipos do vírus HIV é produto de vários mecanismos: a falta de atividade de revisão do gene da transcriptase reversa (o que leva a uma taxa de mutação de aproximadamente $3,4 \times 10^{-5}$ por par de base em cada ciclo de replicação), a alta taxa de rotatividade *in vivo* e a recombinação entre duas linhagens distintas do vírus replicando dentro de uma única célula de determinado paciente (LUFT, 2011).

O HIV ataca principalmente as células T CD4⁺ através da ligação da sua glicoproteína de membrana gp120 ao receptor CD4 e ao co-receptor CXCR4 da célula-alvo. Esta infecção resulta tipicamente numa vasta replicação do vírus durante a fase aguda. A carga viral então se torna muito mais baixa e se aproxima de um estado quase estacionário, chamada fase crônica. Um balanço entre altas taxas de produção de vírus e sua liberação pode explicar por que a carga viral permanece notavelmente estável numa escala temporal de semanas (PATERSON, 2010; XIAO, 2013). Depois disso, a carga viral irá aumentar lentamente até o aparecimento da AIDS, enquanto o número de linfócitos T CD4⁺ diminui regularmente (SABIN, 2000). Finalmente, a carga viral aumenta de forma significativa após o desenvolvimento da AIDS, a qual é definida quando as contagens das células T CD4⁺ cai abaixo 200 células/ μ L de plasma, ou quando ocorrem doenças específicas em associação com a infecção pelo HIV (XIAO, 2013).

A morbidade e mortalidade por HIV-1/AIDS criou um desproporcional fardo em pessoas relativamente jovens, e ainda o faz em muitas partes do mundo. Nos Estados Unidos, entre 1994-1995, o HIV-1 era a principal causa de morte entre os indivíduos com 25-44 anos de idade e em 1995 causou cerca de 32.000 mortes, ou 20% de todas as mortes nessa faixa etária. Finalmente, entre 1997-2000, a mortalidade causada por HIV-1 caiu para quinto lugar e para o 6 ° lugar entre 2001-2005. Em 2005, HIV-1/AIDS causou cerca de 6.000 mortes, ou 5% de todas as mortes nessa faixa etária. A larga redução na mortalidade foi devido ao advento e a ampla disponibilidade da terapia antirretroviral (ARV), reforçada pela aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) de kits de carga viral e outros diagnósticos moleculares (BRODER, 2010).

3.2 TERAPIA ANTIRRETROVITAL

O primeiro caso de AIDS foi registrado no Brasil em 1982 e, enquanto muitos países têm se esforçado para conter a propagação do HIV e para cuidar das pessoas com AIDS, o governo brasileiro tem realizado esforços agressivos para minimizar o impacto da epidemia de HIV. Até o final de 2011, estimava-se que 490.000 brasileiros viviam com HIV e cerca de 15.000 mortes por doenças relacionadas à AIDS foram registradas neste ano. Em 2002, metade de todas as pessoas no mundo que recebiam tratamento antirretrovital (ARV) estavam no Brasil. O compromisso do país no acesso ao tratamento tem continuado desde então, alcançando em 2011 o status de acesso universal à terapia ARV através do fornecimento de tratamento a mais de 80% das pessoas que necessitavam desta terapia (AVERT, 2013).

Em se tratando dos pacientes idosos no Brasil, a incidência de AIDS em pessoas com a faixa etária de 50 anos ou mais duplicou entre 1996 e 2006 (BRASIL, 2011). O avanço da terapia ARV tem então aumentado a expectativa de vida dos indivíduos diagnosticados com essa idade. Estima-se que até 2015, as pessoas com 50 anos de idade ou mais irão representar 50% das pessoas vivendo com HIV em tratamento clínico (VANCE, 2010). Um paciente com infecção típica de HIV-1 nos Estados Unidos (EUA), por exemplo, vive aproximadamente 14 anos a mais devido às intervenções dos ARV e, se esse benefício é expresso em anos de vida, milhões de anos de vida têm sido salvos pelo desenvolvimento de medicamentos ARV (WALENSKY, 2006; VERMUND, 2006). Este cenário, no entanto, encontra alguns desafios, incluindo o fato do diagnóstico ser geralmente tardio em pessoas com mais idade, alguns sintomas serem confundíveis com os de outras doenças comuns entre idosos e o fato da maioria dos profissionais de saúde não considerarem a população idosa como uma parcela de risco para infecção por HIV. Além disso, para estes indivíduos já diagnosticados com HIV há ainda o desafio da morbidade associada ao envelhecimento e a maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos e às interações medicamentosas nesta população (CARDOSO, 2013).

Desde 1996, a introdução do tratamento ARV revolucionou a terapia da infecção pelo HIV (TAKAHASHI, 2007). Além do impacto clínico favorável, o início mais precoce da terapia ARV vem sendo demonstrado como ferramenta importante na redução da transmissão

do HIV. Todavia deve-se considerar a importância da adesão e o risco de efeitos adversos do tratamento a longo prazo (MS, 2013).

A disponibilidade de terapia ARV aumentou significativamente a expectativa de vida das pessoas vivendo com HIV. A cobertura mundial da terapia aumentou de 7% em 2003 para 42% em 2008 e, aproximadamente, 12 milhões de anos de vida foram adicionados no mundo entre 1996 e 2008 (CARDOSO, 2013).

Atualmente são adquiridas 32 apresentações dos medicamentos ARV, das quais 13 são nacionais e 19 são importadas. Esse último grupo corresponde a 72% do gasto total do Ministério da Saúde (MS) do Brasil com a compra de medicamentos ARV (BRASIL, 2010d). Em 2009, o investimento total do MS com a aquisição de ARV foi de aproximadamente R\$ 650 milhões para tratamento de quase 200 mil pacientes (HALLAL, 2010).

O tratamento ARV geralmente é composto por uma combinação de pelo menos três medicamentos ARV de diferentes classes (vias de atuação), a fim de aumentar a eficácia e diminuir o risco de resistência medicamentosa. Esse esquema terapêutico está fundamentado na atuação conjunta de diferentes fármacos nas diferentes etapas do ciclo de replicação viral, que apresenta diversos eventos exclusivamente relacionados a componentes virais utilizados como alvos para intervenção quimioterápica (MARIER, 2007).

O tratamento ARV, embora não represente a cura para a infecção pelo HIV, tem promovido uma supressão quase total da replicação do HIV. Os ARVs são assim classificados, de acordo com as enzimas virais do ciclo celular que inibem: Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleotídeo (ITRNt, ex.: fumarato de tenofovir desoproxila), Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRNs, ex.: zidovudina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir e emtricitabina), Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNNs, ex.: nevirapina, efavirenz, delavirdina, etravirina) e Inibidores da Protease (IP, ex.: saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir e darunavir) (CHEARSKUL, 2006; DE CLERCQ, 2010).

No início da terapia é recomendada a utilização de esquemas eficazes, mais simplificados, menos tóxicos e de menor custo, que geralmente inclui combinações de três

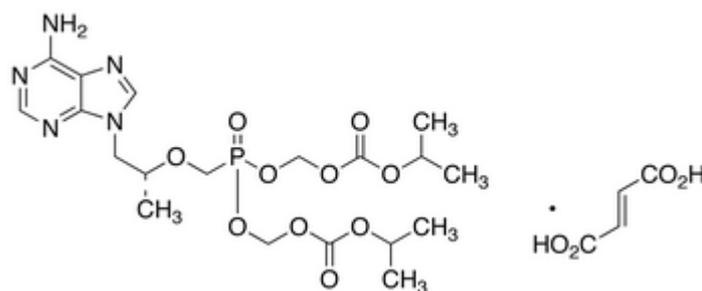
antirretrovirais, sendo dois ITRN (sendo estes zidovudina/lamivudina ou Fumarato de Tenofovir Desoproxila/lamivudina) associados a um ITRNN ou IP. A decisão em relação a esta escolha deve considerar alguns fatores:

- Eficácia e toxicidade imediata e no longo prazo;
- Presença de coinfeções e comorbidades;
- Uso concomitante de outros medicamentos;
- Potencial de adesão;
- Adequação à rotina de vida do paciente;
- Interação com a alimentação;
- Custo dos medicamentos (BRASIL, 2013).

3.3 FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA

O primeiro fármaco introduzido no mundo pertencente à classe dos ITRNt foi o tenofovir [1-(6-aminopurin-9-il) propan-2-ilo ximetilfosfônico ácido]. O tenofovir é administrado como um pró-fármaco na forma de Fumarato de Tenofovir Desoproxila (FTD), aprovado em 2001 como Viread[®]. Quimicamente se trata de um análogo da adenosina 5' – monofosfato (figura 1) (DELAHUNTY et al, 2006), com capacidade de ser metabolizado por células em repouso e pode atingir uma concentração duas vezes maior em monócitos periféricos em repouso em relação a monócitos ativos (ROBBINS et al, 1998). O acúmulo do fármaco em células em repouso significa que o tenofovir tem a capacidade de inibir o HIV em células latentes, característica ausente nos ITRNs desenvolvidos anteriormente, como a zidovudina ou estavudina (KEARNEY et al., 2004).

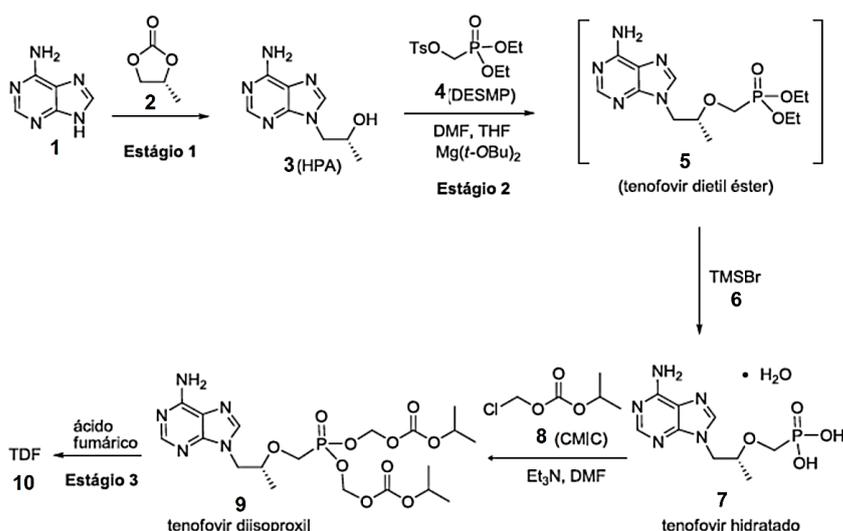
Figura 1 - Estrutura química do Fumarato de Tenofovir Desoproxila



Fonte: adaptado de Siqueira (2012).

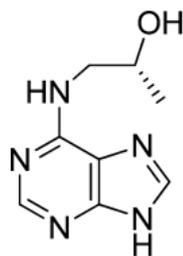
Na sua síntese, uma sequência de três etapas reacionais pode ser aplicada à adenina para obtenção sintética do FTD (Figura 2). Na primeira etapa, a adenina (**composto 1**) sofre facilmente uma reação de condensação com o (R) propileno-carbonato – RPC (em excesso) (**composto 2**), a 120°C, sendo adicionado o grupamento 2-propanol ao segundo nitrogênio da adenina, gerando o produto (R)-9-(2-hidroxipropil) adenina – HPA (**composto 3**) (RIPIN et al., 2010; SIQUEIRA, 2012). Nesta etapa, a única impureza significativa formada é um regioisômero (em torno de 10%) demonstrado na Figura 3. A adição de tolueno provoca precipitação dos sólidos, acarretando um rendimento bruto de 84%, estando este contaminado com 7-9% desta impureza.

Figura 2 - Etapas da síntese clássica do fumarato de tenofovir desoproxila



SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

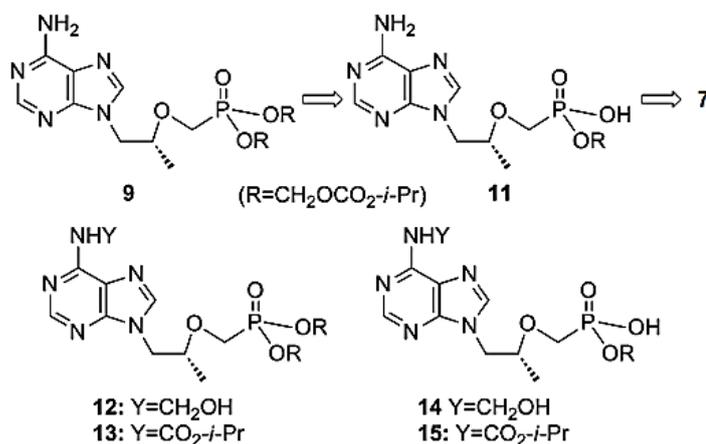
Fonte: adaptado de Siqueira (2012) **Figura 3** - Impureza chave da primeira etapa de síntese do FTD.



Fonte: Ripin et. al., 2010

Na segunda etapa, o produto resultante sofre uma reação de alquilação com o reagente dietil p-toluenosulfoniloximetanofosfonato – DESMP (**composto 4**), formando o tenofovir dietiléster (**composto 5**). Em sequência, tal produto sofre reação de hidrólise com o reagente bromotrimetilsilano - TMSBr (**composto 6**), formando o tenofovir hidratado (**composto 7**). Este produto, por sua vez, sofre dois tratamentos sucessivos (3ª etapa): 1) reage com o carbonato de clorometilisopropil – CMIC (**composto 8**), formando o tenofovir diisoproxil (**composto 9**); e 2) reage com ácido fumárico para obter o sal de fumarato, ou seja, o FTD (SIQUEIRA, 2012). Segundo Ripin et al. (2010), as impurezas-chave da terceira etapa de síntese são os compostos descritos na Figura 4.

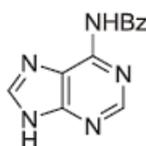
Figura 4 - Impurezas chave da 3ª etapa da síntese do FTD.



Fonte: Adaptado de RIPIN et al., 2010.

A primeira etapa de obtenção do FTD é crítica, pois a adição do grupamento 2-propanol poderia ocorrer apenas de forma parcial na região desejada, como cita Schultze e colaboradores (1998), já que existem outras regiões na molécula aptas a realizarem a reação, como o grupamento NH_2 . Entretanto, com a adição do reagente RPC (**composto 2**), alcançou-se uma melhoria significativa na obtenção do pró-fármaco, aumentando assim seu rendimento final. Esta melhoria deve-se à proteção dada à hidroxila primária e à proteção dada à hidroxila secundária, alcançando a total regioseletividade na posição N9, através da formação da N-benzil-adenina (Figura 5).

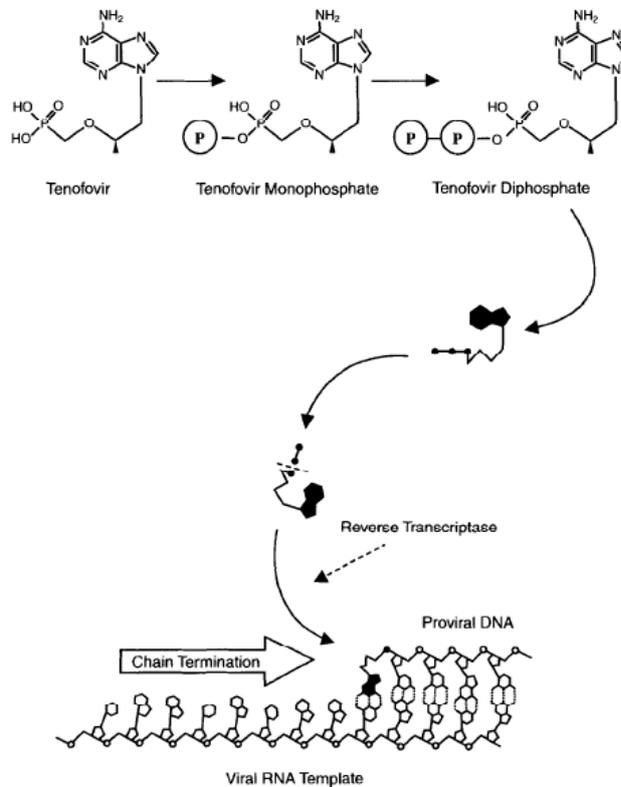
Figura 5 - Ilustração da proteção conferida pelo RPC à adenina.



Fonte: adaptado de SIQUEIRA, 2012.

Após a administração oral, o FTD sofre hidrólise mediada por esterases, que removem os dois grupos éster, como ilustrado na Figura 1, gerando o tenofovir. O tenofovir penetra nas células e sofre fosforilação pela adenilato quinase (AQ) gerando um intermediário monofosfatado, que é rapidamente convertido pela difosfato nucleosídeo quinase (DNQ) a sua forma ativa bifosfatada, conforme apresentado na Figura 6. O tenofovir difosfato atua como um inibidor competitivo da transcriptase reversa do HIV-1, competindo com o substrato natural deoxiadenosina 5'- trifosfato pelo sítio ativo de ligação na transcriptase reversa viral (DNA polimerase viral). A incorporação do tenofovir difosfato no DNA viral resulta na terminação da cadeia, uma vez que no tenofovir difosfato falta o grupamento hidroxil na posição 3', que seria o ponto de ligação do próximo deoxiribonucleosídeo trifosfato. Desta forma, a transcrição reversa, etapa-chave para a proliferação viral, é inibida (AZANZA, 2008; BRODER, 2010; BENNETTO-HOOD et al., 2007; FUNG et al, 2002;). O mecanismo de terminação da cadeia está representado na Figura 6.

Figura 6 - Mecanismo de ação do tenofovir como um nucleotídeo inibidor da transcriptase reversa.



Fonte: adaptado de FUNG, 2002.

O FTD é comercialmente fornecido na forma de pó cristalino branco a branco-amarelado, sem odor, com massa molecular de $635,51 \text{ g.mol}^{-1}$ (USP, 2011). Segundo as monografias oficiais, trata-se de um composto muito solúvel em metanol e diclorometano, e pouco solúvel em água e acetona (USP, 2011; WHO, 2009). A solubilidade em água destilada a 25°C é dita $13,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ (DRUGBANK, 2013).

O FTD encontra-se disponível comercialmente nas apresentações de administração oral: comprimido (150, 200, 250 e 300 mg) (RAKHMANINA, 2012; GILEAD, 2010; GUIDLINE, 2013) e pó (40 mg/g) (RAKHMANINA, 2012; GUIDLINE, 2013). Além destas, foram desenvolvidas nanopartículas para prevenção do HIV (MENG, 2011; ZHANG, BELLETTI et al., 2012), lipossomas (XU, 2011; ZIDAN et al., 2010), gel microbicida anti-HIV (KARIM et

al., 2011), anel intravaginal contra HIV e HSV (MESQUITA et al., 2012) e comprimido vaginal de liberação prolongada (MCCONVILLE et al., 2013).

Dentre as terapias antirretrovirais, uma das escolhas iniciais é a associação de FTD com lamivudina (TDF/3TC), que apresenta um perfil de toxicidade favorável em relação à lipoatrofia e à toxicidade hematológica quando comparado à zidovudina (AZT), e permite uma tomada única diária. A maior desvantagem de uso do FTD é a nefrotoxicidade, particularmente em diabéticos, hipertensos, negros, idosos e com uso concomitante de outros medicamentos nefrotóxicos. Pacientes com doença renal preexistente devem usar preferencialmente outra associação de ITRN. A diminuição da densidade óssea também tem sido relacionada ao uso de FTD (MS, 2013).

Uma série de estudos têm examinado a relação entre a exposição do FTD e a função renal através da medição da creatinina no soro e na maioria dos casos cálculo do clearance de creatinina ou estimada Taxa de Filtração Glomerular (eTFG) (HALL, 2011). Uma recente revisão sistemática e meta-análise que incluiu dados de 17 estudos concluíram que os pacientes tratados com FTD apresentaram uma pequena, mas perda significativa da função renal durante o curso de tratamento, em comparação com os grupos controles (diferença média em 3,9 mL/min da eTFG, IC 95%) (COOPER, 2010).

Em geral, os ensaios clínicos tendem a não mostrar significativa nefrotoxicidade com o FTD, ao passo que a diminuição das TFG foi relatada em estudos observacionais. Esta discrepância pode ser causada em parte pelo uso mais frequente nos ensaios clínicos de exclusão de pacientes com diminuição da função renal pré-existente, ou daqueles que utilizam outras drogas que podem interagir com FTD (GTMAN, 2007). Num estudo de coorte com mais de 10.000 pacientes sob tratamento com FTD, foi verificado aumento dos níveis de creatinina sérica de 0,5 e 2 mg/dL, observados em 2,2% e 0,6% do pacientes, respectivamente (NELSON, 2010).

A atividade antiviral foi avaliada contra diversas cepas de HIV-1 em linhagens celulares linfoblastóides, em monócitos/macrófagos primários e em linfócitos do sangue periférico. A CE50 (concentração efetiva 50%) do tenofovir situou-se no intervalo de 0,04 μ M e 8,5 μ M. Em estudos de associação farmacológica do tenofovir com ITRN, ITRNN e IP observaram-se efeitos aditivos e sinérgicos. O FTD demonstrou atividade antiviral em cultura de células contra os subtipos A, B, C, D, E, F, G, e O do HIV-1 (com valores de CE50 variando de 0,5

μM a $2,2 \mu\text{M}$) e atividade específica contra cepas de HIV-2 (valores de CE50 variaram de $1,6 \mu\text{M}$ a $5,5 \mu\text{M}$) (GILEAD, 2010). A concentração atingida pelo tenofovir em plexo coróide e líquido espinhal possibilita sua ação no sistema nervoso central (ANTHONY PILLAI, 2006).

O FTD também é um potente e inibidor seletivo do vírus da hepatite B (HBV) e contra o HBV resistente à lamivudina, tanto em doentes mono-infectados com HBV quanto em pacientes co-infectados com HIV-1 e de HBV (HU, 2013).

3.4 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Os estudos de pré-formulação visam acumular o máximo de informação sobre o comportamento dos fármacos, constituindo um valioso instrumento para traçar estratégias de desenvolvimento racional de formulações mais eficazes e seguras e, portanto, com maiores possibilidades de êxito (MAXIMIANO, 2010). Dados necessários (especialmente físico-químicos, físico-mecânicos e propriedades biofarmacêutica do fármaco, excipientes e materiais de embalagem) que possam influenciar no desenvolvimento da formulação, no processo da produção, na farmacocinética, nas propriedades biofarmacêuticas do produto final e na embalagem de acondicionamento escolhidas, são investigados no estudo de pré-formulação (GOPINATH, 2011; SOARES-SOBRINHO, 2010).

3.5 ANÁLISE TÉRMICA

O termo análise térmica refere-se a um grupo de técnicas nas quais propriedades físico-químicas de uma substância são mensuradas em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG) são as técnicas termoanalíticas mais difundidas e empregadas para o desenvolvimento de diferentes estudos sendo aplicadas a uma grande variedade de materiais farmacêuticos (VIANA, 2008; RODRIGUES, 2005).

As curvas TG e DSC oriundas dessas técnicas fornecem informações importantes sobre as propriedades físicas de substâncias (estabilidade, compatibilidade, polimorfismo, pureza, análise cinética e transição de fase) (SANTOS, 2008; ATTIA, 2012). Dessa forma, a

análise térmica é utilizada na indústria farmacêutica como uma técnica confiável para o controle de qualidade e para o desenvolvimento de formulações com novos fármacos (STULZER, 2008; VERMA, 2005).

Entre outras aplicações, a análise térmica tem se constituído como uma ferramenta para a avaliação rápida das interações entre os princípios ativos e excipientes nos estudos de pré-formulação e, embora não substitua completamente o programa clássico de estabilidade, ela pode fornecer um alerta precoce para problemas de compatibilidade, possibilitando a escolha das formulações mais estáveis com extrema rapidez, fator desejável especialmente para a indústria farmacêutica (OLIVEIRA, 2011; VECCHIO et al., 2001; RODANTE et al., 2002; SOUZA et al., 2002; CHAVES, 2010).

Nas curvas TG, a mudança em termos de massa da amostra aquecida a taxa constante são registradas e plotadas *versus* a temperatura. Este é um método eficaz de se estudar a estabilidade térmica e para determinação dos parâmetros cinéticos de decomposição de fármacos e medicamentos (VIANA, 2008).

A DSC, dentre várias técnicas de investigação de interação fármaco-excipiente, demonstrou ser a melhor na busca de indicadores de interação, pois com uma seleção adequada das condições experimentais é capaz de revelar as variações térmicas que podem resultar de uma interação entre os componentes em fase sólida. Assim, torna possível detectar a compatibilidade diretamente das misturas (BRUNI, 2010). Outra aplicabilidade da DSC é a determinação da pureza sendo, neste caso, bastante utilizada para materiais farmacêuticos e apresentando como vantagens a rapidez, exatidão, precisão e facilidade de execução, sem a necessidade de utilizar padrões certificados (STORPIRTIS, 2009).

Essas técnicas são amplamente aplicadas isoladamente ou combinadas com a microscopia, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X e espectroscopia de massa, que corroboram com a elucidação dos resultados (STULZER, 2008).

3.6 ANÁLISE TÉRMICA NO ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO/EXCIPIENTE

Durante muito tempo os excipientes eram considerados substâncias inertes, entretanto atualmente sabe-se que eles podem influenciar acentuadamente na ação terapêutica dos fármacos (ABDOU, 1995; CONSIGLIERE, 1996). Além disso, a relação destes excipientes da formulação frente aos ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) frequentemente resulta na degradação dos medicamentos em produtos (WU, 2011).

O estudo de compatibilidade fármaco/excipiente é importante na fase de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. De fato, o potencial de interações físicas e químicas entre fármacos e excipientes pode afetar a natureza química, a estabilidade, a biodisponibilidade das drogas e, conseqüentemente, sua eficácia (CHAVES, 2013). Além disso, as alterações posteriores que podem ocorrer com a formulação em decorrência de problemas de estabilidade inesperados podem levar ao aumento no tempo e no custo com o desenvolvimento de medicamentos. Por isso, a possibilidade de utilizar um método rápido e confiável para a previsão de compatibilidade fármaco-excipiente é de grande interesse para a indústria farmacêutica e, dessa forma, a aplicação da análise térmica pode ser favorável (BRUNI, 2010).

A DSC pode assim ser empregada como ferramenta de triagem para a previsão de tais reações entre fármaco-excipiente (MAXIMIANO, 2011). Em uma análise por DSC de mistura binária, ou multicomponente, pode haver a solubilização do fármaco por um excipiente da mistura durante o aquecimento. Isto acontece quando o excipiente tem menor faixa de fusão e consegue solubilizar o fármaco presente na mistura. No entanto, se existem cristais do fármaco intactos, estes fundem na faixa de temperatura adequada e, por isso, não existe interferência nas análises de compatibilidade propostas. Uma adequação da taxa de aquecimento pode ser necessária para melhor visualizar a faixa de fusão do fármaco nestas condições e uma alternativa seria realizar o aquecimento em uma menor razão de temperatura. Técnicas alternativas para visualizar este evento de solubilização do fármaco pelo excipiente podem ser necessárias, tais como análise termo-óptica (TOA) ou o uso de DSC fotovisual (OLIVEIRA, 2011, VERMA, 2005).

3.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

A cinética de degradação térmica tornou-se um elemento fundamental na análise térmica, onde o objetivo principal é determinar o mecanismo de reação de decomposição e os parâmetros da equação de Arrhenius (energia de ativação, fator de frequência e ordem de reação) (COSTA, 2013). Os parâmetros cinéticos como energia de ativação (E_a) e fatores de pré-exponencial (A) são calculados utilizando métodos integrais e diferenciais relatados na literatura (VIANA, 2008). A E_a é um dos parâmetros de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos farmacêuticos (VECCHIO et al., 2001; NETO, 2011). De acordo com Macedo et al. (2000), pode-se estabelecer um perfil comparativo de estabilidade entre vários fármacos através dos valores obtidos de E_a , em que quanto maior a energia de ativação, maior a estabilidade térmica do composto.

Há duas maneiras de determinar os mecanismos de reação e calcular os parâmetros cinéticos de Arrhenius: usando o método isotérmico e o não-isotérmico (ARAUJO, 2005). Os resultados deverão ser expressos como a fração decomposta de sólido ou conversão da transformação (α) em função da temperatura ou do tempo, já que não é possível considerar o termo da concentração para o estudo cinético de sólidos (PIMENTEL, 1998).

A representação de Arrhenius do $\ln k$ versus $1 / T$ (onde k é a taxa constante de degradação e T é a temperatura em Kelvin) deve dar uma linha reta. Os parâmetros cinéticos, tais como E_a ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) e A (S^{-1}) são obtidos a partir da inclinação da reta $-E_a / R$ (onde R é a constante dos gases, $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$) e do intercepto $\ln A$, respectivamente (FELIX, 2009).

3.8 TESTES DE ESTABILIDADE

A estabilidade de um fármaco é definida como a sua capacidade de manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas durante um período de tempo (O' DONNELL; BOKSER, 2006). Assim, o produto deve manter-se dentro dos limites especificados e durante todo período de estocagem e uso dentro das mesmas condições e características da época de sua fabricação. Este termo também ser definido como

o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado e aquele no qual sua potência está reduzida a não mais do que 10% (BRASIL, 2005).

Um estudo de estabilidade deverá ser iniciado sempre que surgir um novo produto, que ocorrer uma mudança no material das embalagens, no processo de fabricação ou no equipamento, em reformulações ou sempre que houver alterações dos fornecedores do fármaco ou excipiente crítico (TABORIANSKI, 2003). O estudo de estabilidade convencional associa diferentes etapas a fim de prever, confirmar e monitorar a estabilidade e a qualidade do produto (Quadro 1).

Quadro 1 - Tipos de estudo de estabilidade (adaptado de SOARES, 2011).

Tipos de estudo	Objetivos
Estudo de estabilidade primária	Visa à seleção dos melhores protótipos fabricados no laboratório de pesquisa e desenvolvimento (P & D) da indústria. Caracteriza-se como um estudo inicial de desenvolvimento e não possui condições de temperatura, umidade e luminosidade definidas na legislação.
Estudo de estabilidade acelerada	Visa acelerar o processo de registro de um produto farmacêutico, em condições forçadas de umidade relativa do ar (75% UR) e temperatura, durante seis meses, para simular o comportamento do produto para dois anos de armazenamento em condições normais pelo consumidor. As frequências dos ensaios são de 0, 3 e 6 meses.
Estudo de estabilidade de longa duração	Visa estabelecer a validade real do produto farmacêutico, substituindo a temperatura extrapolada para o estudo de estabilidade acelerada por uma temperatura mais amena. Cada estudo deve ser realizado em conformidade com as condições climáticas do país onde se intenciona registrar o produto. A frequência dos ensaios são geralmente a cada três meses no primeiro ano, semestralmente no segundo ano e, a partir do terceiro ano em diante, anualmente.

Estudo de fotoestabilidade	Pretende demonstrar que a exposição à luz não resulta em mudanças significativas. Pertence ao estudo de estabilidade convencional do produto, considerado no registro, sendo realizado para definir a capacidade da formulação do produto e do material de embalagem em proteger os fármacos da exposição à radiação ultravioleta e visível. O estudo deve ser conduzido com o ativo e produtos acabados, com e sem embalagem primária e do produto na embalagem comercial.
Estudo de estabilidade de acompanhamento	Caracterizado como Boas Práticas de Fabricação, desde que seu objetivo seja correlacionar a manutenção da qualidade dos lotes do produto que foram produzidos em longos períodos de tempo, através do monitoramento da estabilidade do mesmo. Esses estudos são realizados uma vez ao ano ou a cada dois anos, dependendo no número de lotes fabricados.

A avaliação da estabilidade também pode ser realizada por estudos de degradação forçada ou estresse, o qual permite determinar o efeito de condições extremas de degradação sobre o produto farmacêutico, excedendo aquelas utilizadas em estudos acelerados. Nesses ensaios, as condições de degradação aos quais os produtos farmacêuticos e fármacos são submetidos são: degradação térmica; hidrólise ácida, básica e neutra; decomposição oxidativa e fotolítica (KLICK et. al., 2005).

De acordo com a Resolução nº 01, de 29 de Julho de 2005 da ANVISA, deve-se apresentar no estudo de estabilidade do medicamento a justificativa de ausência ou a quantificação de produtos de degradação, assim como o método analítico correspondente. Desta forma, é imprescindível para a indústria farmacêutica o conhecimento de métodos indicativos de estabilidade, análise crítica de resultados de degradação de amostras submetidas a determinadas condições de estresse e a cinética da degradação do produto em questão (LINDINO, 2010).

O Guia de Estabilidade determinado pela *Food and Drug Administration* (FDA) define métodos indicativos de estabilidade como métodos analíticos quantitativos validados que podem detectar as alterações das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do

fármaco e do produto, em relação ao tempo, e que são específicos, de forma que o conteúdo do ativo, dos produtos de degradação e outros componentes de interesse possam ser exatamente medidos sem interferência (BAKSHI, 2002).

3.9 IMPUREZAS (IMPS) E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO (PD)

O foco em IMPs e PD nos produtos farmacêuticos são considerações de segurança. Há exemplos em que estes componentes quando encontrados podem induzir efeitos secundários em seres humanos. Um PD de tetraciclina (epianhydrotetracycline), por exemplo, provocou síndrome de Fanconi levando à insuficiência renal (SINGH, 2012). Outro exemplo é o de PD polimérico em aminopencilinas, ao qual se tem atribuído por causar alergenicidade, e não as próprias drogas (BETTO, 1989; ROMANO, 1997). Um subconjunto de IMPs e PD pode levar a uma potencial genotoxicidade, que representam uma preocupação adicional de segurança porque essas moléculas podem causar mutações genéticas, quebras cromossômicas e/ou rearranjos cromossômicos, conduzindo a um risco significativo de carcinogenicidade ou outros efeitos tóxicos (MULLER, 2006). Devido a estas razões, intensa atenção tem sido dada pelas agências reguladoras de todo o mundo e, conseqüentemente, várias diretrizes foram emitidas para o controle e teste de IMPs e PD.

3.10 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Ao longo da última década, a partir do momento em que uma série de diretrizes do International Conference and Harmonization – ICH Q3 foi introduzida, uma mudança radical tem ido para a definição de "qualidade" dos produtos farmacêuticos. O foco, definitivamente, mudou de "pureza" para "impurezas" em fármacos e produtos de degradação no final dos produtos farmacêuticos (SINGH, 2012).

Os estudos de degradação forçada também são conhecidos como testes de estresse, estudos de estresse, estudos de decomposição, estudos de decomposição forçada, etc. Estes estudos não têm sido exigidos na prática industrial por longo período de tempo, mas tornou-se um requisito regulamentar formal com a introdução da *International Conference and Harmonization* (ICH), na diretriz intitulada "Stability Testing of new Drug Substances and Products" (Q1A), em 1993. Essa diretriz usada "teste de estresse" foi definida para as substâncias farmacêuticas como se segue: "Estes estudos são realizados para elucidar as características de estabilidade intrínseca". Este tipo de teste é estratégico no desenvolvimento e normalmente é realizado sob condições mais severas do que os utilizados para os testes acelerados. Os testes de estresse são conduzidos para prover produtos de decomposição forçada e mecanismos de decomposição do fármaco. Esse estudo também visa formar padrões de produtos de degradação desconhecidos na amostra. A formação de produtos de degradação em medicamentos além de comprometer a eficácia clínica do fármaco, pode apresentar efeitos tóxicos ao organismo, de intensidade leve a letal (SINGH, 2000).

O conhecimento adquirido a partir de testes de estresse também é útil para a formulação e desenvolvimento de embalagens. Quando esses bem projetados podem determinar a susceptibilidade de um composto para a hidrólise, oxidação, degradação fotoquímica e a degradação térmica. Esta informação é então levada em consideração ao desenvolver a formulação e determinar a embalagem apropriada. Por exemplo, se os estudos de teste de degradação indicam que um composto é rapidamente degradado em ácido, em seguida, deveria ser dado ao desenvolvimento de uma formulação um revestimento entérico que protege o composto da rápida degradação no estômago. Do mesmo modo, se um composto é sensível à hidrólise neutra, uma embalagem que protege contra a transmissão de vapor de água a partir do lado de fora da embalagem para o seu interior pode ser útil para assegurar a estabilidade de armazenamento em longo prazo (BAERTSCHI; JANSEN, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a orientação de testes de estabilidade de fármacos de 1996 (WHO, 1996), que era aplicável a produtos farmacêuticos que contenham substâncias farmacológicas bem estabelecidas, não tem qualquer exigência para o teste de stress. A atual diretriz da OMS de 2009 (WHO, 2009) baseia-se no ICH Q1A (R2) (ICH, 2003) e descreve as mesmas definições, objetivo e requisitos, conforme

mencionado na ICH Q1A (R2) de novos medicamentos, fornecendo ainda subsídio importante para o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), bem estabelecido na seguinte redação: Para um IFA podem ser utilizadas as seguintes abordagens, quando disponíveis, é aceitável fornecer os dados relevantes publicados na literatura científica para ajudar a identificação dos produtos de degradação e os caminhos, e quando não há dados disponíveis, os testes de estresse devem ser realizados.

Conforme o ICH, o processo que estabelece um método indicativo de estabilidade envolve testes de estresse, que auxiliam na identificação dos possíveis produtos de degradação, que por sua vez ajudam a estabelecer as vias de degradação, a estabilidade intrínseca da molécula e a validar o poder indicativo de estabilidade dos procedimentos analíticos utilizados (KOVARICOVA, 2004; ICH Q1A, 2003; BAKSHI, 2001). Esses estudos de estresse são importantes durante a pré-formulação, já que ajudam a avaliar a estabilidade intrínseca de um medicamento por aplicação deliberada de estresse para forçar a degradação (COELHO, 2012).

A degradação do fármaco é induzida através do aumento da temperatura, do aumento da umidade (quando relevante), da exposição a condições variadas de pH ou à luz UV-visível intensa (fotoestabilidade) ou pela adição de outros reagentes (por exemplo, ácidos, bases, peróxidos) (QIU, 2009). Embora essas exposições não substituam procedimentos rigorosos envolvendo testes de estabilidade do produto na forma em que será comercializado, eles proporcionam um ganho considerável de tempo durante o processo de desenvolvimento do produto, quando é necessário identificar com rapidez uma formulação que apresente estabilidade aceitável (FLORENCE, ATTWOOD, 2011).

3.10.1 Hidrólises

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação. Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição

de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ANSEL, 2007).

O estudo de estresse para ser realizado em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio. No entanto, muitas variações são observadas quanto ao tempo, temperatura e concentração dos reagentes utilizados nessas condições (SILVA, 2009). Na literatura existem pouco relatos sobre a hidrólise realizada em pH neutro, onde geralmente se utiliza água como agente de hidrólise, o que é compreensível, porque reações em pH neutro são não-catalíticas e por isso podem ser necessários períodos muito longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação (SINGH, 2000).

A maioria dos autores prefere iniciar os estudos com concentrações mais baixas e aumentar gradativamente à medida que se observa a não degradação. Apesar de não haver padronização oficial quanto ao roteiro a ser seguido para a realização dos testes, é importante assegurar que os produtos de degradação trabalhados sejam os iniciais, não sendo o objetivo destes testes avaliação de produtos de degradação secundários (CHAVES, 2010).

3.10.2 Oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos e um dos mecanismos mais comuns de degradação, dentre os mais conhecidos e estudados têm-se os esteroides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical (FLORENCE, ATTWOOD, 2011).

A degradação oxidativa pode ocorrer por auto-oxidação, na qual a reação não-catalisada progride muito lentamente sob a influência do oxigênio molecular, ou pode envolver um processo em cadeia que consiste de três reações simultâneas: iniciação, propagação e término (FLORENCE, ATTWOOD, 2011; BAERTSCHI, JANSEN, 2005). Para estudos com fármacos, geralmente, utiliza-se peróxido de hidrogênio para criar condições de estresse e a concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30% (SILVA, 2009).

3.10.3 Fotólise

A degradação fotolítica, aplicada a estabilidade farmacêutica, é a degradação que resulta da exposição a luz ultravioleta ou visível no intervalo de comprimento de onda de cerca de 300-800 nm. Sendo assim, para a degradação fotolítica ocorrer, a radiação tem que ser absorvida, seja pela substância medicamentosa ou pela formulação (BAERTSCHI; JANSEN, 2005).

A fotodegradação de medicamentos pode conduzir à perda de princípios ativos e assim à perda na sua eficiência, além de formar subprodutos ou intermediários tóxicos de vida curta (ex. radicais livres) (LAVOIE, 2004; PIECHOCK, 2007).

Para o registro de produtos no Brasil, poderá ser necessária a comprovação da fotoestabilidade em adição aos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos. A RE 01/2005 reporta as recomendações para a realização desses estudos. A não apresentação do estudo de fotoestabilidade deve ser justificada tecnicamente com base em evidências científicas de que os componentes do produto não sofrem fotodegradação ou que a embalagem primária não permite a passagem de luz (BRASIL, 2005; ICH Q1B, 1996).

3.11 ESTUDOS DAS CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO

A Cinética é o estudo da velocidade na qual os processos ocorrem, e tem como objetivo fornecer informações que permitam a compreensão dos mecanismos das transformações envolvidas e a previsão do grau de transformação que ocorrerá após um dado intervalo de tempo. As transformações podem ser químicas ou físicas, as quais determinam a estabilidade e o prazo de validade de produtos farmacêuticos (AULTON, 2005; RODANTE, et al., 2002).

As reações de degradação de produtos farmacêuticos ocorrem com velocidade definida, portanto ao considerar sua estabilidade, é preciso conhecer a ordem e a velocidade de reação (YOSHIOKA, STELLA, 2002). Em geral, estas reações podem ser de ordem zero

(quando a velocidade independe da concentração dos reagentes). Nesse caso, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Na cinética de primeira ordem (quando a velocidade de reação é determinada pela concentração de um dos reagentes), obtém-se uma reta com representação do logaritmo neperiano da concentração ($\ln C$) em função do tempo (t). A de segunda ordem (quando a velocidade de reação depende das concentrações de dois reagentes), é representada pelo inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t), que resulta em uma reta (SINKO, 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARTE I: ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR FRENTE À UMIDADE E AO ESTRESSE HIDROLÍTICO E OXIDATIVO

4.1.1 Material

A matéria-prima FTD foi sintetizada pela Cdymax India Pharma PVT LTDA. Foi utilizado lote D110081, doado e certificado pela Cristália Prod. Farmaceuticos LTDA. Lote/Série 07470/2011.

Foram utilizados na preparação dos componentes da fase móvel e diluição das amostras do fármaco acetonitrila grau HPLC (JTBaker[®]), acetato de amônio (Proquímios), ácido acético (Vetec[®]) e água ultra-pura (Milli-Q[®]). As amostras foram filtradas com membrana de porosidade 0,22µm (Millipore[®]). Adicionalmente foram utilizados para obtenção das amostras estressadas os reagentes ácido clorídrico (Química moderna), hidróxido de sódio (Vetec[®]) e peróxido de hidrogênio 30% (Vetec[®]).

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção na região do infravermelho médio foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. A análise foi realizada com 16 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ na região compreendida entre 4000 a 650 cm⁻¹.

4.1.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

O difratograma foi obtido no difratômetro SIEMENS[®] (X-Ray Diffractometer, D-5000),

equipado com anodo de cobre. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2θ de 3-45°.

4.1.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A amostra do FTD foi montada em *stub*, fixada em fita dupla face de carbono e metalizada com ouro por 5 min (Metalizador Desk II/Denton Vacuum®). A morfologia da amostra foi verificada no Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® 5600 LV.

4.1.2.4 Análise Térmica

As curvas TG, DTG e DTA do FTD foram obtidas utilizando uma termobalança modelo DTG-60H Shimadzu®, com massa de $6 \text{ mg} \pm 0,2$, na faixa de temperatura de 25 a 600°C, em atmosfera de N₂ com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. A calibração do instrumento foi verificada anteriormente aos ensaios empregando-se amostra de zinco (99,98%, Aldrich®, Milwaukee, USA).

A curva DSC do FTD foi obtida através de calorímetro de varredura Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS (Kyoto, Japão), com atmosfera de nitrogênio (fluxo 50 mL.min⁻¹). Foram empregadas as razões de aquecimento de 10 e 0,5°C.min⁻¹ para caracterização e determinação da pureza da amostra, respectivamente. Os ensaios foram realizados na faixa de temperatura de 25 a 600°C e a amostra foi acondicionada em porta-amostra de alumínio hermética, com massa de $6 \text{ mg} \pm 0,3$. Utilizou-se Índio (99,98%, mp 156,65°C, Aldrich®, Milwaukee, USA) para calibração do equipamento previamente ao ensaio.

4.1.2.5 Obtenção das cinéticas de decomposição não-isotérmica e isotérmica

O estudo de decomposição térmica dinâmica foi realizado sob diferentes razões de aquecimento (β): 5,0°C, 10°C, 20°C e 40°C. A seleção do modelo cinético para o cálculo da energia de ativação (E_a), constante de velocidade (k) e ordem da reação foi realizado por simulação computacional aplicando o método descrito por Ozawa (LÓPEZ, 2008). Para o

estudo cinético isotérmico, as curvas TG foram obtidas a partir do aquecimento das amostras até as temperaturas de 120, 130, 140, 150 e 160° C, e mantidas em condições isotérmicas em atmosfera de N₂ (50 mL. min⁻¹) durante o tempo necessário para uma perda de massa de 10% ± 0,5.

4.1.2.6 Determinação de água por Karl Fischer

Amostras de FTD foram analisadas em triplicata para “determinação de água” (método volumétrico de Karl Fischer), segundo os procedimentos descritos na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (2010).

4.1.2.7 Estudo de higroscopicidade

Para determinar a estabilidade do FTD frente às diferentes condições de umidade relativa (UR), foram seguidas técnicas adaptadas de Lemos Senna e colaboradores (1997) e De Souza e colaboradores (2000). Amostras de 0,25 g de FTD foram acondicionadas em pesa-filtros e mantidas em dessecador, o qual garante a saturação sob UR constante à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à exposição de diferentes condições de UR para alcançar a saturação do ambiente: 28%, 74% e 95%, utilizando sílica, solução de uréia e solução de fosfato monocálcico, respectivamente. Tais condições foram confirmadas através do termohigrômetro digital J.Prolab® modelo SH 122.

As amostras em triplicata foram analisadas nos tempos: 0, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias e a porcentagem de água absorvida (% U) foi calculada em relação ao peso (g) da amostra seca (Ps) e úmida (Pu): $U = [(Pu-Ps)/Ps*100]$. As amostras foram posteriormente analisadas por DRX, MEV, TG/DTA e frente a condições de estresse hidrolítico e oxidativo.

4.1.2.8 Estudo de degradação forçada sob condições hidrolíticas e oxidativa

Com base na característica higroscópica do material e sabendo-se que as reações de hidrólise constituem a via mais comum de degradação de drogas, estas serão analisadas neste experimento utilizando-se água e os íons H^+ e OH^- , como catalisadores do processo. Juntamente com estas condições, serão adicionalmente avaliadas as reações de oxidação, uma vez que se trata da segunda via mais comum de degradação de fármacos. Neste último caso, os radicais peróxidos e hidroperóxidos são os reagentes mais comumente utilizados, uma vez que induzem a formação de espécies altamente oxidantes. Em todas as condições supracitadas, a avaliação da ocorrência de decomposição química é relevante, pois pode provocar desde mudanças na aparência física à perda da potência do fármaco (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Assim, para esta determinação, foi utilizado o método de doseamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) fornecida pela Cristália, com as adaptações necessárias para a quantificação proposta. Os estudos de degradação foram conduzidos com a matéria-prima FTD (1mg. mL^{-1}), utilizando para o estudo hidrolítico as soluções de HCl 0,5M à 60°C para hidrólise ácida, NaOH 0,03M à 60°C para básica e água ultra-pura (80°C) para hidrólise neutra até observação de decaimento no teor do fármaco entre 10-30%, conforme preconizado pela *International Conference and Harmonization* (ICH Q3B, 2003). A degradação oxidativa foi conduzida utilizando uma solução de H_2O_2 15%. Todas as soluções foram mantidas protegidas da luz e o tempo de exposição e as concentrações das soluções reagentes foram aumentados conforme detecção de decaimento suficiente ou não. As soluções provenientes da hidrólise ácida e básica foram posteriormente neutralizadas com NaOH 0,05M e HCl 0,03M, respectivamente, para proceder com a leitura por CLAE. O excesso de H_2O_2 foi eliminado com o prévio aquecimento da amostra.

A solução de FTD 1mg.mL^{-1} foi diluída com a própria fase-móvel, composta por tampão acetato de amônio pH 3,8 e Acetonitrila (ACN) 60:40, seguindo condições analíticas descritas pelo fabricante. A curva de calibração foi preparada nas mesmas condições a fim de obter as concentrações das amostras degradadas. O método de quantificação utilizou ainda coluna cromatográfica C18 Waters[®] (250 x 4,6 mm/ 3,5 mm), com temperatura do forno de 30°C , com temperatura do forno de 30°C e fluxo da fase-móvel de 1 mL/min. A adequação

deste método foi avaliada com base no número de pratos teóricos e na resolução apresentada pelos picos cromatográficos.

O sistema utilizado para o desenvolvimento do método foi um CLAE Shimadzu[®], equipado com bomba modelo LC-10ADVP, com degaseificador de hélio modelo DGU-14A, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD) PDA modelo SPD-M10AVP, forno modelo CTO-10AVP, injetor automático modelo SIL-10ADVP e controlador modelo SCL-10AVP. Os dados foram processados pelo software Shimadzu[®] Class VP.

4.2 PARTE II: ESTUDO DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO NÃO-ISOTÉRMICA DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR COM ADJUVANTES FARMACÊUTICOS

4.2.1 Material

O FTD foi doado pela Cristália Prod. Farmacêuticos Ltda., Lote/Série 07470/2011 e sintetizado pela Cdymax India Pharma PVT. LTD. Lote CD110081, certificada e fornecida. Os excipientes usados foram Croscarmelose de sódio, Lote 80275 (Blanver Famoquímica Ltda[®]); Lactose monohidratada, Lote L0913A4033 (MEGGLE); Estearato de magnésio, Lote 2009121200 (Ind. Química Anastácio S/A[®]); Celulose microcristalina (CMC) (Blanver e Microcel), Lote 1743105 e Amido (Starch 1500), Lote IN516910 (Colorcon).

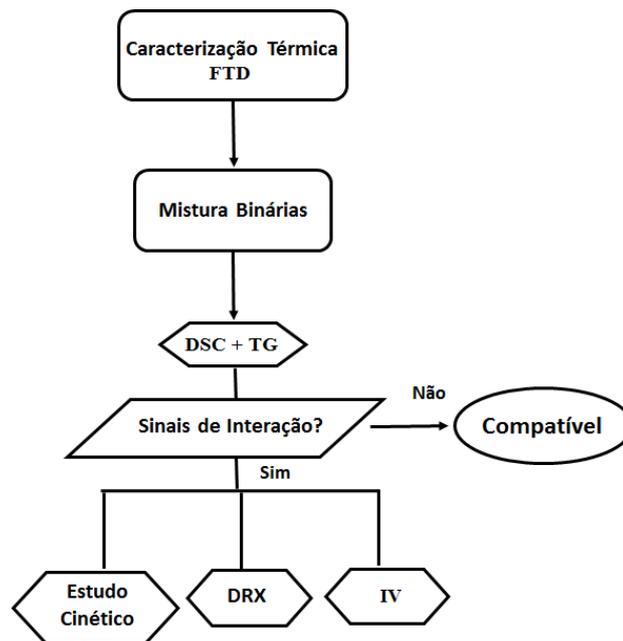
4.2.2 Métodos

Para a avaliação da estabilidade térmica do FTD foi primeiramente realizada sua caracterização térmica utilizando os dados obtidos por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG/DTA), que indicaram pureza 98.28% e temperatura de degradação em torno de 146.49° C.

4.2.2.1 Estudo de compatibilidade utilizando Análise Térmica

O fluxograma (Figura 7) apresenta o procedimento utilizado para verificação da estabilidade térmica do TDF frente aos adjuvantes em análise (COSTA et al., 2013). As curvas TG e DSC do FTD, misturas binárias (MB) FTD: excipiente (1:1, p/p) e a formulação comercializada foram obtidas e comparadas. As MB com sinais de interação serão adicionalmente investigadas por meio das técnicas de Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para confirmação das interações constatadas por análise térmica. Os resultados foram paralelamente investigados quanto a cinética de degradação não-isotérmica.

Figura 7 - Fluxograma para a avaliação da estabilidade térmica do FTD.



Fonte: Autoria própria

4.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curvas DSC do FTD, dos excipientes, das MB e da formulação Viread[®] foram obtidas utilizando Calorímetro de Varredura Shimadzu[®] DSC-60, interligado ao software Shimadzu[®] TA-60WS, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10° C.min⁻¹, utilizando a faixa de temperatura de 25–200° C. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio fechado com massa de 2mg (± 0.3). As determinações foram realizadas em triplicata. Antes desses ensaios, verificou-se a escala de temperatura e a resposta de entalpia calibrando-se o instrumento com índio (99,98%, 156,65° C, Aldrich[®], Milwaukee, USA).

4.2.2.3 Termogravimetria (TG/DTG)

Essas mesmas amostras tiveram seus perfis térmicos avaliados por TG/DTG, utilizando a termobalança Shimadzu[®], modelo TGA Q60, em atmosfera dinâmica de nitrogênio sob fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa do fármaco, MB e do Viread cerca de 6mg, 12mg e 12mg (± 0.3), respectivamente. As amostras foram acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600° C, na razão de aquecimento de 10° C.min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de zinco (99,98%, Aldrich[®], Milwaukee, USA).

4.2.2.3 Difração de raios X (DRX)

Para avaliar a ocorrência de interação entre os componentes da MB, os difratogramas do FTD, dos excipientes e das MB foram obtidos através do difratômetro Siemens[®] (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 3-45°.

4.2.2.4 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção na região do infravermelho médio foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. As amostras do FTD, dos excipientes e das MB analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR e os resultados foram obtidos com 16 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ na região compreendida entre 4000 a 650 cm⁻¹.

4.2.2.5 Estudo cinético de decomposição não-isotérmica

A investigação da cinética de degradação não-isotérmica foi obtida com TG através da aplicação do método de Ozawa. Foram utilizadas razões de aquecimento 5, 10, 20 e 40°C.min⁻¹, na faixa de temperatura entre 25-600°C, em porta amostra de platina com aproximadamente 6mg (\pm 0,3) de amostras e atmosfera dinâmica de nitrogênio sob fluxo de 50 mL.min⁻¹, utilizando a termobalança Shimadzu[®], modelo TGA Q60.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

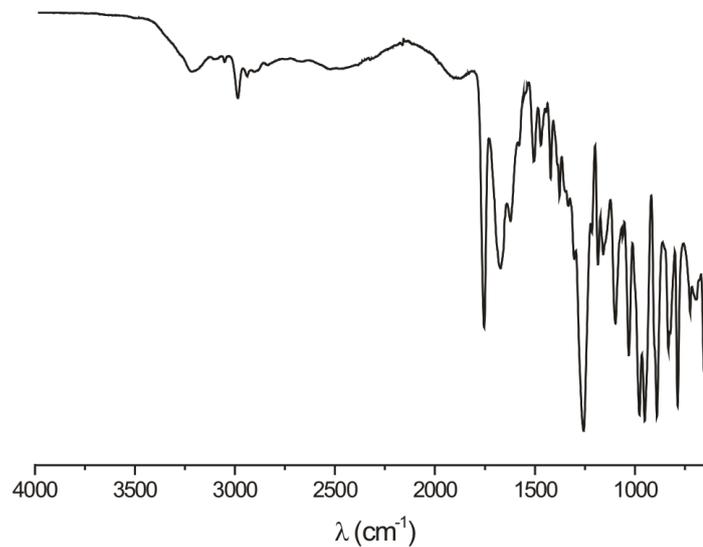
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR FRENTE À UMIDADE E AO ESTRESSE HIDROLÍTICO E OXIDATIVO

5.1.1 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção do FTD foi obtido na região do infravermelho médio (FTIR-MID), entre 4000 a 650 cm^{-1} (Figura 8), onde é possível observar as bandas características do pró-fármaco (Tabela 1). O espectro obtido para o FTD apresentou bandas concordantes com as citadas na especificação da matéria-prima fornecida pela Cristália e com as características da substância química de referência analisada por Teixeira (2011).

Figura 8 - Espectro de absorção de Infravermelho do FTD.



Fonte: autoria própria

Tabela 1 - Espectro de absorção do Infravermelho do FTD

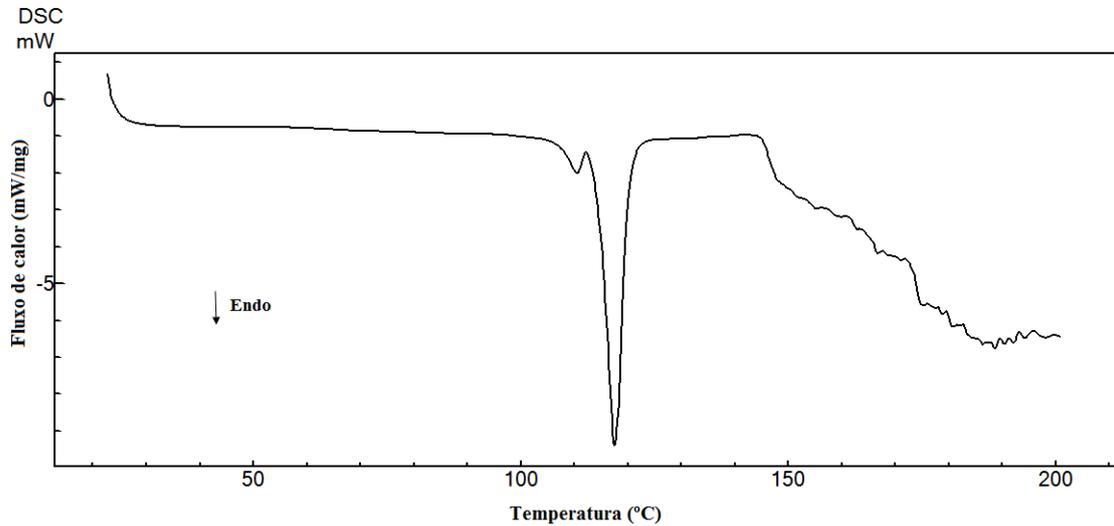
Frequência de absorção (cm-1)	Grupo funcional	Frequência de absorção (cm-1)	Grupo funcional
3600-3200 (intensidade fraca)	Amina secundária aromática	1250 e 1020 (banda larga)	Ligação C-N de amina terciária alifática
1400-1200 (intensidade forte)	Ligação N-H, característico de amina primária	1800 – 1600	Banda correspondente a ligação do tipo C=O de éster
1650 – 1580 (intensidade média)	Ligação N-H, característico de amina primária	1000 – 650	Vibrações C-H de alqueno

Fonte: SILVERSTEIN, 2006

5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

A curva DSC do FTD (Figura 9) apresenta seu primeiro evento através de um pico endotérmico fino principal, característico do processo de fusão do fármaco, na faixa de 114,31 a 119,99°C ($\Delta H = - 70,82 \text{ J.g}^{-1}$). Um pico de menor intensidade encontra-se entre 107.74 e 112,30° C ($\Delta H= -3,68 \text{ J/g}$) (Figura 4). Ambos os picos referem-se as duas formas polimórficas presentes no FTD, sobre as quais a literatura aponta a primeira entre 115-118° C e a segunda entre 112-114°C. Entretanto as variações de entalpias de fusão, taxas de dissolução intrínsecas e solubilidade entre estas duas formas cristalinas não trazem repercussão clínica (EMEA, 2005).

Figura 9 - Curva DSC do FTD obtida sob atmosfera de N₂ em fluxo de 50mL.min⁻¹ e razão de aquecimento 10°C.min⁻¹.



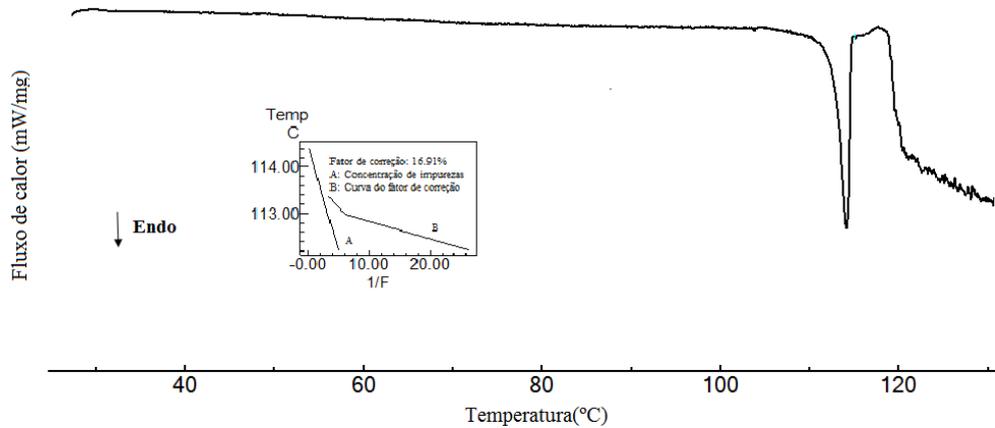
Fonte: Autoria própria

Segundo Oliveira (2011), é possível calcular a pureza das amostras a partir da linearização do evento de fusão observado na curva DSC. Este artifício matemático é alcançado através da aplicação da equação de Van't Hoff (Equação 1), onde se calcula a fração molar das impurezas do material, sendo assim permitido o cálculo indireto de sua pureza. Tal equação correlaciona a temperatura de fusão das impurezas no processo de fusão (T_s); a temperatura de fusão do analito 100% puro (em Kelvin) (T_o); a fração molar das impurezas na fase líquida (X^2); o calor de fusão da amostra pura (ΔH); e a constante dos gases ($R = 8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$) (R) (RODRIGUES, 2005; OLIVEIRA, 2011; VIEIRA et al., 2013).

$$T_s = T_o - X^2 \frac{RT_o^2}{\Delta H} \text{ (Equação 1)}$$

Assim, através da aplicação desta teoria foi calculada a pureza do insumo farmacêutico ativo em torno de $98,28\% \pm 0,07\%$ (Figura 10). A técnica foi capaz de verificar a pureza do fármaco.

Figura 10 - Curva de DSC do FTD obtida na razão de $0,5^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ sob atmosfera de N_2 $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

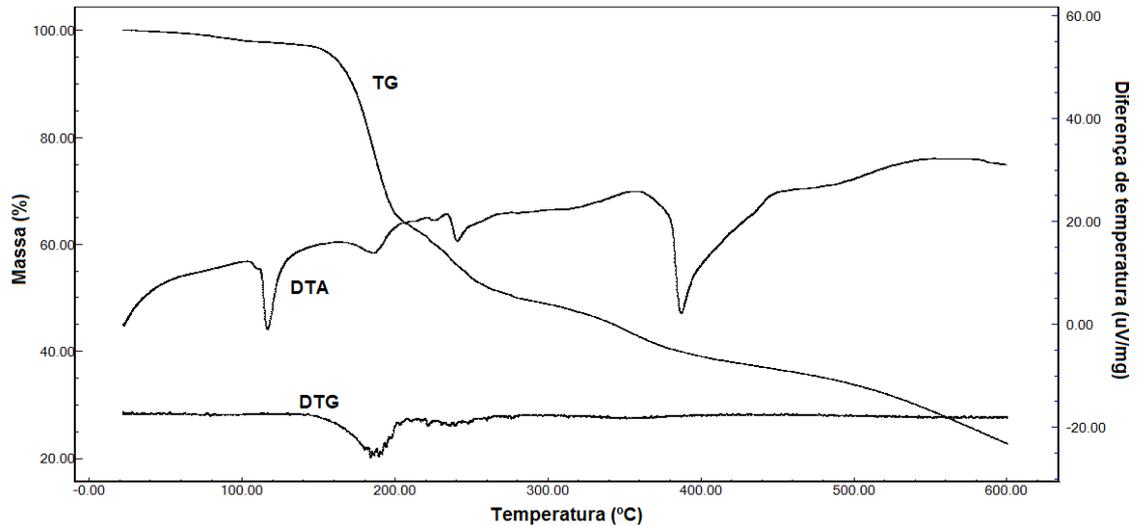


Fonte: Autoria própria

5.1.3 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial

A curva TG do FTD (Figura 11) indica que a forma cristalina deste fármaco foi termicamente estável até $146,49^{\circ}\text{C}$, quando ocorre o início da sua decomposição térmica. Apesar do DTA não ser sensível como o DSC para avaliar o ponto de fusão da amostra, a técnica foi utilizada para entender os eventos térmicos que ocorrem durante a decomposição do FTD. Na curva DTA (Figura 11), o primeiro evento é expresso como um pico endotérmico fino em $116,89^{\circ}\text{C}$, característico da fusão do FTD. A principal etapa de perda de massa (32,78%) é o segundo evento observado nesta curva, onde ocorre entre $146,49$ e $205,75^{\circ}\text{C}$. Os eventos seguintes, ocorridos em $240,88$ e $387,32^{\circ}\text{C}$, com perda de massa de 3,79 e 5,76%, respectivamente, são decorrentes das últimas duas etapas minoritárias de decomposição do fármaco.

Figura 11 - Curvas TG, DTG e DTA do FTD obtida em atmosfera dinâmica de N_2 $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$.

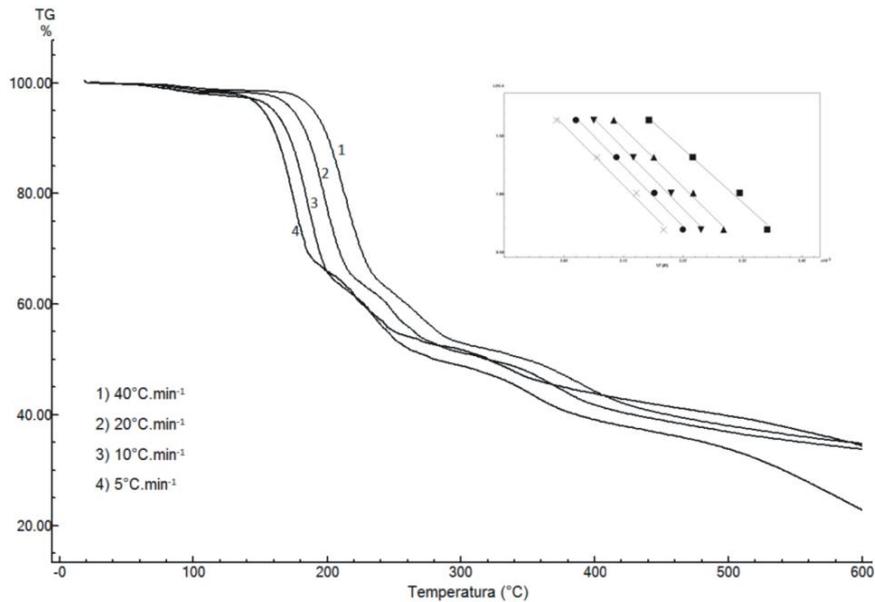


Fonte: Autoria própria

5.1.4 Estudo das cinéticas de decomposição não-isotérmica e isotérmica

Para o estudo da cinética de decomposição não-isotérmica do FTD foi empregado o método de Ozawa (LÓPEZ, 2008; ROLIM-NETO 2011). Os dados foram determinados pela plotagem da perda de massa versus temperatura de quatro curvas TG em diferentes razões de aquecimento 5, 10, 20 e $40^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, representada na Figura 12.

Figura 12 - Curvas TG e o gráfico de Ozawa do FTD obtidos em quatro razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não isotérmico.



Fonte: Autoria própria

O método de Ozawa é baseado nos cálculos da integral a partir da equação da Arrhenius para obtenção dos parâmetros cinéticos no início da etapa de decomposição térmica em torno de 146-200° C do FTD: E_a (energia de ativação) 87,86 kJ/mol, A (fator de frequência) $5,511 \times 10^9 \text{ min}^{-1}$ e ordem de reação 1,0. A tabela 2 a partir do r^2 relatou que a melhor ordem de reação para o FTD é a do tipo 1.

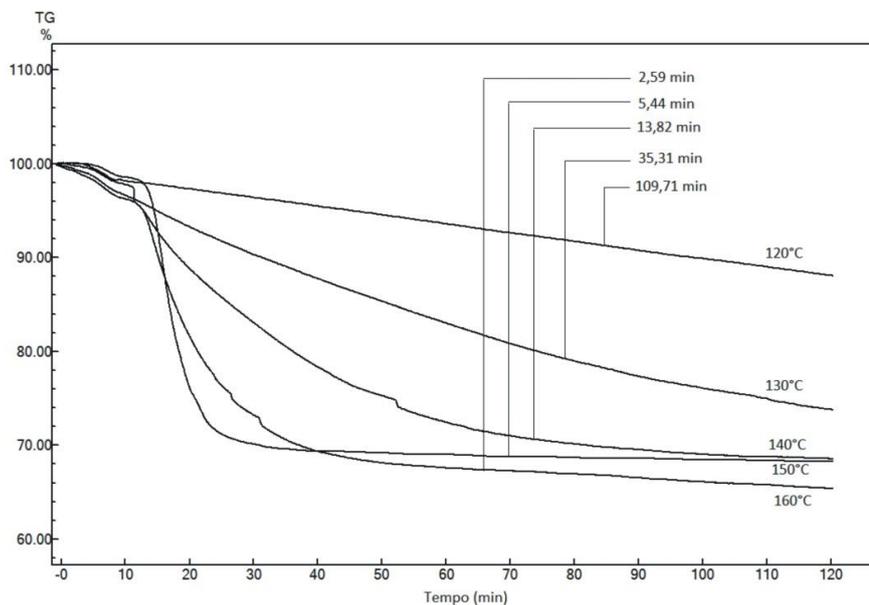
Tabela 2 - Correlação entre a ordem de reação do FTD.

Ordem de reação	E_a (kJ/mol)	r^2
0	87,86	0,9942
1	87,86	0,9957
2	87,86	0,9695
3	87,86	0,9946

Fonte: Autoria própria

Na avaliação das curvas isotérmicas foram considerados os tempos em que cada isoterma necessita para degradar 10% do fármaco. Esta é uma correlação realizada com a finalidade de prever o prazo de validade na temperatura ambiente, conforme aplicado por Costa et al. (2013). Assim, a Figura 13 apresenta tempo necessário para degradação de 10% do FTD nas diferentes temperaturas isotérmicas e demonstram a redução do tempo em função do aumento da temperatura.

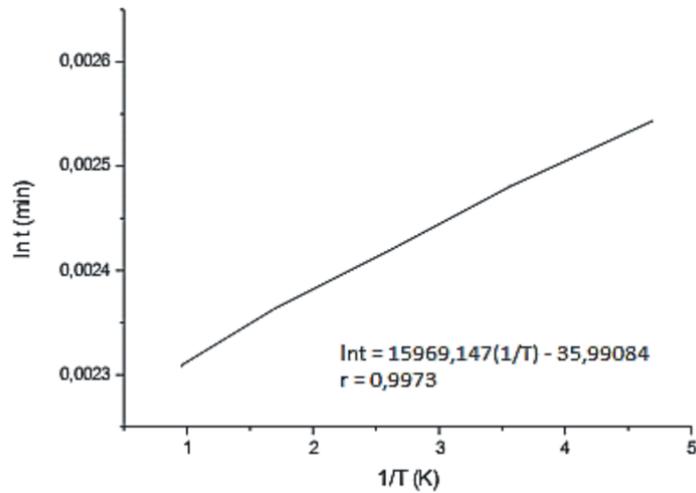
Figura 13 - Curvas isotérmicas do FTD em diferentes temperaturas na atmosfera de N₂ (50 mL. min⁻¹).



Fonte: Autoria própria

A partir destas curvas foi possível obter o gráfico $\ln t$ (min.) vs. $1/T$ (K⁻¹), também chamado de gráfico de Arrhenius (Figura 14), onde a reta obtida através da regressão linear permite avaliar a validade do modelo cinético, através do valor de r^2 (REZENDE, 2008). Adicionalmente, o produto do coeficiente angular e a constante geral dos gases (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹) fornece a energia de ativação, que neste estudo foi calculada em 132,76 KJ. mol⁻¹

Figura 14 - Gráfico de Arrhenius, $\ln t$ vs $1/T$, para a decomposição térmica das amostras de FTD.

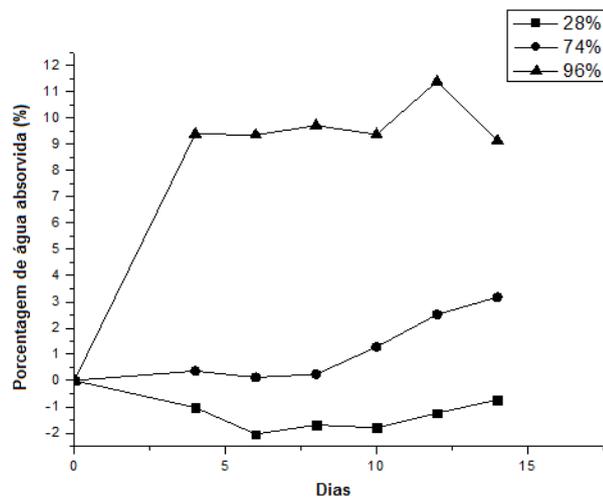


Fonte: Autoria própria

5.1.5 Estudo de higroscopicidade do FTD

De acordo com a metodologia proposta Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (2010), na qual se aplica o método de Karl Fisher, verificou-se que o insumo farmacêutico ativo (IFA) de partida encontrava-se dentro das especificações preconizadas, apresentando teor de água de $0,74\% \pm 0,017$, cujo limite estabelecido para o FTD é de até 1%. Este IFA teve suas propriedades higroscópicas determinadas pela sorção de água em diferentes condições de umidade (28%, 74% e 96%), cujas curvas estão representadas na Figura 15

Figura 15 - As curvas de sorção de umidade do FTD.



Fonte: Autoria própria

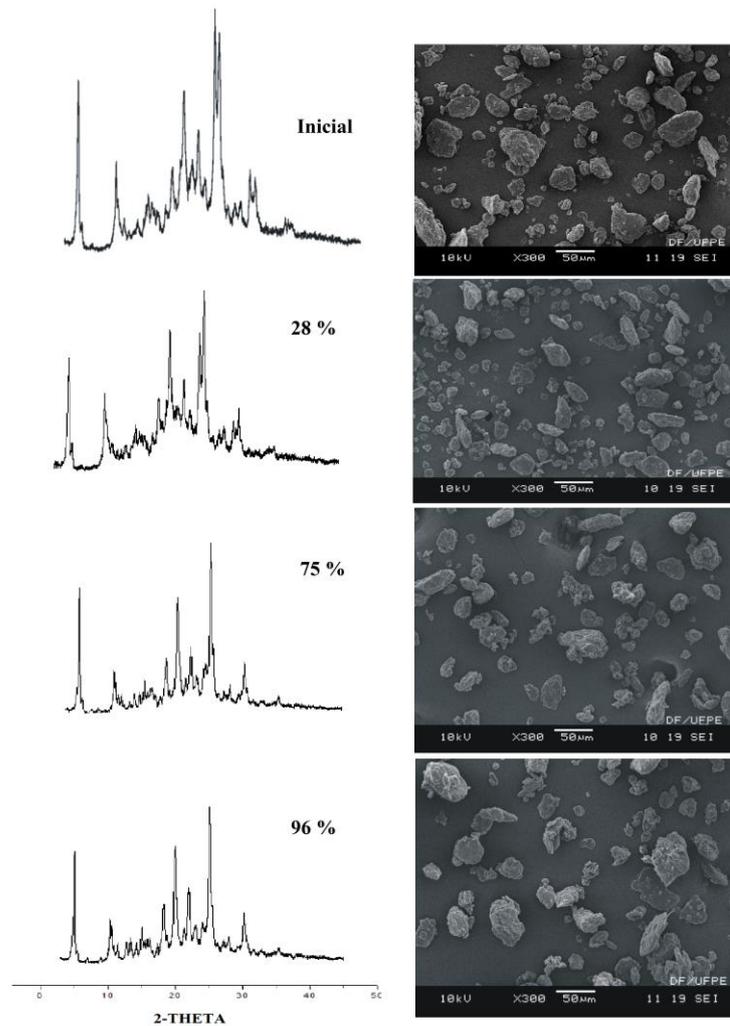
De acordo com os resultados apresentados, foi verificado que a absorção de umidade pelo FTD variou em função do teor de umidade ambiente e do seu tempo de exposição à umidade relativa (UR), de modo que, ao fim dos 14 dias de estudo, houve incremento de 3,09% e 9,16% no peso das amostras nas condições de UR 74% e 95%, respectivamente. Entretanto, na condição de UR 28% houve uma redução do peso das amostras. Este resultado pode ser explicado pela capacidade de sorção da água contida na amostra pela sílica.

Segundo Maximiano (2010), o comportamento do FTD frente as condições deste estudo permite classificá-lo como uma substância higroscópica, já que no contato com UR elevadas há apreciável captação de água (superior a 1%). Uma vez que FTD apresenta forte susceptibilidade a sofrer hidrólise (ASHENAFI et al. 2010) esta captação de água pode interferir drasticamente na qualidade, segurança e eficácia do fármaco. Assim, a UR atmosférica representa um parâmetro de risco para o manuseio e armazenamento do fármaco no estado sólido, de modo que se torna necessária a escolha apropriada do seu material de envase e condições de armazenamento.

Paralelamente, a alteração das características das partículas de FTD foi monitorada através das técnicas de DRX e MEV (Figura 16). O difratograma do FTD puro antes de ser submetido ao estudo de higroscopicidade apresenta picos de difração intensos, revelando o

típico padrão de um produto cristalino, com pico principal em $24,34^\circ$ (2θ) e picos secundários em $4,98^\circ$, $10,34^\circ$, 20° , $21,96^\circ$ e $24,36^\circ$ (2θ). A morfologia correspondente a este perfil difratométrico está disposta ao lado do difratograma.

Figura 16 - DRX e MEV do FTD após 28%, 75% e 96% de UR, respectivamente.



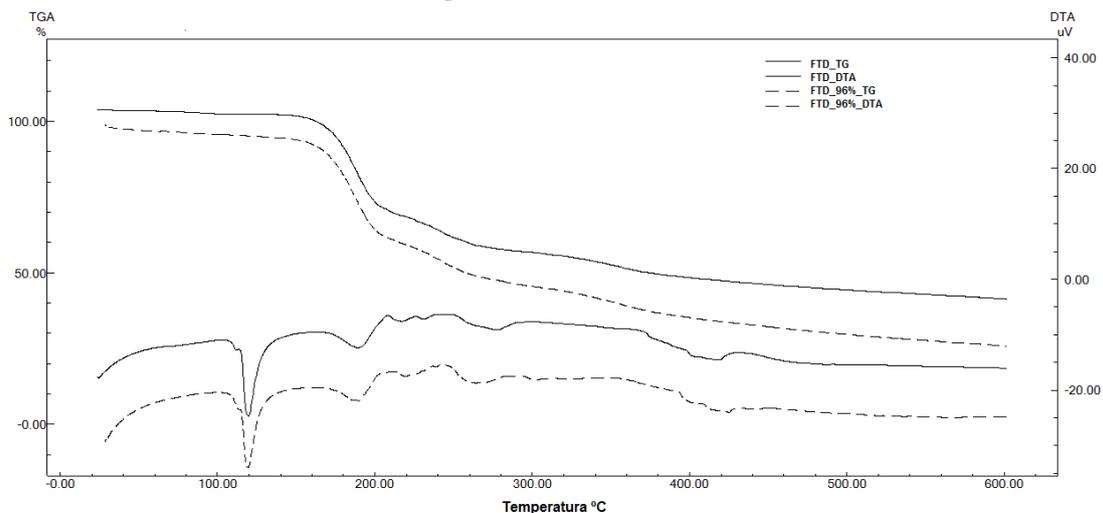
Fonte: Autoria própria

De acordo com os resultados nota-se que não houve alteração no difratograma do FTD frente às diferentes condições de umidade, sugerindo que a absorção de água não interfere na estabilidade física do fármaco.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

Ainda, de acordo com as curvas TG e DTA obtidas para a amostra de maior sorção de umidade (UR 96%), verifica-se que todos os eventos térmicos obtidos para o FTD antes do estudo foram conservados. Ademais, não houve alteração na temperatura inicial de fusão e de degradação, sugerindo que a higroscopicidade também não interfere na estabilidade térmica do IFA (Figura 17).

Figura 17 - Curvas TG e DTA do FTD protegido da umidade e do FTD após 96% de UR, em atmosfera dinâmica de N₂ 50 mL /min⁻¹ e razão de aquecimento 10°C/min⁻¹.

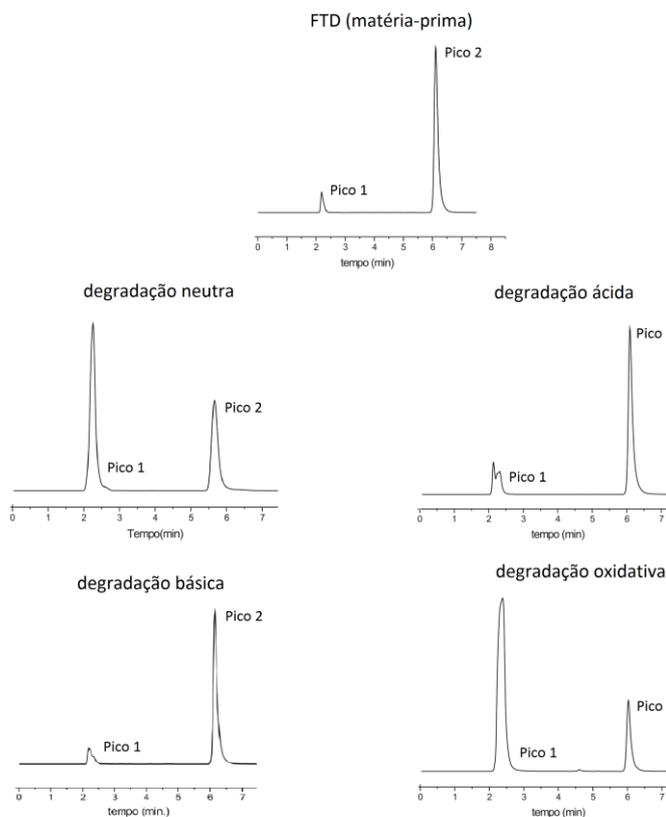


Fonte: Autoria própria

5.1.6 Teste de estresse

Uma vez confirmada a higroscopicidade deste IFA, torna-se também necessário conhecer a influência das potenciais reações de hidrólise sobre a sua estabilidade, além de avaliar a influência da reação oxidativa sobre este material. Seguindo-se o método proposto, foi constatado o decaimento no teor do tenofovir desoproxila (pico 2) entre 10-30% nas condições apontadas na Figura 18 abaixo.

Figura 18 - Cromatogramas obtidos com o FTD (matéria-prima) e com o FTD frente às condições de hidrólise ácida (HCl 0,05M, 0 min.), básica (NaOH 0,03M, 0 min.), neutra (água à 80° C, 24h); e oxidação (H₂O₂ 15%, 0 min.), com decaimento registrado de 20,55%, 10,76%, 30,01% e 24,01%, respectivamente.



Fonte: Autoria própria

Em todas essas amostras, foi possível constatar o número de pratos teóricos (N) e pureza do pico principal, referente ao tenofovir desoproxila (pico 2), avaliado por meio do detector DAD (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor, número de pratos teóricos (N) e pureza do pico do tenofovir desoproxila na matéria-prima e nas amostras estressadas.

Amostra	Teor do tenofovir desoproxila (%)	N (tenofovir desoproxila)	Índice de pureza do pico (tenofovir desoproxila)
FTD (matéria-prima)	100%	11007	0,9999
Hidrólise ácida	75,93%	12868	0,9999
Hidrólise básica	89,24%	2398	0,9999

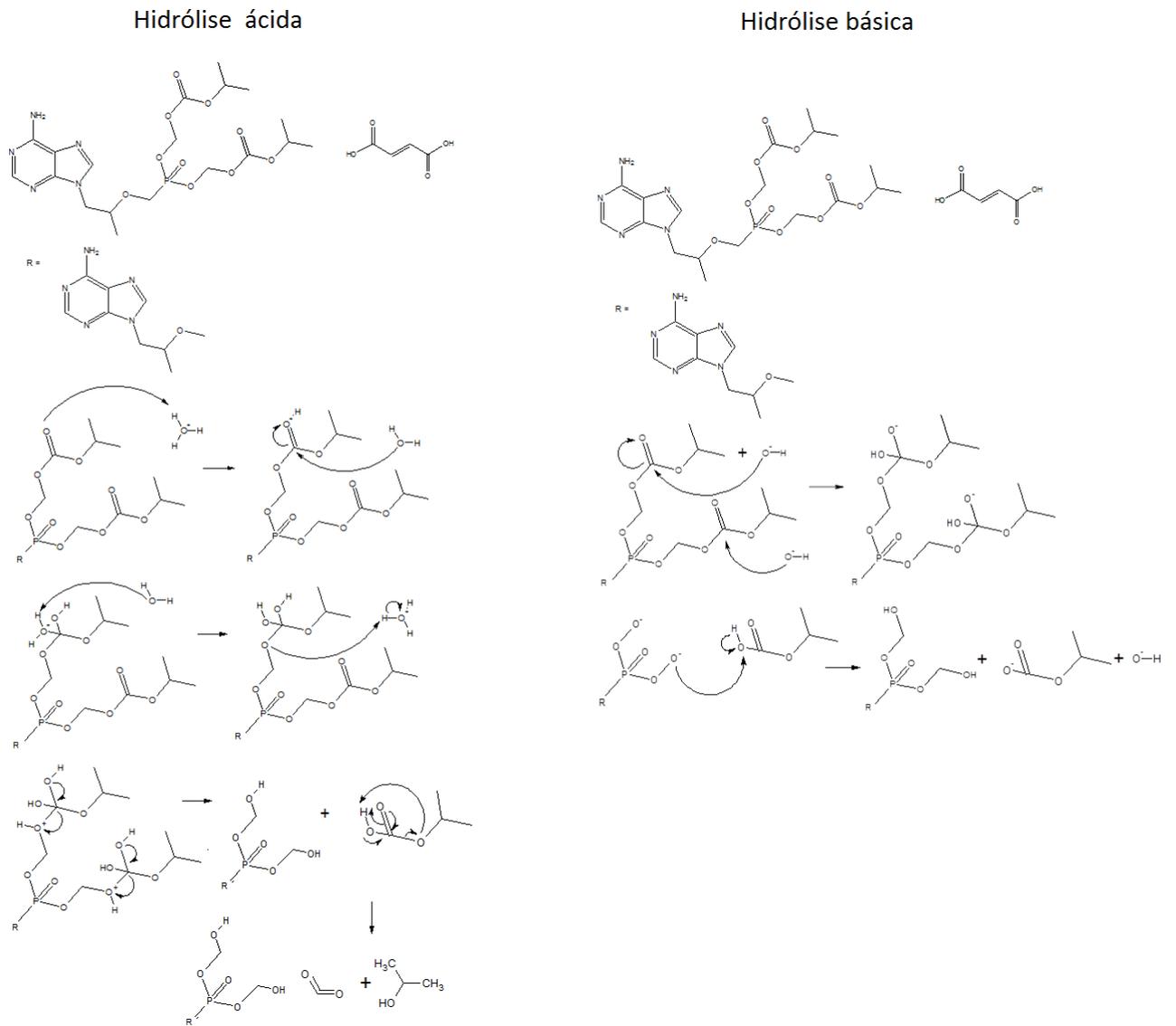
Hidrólise neutra	69,90%	4509	0,9999
Oxidação	75,30%	12848	0,9999

Fonte: Autoria própria

O FTD possui em sua molécula dois grupamentos éster (Figura 19) que, em geral, são sujeitos à hidrólise ácida ou básica para formar um ácido carboxílico e um álcool. Os resultados obtidos nos cromatogramas acima (Figura 18) ilustram a susceptibilidade do fármaco à degradação nesses meios, em que foi verificado decaimento significativo no teor do tenofovir desoproxila (pico 2).

A hidrólise catalisada pela base é mais rápida, pois o ataque nucleófilo do -OH resulta no sal do ácido, favorecendo a rápida degradação do FTD com menor concentração de NaOH , em relação à concentração de HCl , que é catalisada mais lentamente. Os ácidos catalisam a reação tornando o carbono da carbonila mais eletropositivo (por protonação do oxigênio da carbonila), já na hidrólise básica ocorre o ataque do oxigênio no carbono da carbonila, sendo, portanto, mais suscetível ao ataque nucleofílico. Na hidrólise neutra, o nucleófilo geralmente é a água, e essa reação geralmente ocorre mais lentamente (ALSANTE, BAERTSCHI, 2005), corroborando com os resultados encontrados para o FTD, cujo resultado de degradação suficiente só ocorre em 24 horas, à 80°C . Na Figura 19 são apresentados os possíveis mecanismos de degradação do FTD em meio hidrolítico ácido e básico.

Figura 19- Possível rota degradativa por hidrólise ácida e básica do FTD.

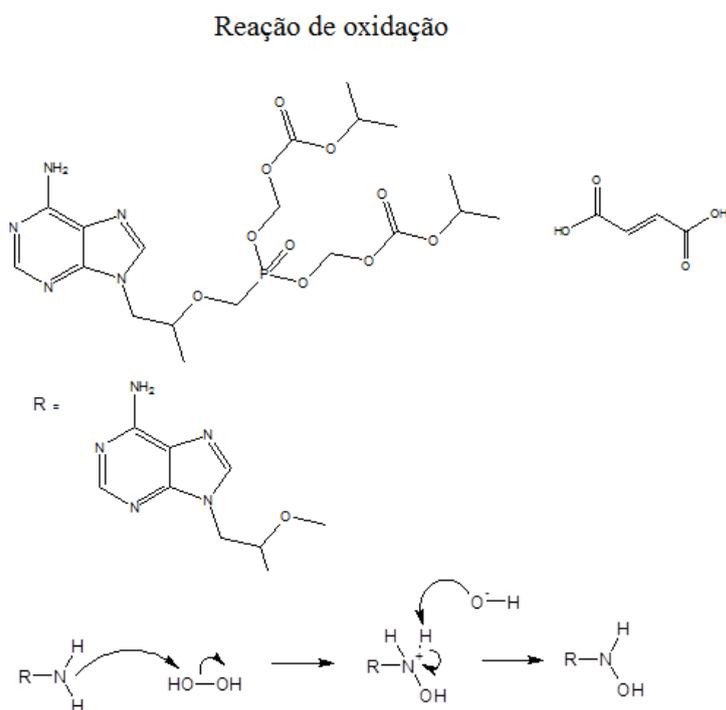


* A reação ocorre simultaneamente nas duas porções semelhantes da molécula.

Fonte: Autoria própria

Quanto à reação de oxidação ocorrente com o FTD, esta se encontra beneficiada pela presença de amina primária e amina terciária. As aminas são um grupo funcional muito comum na indústria farmacêutica e são propensas a uma variedade de reações de degradação. A oxidação de aminas primárias geralmente resulta na formação de hidroxilaminas, as quais nem sempre podem ser observados ou podem ser difíceis de isolar. A protonação de aminas para a forma catiônica reduz significativamente a sua taxa de oxidação, mas a degradação oxidativa de aminas terciárias, ainda pode apresentar problemas para o armazenamento a longo prazo ou de formulação, como foi observado para o cloridrato de raloxifeno. A oxidação de arilaminas leva a arilo hidroxilaminas, que são suscetíveis à oxidação adicional para compostos aril nitroso. Aminas heteroaromáticas podem oxidar para o N-óxido correspondente, que são geralmente suficientemente estáveis para serem isolados e detectados como produtos de degradação (BAERTSCHI; ALSANTE, 2005). A Figura 20 mostra o possível mecanismo de degradação do FTD para amina primária.

Figura 20- Possível rota da degradação oxidativa do FTD.



Fonte: Autoria própria

Assim, as condições e reações degradativas ora apresentadas corroboram com os achados de grande susceptibilidade da matéria-prima FTD à degradação em meio hidrolítico, o que é particularmente crítico e importante para um fármaco com capacidade higroscópica significativa, como comprovado neste trabalho.

5.2 PARTE II. ESTUDO DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO NÃO- ISOTÉRMICA DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR COM ADJUVANTES FARMACÊUTICOS

5.2.1 Estudo de compatibilidade do FTD com excipientes utilizando análise térmica

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para o estudo de compatibilidade mediante avaliação dos eventos de fusão e degradação do FTD, FTD + MB, como também do medicamento de referência (Viread®) por DSC e TG/DTG, respectivamente. Na análise por DSC a maioria das MB apresentaram pequenas mudanças no formato do pico com poucas variações de temperatura de fusão, a exceção da MB FTD: EMg, que apresentou redução de 19, 79°C em relação ao pico de fusão do FTD isolado.

Tabela 4 - Dados termoanalíticos do FTD e das MB com excipientes.

	DSC			TG/ DTG	
	T _{onset} (fusão) /°C	T _{pico} (fusão) /°C	ΔH* (J.g ⁻¹)	T _{onset} (degradação) /°C	Δm (%)
FTD	114,26	117,53	-70,00	146,49	77,53
Viread®	105,91	113,77	-78,46	157,88	70,79
Croscarmelose + FTD	112,69	115,95	-86,93	166,38	68,99
Lactose + FTD	110,23	114,91	-101,95	---	---
EMg + FTD	87,10	97,74	-307,33	150,27	80,87
Celulose + FTD	113,80	116,16	-80,77	164,06	65,50
Starch + FTD	111,51	115,50	-58,93	164,46	73,53

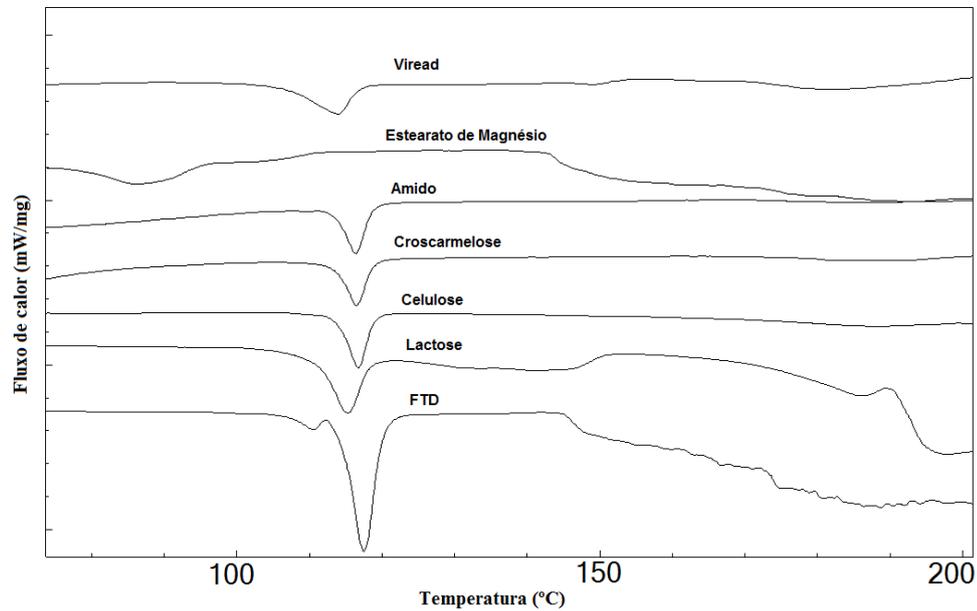
Legenda: *valores negativos representam evento endotérmico; (---) Não foi possível analisar a etapa inicial decomposição.

Fonte: Autoria própria

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

Com relação a MB de FTD:EMg, a análise das curvas DSC da mistura e dos constituintes isolados (Tabela 3 e Figura 21) permite observar que o evento de fusão do excipiente ocorre antes do evento de fusão do fármaco. Assim, a ausência do pico de fusão do FTD observado para MB FTD:EMg pode ser explicada por uma solubilização prévia do fármaco no excipiente liquefeito, assumindo que ambos apresentam certa miscibilidade. A antecipação do $T_{\text{onset (fusão)}}$ observada na Tabela 1 é um indicativo de possível interação entre essas substâncias, pois demonstra que os cristais de FTD se fragilizam, tornando-os mais susceptíveis à fusão na presença deste excipiente, uma vez que é necessário menor quantidade de energia para desfazer a rede cristalina (fusão). Paralelamente, fragilizar a estrutura cristalina também reflete num aumento da solubilidade aquosa da substância (STULZER et al., 2008), sendo esta uma consequência benéfica para o FTD, uma vez que este apresenta baixa solubilidade em água (USP, 2011; WHO, 2009). Fato semelhante foi descrito por Aigner (2011), que detectou desaparecimento do evento de fusão do aceclofenaco na presença do estearato de magnésio.

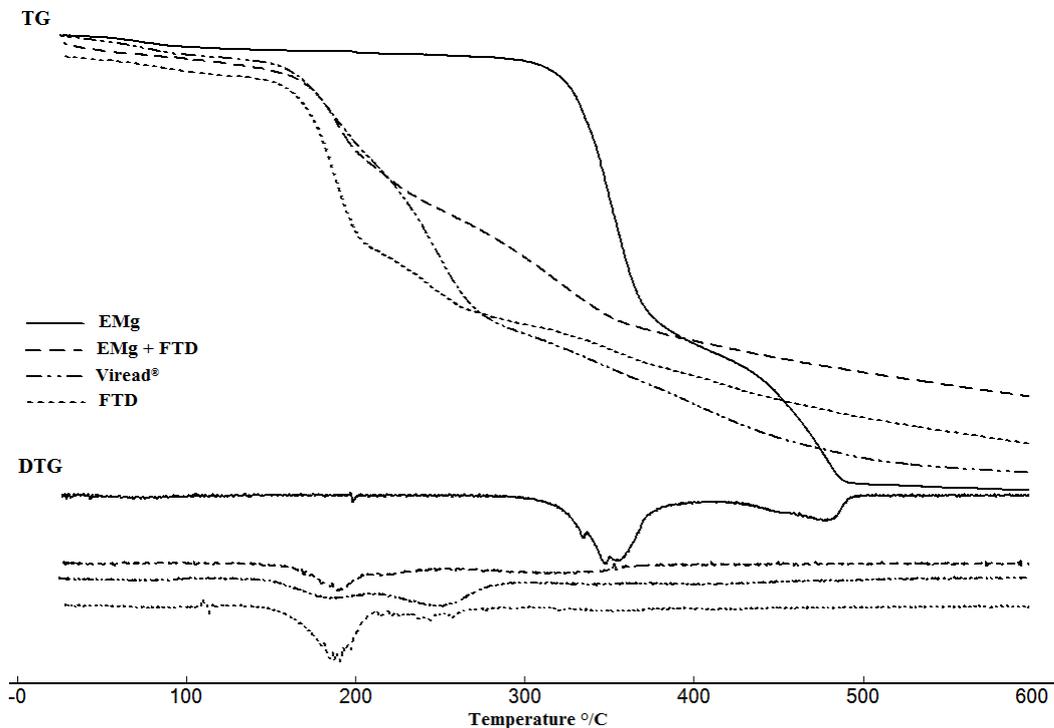
Figura 21 - Curvas DSC do FTD e dos excipientes obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria

Pode-se observar também que, apesar do estearato de magnésio alterar o ponto de fusão do FTD, a temperatura inicial de decomposição do fármaco [$T_{\text{onset (degradação)}}$] não foi alterada, conforme demonstrado nas curvas TG (Tabela 3 e Figura 22).

Figura 22 - Curvas TG obtidas a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de N_2 das amostras de: EMg, MB de FTD + EMg, Viread[®] e FTD.



Fonte: Autoria própria

A literatura descreve diversas interações entre outros fármacos com o estearato de magnésio, a exemplo da glibenclamida + aciclovir (OLIVEIRA, 2005; BARBOSA, 2009), captopril, foi verificada diminuição da temperatura de fusão de $108,3^{\circ}\text{C}$ para $81,82^{\circ}\text{C}$, bem como alterações na forma do pico (BAZZO, 2005). Observação semelhante foi encontrada para a picotamida e o estearato de magnésio (MURA, 1998b). Para o aceclofenaco, o pico endotérmico característico da fusão desapareceu na presença do estearato de magnésio e os sinais deste excipiente foram alterados, indicando interação física entre esses componentes, uma vez que o estearato de magnésio fundido dissolveu o aceclofenaco (AIGNER, 2011). Na indometacina foram constatados alargamento e mudança do pico de fusão da MB com estearato de magnésio. Os autores sugeriram a formação de composto eutético *in situ* (MARINI, 2003).

Com relação à MB de FTD:Lactose monohidratada, não houve mudanças significativas no $T_{\text{onset(fusão)}}$ do fármaco (Tabela 3), contudo não foi possível analisar com exatidão o $T_{\text{onset (degradação)}}$, uma vez que houve expansão da amostra após aquecimento a 219°C, resultando em uma curva pouco definida e resultado não conclusivo.

A lactose é empregada como diluente na indústria farmacêutica como diluente e aglutinante, originando comprimidos de bom aspecto. Entretanto, devido a sua característica de açúcar redutor, suas carbonilas reagem facilmente com compostos que possuem amina primária e/ou secundária alifáticas em sua estrutura química, denominada reação de Maillard (BOTH, LÖTTER, 1990; NARANG; DESAI; BADAWEY, 2012). Esta interação foi percebida no trabalho de Soares-Sobrinho e colaboradores (2010) com o anti-chagásico benznidazol, que apresenta grupamento amina, além de outros fármacos como o aciclovir (MONAJJEMZADEH, 2009; BARBOSA, 2009), cloridrato de fluoxetina (WIRTH et al., 1998), amlodipina (ABDOH et al., 2004) e metformina (SANTOS et al., 2008), dentre outros.

Assim, percebe-se que esta reação possui grande probabilidade de ocorrer entre o FTD e a lactose, já que o fármaco possui amina primária em sua estrutura química.

Esta reação pode estar ocorrendo entre a lactose e o FTD, pois existe a presença da amina primária na estrutura molecular deste fármaco. A lactose também apresentou incompatibilidade com outros fármacos que contém amina primária, como o aciclovir, avaliado mediante estudos termoanalíticos (MONAJJEMZADEH, 2009; BARBOSA, 2009).

Para os demais excipientes não foi verificada alteração nas temperaturas de fusão e degradação do FTD, descartando assim a possibilidade de interação entre eles. As técnicas de DRX e FTIR foram utilizadas como complementares para compreender o tipo interação entre FTD + EMg e FTD + lactose.

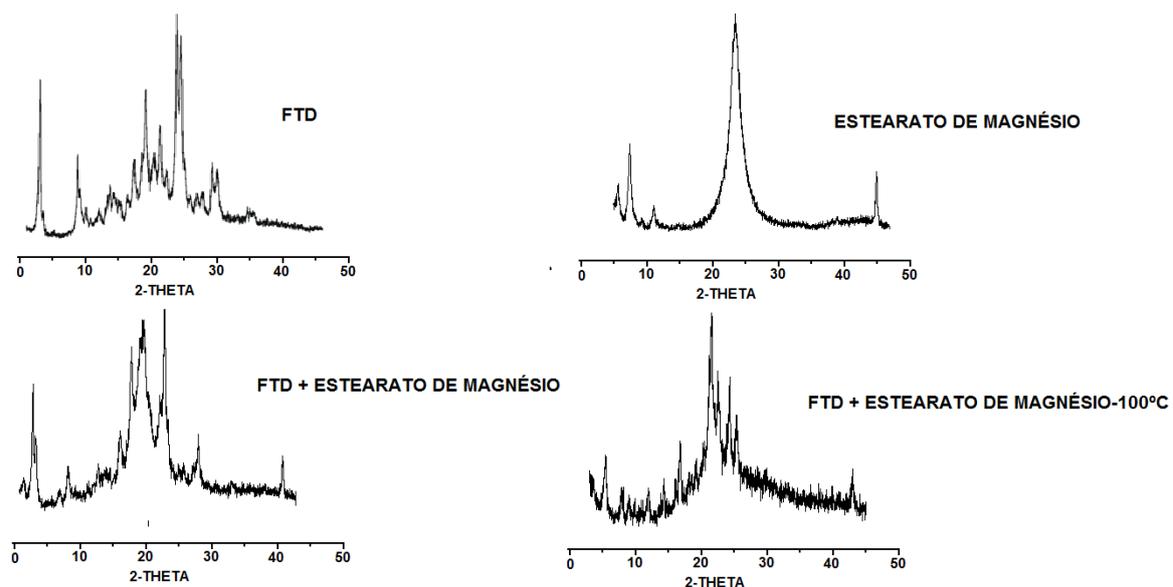
O comportamento térmico do FTD na formulação Viread[®] apresentou redução do $T_{\text{onset(fusão)}}$, além de retardo do $T_{\text{onset (degradação)}}$ para 157,88°C. Apesar de ter sido verificado que a associação do fármaco ao estearato de magnésio provoca redução da temperatura inicial de fusão do fármaco e esse comportamento ter permanecido expresso quando inserido na formulação, percebe-se que a associação mútua dos demais excipientes o protegem da degradação térmica, conferindo-lhe, assim, estabilidade.

Quanto ao Viread[®], observou-se diminuição do $T_{\text{onset(fusão)}}$, em relação ao fármaco sozinho, justificado pela presença do estearato de magnésio na formulação. Por outro lado o $T_{\text{onset (degradação)}}$ foi retardado para 157,88 °C quando comparado ao do fármaco (146,49 °C), isso pode ser explicado pela presença de outros adjuvantes na formulação, os quais podem retardar a degradação térmica do fármaco.

5.2.2 Estudo de compatibilidade do FTD com excipientes utilizando DRX e FTIR

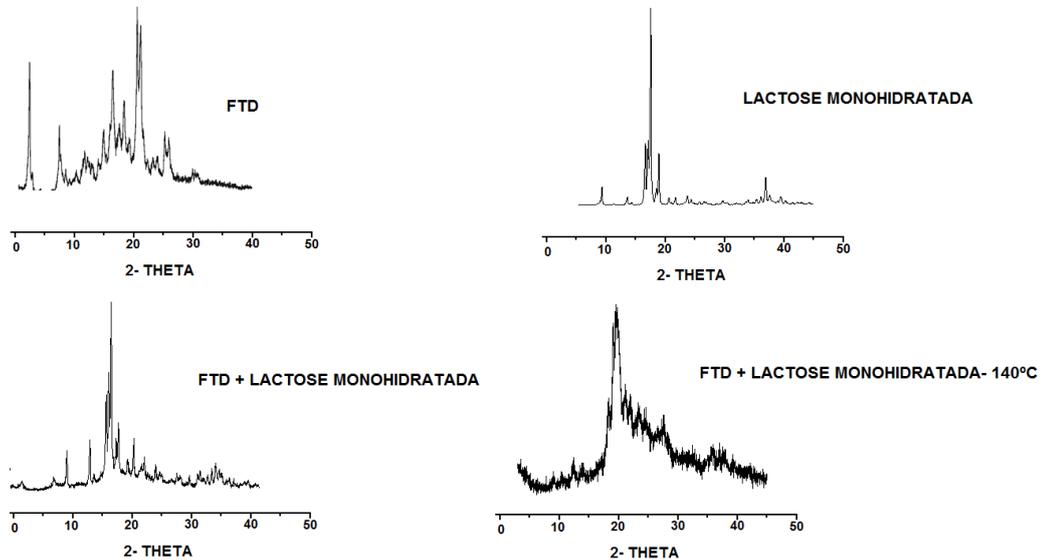
As interações por DRX são observadas quanto a presença do pico principal em 24,43° e dos picos secundários em 4,96°, 10,29°, 19,89° e 24,29°, característicos do FTD. Em ambas as MB avaliadas não houve alteração do perfil cristalino do fármaco, uma vez que houve manutenção de todos os picos característicos da molécula, já após aquecimento das MB a temperaturas que foram posterior a fusão do fármaco com cada excipiente relatado EMg + FTD e Lactose + FTD à 100 e 140°C respectivamente ocorreu perda do perfil cristalino de ambos conforme observado nas Figuras 23 e 24. As diferenças em termos de intensidade desses picos do FTD se devem a menor quantidade de fármaco presente na mistura, quando comparada a maior proporção de fármaco sob análise sozinho.

Figura 23 - Difratoograma de Raios X do FTD, Estearato de Mg, FTD+ Estearato de Mg (1:1) e FTD + Estearato de Mg (1:1) após aquecimento à 100°C.



Fonte: Autoria própria

Figura 24 - Difratoograma de Raios X do FTD, Lactose monohidratada, FTD+ Lactose monohidratada (1:1) e FTD + Lactose monohidratada (1:1) após aquecimento à 140°C.

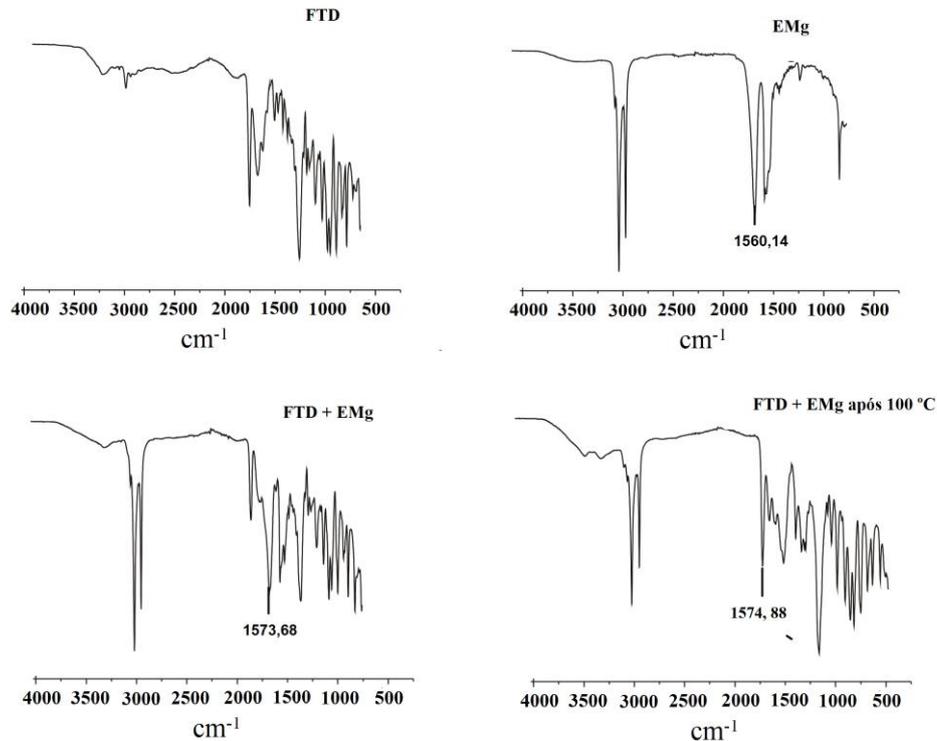


Fonte: Autoria própria

Diferentes estudos empregam essa técnica para elucidar a compatibilidade fármaco/excipiente na fase de pré-formulação, a exemplo da análise do cetoprofeno com diferentes excipientes farmacêuticos, em que foi constatada a incompatibilidade com PVP K-30 e estearato de magnésio utilizando DSC, TG, FTIR e DRX (TITA, 2011).

O FTIR foi usado como técnica suplementar com objetivo investigativo das possíveis interações químicas entre o FTD e as MB. Ambas as misturas demonstram a presença das bandas características do fármaco e dos excipientes (Figuras 25 e 26).

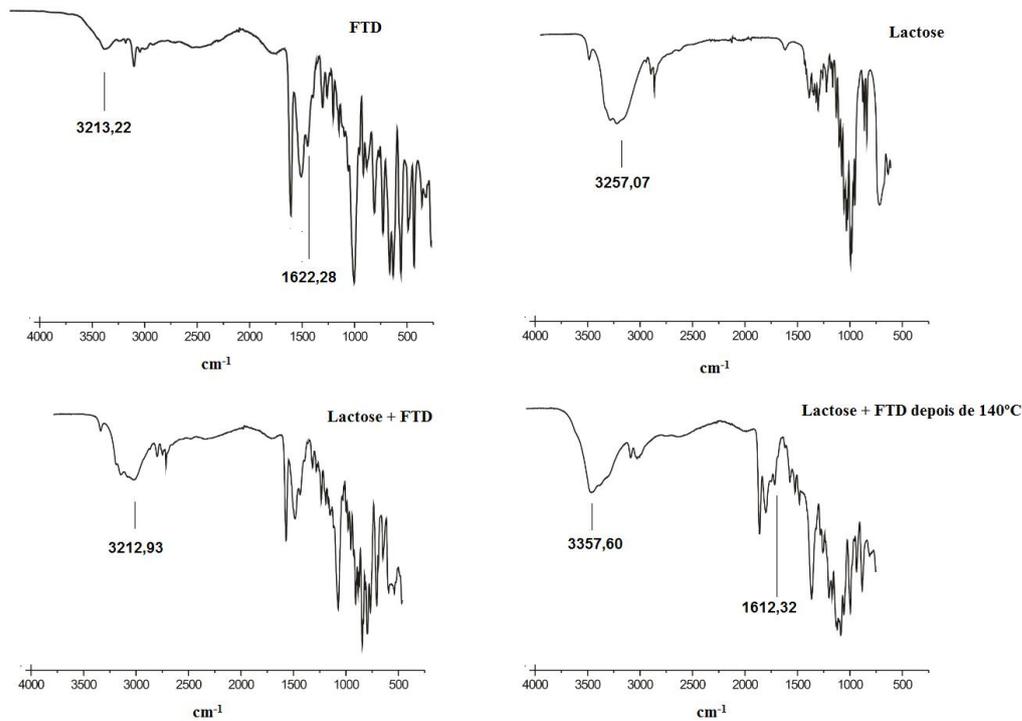
Figura 25 - Espectro na região do IV do FTD, EMg, FTD + Estearato de Mg (1:1) e FTD + Estearato de Mg (1:1) após aquecimento à 100°C.



Fonte: Autoria própria

Em relação à mistura FTD:Estearato de Mg (Figura 17), foi observado um descolamento na frequência da banda C=O do estearato em 13 cm⁻¹, caracterizando formação de ligação de hidrogênio intermolecular fraca (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006), envolvendo a amina primária do FTD. Em relação a outras bandas, não houve alterações significativas.

Figura 26 - Espectro na região do IV do FTD, da lactose monohidratada e das MB 1:1 FTD + Lactose (25° C) e FTD + Lactose após aquecimento a 140° C.



Fonte: Autoria própria

Na MB do FTD:Lactose (25 °C) ocorreu diminuição de 44,14 cm⁻¹ na intensidade da banda correspondente a ligação do O-H da lactose. Após aquecimento, a intensidade desta banda característica da interação O-H aumentou de 3212,93cm⁻¹ para 3257,60cm⁻¹, além de haver diminuição da banda característico da amina primária N-H pertencente ao FTD de 1622,98 para 1612,32 cm⁻¹ (Figura 18), demonstrando assim mais um indício da ocorrência da reação de Maillard entre estas substâncias (ROWE, 2006).

5.2.3 Estudo cinético de decomposição não-isotérmica

Por meio dos dados contidos na Tabela 4 pode-se estabelecer um perfil comparativo de estabilidade entre a matéria-prima, a mistura FTD + EMg e o medicamento (VIREAD). Dentre os dados obtidos neste estudo, a energia de ativação (E_a) apresenta maior interesse na avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos, sendo útil no estabelecimento de um perfil comparativo entre o fármaco e suas associações, onde o aumento do valor de E_a significa um incremento na estabilidade do sistema (SOVISI et al., 2010; SOARES, 2011; OLIVEIRA, 2011; VIEIRA et al., 2013).

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos obtidos através do método não-isotérmico nas razões 5, 10, 20 e 40 °C. min⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

	Ordem de reação	A (min ⁻¹)	E_a (KJ.mol ⁻¹)
FTD	1	5,511 x10 ⁹	87,86
FTD + Estearato de Mg	1	1,722x10 ⁹	83,57
Viread[®]	1	4,047x 10 ⁹	73,05

Fonte: Autoria própria

De acordo com a análise realizada, percebe-se que o FTD isolado e o FTD na formulação VIREAD[®] apresentam variações de E_a em torno de 15%; enquanto com relação a MB FTD: EMg foi verificada variação pouco expressiva sobre a E_a (5%). Assim, esses resultados confirmam a pouca interferência do estearato de magnésio sobre a degradação/estabilidade do FTD e, em contrapartida, corroboram com a influência negativa da junção de todos os excipientes do Viread[®], além da influência dos excipientes que compõe o revestimento desta formulação (Opadry II Y-30-10671-A, contendo FD&C Azul n°2 laca de alumínio, hidroxipropilmetilcelulose 2910, lactose mono-hidratada, dióxido de titânio e triacetina).

Além disso, todas as cinéticas de decomposição indicaram uma reação de primeira ordem (uma única reação contribui para a perda de massa), ou seja, existe apenas uma reação significativa ocorrendo e não é afetada por processos concorrentes (HOWELL; RAY, 2006).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As técnicas de caracterização utilizadas permitiram um melhor conhecimento das características físico-químicas do antirretroviral FTD, sobretudo das condições degradativas capazes de influenciar negativamente a sua estabilidade. Estas condições caracterizam os entraves inerentes ao fármaco em questão e que, portanto, requerem profundo conhecimento, tendo em vista sua repercussão sobre a eficácia e segurança dos medicamentos contendo este ARV. Assim, as informações abordadas ofereceram subsídio para o desenvolvimento racional de medicamentos que o utilizem.

Os resultados oriundos do estudo de compatibilidade por análise térmica identificaram a interação existente entre o fármaco e os excipientes estearato de magnésio e lactose monohidratada, confirmados por FTIR. Além disso, a cinética de degradação térmica permite concluir o estudo de estabilidade do ARV no que se refere à constatação de que a junção dos excipientes da formulação, ou daqueles presentes no revestimento, repercute negativamente na estabilidade do fármaco. Tais informações são importantes por se tratarem do primeiro estudo de compatibilidade envolvendo este fármaco, além de visar orientar o delineamento de outras formulações contendo FTD.

O presente trabalho tem como perspectivas o desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade para identificação e quantificação dos possíveis produtos de degradação e impurezas mais significantes, e a aplicação do método indicativo de estabilidade para o medicamento dispensado comercialmente.

REFERÊNCIAS

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H.M. Dissolution. In: GENNARO, A.R., ed. Remington: **The Science and Practice of Pharmacy**. 18th ed. Easton: Mack Publishing. P. 593-604, 1995.

AIGNER, Z. et al. Compatibility studies of aceclofenac with retard tablet excipients by means of thermal and FT-IR spectroscopic methods. **J Therm Anal Calorim**, v.104, p.265–271, 2011.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN-JR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; p. 775, 2007.

ANTHONY PILLAI, C.; GIBBS, J.E.; THOMAS, S.A. The distribution of the anti-HIV drug, tenofovir (PMPA), into the brain, CSF and choroid plexuses. **Cerebrospinal Fluid Res**; v.3, n.1, 2006.

ASHENAFI, D.; CHINTAM, V.; VEGHEL, D.; DRAGOVIC, S.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Development of a validated liquid chromatographic method for the determination of related substances and assay of tenofovir disoproxil fumarate. **J. Sep. Sci.**, v.33, p.1708–1716, 2010.

ATTIA, A. K.; ABDEL-MOETY, M. M.; ABDEL-HAMID, A. G. Thermal analysis study of antihypertensive drug doxazosin mesilate. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

AVERT. HIV types, groups and subtypes. Disponível em <<http://www.avert.org/hivtypes.htm>>. Acesso em: 15 Nov. 2012.

AVERT. HIV The current situation. Disponível em <http://www.avert.org/hiv-AIDS-brazil>. Acesso em: 12 Out. 2013.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

AZANZA, J. R.; QUETGLAS, E.G.; SÁDABA, B.; GÓMEZ-GIU, A. Tenofovir: farmacología e interacciones. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**; v.26, n. 8, p.2-6, 2008.

BAKSHI, M., SINGH, B.; SINGH A.; Singh, S. The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability- indicating assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 26, p. 891, 2001.

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

BAERTSCHI AND JANSEN. **Pharmaceutical Stress Testing.** by Taylor & Francis Group, LLC p. 14. 2005.

BARBOZA, F.; VECCHIA, D.D.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H.K. Differential scanning calorimetry as a screening technique in compatibility studies of acyclovir extended release formulations. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 6, 2009.

BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

BELLETTI, D.; TOSIA, G.; FORNIA, F.; GAMBERINIB, M.C.; BARALDIB, C.; VANDELLIA, M. A.; RUOZIA, B. Chemico-physical investigation of tenofovir loaded polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p.753– 763, 2012.

BENNETTO-HOOD, C.; LONG, M. C.; ACOSTA, E. P. Development of a sensitive and specific liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of tenofovir in human plasma. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 13, p. 2087-2094, 2007.

BENTLE, M.S.; BEY, E.A.; DONG, Y.; REINICKE, K.E.; BOOTHMAN, D. A. New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. **J Mo. Hist**, v.37, p.203-18, 2006.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

BETTO, P. L.; LONGINOTTI, T. L. Allergenic impurities in medicinal preparations containing aminopenicillin. I. Ampicillin sodium, **Ann. Ist. Super. Sanità**, v. 25, 315–317, 1989.

BONOLO, P.F; GOMES, R.R.F. M; GUIMARÃES, M.D.C. Adesão à terapia anti-retroviral (HIV/aids): fatores associados e medidas de adesão. **Epidemiol Serv Saúde**, v.16, n.4, p.261-278, 2007.

BOTHA, S.A.; LÖTTER, A.P. Compatibility study between atenolol and tablet excipients using differential scanning calorimetry. *Drug Development and Industry Pharmacy*, New York, v.16, n.12, p.1945-1954, 1990.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Quais são os antirretrovirais**. 2012b.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. Aids e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 207–17, 2001.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de julho de 2005, do Guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Contratos para compra de antirretrovirais ficam R\$ 118 milhões mais baratos. Disponível <<http://www.AIDS.gov.br/noticia/contratos-paracompra-de-antirretrovirais-ficam-r-118-milhoes-mais-baratos>>. Acesso em: 27 dez 2010d.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Adultos Vivendo com HIV/AIDS. Brasília, 2013. Disponível em:

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

www.AIDS.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c_2013montado.pdf>. Acesso em: 22 Out 2013.

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral Research** v.85, p.1–18, 2010.

BRUNI, G.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; MARINI, A. Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques. **J Therm Anal Calorim**, v.102, p.193–201, 2010.

BURNS, D.A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker; 2001.

CARDOSO, S.W.; TORRES, T. S.; OLIVEIRA, M.S.; MARINS, L.M.S.; VALDILÉA VELOSO, V. G.; GRINSZTEJN, B. Aging with HIV: a practical review. **br z j i n f e c t d i s**, v.17, n.4, p.464–479, 2013.

CANINI, S. R. M. S; REIS, R.B; PEREIRA, L. A; GIR, E; PELÁ, N. T. R. Qualidade de Vida de Indivíduos com HIV/AIDS: Uma Revisão de Literatura. **Re. Latino-am Enfermagem**, v.12, n.6, p.940-5, 2004.

CECCATO, M. G. B; ACURCIO, F. A; BONOLO, P. F; ROCHA, G. M; GUIMARÃES, M. D. C. Compreensão de informações relativas ao tratamento antirretroviral entre indivíduos infectados pelo HIV. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n.5, p. 1388-1397 2004.

CIDES, L.C.S., ARAUJO, A.A.S., SANTOS-FILHO, M., MATOS, J.R., Thermabehaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions - **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v 84, p. 441-445, 2006.

CHAVES, L.L. Estudo de estabilidade forçada do fármaco citrato de dietilcarbamazina utilizado no combate a filariose linfática. Dissertação de Mestrado-Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, 2010.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 33, n.4, p. 307-320, 2009.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. **Journal of Chromatography B -Analytical technologies in the biomedical and life**, Amsterdam, v. 830, n. 1, p. 6-12, 2006.

Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>. Acesso em março de 2013.

CHEARSKUL, P.; RONGKAVILIT, C; AL-TATARI, H.; ASMAR, B. New antiretroviral drugs in clinical use. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 73, n. 4. P. 335-341, 2006.

COELHO, M. L. Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: desenvolvimento de métodos e avaliação da estabilidade. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do PIAUÍ. 2012.

COOPER, R.D.; WIEBE, N.; SMITH, N.; KEISER, P.; NAICKER, S.; TONELLI, M. Systematic review and meta-analysis: renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. **Clin Infect Dis**, v. 51, p.496-505, 2010.

CONSIGLIERE, V.O. Avaliação da qualidade biofarmacêutica da ampicilina sob as formas de suspensão e cápsulas: ensaios in vitro e in vivo (bioequivalência). **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo. p. 135. 1996.

COSTA, S. P. M. et al. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, v.562, p.29– 34, 2013.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. **Journal of Chromatography B -Analytical technologies in the biomedical and life**, v. 830, n. 1, p. 6-12, 2006.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

DE SOUZA, K. C. B.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L.; GONZÁLEZ, O. G. The adjuvants aerosil 200 and gelita-sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2000.

EMA. Scientific discussion for the approval of Viread. p. 1-43. 2005. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000419/WC500051732.pdf. Acesso em 13 de Junho de 2012.

DRUGBANK. Tenofovir. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00300> . Acesso em 3 dezembro de 2013.

FB. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5 ed., Fiocruz: São Paulo, 2010.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3 ed. São Paulo: Edusp, p.126, 2011.

FREIRE, F.D.; ARAGÃO, C.F.S.; MOURA, T.F.A.L.; RAFFIN, F.N. Compatibility study between chlorpropamide and excipients in their physical mixtures. **J Therm Anal Calorim**, v.97, p.355-7, 2009.

FUNG, H.B.; STONE, E. A.; PIACENTI, F. J. Tenofovir Disoproxil Fumarate: A Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor for the Treatment of HIV Infection. **Clinical therapeutics**, v.24, n. 10, 2002.

GASPARIN, A.B. et al. Prevalência e fatores associados às manifestações bucais em pacientes HIV positivos atendidos em cidade sul-brasileira. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n.6, p.1307-1315, 2009.

Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>. Acesso em março de 2013.

GOPINATH, R.; NAIDU, R.A.S. Pharmaceutical Preformulation Studies- Current Review. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**, v. 2, n.5, p. 1391-1400, 2011.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

GITMAN, M.D.; HIRSCHWERK, D.; BASKIN, C.H.; SINGHAL, P.C.; Tenofovir- induced kidney injury. **Expert Opin Drug Saf**, v.6, p.155-164, 2007.

GILEAD. Disponível em : http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000419/WC500051737.pdf. Acesso em 03 de Maio de 2012.

HALL, A. M.; HENDRY, B. M.; NITSCH, D.; CONNOLLY, J. O. Tenofovir-Associated Kidney Toxicity in HIV-Infected Patients: A Review of the Evidence. **Am J Kidney Dis**, v.57, n.5, p.773-780, 2011.

HALLAL, R.; RAVASI, G.; KUCHENBECKER, R.; GRECO, D.; SIMÃO, M. O acesso universal ao tratamento antirretroviral no Brasil. **Revista Tempus Actas em Saúde Coletiva**. 2010.

HONGTHANAKORN, C; LOK, A. S. F. New Pharmacologic Therapies in Chronic Hepatitis B. **Gastroenterol Clin N Am**, v.39, p.659–680, 2010.

HOWELL, B. A.; Ray, J. A. Comparison of isothermal and dynamic methods for the determination of activation energy by thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 83, n. 1, p. 63–66, 2006.

HU, C.Y. et al. Pharmacokinetics and Tolerability of Tenofovir Disoproxil Fumarate 300 mg Once Daily: An Open-Label, Single- and Multiple-Dose Study in Healthy Chinese Subjects. **Clinical Therapeutics**, v. 1, n. 1, 2013.

ICH, Photostability Testing of New Drug Substances and Products, “Step 5 (1996a).

ICH, Stability Testing of New Drug Substances and Products. Geneva, 2003.

ICH, Impurities in new drug substances Q3A (R2), in: International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland), 2006.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

ICH, Impurities Guideline for metal impurities Q3D, in: International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland), 2009.

KARIM, Q. A. et al. Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. **CIENCE** . v. 329, 2010.

KEARNEY B. P.; FLAHERTY, J. F.; SHAH, J. Tenofovir Disoproxil Fumarate: Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 9, p. 613-622, 2004.

KLICK, S. et al. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology. February**, p. 48-66, 2005.

KOVARIKOVA P.; KLIMES, J.; DOHNAL, J.; TISOVSKA, L. HPLC study of glimepiride under hydrolytic stress conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 205, 2004.

LAVOIE, J-C.; CHESSEX P.; ROULEAU, T.; MIGNEAULT D.; COMTE B. Light-induced by products of vitamin c in multivitamin solutions. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 135–140, 2004.

LEMOS SENNA, E.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ, O. G.; BASSANI, V. L. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 11, n. 2, p. 123-7, 1997.

LÓPEZ, F.A.; MERCÊ, A. L.R.; ALGUACIL, F.J.; LÓPEZ-DELGADO, A. A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, n.2, p.633–639, 2008.

LINDINO, C. A.; MITSUI, M. L.; ORTIGUARA, R.; FELIN, D.; ROSA, M. F.; BARICCATTI, R. A. Estudo de estabilidade do fosfato dissódico de prednisolona em condições de estresse oxidativo e térmico, em formulação oral. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 35, n.4,p. 9 - 15, 2010.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Application of thermal analysis in the characterization of anti-hypertensive drugs. **J. Therm. Anal. Calorim.** v.59, n.3, p. 657-661, 2000.

MATHKAR, S et al. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 49, n. 3, p. 627–631, 2009.

MARIER, J. F. et al. Pharmacokinetics of lamivudine, Zidovudine, and Nevirapine Administered as a Fixed-Dose Combination Formulation Versus Coadministration of the Individual Products. **Journal of Clinical Pharmacology.** V. 47. P. 1381-1389, 2007.

MARINI, A. et al. Drug-excipient compatibility studies by physicochemical techniques: the case of indomethacin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.73, p. 529-545, 2003.

MAXIMIANO, F. P.; NOVACK, K. M.; BAHIAM. T.; SÁ-BARRETO, L. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Polymorphic screen and drug-excipient compatibility studies of the antichagasic benzimidazole. **J Therm Anal Calorim**, v.106, p.819–824, 2011.

MAXIMIANO, F. P; COSTA, G. H.Y; SOUZA, J. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benzimidazol. **Quim. Nova**, V. 33, n. 8, p.1714-1719, 2010.

MCCONVILLE, C.; FRIEND, D. R.; CLARK, M. R.; MALCOLM, K. Preformulation and Development of a Once-Daily Sustained-Release Tenofovir Vaginal Tablet Containing A Single Excipient. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 6, 2013.

MENG, J.; STURGIS, T. F.; YOUAN, B. C.; Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, p.57–67, 2011.

MESQUITA, P. M. M. et al. Intravaginal ring delivery of tenofovir disoproxil fumarate for prevention of HIV and herpes simplex virus infection. **J Antimicrob Chemother**, 67, p.1730–1738, 2012.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites virais. **Boletim Epidemiológico – AIDS e DST**. ano VIII, nº 1. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos vivendo com HIV/AIDS. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites virais. **Boletim epidemiológico-AIDS e DST**. Ano II nº 1, ISSN 1517 1159. 2013.

MOGENSEN, T.H, MELCHJORSEN, J.; LARSEN, C.S.; PALUDAN, S.R. Innate immune recognition and activation during HIV infection. **Retrovirology**, v.7, p.54, 2007.

MONAJJEMZADEH, F. et al. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.73, p.404–413, 2009.

MÜLLER, L. et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity, **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v.44, p.198–211, 2006.

MURA, P.; FAUCCI, M. T.; MANDERIOLI, A.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Thermal analysis as a screening technique in preformulation studies of picotamide solid dosage forms. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 24, n. 8, p. 747-756, 1998 b.

NARANG, A. S.; DESAI, D.; BADAWY, S. Impact of Excipient Interactions on Solid Dosage Form Stability. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n.10, p 2660-2683, 2012.

NELSON, M.R.; KATLAMA, C.; MONTANER, J.S. The safety of tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HIV infection in adults: the first 4 years. **AIDS**. v.21, p.1273-1281, 2007.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

NETO, P. J. Study of stability and drug-excipient compatibility of diethylcarbamazine citrate. **J Therm Anal Calorim**, v.111, p.2179–2186, 2013.

NETO, J.L.F. Desenvolvimento de cápsula oral a base de β -lapachona complexada com ciclodextrina para terapia antineoplásica. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas- **Dissertação de Mestrado**. 2012.

NETO, H. S.; MATOS, J. R. Compatibility and decomposition kinetics studies of prednicarbate alone and associated with glyceryl stearate. **J Therm Anal Calorim**, v.103, p.393–399, 2011.

O' DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. **Stability of pharmaceutical products**. In: TROY, D. B. (Ed). Remington: The science and practice of Pharmacy. 21th. Ed. Philadelphia: The university of the sciences, cap. 52, p. 1025-1036, 2006.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

PALOMBO, M.S., SINGH, Y., SINKO, P.J. Prodrug and conjugate drug delivery for improving HIV/AIDS therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 3-14, 2009.

PATERSON, D.L.; SWINDELLS, S.; MOHR, J.; BRESTER, M.; VERGIS, E.N.; SQUER, C.; WAGENER, M.M.; SINGH, N. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection, **J. Intern. Med**, v.133, p.21–30, 2000.

PIECHOCK, J.T., THOMA, K.; **Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology**, Ed .Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

PINNA, G.; KAKALOU, E.; ROSENBERG, T. Access to Affordable Highly Active Anti – Retroviral Therapy (HAART) for HIV / AIDS Patients. Where Do We Stand? **Hospital Chronicles**, Athens, v. 7, n. 3, p. 133–142, 2012.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.G.Z.; LIU, L.; PORTER, W. **Developing solid oral dosage forms: Pharmaceutical Theory and Practices**. 1. ed. New York: Elsevier, 2009.

QUIRÓS, J. C. L. B. Tenofovir en Pautas de Rescate. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.26, n.8:p.25-30, 2008.

RAKHMANNINA, N.; PHELPS, B. R. Pharmacotherapy of Pediatric HIV Infection. **Pediatr Clin N Am**, v. 59, p. 1093–1115, 2012.

REZENDE, R.L.O; SANTORO, M. I.R.M.; MATOS, J.R.; stability and compatibility study on enalapril maleate using thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n.3, p.881–886, 2008.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A.; SANTOS D.; VEIGA, F. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. **AAPS Pharm Sci Tech**, v.9, n.4, p.1102-9, 2008.

RIPIN, D. H. B.; TEAGER, D. S.; FORTUNAK, J.; BASHA, S. M.; BIVINS, N.; BODDY, C. N. Process Improvements for the Manufacture of Tenofovir Disoproxil Fumarate at Commercial Scale. **Organic Process Research & Development**, 14, 1194–1201, 2010.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Compatibility between active components of a commercial drug. **Farmaco**, v. 57, p.833-843, 2002.

ROLIM, L. A. Estudo da degradação do fármaco benznidazol utilizado no combate a doença de chagas por hidrólise, oxidação, fotólise e termodegradação. **Dissertação de Mestrado**. 2010.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R.; SABIN, C.A. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT) **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.3, p.383-7, 2005.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

ROMANO, A. M.J.; FERNANDEZ, T. J.; VEGA, J. M.; MAYORGA, C.; GARCIA, J.; BLANCA, M. Allergic reactions to ampicillin. Studies on the specificity and selectivity in subjects with immediate reactions, **Clin. Exp. Allergy**, v.27, p.1425–1431, 1997.

ROWE, R. C. **Lactose, In Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 15nd ed. Eds.; American Pharmaceutical Association: Washington DC, p 389-91, 2006.

SANTOS, A. F. O. et al. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **J. Thermal. Anal. Calorim.** v. 93 n. 2, p.361–364, 2008.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.30, n.2, p.1808-4532, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC editora. Cap.2, p. 70-104, 2006.

SILVIA, R.M.F; MEDEIROS, F.P.M; NASCIMENTO, T.G; MACÊDO RO, ROLIM-NETO, P.J. Thermal characterization of indinavir sulfate using TG, DSC and DSC-photovisual. **J Therm Anal Calorim**, v.95, n.3, p.965–8, 2009.

SIQUEIRA, E. C. Obtenção de compostos intermediários para a síntese do agente anti-HIV Tenofovir, e de derivados do D-manitol. Dissertação de mestrado. universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

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

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

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N.; SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical chemistry**, v. 49, p. 71–88, 2013.

SINKO, P. J. Martim- **Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. Editora Artmed. 5ªEd. 411-417p. 2005.

SOARES, M.F.R. Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efavirenz. Tese de doutorado, Recife, 280 p. 2011.

SOARES, et al. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.104, p 307-313, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, 2010.

SOUZA, F. S.; MACEDO, R. O.; VERAS, J. W. E. Studies of cimetidine pre-formulated and tablets for TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochim. Acta**, v. 392-393, p. 99-106, 2002.

SOVIZI, M.R. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **J Therm Anal Calorim**, v.102, p.285–9, 2010.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**, 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara; 2009.

STULZER, H. K.; RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; MATOS, J. S.R.; SILVA, M. A. S. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91 n.1, p.323–328, 2008.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

SWAMIVELMANICKAM, M.; VALLIAPPAN, K.; REDDY, P. G.; MADHUKAR, A.; MANAVALAN, R.; Preformulation studies for Amoxicillin trihydrate and Dicloxacillin sodium as Mouth Dissolve tablets **Int. J. ChemTech Res.** 2009, 1, 1032.

TABORIANSKI, A.M. Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas. Dissertação de mestrado, São Paulo, 167p. 2003.

TAKAHASHI, M; KUDAKA, Y; OKUMURA; HIRANO, A; BANNO, K; KANEDA, TSUGUHIRO. Determination of Plasma Tenofovir Concentrations Using a Conventional LC-MS Method. **Biol. Pharm, Bull**, v.30, n9, p. 1784-1786, 2007.

TEIXEIRA, M.O.N. Desenvolvimento de métodos de determinação de tenofovir para aplicação em controle de qualidade e estudo de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa. **Dissertação de Mestrado.** UFMG 2011.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIRA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms, **J. Pharm. Biomed. Anal**, v. 56, p.221-227, 2011.

USP. Tenofovir Disoproxil Fumarate. Authorized USP Pending Monograph, 2011.

VANCE, D.E. Aging with HIV: clinical considerations for an emerging population. **Am J Nurs**, v.110, p.42-7, 2010.

VECCHIO, S.; RODANTE, F.; TOMASSETTI, M. Thermal stability of disodium and calcium phosphomycin and the effects of the excipients evaluated by thermal analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 1111-1123, 2001.

VERMA, R. K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.633-644, 2005.

VERMUND, S.H., 2006. M API: I. Formulation, processing design and risk assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 52- 59, 2011.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

VIANA, O. S. et al. Kinetic Analysis of the Thermal Decomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 2, p. 211-6, 2008.

VIEIRA, A. C. Q. M. et al. Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **J Therm Anal Calorim.** 2013.

XIAO, Y.; MIAO, H.; TANG, S.; WU, H. Modeling antiretroviral drug responses for HIV-1 infected patients using differential equation models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 940–953, 2013.

XU, X.; KHANB, M. A.; BURGESSA, D. J. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar. **International Journal of Pharmaceutics.** v.423, p.410– 418, 2012.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. **Stability of Drugs and Dosage Forms.** Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, v.274, 2002.

YOSHIDA, M.I.; OLIVEIRA, M. A.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; W. V. CASTRO, W.V.; V. SOARES, C. D. V. Thermal characterization of lovastatin in pharmaceutical formulations. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.31, n. 2, p.117-24, 2010.

WALENSKY, R.P., PALTIEL, A.D., LOSINA, E., MERCINCAVAGE, L.M., SCHACKMAN, B.R., SAX, P.E., WEINSTEIN, M.C., FREEDBERG, K.A. The survival benefits of AIDS treatment in the United States. **J. Infect. Dis.**, v.194, p.11–19, 2006.

WIRTH, D. D.; BAERTSCHI, S. W.; JOHNSON, R. A.; MAPLE, S. R.; MILLER, M. S.; HALLENBECK, D. K.; GREGG, S. M. Maillard Reaction of Lactose and Fluoxetine Hydrochloride, a Secondary Amine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 1, 1998.

World Health Organization –WHO, Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series 953, Annex 2, Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products, Geneva, Switzerland. 2009.

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

WU, Y.; LEVONS, J.; NARANG, A. S.; RAGHAVAN, K.; RAO, V. M.; Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, 2011.

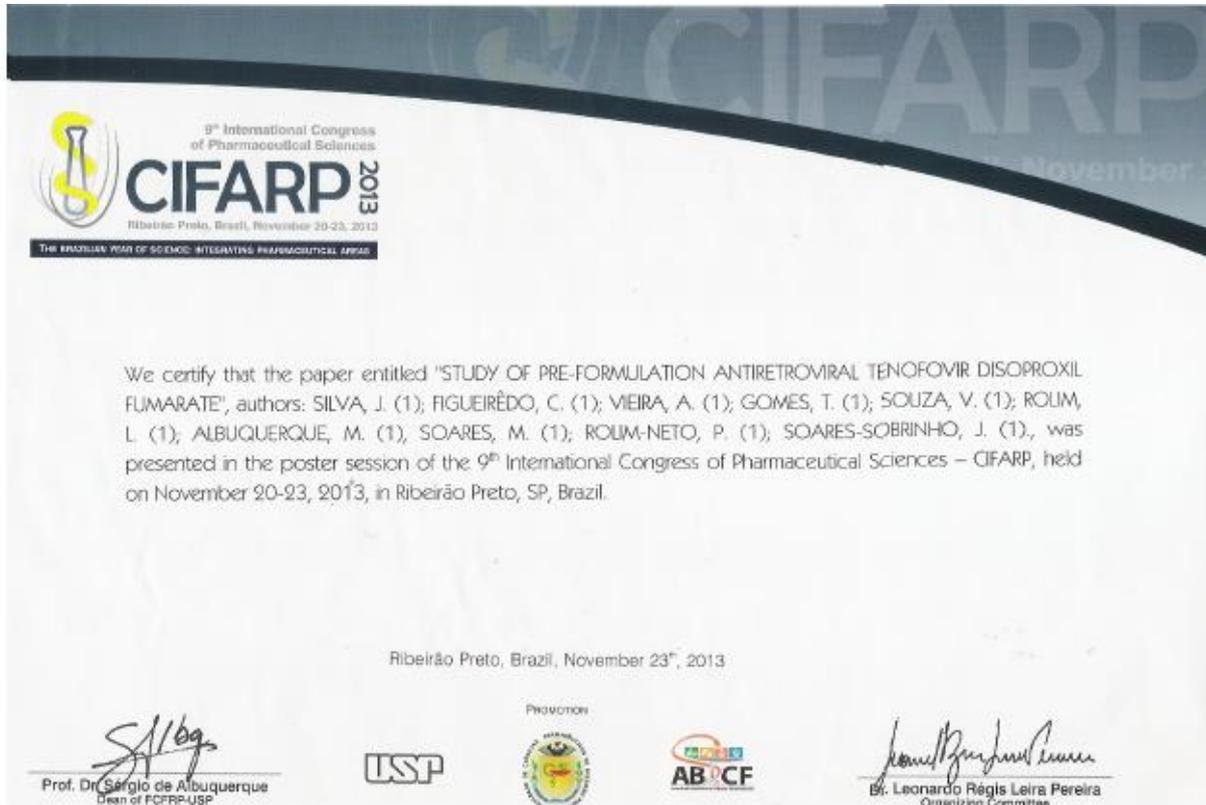
ZIDAN, A. S.; SPINKS, C.; FORTUNAK, J.; HABIB, M.; KHAN, M. A. Near-Infrared Investigations of Novel Anti-HIV Tenofovir Liposomes. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 2, 2010.

ZHANG, T.; STURGIS, T.F.; YOUAN, B. C. pH-responsive nanoparticles releasing tenofovir intended for the prevention of HIV transmission. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p.526–536, 2011.

ANEXOS

SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

**ANEXO A - Resumo: Study of Pre-formulation Antiretroviral Tenofovir Disoproxil Fumarate.
Apresentado no 9th International Congresso of Pharmaceutical Sciences- CIFARP**



SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

ANEXO B – Resumo expandido: Influência da Higroscopicidade na Estabilidade do Antirretroviral Fumarato de Tenofovir Desoproxila (FTD). Apresentado no 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica



SILVA, J. A. S. Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento.

ANEXO C – Resumo: Aplicação da Análise Térmica no Estudo de Compatibilidade Fármaco-Excipiente do Antirretroviral Fumarato de Tenofovir. Apresentado no 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica



3º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica

“Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde”



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico intitulado “APLICAÇÃO DA ANÁLISE TÉRMICA NO ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO – EXCIPIENTE DO ANTIRRETROVIRAL FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA (FTD)”, de autoria de “V. M. S. SOUZA, J. P. A. SILVA, F. A. MARINHO, C.B.M. FIGUEIRÊDO, M.M. ALBUQUERQUE, P. J. ROLIM NETO, M. F. R. SOARES, J.L. SOARES SOBRINHO.”, foi apresentado na modalidade pôster no 3º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica e 1º Workshop Rede RISH, realizado entre os dias 21 a 25 de Outubro de 2013.

Jaboatão dos Guararapes, 25 de Outubro de 2013.

César Augusto Souza de Andrade
Presidente do 3º EBIT

Ivan da Rocha Pitta
Coordenador da Rede RISH