



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

TALITA ATANAZIO ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE
QUÍMICA E FÍSICA DE ANTIRRETROVIRAIS**

**Recife
2019**

TALITA ATANAZIO ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE
QUÍMICA E FÍSICA DE ANTIRRETROVIRAIS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Coorientadoras:

Prof^a Dr^a Maria Fernanda Pimentel

Prof^a Dr^a Rosali Maria Ferreira da Silva

**Recife
2019**

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

R788d Rosa, Talita Atanzio.
Desenvolvimento de métodos para avaliação da estabilidade química e física de antirretrovirais / Talita Atanzio Rosa. – Recife: o autor, 2019.
108 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências e anexos.

1. Estabilidade de medicamentos. 2. Efavirenz. 3. Lamivudina. 4. Zidovudina. I. Rolim Neto, Pedro José (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 107)

TALITA ATANAZIO ROSA

“Desenvolvimento de métodos para avaliação da estabilidade química e física de antirretrovirais”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 14/03/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Beate Saegesser Santos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Leandro de Moura França (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Montenegro Rabello (Examinador Externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. José Lourenço de Freitas Neto (Examinador Externo)
Polícia Científica de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que este trabalho tenha sido realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade de formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de doutorado concedida nos primeiros anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Rolim, por ter me aceitado no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) há oito anos atrás, o que me permitiu adquirir tantos conhecimentos e vivenciar tantos momentos. E agradeço também por ter acreditado em mim, quando nem eu mesma acreditava.

À Prof^a Dr^a Fernanda Pimentel por todo o apoio e o auxílio imprescindíveis para a realização desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Rosali Maria pelas discussões e pelo apoio dados.

Aos integrantes do LTM pelo auxílio nos trabalhos práticos, por discussões teóricas pertinentes e até pelos momentos de descontração que fizeram esses anos serem felizes e parecerem mais leves. São muitos nomes, mas não posso deixar de citar os companheiros de defesa: Paulo, Larissa Morgana e Lidiany.

À Prof. Dra. Larissa Rolim, pelas discussões e sugestões sobre CLAE.

Ao Dr. Leandro França, por me mostrar a quimiometria aplicada à área farmacêutica.

Ao doutorando Eduardo Maia Paiva, pela realização das análises de espectroscopia Terahertz na Universidade Estadual de Campinas.

À Cristália e à Nortec, pela doação de efavirenz.

Ao pessoal do trabalho, onde encontrei amigos presentes, que além dos momentos de descontração, me deram força para continuar e persistir, principalmente a: Thaíse e a Raquel. E aos “gênios” da informática, Moisés Gauthier e, principalmente Lucas Araújo, que me ajudaram com o Matlab, mesmo sem eles entenderem nada do que eu estava fazendo.

Aos amigos de desde sempre, que acompanharam a saga desde o início e sempre estavam dispostos a me ouvir e me apoiar, principalmente Marília Carla, Ângela, Lília e Isnard, e a turminha do técnico, não tão presente, mas que sei que sempre pude contar: Dione, Brena, Marília, Suelen, Sandra e Nathália.

A minha tia Lêla e Gicélia, que na ausência dos meus pais sempre foram um porto seguro. Aos meus pais, Edmilson e Nena, pelo apoio e o carinho. Por terem me incentivado desde criança à leitura, educação e independência. Essa conquista também é de vocês.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(CHAPLIN..., 1997, p. 118)

RESUMO

Medicamentos em associação dose fixa (ADF) são importantes no tratamento do Vírus da Imunodeficiência Humana por diminuir a complexidade e a falha terapêutica. Por isto, em 2011, foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco um comprimido ADF contendo zidovudina, lamivudina e efavirenz (EFZ), porém o estudo de estabilidade necessário não foi realizado. Por outro lado, vem sendo questionado se a forma polimórfica I do EFZ, utilizada em formas farmacêuticas comerciais, seria a mais adequada em relação a parâmetros de dissolução e estabilidade. Logo, este trabalho objetivou desenvolver método indicativo de estabilidade (MIE) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para o comprimido ADF, além de investigar as condições de obtenção do polimorfo II do EFZ e desenvolver métodos de quantificação deste polimorfo em misturas contendo o polimorfo I. Para o desenvolvimento do MIE foram testadas diferentes condições, o melhor resultado foi obtido a partir de gradiente utilizando água e acetonitrila a $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna Supelco® C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) a 30°C e tempo de análise de 50 min. No entanto, ajustes ainda devem ser realizados para separar devidamente os produtos de degradação. Em relação à obtenção do polimorfo II, após avaliar diferentes condições, foi escolhida realizar a cristalização de EFZ em metanol a $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e temperatura entre -4 a 4°C em recipientes abertos. Os polimorfos I e II foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X, calorimetria diferencial de varredura, polarimetria, dissolução intrínseca e espectroscopias de infravermelho e Raman. Os resultados obtidos mostraram-se semelhantes aos da literatura, com exceção do teste de dissolução intrínseca. Foram ainda realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e de Terahertz, ainda não descritas para o EFZ, tendo sido possível diferenciar as duas formas por essas técnicas. Após a caracterização, procedeu-se o desenvolvimento de métodos de quantificação por espectroscopia na região do infravermelho médio (MID), NIR (equipamentos de bancada e portátil) e Raman (equipamentos de bancada e portátil) utilizando modelos de calibração multivariada por regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Além disso, a performance dos modelos construídos foi avaliada com o uso de técnicas de pré-processamento dos dados e de seleção de variáveis. Em geral, as técnicas de infravermelho resultaram nos melhores modelos, com erro em torno de 5% (m/m), sendo que o erro analítico do MID foi reduzido para em torno de 4% (m/m) com o uso da seleção de variáveis por iPLS. Por outro lado, a espectroscopia Raman resultou em maior erro, mesmo com o uso de técnicas de seleção de variáveis. Neste trabalho, portanto, foram desenvolvidos métodos de quantificação de

misturas polimórficas (formas I e II) de EFZ inéditos na literatura, sendo os melhores resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho utilizando equipamento de bancada ou portátil. A técnica utilizada é simples, de baixo custo e, devido a facilidade do uso de instrumentos portáteis, poderá futuramente ser utilizada não apenas para estudo da estabilidade do polimorfo II do EFZ, como também em processos *-at*, *-in*, *-online* de monitoramento da qualidade.

Palavras-chave: Estabilidade de Medicamentos. Efavirenz. Lamivudina. Zidovudina.

ABSTRACT

Fixed dose combination drugs (ADFs) are important in the treatment against human immunodeficiency virus, because of their contribution in decreasing therapeutic complexity and failure. In 2011, an ADF tablet containing zidovudine, lamivudine and efavirenz (EFZ) was developed at Federal University of Pernambuco, however, without having undergone the required stability study. On the other hand, recently it has been questioned if the polymorphic form I of EFZ utilized in commercial dosage forms is the most suitable regarding to dissolution and stability parameters. Therefore, this work aimed to develop stability-indicating method (MIE) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the ADF tablet, as well as to investigate the conditions for obtaining and characterizing the polymorph II of EFZ and to develop methods for quantifying this polymorph in mixtures containing the polymorph I. For the development of MIE, it was tested different conditions, the best result was obtained from a gradient using water and acetonitrile, Supelco® C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm) at 30°C, flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ and analysis time of 50 min. Although, adjustments must be realized to separate the degradation products. Regarding to the obtainment of polymorph II, after evaluation of different conditions, it was chosen the crystallization of EFZ in methanol at 20 mg.mL at -4 to 4°C in open recipients. Polymorphs I and II were characterized by common techniques for polymorphism investigation: scanning electron microscopy, x-ray diffraction, scanning differential calorimetry, polarimetry, intrinsic dissolution and infrared and raman spectroscopy. The obtained results demonstrated similarity with it has been seen in literature, except for the intrinsic dissolution. In addition, it was realized analyses that were not yet described for EFZ in the near infrared region and in the terahertz range, these techniques were able to differentiate the polymorphs I and II. After characterization, methods of quantification were developed in the infrared (MID), NIR (portable and benchtop equipment) and Raman (portable and benchtop equipment) using multivariate calibration models and Minimal regression Partial Squares (PLS). In addition, the performance of the constructed models using different data pre-processing and variable selection techniques was evaluated. In general, infrared techniques resulted in the best models, with an error around 5% (w/w), and for MID the error was reduced to around 4% (w/w) with the use of variables by iPLS. While Raman spectroscopy resulted in greater error, even with the use of variable selection techniques. Therefore, unprecedented methods were developed for quantification of polymorphic mixtures (forms I and II) of EFZ and the best results were obtained using benchtop or portable equipment of infrared spectroscopy. The

technique is simple, low cost and, due to the ease of use of portable instruments, it will can be used not just for the stability study of the polymorph II of EFZ, as also -at, -in, -online quality monitoring process.

Keywords: Drug Stability. Efavirenz. Lamivudine. Zidovudine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do HIV.....	24
Figura 2 - Ciclo de replicação do HIV.	25
Figura 3 - Tipos e subtipos conhecidos do vírus HIV.	26
Figura 4 - Mecanismo de degradação hidrolítica da AZT.....	32
Figura 5 - Mecanismo de degradação fotolítica da AZT.....	32
Figura 6 - Esquema de formação dos produtos de degradação (I-V) da 3TC.	33
Figura 7 - Mecanismos de degradação hidrolítica da 3TC.....	34
Figura 8 - Estrutura molecular do novo produto de degradação identificado da 3TC.	35
Figura 9 - Mecanismo de degradação hidrolítica do EFZ em aminoálcool.....	37
Figura 10 - Mecanismo de degradação hidrolítica do EFZ em quinolina.	38
Figura 11 - Cromatograma utilizando método a 40°C.	58
Figura 12 - Cromatograma utilizando gradiente da USP34 (pH 6,8) para AZT e 3TC.	58
Figura 13 - Cromatograma utilizando gradiente da USP34 (pH 4,5) para AZT e 3TC.	59
Figura 14 - Cromatograma utilizando método da USP34 (pH 3,0) para AZT e 3TC.	59
Figura 15 - Cromatograma padrão de comprimido ADF degradado.	61
Figura 16 - Cromatograma de comprimido ADF contaminado com timina e citosina.	62
Figura 17 - Imagens de aumento, respectivamente, de 500 e de 6000 vezes do polimorfo I do EFZ.	64
Figura 18 - Imagem de aumento de 500 vezes do polimorfo II do EFZ.	65
Figura 19 - Difrátogramas dos polimorfos I e II do EFZ.	65
Figura 20 - Curva DSC do polimorfo II do EFZ.	66
Figura 21 - Gráfico de dissolução intrínseca dos polimorfos I e II do EFZ.	67

Figura 22 - Espectros dos polimorfos I e II do EFZ nas faixas espectrais de THz.	69
Figura 23 - Espectros de MID dos polimorfos I e II do EFZ.	70
Figura 24 - Estruturas dos <i>synthons</i> A e C do EFZ.	70
Figura 25 - Espectros MID sobrepostos dos polimorfos I e II do EFZ.	71
Figura 26 - Espectros MID obtidos da análise de misturas polimórficas de EFZ.	72
Figura 27 - Espectros MID, após aplicação de suavização (janela de 15 pontos) e MSC.	73
Figura 28 - Gráfico de VIP scores obtido para o modelo utilizando o MID.	74
Figura 29 - Resultados do iPLS para os espectros MID.	74
Figura 30 - Região espectral selecionada pelo iPLS para os espectros MID.	75
Figura 31 - Espectros NIR dos polimorfos I e II do EFZ obtidos a partir do espectrômetro de bancada.	76
Figura 32 - Espectros NIR do instrumento de bancada de misturas polimórficas de EFZ.	77
Figura 33 - Espectros NIR após aplicação da primeira derivada.	77
Figura 34 - Gráfico de VIP scores referente aos espectros NIR de bancada.	78
Figura 35 - Resultados do iPLS para os espectros NIR de bancada.	79
Figura 36 - Espectros NIR dos polimorfos I e II do EFZ obtidos do espectrômetro portátil. ...	80
Figura 37 - Espectros das misturas polimórficas do EFZ obtidos em NIR portátil.	80
Figura 38 - Espectros do NIR portátil após da aplicação de pré-processamento de primeira derivada e SNV.	82
Figura 39 - Gráfico de VIP scores obtido a partir do NIR portátil.	82
Figura 40 - Gráfico de iPLS gerado a partir do modelo obtido do NIR portátil.	83
Figura 41 - Espectro Raman obtido do espectrômetro de bancada.	84
Figura 42 - Espectros das misturas polimórficas de EFZ, obtidas do Raman de bancada.	85
Figura 43 - Espectros do Raman de bancada, após pré-processamento com ALS e MSC.	86

Figura 44 - Gráfico de VIP scores dos espectros do Raman de bancada.	87
Figura 45 - Resultados iPLS para os espectros do Raman de bancada.	88
Figura 46 - Espectros Raman obtido do espectrômetro portátil.	89
Figura 47 - Espectros das misturas polimórficas do EFZ obtidas a partir do Raman portátil.	89
Figura 48 - Espectros das misturas polimórficas do EFZ em Raman portátil após pré- processamentos.	90
Figura 49 - Gráfico de VIP scores dos espectros obtidos pelo Raman portátil.	92
Figura 50 - Resultados iPLS para os espectros obtidos por Raman portátil.	92
Figura 51 - Gráficos dos valores preditos e os de referência.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fármacos utilizados no protocolo clínico de tratamento do HIV/AIDS no Brasil.	27
Tabela 2 - Gradiente de método USP para doseamento de comprimido ADF contendo AZT e 3TC.	35
Tabela 3 - Gradiente de método da Farmacopeia Internacional para doseamento de comprimido ADF contendo AZT e 3TC.	36
Tabela 4 - Gradiente para doseamento de substâncias relacionadas de comprimidos contendo EFZ.	39
Tabela 5 - Regiões espectrais que compreendem o Infravermelho.	42
Tabela 6 - Condições utilizadas na recristalização do EFZ.	52
Tabela 7 - Gradiente para MIE de comprimido ADF.	57
Tabela 8 - Gradiente de fase móvel para doseamento de comprimido ADF degradado.	60
Tabela 9 - Tempo de recristalização do EFZ em metanol em diferentes condições.	63
Tabela 10 - Parâmetros da dissolução intrínseca.	67
Tabela 11 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando MID.	72
Tabela 12 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando NIR de bancada.	78
Tabela 13 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando NIR portátil.	81
Tabela 14 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando Raman de bancada.	86
Tabela 15 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando Raman portátil.	91
Tabela 16 - Melhores modelos obtidos por iPLS para quantificar misturas polimórficas de EFZ.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ADF	Associação Dose Fixa
ALS	<i>Asymmetric Least Squares</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZT	Zidovudina
ATR	Reflectância total atenuada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	<i>Cross-validation</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio Padrão
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EFZ	Efavirenz
EM	Espectrometria de Massas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
iPLS	<i>Interval PLS</i>
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LC/MS	Cromatografia líquida/Espectrometria de massas
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
LSS	Lauril Sulfato de Sódio

MBZ	Mebendazol
MID	<i>Middle Infrared</i>
MIE	Método Indicativo de Estabilidade
MSC	<i>Multiplicative Scatter Correction</i>
NIR	<i>Near Infrared</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PDA	<i>Photodiode Array</i>
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
Pred	Predição
PTFE	Politetrafluoretileno
R ²	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPM	Rotações por minuto
SG	<i>Savitzky-Golay</i>
SNV	<i>Standard Normal Variate</i>
TARV	Tratamento Antirretroviral
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UHPLC	<i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>

UPLC	<i>Ultra-performance liquid chromatography</i>
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>
Vis	Visível
VDI	Velocidade de dissolução intrínseca
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
THz	<i>Terahertz</i>
TG	Termogravimetria
WHO	<i>World Health Organization</i>
WLS	<i>Weighted Least Squares</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	Breve histórico sobre HIV/AIDS	23
3.2	O vírus HIV	24
3.2.1	<i>Classificação do HIV</i>	26
3.3	O tratamento antirretroviral (TARV)	27
3.4	Medicamentos ADF	28
3.4.1	<i>Estudos de compatibilidade</i>	29
3.4.2	<i>Estudos de estabilidade</i>	30
3.4.2.1	<i>AZT</i>	31
3.4.2.2	<i>3TC</i>	33
3.4.2.3	<i>ADF: AZT+3TC</i>	35
3.4.2.4	<i>EFZ</i>	36
3.5	O polimorfismo	39
3.5.1	<i>O polimorfismo do EFZ</i>	40
3.5.2	<i>Caracterização polimórfica</i>	41
3.5.2.1	<i>Espectroscopia do Infravermelho</i>	41
3.5.2.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	43
3.6	Quimiometria	44
3.6.1	<i>Pré-processamento de dados</i>	44
3.6.1.1	<i>Métodos de correção de linha de base</i>	45
3.6.1.2	<i>Suavização por SG</i>	45
3.6.1.3	<i>Métodos de correção do espalhamento</i>	46
3.6.1.4	<i>Normalização</i>	46
3.6.2	<i>Modelo de Calibração multivariada para uso em espectroscopia</i>	46
3.6.2.1	<i>PLS</i>	47
3.6.2.2	<i>Métodos de seleção de amostras</i>	48
3.6.2.3	<i>Métodos de seleção de variáveis</i>	49

4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	Material	50
4.2	Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade	50
4.2.1	<i>Preparo de amostras</i>	51
4.2.2	<i>Degradação forçada</i>	51
4.3	Investigações do polimorfo II do EFZ	51
4.3.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	52
4.3.2	<i>Difração de raios X</i>	53
4.3.3	<i>Calorimetria diferencial de varredura</i>	53
4.3.4	<i>Polarimetria</i>	53
4.3.5	<i>Dissolução Intrínseca</i>	53
4.3.6	<i>Espectroscopia terahertz (THz)</i>	54
4.3.7	<i>Desenvolvimento de método de quantificação de polimorfos de EFZ</i>	54
4.3.7.1	<i>Preparação de amostras</i>	54
4.3.7.2	<i>Análises espectroscópicas</i>	54
4.3.7.2.1	<i><u>Espectroscopia na região do infravermelho médio (MID)</u></i>	54
4.3.7.2.2	<i><u>Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR)</u></i>	55
4.3.7.2.3	<i><u>Espectroscopia Raman</u></i>	55
4.3.7.3	<i>Tratamento de dados</i>	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (MIE)	57
5.1.1	<i>Degradação Forçada</i>	61
5.2	Investigação do polimorfo II do EFZ	62
5.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	64
5.2.2	<i>Difração de raios X</i>	65
5.2.3	<i>DSC</i>	66
5.2.4	<i>Polarimetria</i>	66
5.2.5	<i>Dissolução intrínseca</i>	67
5.2.6	<i>Espectroscopia THz</i>	68
5.2.7	<i>Desenvolvimento de método de quantificação polimórfica</i>	69
5.2.7.1	<i>MID</i>	69
5.2.7.2	<i>NIR</i>	76
5.2.7.2.1	<i><u>Instrumento de bancada</u></i>	76

5.2.7.2.2	<i>Instrumento portátil</i>	79
5.2.7.3	<i>Espectroscopia Raman</i>	83
5.2.7.3.1	<i>Instrumento de bancada</i>	83
5.2.7.3.2	<i>Equipamento portátil</i>	88
5.2.8	<i>Comparação das técnicas utilizadas</i>	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DE EFAVIRENZ (CRISTÁLIA®, LOTE 86/16).	107

1 INTRODUÇÃO

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

Segundo as estimativas mais recentes, existem em torno de 36,9 milhões de infectados no mundo, mas apenas 59% recebem tratamento (UNAIDS, 2018). Nesse cenário, o Brasil se destaca desde 1996, por ter sido o primeiro país em desenvolvimento a adotar políticas públicas de prevenção e combate ao HIV/AIDS, a diagnosticar e distribuir medicamentos gratuitamente (BRASIL, 1996).

O tratamento consiste no uso de terapia antirretroviral de alta atividade (HAART, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*) que consiste na combinação de, pelo menos, três fármacos: dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo ou nucleotídeo associados a outras classes de antirretrovirais, como inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo, inibidores de protease e inibidores de integrase (BRASIL, 2017). Devido à complexidade do regime terapêutico ser um dos grandes fatores de comprometimento da adesão do paciente, novas formas farmacêuticas têm sido criadas em regime de associação dose fixa (ADF).

A primeira ADF foi registrada, em 1997, pela FDA (*Food and Drug Administration*) sob o nome de Combivir[®], composta por 150 mg de lamivudina (3TC) e 300 mg de zidovudina (AZT) (PORTSMOUTH; SCOTT, 2007). Essa associação de fármacos faz parte até hoje dos esquemas terapêuticos, juntamente com 600 mg de efavirenz (EFZ) (BRASIL, 2017).

Com o objetivo de diminuir a administração de comprimidos e, conseqüentemente, aumentar a adesão terapêutica, foi desenvolvido um comprimido ADF contendo estes três fármacos no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em parceria com o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). O comprimido ainda deve passar por estudos de estabilidade acelerada e de longa duração para o estabelecimento do prazo de validade conforme o estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (SILVA, 2009; FONTES, 2011; SOARES, 2011).

Estudos de estabilidade são realizados para avaliar as alterações químicas e físicas que podem ocorrer ao longo do tempo de vida de prateleira. No estudo, são detectados e

quantificados todos os produtos de degradação que podem ser gerados durante o prazo de validade por meio de método indicativo de estabilidade (MIE).

Em relação aos fármacos utilizados na formulação, apenas o EFZ possui biodisponibilidade limitada pela baixa solubilidade aquosa. Por este motivo, muitas estratégias têm sido aplicadas para o aumento da solubilidade como o uso de dispersões, complexação com ciclodextrinas e outros polímeros (GOMES et al., 2015). Mais recentemente, estudos de termodinâmica e de dissolução indicaram que o polimorfo II do EFZ, além de mais estável em temperatura ambiente, tem solubilidade 10 vezes maior do que o polimorfo I atualmente utilizado. Dessa forma, o polimorfo II seria a forma mais indicada para uso em formas farmacêuticas (FANDARUFF et al., 2014; FANDARUFF, 2016). No entanto, a ANVISA, por meio da RDC nº 45 de 2012, estabelece que insumos farmacêuticos também devam passar por estudos de estabilidade acelerada e de longa duração. Sendo assim, para fins de registro, esses estudos precisariam ser realizados para o polimorfo II antes de ser veiculado em medicamentos (BRASIL, 2012). Para tanto, é necessário que sejam desenvolvidos métodos analíticos que quantifiquem polimorfos I e II em amostras.

Neste contexto, a finalidade deste trabalho foi desenvolver ferramentas para estudar a estabilidade química dos comprimidos ADF contendo AZT, 3TC e EFZ e a estabilidade física do polimorfo II do EFZ.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver método analítico para avaliar a estabilidade química dos antirretrovirais 3TC, AZT e EFZ em comprimido ADF, assim como desenvolver método quantitativo de misturas contendo as formas polimórficas I e II do EFZ.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os métodos compendiais para doseamento de substâncias relacionadas dos antirretrovirais de escolha: AZT, 3TC, EFZ;
- Analisar a influência de modificações na temperatura, tempo de análise, coluna, gradiente e na preparação da amostra no desenvolvimento do MIE utilizando CLAE;
- Realizar estudos de degradação forçada para avaliar a eficiência do MIE desenvolvido;
- Analisar a influência de condições de temperatura, concentração de EFZ e de superfície de evaporação na cristalização do polimorfo II do EFZ;
- Caracterizar os polimorfos por Microscopia Eletrônica de Varredura; Difração de raios-X; Polarimetria; Calorimetria diferencial de varredura; Espectroscopias na região do infravermelho médio (MID), próximo (NIR); Raman e de Terahertz; Dissolução intrínseca.
- Desenvolver métodos analíticos para quantificação de misturas binárias dos polimorfos I e II do EFZ por MID, NIR e espectroscopia Raman utilizando regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Breve histórico sobre HIV/AIDS

O HIV surgiu de uma mutação do vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês *Simian Immunodeficiency Virus*) presente em primatas não humanos. Segundo estimativas, a adaptação do vírus para a espécie humana ocorreu pela exposição de caçadores, em Camarões, à carne contaminada destes primatas por volta do início do século 20. O crescente comércio de borracha e marfim pelo rio *Sangha* permitiu que a infecção chegasse a Kinshasa na República Democrática do Congo durante a década de 1920. A cidade continha grande número de trabalhadores mineiros e prostituição, o que levou a um maior contágio de pessoas (COHEN, 2014; FARIA et al., 2014; HEENEY, DALGLEISH, WEISS, 2006).

O vírus chegou ao continente americano apenas na década de 1960 por meio de profissionais haitianos que haviam estado na República Democrática do Congo (COHEN, 2014). As migrações populacionais e a mudança das relações sociais com a maior liberdade sexual e uso de drogas injetáveis, levou à disseminação do vírus por vários outros países. No entanto, só em 1981, foram oficialmente descritos nos Estados Unidos os primeiros casos (CDC, 1981; WOROBEY et al., 2016).

Inicialmente, a doença se concentrou em homens jovens homossexuais e em usuários de drogas injetáveis. As principais manifestações eram a pneumonia causada pelo protozoário *Pneumocystis jiroveci* e o sarcoma de Kaposi, aliados a um quadro de imunodeficiência sem causa aparente.

Somente em 1983, o vírus foi isolado, o que foi decisivo para iniciar o desenvolvimento de testes de identificação do vírus em produtos hemoderivados, reduzindo as infecções por uso destes produtos ou por transfusões sanguíneas (BARRÉ-SINOUSSE et al., 2013; VAHLNE, 2009). Esforços também estavam sendo realizados para o desenvolvimento de tratamento específico de combate ao HIV.

A urgência de encontrar uma alternativa terapêutica levou a AZT a ser aprovada como medicamento em tempo recorde. Os primeiros testes clínicos da AZT iniciaram em 1985 e o registro do medicamento ocorreu em 1987 (BRODER, 2010).

Apesar do uso da AZT como monoterapia não ser o ideal, devido à toxicidade e eficácia limitada, o uso deste fármaco demonstrou que o desenvolvimento de um tratamento era possível. Outras classes de fármacos foram criadas e, em 1996, a terapia HAART foi implementada, aumentando a expectativa de vida dos pacientes (BRODER, 2010).

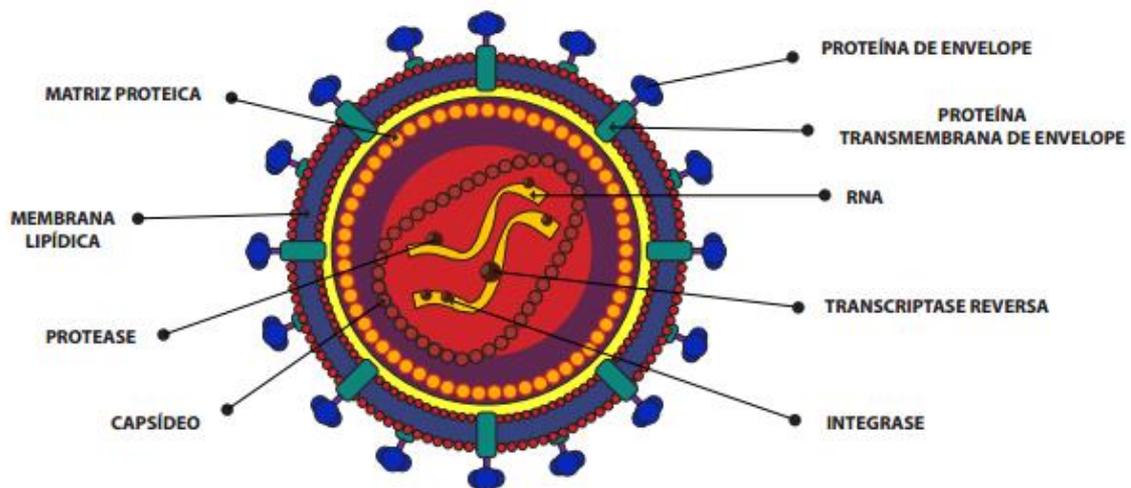
Esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e de uma vacina. No entanto, até o momento, apenas duas pessoas foram consideradas curadas em um tratamento que consistiu no transplante de células tronco com uma mutação genética de uma quimiocina (CCR5), importante na ligação do vírus à célula hospedeira (HÜTTER et al., 2009; JOHNSTON, 2016; WARREN, 2019).

Embora seja promissora, atualmente a terapia genética é complexa, de alto custo, ainda sem reprodutibilidade e dificilmente seria viável utilizá-la para curar a todos os milhões de infectados, a maior parte deles residente da África (JOHNSTON, 2016; KURITZKES, 2016).

3.2 O vírus HIV

O HIV é pertencente à família *Retroviridae* (do latim *retro*: reverso), por possuir a transcriptase reversa (enzima responsável por transcrever o RNA viral em DNA de dupla fita para realização da replicação), e ao gênero *Lentivirus* (do latim *lentus*: lento), por causar infecção de progressão lenta (LEITE et al., 2013; LEVINSON, 2016).

Figura 1 - Estrutura do HIV.



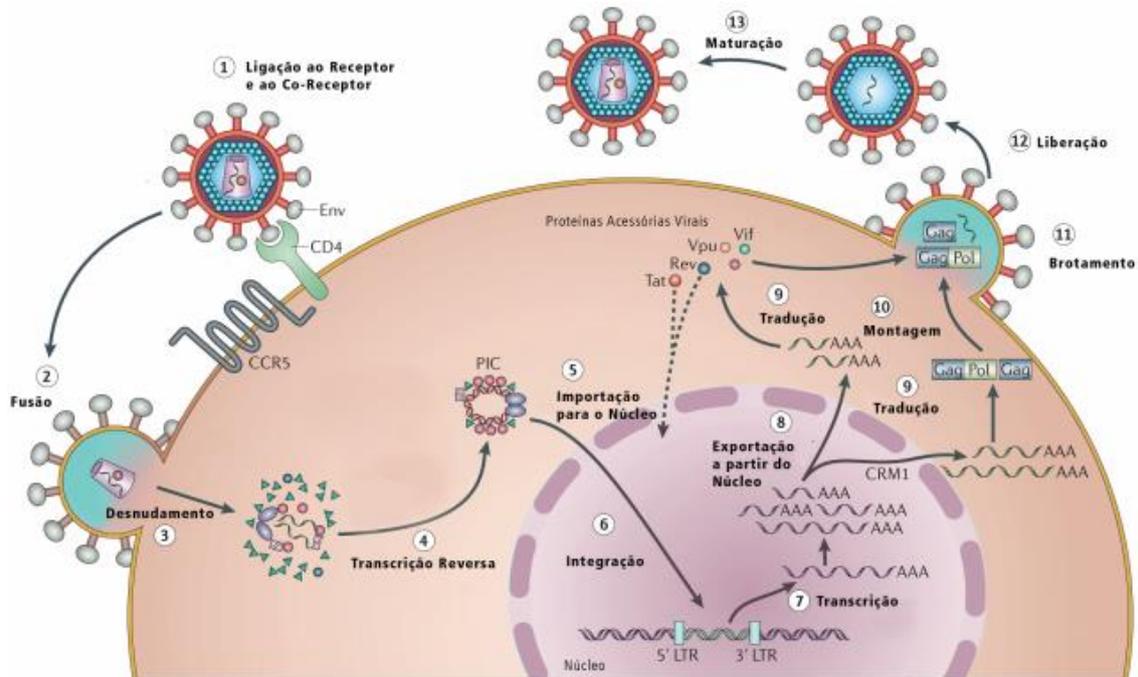
Fonte: Imagem adaptada de BRASIL (2016).

Estruturalmente, o HIV é uma partícula esférica que mede entre 100 a 120 nm de diâmetro. A camada mais externa, o envelope, é composta por uma bicamada fosfolipídica que envolve o capsídeo de formato cônico assimétrico formado por 1000 a 1500 cópias de proteína. Esta estrutura protege o material genético: duas fitas simples de RNA (Figura 1) (BRASIL, 2016; CHEN, 2016).

Quando se encontra no corpo humano, o HIV atua infectando preferencialmente células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e macrófagos. Nas células T, o processo resulta em lise, causando a diminuição drástica destas células, sendo um dos indicadores da infecção (DALGLEISH et al, 1984; KLATZMANN et al., 1984; KUMAR; HERBEIN, 2014).

O ciclo de replicação (Figura 2) começa com a ligação da glicoproteína gp120 do HIV ao receptor CD4 da célula, seguido da fusão do envelope viral a membrana plástica mediada pelo co-receptor CCR5 ou CXR4. Após a fusão, inicia-se a etapa de desnudamento, que consiste na dissolução do capsídeo no citoplasma da célula do hospedeiro e, conseqüente, liberação do conteúdo: RNA viral e proteínas.

Figura 2 - Ciclo de replicação do HIV.



Fonte: Adaptação a partir de Engelman e Cherepanov, 2012 (BRASIL, 2016).

No citoplasma, o DNA viral é transcrito pela transcriptase reversa, a partir do RNA viral, e associado a proteínas para formar um complexo núcleoprotéico de integração (PIC, do inglês *Pre-Integration Complex*). O PIC é responsável por transportar o DNA viral ao núcleo celular, onde este será ligado a cromossomos por intermédio da enzima viral, a integrase (FERREIRA, RIFFEL, SANT'ANA, 2010; KUMAR, HERBEIN, 2014).

Após a integração, a partir do novo DNA é transcrito RNA viral (mensageiro e genômico) com o auxílio do RNA polimerase II celular. O RNA mensageiro viral produzido

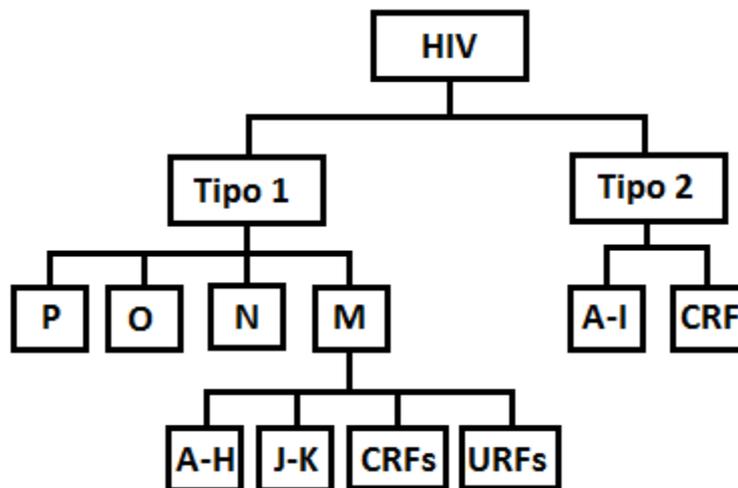
é, então, exportado para o citoplasma para produção de poliproteínas que serão utilizadas na produção de novos vírions.

As poliproteínas Gag e Env são sintetizadas e clivadas pela protease viral em proteínas individuais para a formação estrutural de partículas virais maduras, enquanto a Pol é clivada em três enzimas importantes no processo de replicação: protease, transcriptase reversa e integrase. Outros tipos de proteínas também são sintetizados como Rev e Tat, responsáveis pela regulação da expressão gênica, e as proteínas Vpu e Vif, que mediam a liberação dos vírions a partir da célula hospedeira por meio de brotamento (KARTIKEYAN et al., 2007; FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010).

3.2.1 Classificação do HIV

Devido ao alto grau de mutação, vírus de RNA, como o HIV, possuem uma grande diversificação genética (CUEVAS et al., 2015; ELENA; SANJUAN, 2005). Sabe-se inclusive, que o HIV se adaptou a partir de diferentes tipos de SIVs, originando duas linhagens diferentes (HIV-1 e HIV-2) com apenas 50% de similaridade entre os genomas, além de diversos grupos, subtipos e formas recombinantes (BRASIL, 2016) (Figura 3).

Figura 3 – Tipos e subtipos conhecidos do vírus HIV.



Legenda: CRFs – *Circulating Recombinant forms*; URFs – *Unique Recombinant Forms*. (PEETERS; D'ARC; DELAPORTE, 2014; SORIANO et al., 2000). Fonte: Autoria própria.

O tipo 1 é derivado a partir de SIVs encontrados em gorilas e chimpanzés e se divide em grupos O, M, N e P. O grupo M (Principal, do inglês *Main*) é o mais comumente encontrado e mais facilmente transmissível tendo sido apontado como o responsável pela

epidemia atual de HIV/AIDS. Este se divide em subtipos A, B, C, D, E, F, G, H, K, J e em formas recombinantes:

- circulante (CRF), quando documentada em mais de três indivíduos não relacionados epidemiologicamente;
- única (URF), quando casos de transmissão ainda não são conhecidos.

Enquanto o tipo 2 é derivado de SIV encontrado em macacos da espécie *Cercocebus atys*. Divide-se em grupos A, B, C, D, E, F, G, H, I e em CRFs. O grupo A é o mais comum, sendo encontrado apenas na região oeste da África. Difere do tipo 1, por possuir baixa transmissibilidade e progressão mais lenta (BRASIL, 2016; PEETERS, D'ARC, DELAPORTE, 2014).

Apesar de ser menos prevalente, a infecção pelo HIV-2 é um desafio por não possuir tratamento específico, sendo inclusive resistente a fármacos comumente utilizados no HAART, como o EFZ (BORKAR, KASHID, 2015; PETERSON, ROWLAND-JONES, 2012). Além disso, os testes de HIV rotineiramente utilizados não são conclusivos para identificar a infecção pelo tipo 2.

3.3 O tratamento antirretroviral (TARV)

Os fármacos utilizados no tratamento funcionam inibindo fases do ciclo de replicação do HIV. Até o momento existem as seguintes classes de inibidores: de fusão, de CCR5, da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos (ITRN/ITRNt) e não-análogos de nucleosídeos (ITRNN), da protease (IP) e da integrase (IInt). Além dos inibidores também há os promotores farmacocinéticos (PF), indicados para aumentar a efetividade dos medicamentos utilizados no tratamento (USA, 2018).

No Brasil, o protocolo de tratamento atual utiliza ITRNs, ITRNNs, IInts, IPs e PF como as principais linhas de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais fármacos utilizados no protocolo clínico de tratamento do HIV/AIDS no Brasil.

Classe de medicamento	Fármacos inicialmente utilizados
ITRN/ITRNt	Tenofovir (TDF), 3TC, AZT
ITRNN	EFZ
IInt	Dolutegravir (DTG), Raltegravir (RAL)
Classe de medicamento	Fármacos utilizados após falha terapêutica
IP	Atazanavir, Darunavir, Lopinavir
IP/PF	Ritonavir

Fonte: Dados da nota informativa nº 7 de 2017 do DDAHV/SVS/MS (BRASIL, 2017).

O esquema terapêutico principal a ser recomendado, a partir de 2017, em pacientes que nunca utilizaram terapia HAART, é a combinação dos fármacos: TDF + 3TC + DTG (BRASIL, 2018). Enquanto a combinação de AZT + 3TC + EFZ, foco deste trabalho, é aconselhada preferencialmente para:

- adultos intolerantes ao TDF ou coinfectados com tuberculose;
- gestantes ou mulheres com possibilidade de engravidar;
- crianças acima de três anos com peso menor do que 35 kg.

O mecanismo de ação deste esquema terapêutico é baseado na inibição da transcrição do DNA viral. Os fármacos ITRN (AZT e 3TC) inibem por competição a inserção de nucleosídeos naturais durante a transcrição e, quando inseridos na fita de DNA em formação, encerram o processo por falta de sítio de ligação necessários para inclusão de novos nucleosídeos. Já o ITRNN (EFZ) atua ligando-se diretamente a transcriptase reversa, inibindo a sua ação. O EFZ também age aumentando o processamento das poliproteínas Gag e Gag-Pol, o que diminui o aporte destas na formação de novas partículas virais (BRAZ, HOLLADAY, BARKLEY, 2010; SLUIS-CREMER, TACHEDJIAN, 2008; SOUZA, STORPIRTIS, 2004).

3.4 Medicamentos ADF

Segundo a ANVISA, medicamentos ADF são formas farmacêuticas que contém dois ou mais insumos farmacêuticos ativos. São utilizadas, geralmente, para simplificação de regimes terapêuticos complexos com o intuito de melhorar a adesão dos pacientes (BRASIL, 2010a).

A adesão terapêutica de pessoas que vivem com HIV/AIDS é de extrema importância para o sucesso do tratamento. Sabe-se que apenas alguns meses de uso irregular dos medicamentos, aumenta a chance de falha terapêutica, a prevalência de HIV resistente aos fármacos utilizados, além de elevar a chance de transmissão vertical e entre parceiros sorodiscordantes. Por essas vantagens e por serem considerados mais baratos, medicamentos ADFs têm sido sugeridos preferencialmente no tratamento de HIV/AIDS não só no Brasil como na Europa e nos Estados Unidos (COSTA et al., 2018; NARAYANAN, CLAY, 2015; RAMIRO, LLIBRE, 2014).

No entanto, o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas em ADF é um grande desafio farmacotécnico, pois os fármacos podem possuir características físico-químicas diferentes, podendo ocasionar problemas de compatibilidade, estabilidade e biodisponibilidade (DESAI et al., 2013). Sendo assim, diversos estudos devem ser realizados

para avaliar os efeitos de veicular mais de um fármaco em uma mesma forma farmacêutica. Mais adiante serão apresentados os estudos de compatibilidade e de estabilidade voltados para medicamentos ADF.

3.4.1 Estudos de compatibilidade

A incompatibilidade que ocorre entre fármacos e entre fármacos e excipientes durante o período de armazenamento pode ser química ou física. A incompatibilidade química ocorre quando há reação química com formação de produtos de degradação, podendo resultar na diminuição da eficácia terapêutica e toxicidade do medicamento. Já a incompatibilidade física ocorre com a alteração de propriedades físicas como cristalinidade, solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade. Dessa forma, a compatibilidade deve ser identificada para garantir a eficácia e segurança dos medicamentos desenvolvidos (CHADHA, BHANDARI, 2014).

Embora a realização de estudos de compatibilidade seja importante, até o momento não existem protocolos claramente definidos pelas agências regulatórias de medicamentos, cabendo ao pesquisador delinear o estudo.

Geralmente, os estudos são realizados por meio de análises térmicas, como calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) e termogravimetria (TG). A primeira técnica traz informações sobre a variação de entalpia e ocorrência de eventos endotérmicos e exotérmicos, enquanto a segunda técnica é relacionada à mudança de massa que ocorre durante o aquecimento devido a processos de decomposição e evaporação. A interação entre fármacos é identificada quando estes parâmetros ocorrem de forma significativamente diferente para os fármacos isolados e em mistura física (MATOS et al., 2017).

Quando identificada a interação, análises não-térmicas, tais como espectroscopia de infravermelho (IV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são utilizadas de maneira complementar ao estudo. O IV evidencia a ocorrência de interações pelo aparecimento, desaparecimento e mudanças nas bandas relacionadas aos grupos funcionais dos compostos estudados. Enquanto a CLAE consegue separar, identificar e quantificar a ocorrência de possíveis subprodutos formados devido à incompatibilidade química (BEZERRA et al., 2017; LILTROP et al., 2011; MATOS et al., 2017).

No desenvolvimento do comprimido ADF contendo AZT, 3TC e EFZ, Soares (2011) identificou incompatibilidade na mistura ternária, após aquecimento a 200°C em DSC, pela geração de dois produtos de degradação não identificados. No entanto, como essa temperatura

não é usualmente utilizada no processo de produção de comprimidos ou no armazenamento, não foi considerado utilizar tecnologias de produção de comprimidos que envolvesse a separação dos fármacos, como o uso de comprimidos multicamadas e sistemas multiparticulados.

Posteriormente, Gomes e colaboradores (2013) também descreveram mudanças em descolamentos químicos de misturas binárias de 3TC e EFZ provavelmente devido a interações fracas entre ácido e base, não observadas nas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) realizadas por Soares (2011). Nos dois estudos, foi evidenciada a existência de interações pelo adiantamento da temperatura de fusão dos fármacos nas misturas físicas. No entanto, a redução da temperatura de fusão pode auxiliar o aumento de solubilidade, sendo assim mais estudos devem ser realizados para avaliar a qualidade dessas interações.

3.4.2 Estudos de estabilidade

Estudos de estabilidade são realizados em insumos farmacêuticos ativos (IFAs) ou medicamentos em condições de armazenamento específicas com a finalidade de estabelecer ou confirmar prazos de validade. Os parâmetros de armazenamento dos estudos são determinados de acordo com as condições climáticas. Para o Brasil a recomendação é utilizar 30°C/75% UR para estudos de longa duração, por representar as condições comuns de armazenamento em prateleira, e 40°C/75% UR para estudos de estabilidade acelerada para simular o impacto da curta exposição a condições fora da especificação que pode ocorrer durante o transporte do medicamento (BRASIL, 2005; WHO, 2005).

Durante o período de teste que é de seis meses na estabilidade acelerada e, no mínimo, doze meses na estabilidade de longa duração, são avaliados a ocorrência de alterações físico-químicas. Para isto, todos os testes de controle de qualidade especificados devem ser realizados, inclusive um método indicativo de estabilidade (MIE) deve ser desenvolvido e validado para dosear IFAs e produtos de degradação (BRASIL, 2005; 2015b).

Comumente, é escolhida uma técnica cromatográfica como CLAE, UPLC, UHPLC e eletroforese capilar para ser utilizada no MIE. O método cromatográfico deve separar completamente todos os produtos de degradação e IFAs, sendo gradativamente mais complexo alcançar essa separação com o aumento do número de IFAs na ADF. Dessa maneira, para iniciar o desenvolvimento do MIE é necessário avaliar as propriedades físico-químicas dos fármacos isolados e os MIEs já estabelecidos contidos nas monografias individuais (BAKSHI, SINGH, 2002; SINGH et al., 2013).

Para avaliar a habilidade de separação do método e compreender os mecanismos de degradação é indicado realizar a degradação forçada das IFAs (isoladas e misturadas), do placebo e do produto. Neste estudo, são utilizadas diferentes condições como temperatura e umidade, uso de soluções neutras, ácidas, básicas, oxidativas e luz (BRASIL, 2015).

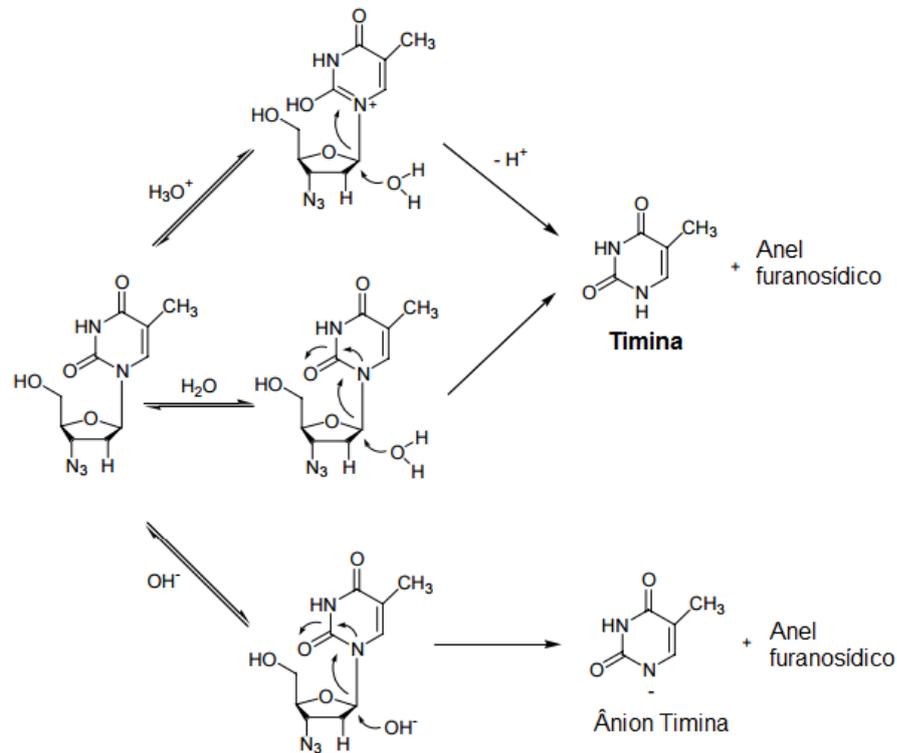
Na literatura, pode-se facilmente encontrar diversos estudos de degradação forçada dos fármacos utilizados no presente trabalho, de forma que já existem propostas de mecanismos de degradação e os principais produtos de degradação já são conhecidos. Mais adiante serão descritas informações sobre a estabilidade e MIE dos fármacos de interesse isolados ou em combinação que podem ser encontrados na literatura.

3.4.2.1 AZT

A AZT foi considerada instável a 80°C em soluções aquosas em pH neutro, básico e, principalmente, ácido em que houve degradação de até 90% em 5 dias (DUNGE, CHAKRABORTI, SINGH, 2004; DUNGE et al., 2005), por meio do mecanismo apresentado na Figura 4.

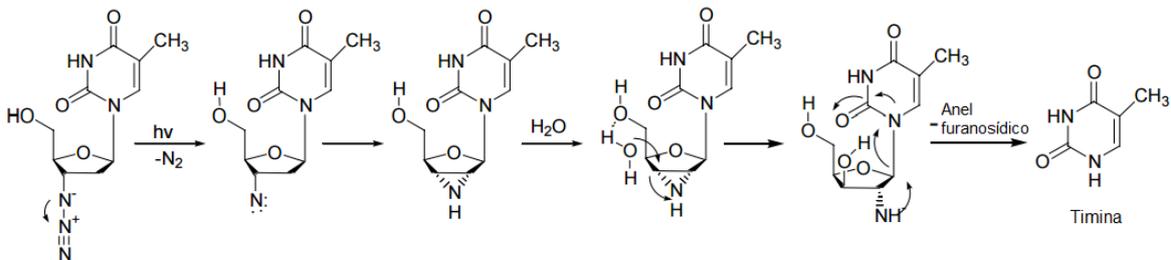
Essas soluções também foram expostas na câmara de fotoestabilidade a 40°C durante 15 dias, tendo sido deixado um grupo controle no escuro. Nessas condições, houve degradação de até 80% do fármaco, possivelmente segundo mecanismo apresentado na Figura 5. No entanto, a sensibilidade do AZT à luz parece ocorrer apenas em soluções aquosas já que houve apenas 5% de degradação quando o sólido ficou exposto durante dois meses nas mesmas condições (DUNGE, CHAKRABORTI, SINGH, 2004; DUNGE et al., 2005).

Figura 4 – Mecanismo de degradação hidrolítica da AZT.



Fonte: Adaptado de Dunge, Chakraborti, Singh (2004).

Figura 5 – Mecanismo de degradação fotolítica da AZT.



Fonte: Adaptado de Dunge, Chakraborti, Singh (2004).

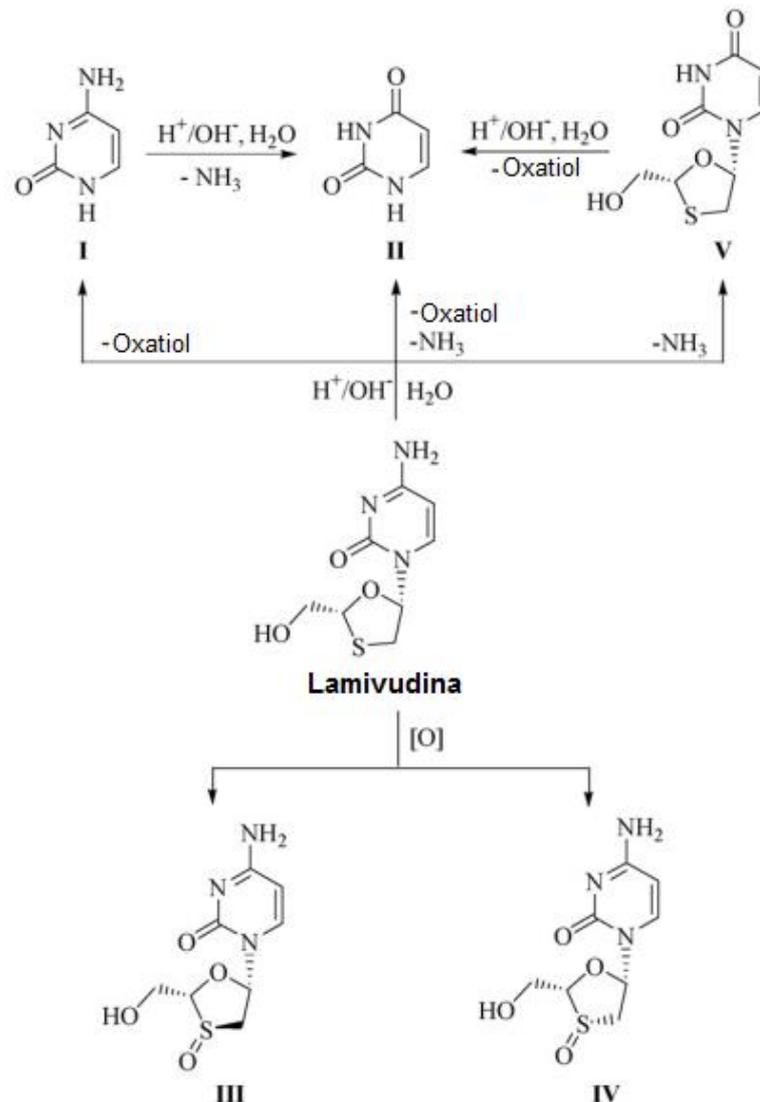
Apesar de se esperar a formação de dois produtos de degradação principais nos cromatogramas (timina e anel furanosídico), o anel furanosídico formado não é detectado em cromatografia líquida por detecção por UV ou espectrometria de massas (EM) (DEVROUKHAKAR et al., 2013; DUNGE, CHAKRABORTI, SINGH, 2004; KURMI et al., 2017). Por ser volátil, a detecção apenas foi possível por meio de técnica hifenada de DSC/TG e cromatografia gasosa com detecção por EM (ARAÚJO et al., 2003).

Em relação ao número de produtos de degradação, além da timina, são descritos a ocorrência de oito produtos minoritários em estudos de degradação em condições de hidrólise e fotólise (KURMI et al, 2017).

3.4.2.2 3TC

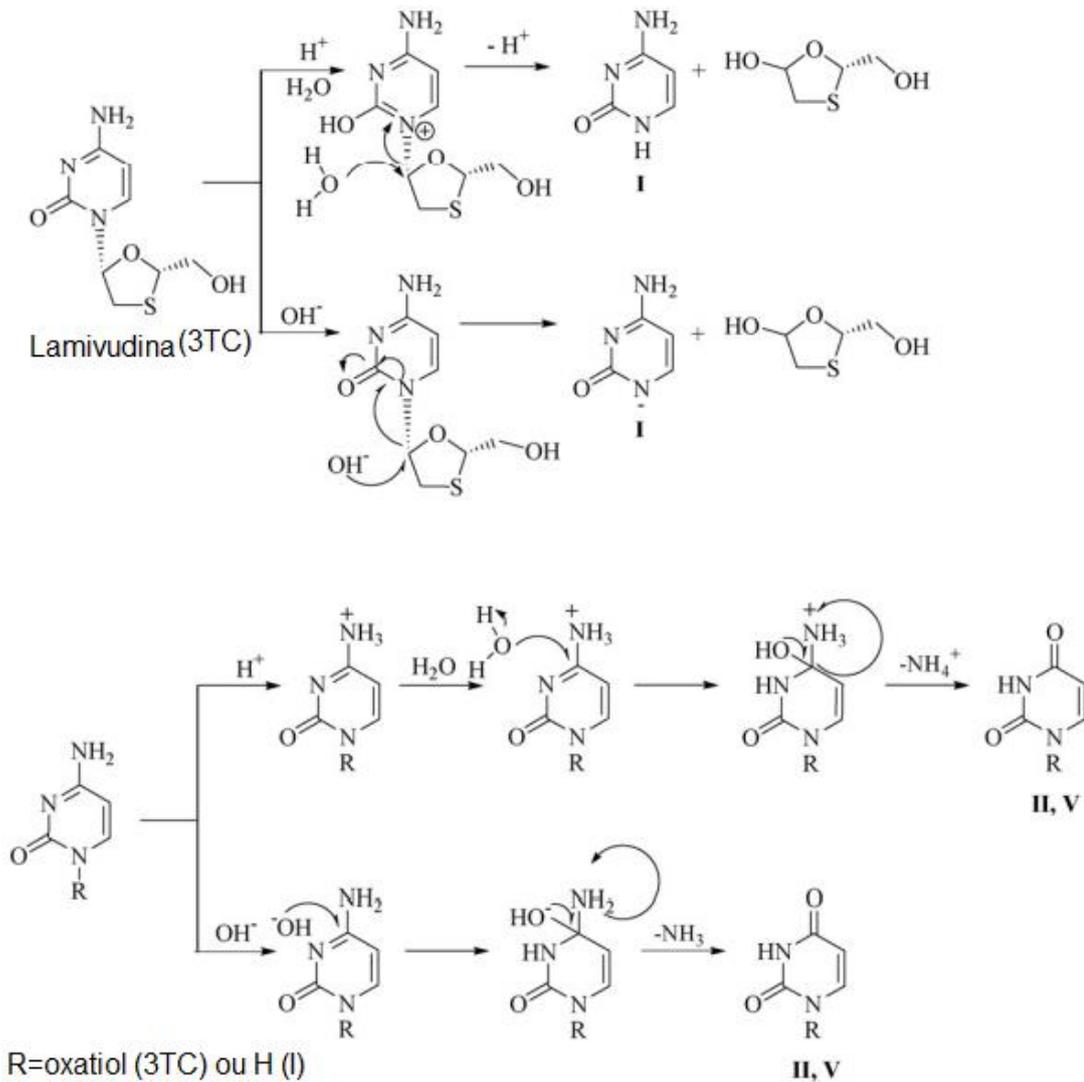
Nos estudos de degradação forçada, a 3TC forma cinco produtos em condições de hidrólise em pH ácido e básico e em soluções oxidativas contendo 30% de peróxido de hidrogênio (Figura 6). Na Figura 7, o mecanismo de degradação hidrolítica está esquematizado.

Figura 6 – Esquema de formação dos produtos de degradação (I-V) da 3TC.



Legenda: I – Citosina; II – Uracil; III – 4-amino-1-[(2*R*,3*S*,5*S*)-2-(hidroximetil)-3-oxo-1,3,4-oxatiolano-5-il]pirimidina-2(1*H*) e IV - 4-amino-1-[(2*R*,3*R*,5*S*)-2-(hidroximetil)-3-oxo-1,3,4-oxatiolano-5-il]pirimidina-2(1*H*). Fonte: Adaptado de BEDSE, KUMAR, SINGH (2009).

Figura 7 – Mecanismos de degradação hidrolítica da 3TC.



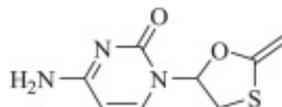
Legenda: I – Citosina; II – Uracil; V- 1-[(2R,5S)-2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolano-5-il]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona. Fonte: Adaptado de BEDSE, KUMAR, SINGH (2009).

Mais recentemente, foi divulgado um novo estudo de degradação forçada com informações sobre a cinética de degradação e a identificação de um novo produto (KURMI, SINGH, 2017).

Segundo Kurmi e Singh, a 3TC seria mais sensível a oxidação, degradando cerca de 16% em apenas 30 min em solução de peróxido de hidrogênio a 3% a 30°C. Em relação à degradação hidrolítica, haveria 11% de degradação em apenas 30 min em solução 0,1 mol.L⁻¹ de hidróxido de sódio a 80°C, enquanto nas mesmas condições utilizando ácido clorídrico, 10% de degradação ocorreriam em 6h.

O novo composto identificado como 4-Amino-1-(2-metileno-1,3-oxatolano-5-il)pirimidina-2(1H) (Figura 8), seria um produto intermediário das reações de hidrólise, que teria concentração gradativamente maior até 12h e depois a concentração começaria a reduzir.

Figura 8 – Estrutura molecular do novo produto de degradação identificado da 3TC.



Fonte: (KURMI, SINGH, 2017).

3.4.2.3 ADF: AZT+3TC

Embora não existam na literatura estudos de degradação forçada ou o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade de ADF contendo AZT e 3TC, existem métodos de doseamento de substâncias relacionadas (impurezas e produtos de degradação) descritos em compêndios internacionais. Em relação à Farmacopeia Brasileira, esta apresenta monografia do comprimido ADF, no entanto omite a apresentação de método para identificação de substâncias relacionadas.

A Farmacopeia Americana (USP, 2011) indica o uso de método gradiente (Tabela 2), utilizando as soluções:

-A: 25 mmol.L⁻¹ de acetato de amônio (pH 3), acidificado com ácido trifluoroacético.

-B: Metanol.

Tabela 2 – Gradiente de método USP para doseamento de comprimido ADF contendo AZT e 3TC.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	95	5
18	85	15
30	55	45
40	40	60
48	40	60
51	95	5
60	95	5

Fonte: USP, 2011.

Em relação ao sistema cromatográfico, é utilizada uma coluna C18 (25 cm × 3 mm), fase móvel com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 µL e detector UV em 270 nm.

Enquanto a Farmacopeia Internacional (WHO, 2018), indica o uso de método (Tabela 3) que utiliza as seguintes soluções:

- A: 25 mmol.L⁻¹ de acetato de amônio (pH 3,8), acidificado com ácido acético.
- B: Metanol.

Tabela 3 - Gradiente de método da Farmacopeia Internacional para doseamento de comprimido ADF contendo AZT e 3TC.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	100	0
30	100	0
40	80	20
45	80	20
55	100	0

Fonte: WHO, 2018.

Para o sistema cromatográfico, é utilizada uma coluna C18 (25 cm × 4.6 mm, 5 µm), fase móvel com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e detector UV em 270 nm.

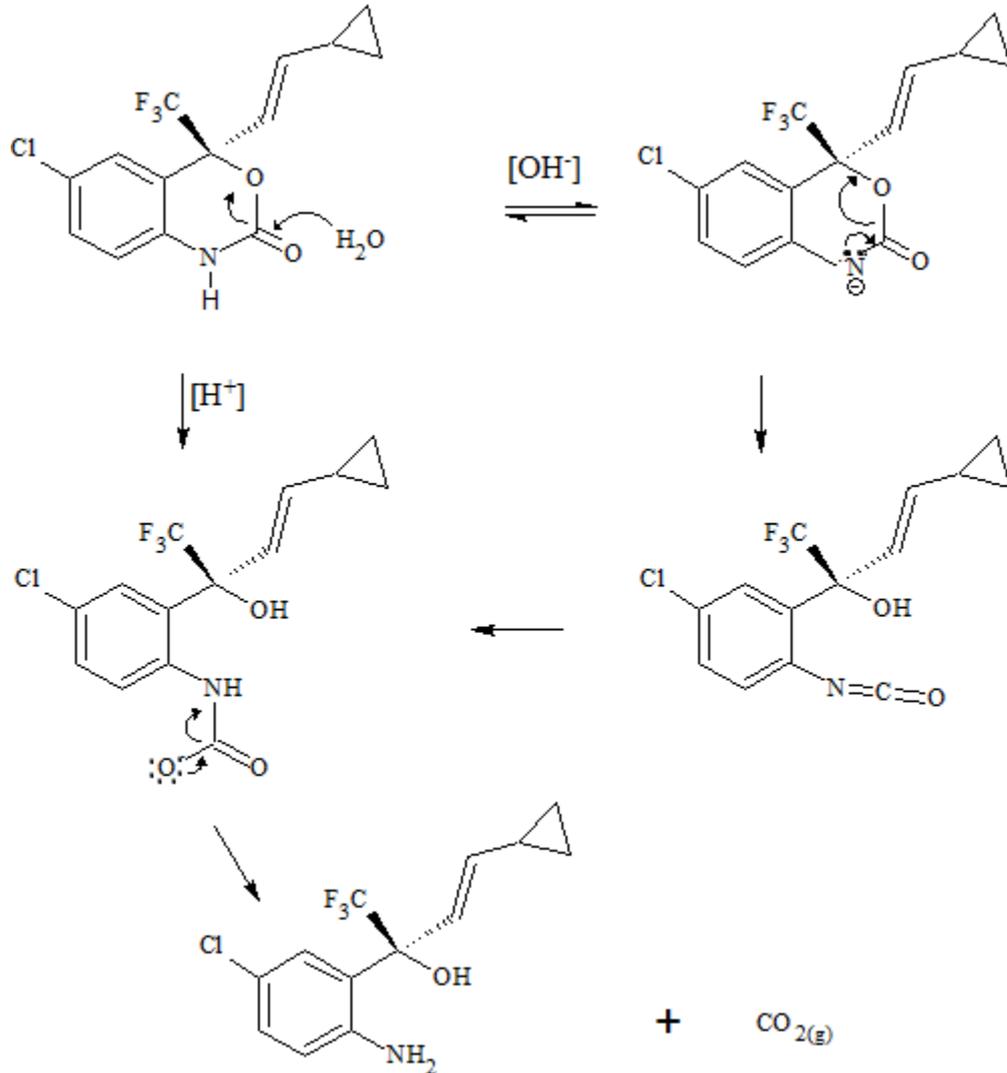
3.4.2.4 EFZ

Maurin e colaboradores (2002), em um estudo que avaliou o comportamento do EFZ a 60°C em uma ampla faixa de pH de 0,6 a 12,8, descreveram a ocorrência de um produto de degradação principal, um aminoálcool, e um produto secundário, uma quinolina. De acordo com os mecanismos de degradação propostos (Figuras 9 e 10), a quinolina seria produzida a partir do aminoálcool formado. A degradação ocorreu principalmente em pH acima de 8, sendo a faixa de pH de 2 a 6 a que possui menor taxa de degradação.

Não existem estudos de degradação forçada na literatura que foquem em outros parâmetros de estresse: térmico, oxidativo e fotolítico do EFZ. Contudo Montgomery e colaboradores (2001) publicaram um estudo que aborda o desenvolvimento de método para doseamento de substâncias relacionadas e a realização do estresse das amostras por hidrólise,

fotólise e oxidação. Em todas as condições foram formados produtos de degradação, sendo separadas ao todo seis substâncias relacionadas que não tiveram a estrutura elucidada.

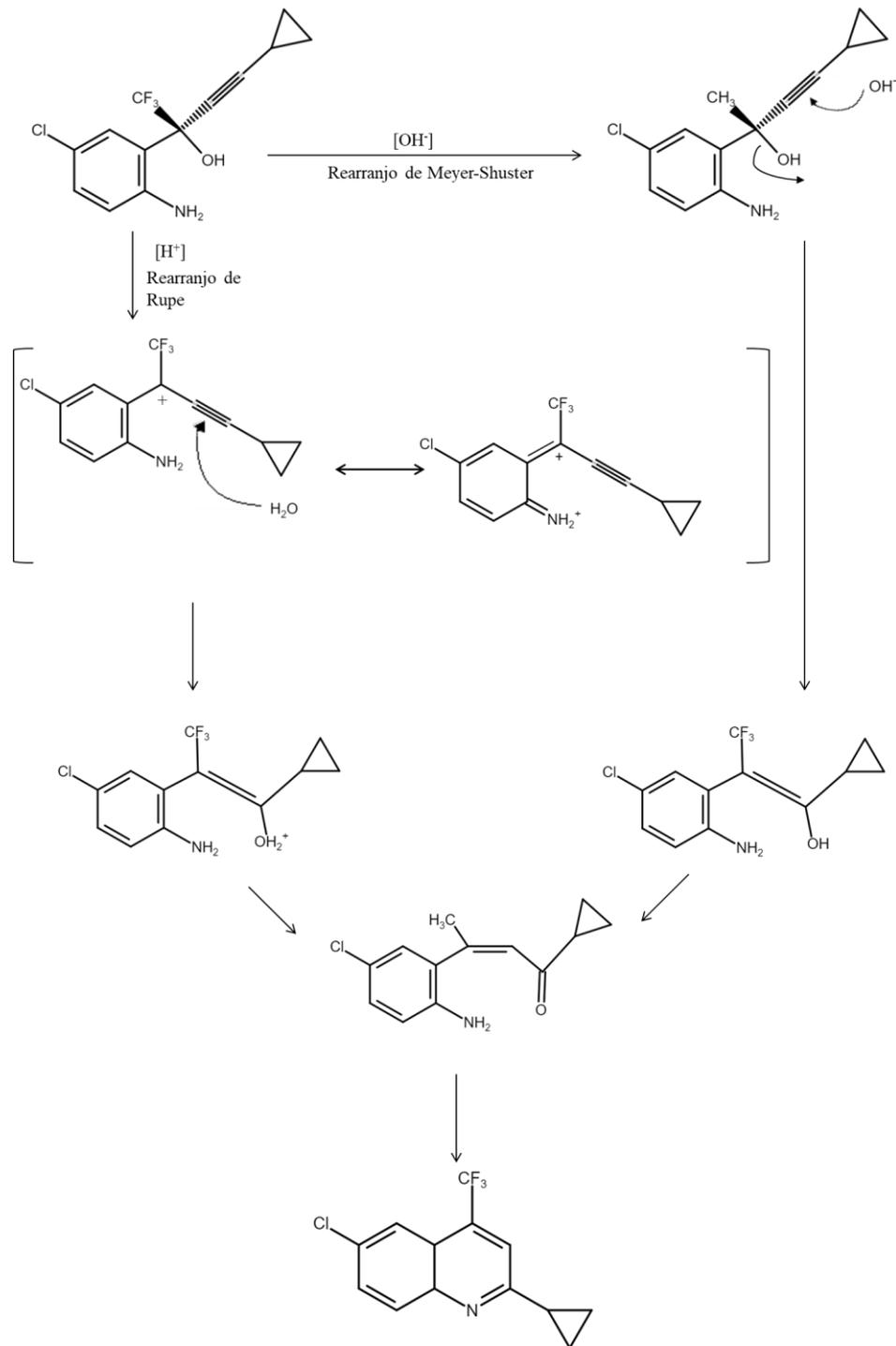
Figura 9 – Mecanismo de degradação hidrolítica do EFZ em aminoálcool.



Fonte: Adaptado de Maurin e colaboradores (2002).

O método desenvolvido por Montgomery e colaboradores (2001) é utilizado atualmente como o padrão nos compêndios oficiais (BRASIL, 2010b; USP, 2018; WHO, 2018) e difere bastante das condições analíticas utilizadas para o comprimido ADF contendo AZT e 3TC. Isso reflete a diferença nas propriedades físico-químicas, o EFZ é um composto mais hidrofóbico que AZT e 3TC e possui pouca solubilidade aquosa.

Figura 10 - Mecanismo de degradação hidrolítica do EFZ em quinolina.



Fonte: Adaptado de Maurin e colaboradores (2002)

O método utiliza um gradiente (Tabela 4) com as seguintes soluções:

- A: Metanol, ácido trifluoroacético (TFA), água (100: 0,5: 900 v/v/v).

- B: Metanol, TFA, água (900: 0,5: 100 v/v/v).

Tabela 4 – Gradiente para doseamento de substâncias relacionadas de comprimidos contendo EFZ.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	60	40
16	50	50
23	35	65
28	30	70
29	20	80
31	20	80
32	60	40
40	60	40

Fonte: BRASIL, 2010b; USP, 2018; WHO, 2018.

Para o sistema cromatográfico, é utilizada uma coluna CN (15 cm × 4.6 mm; 5 μ m) a 40°C, fase móvel com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 35 μ L e detector UV em 250 nm.

3.5 O polimorfismo

Polimorfismo pode ser entendido como a habilidade que alguns fármacos possuem de se cristalizar sob mais de uma forma. Devido a isso, apesar de possuírem a mesma composição química, diferentes polimorfos de um mesmo fármaco podem ter propriedades químicas e físicas diferentes, tais como ponto de fusão, reatividade química, solubilidade aparente, taxa de dissolução, entre outras. São propriedades que podem interferir no processo de fabricação do medicamento, assim como na estabilidade, solubilidade e, conseqüentemente, na biodisponibilidade do fármaco no organismo. Portanto, o polimorfismo pode afetar a segurança, qualidade e eficácia do medicamento (USA, 2007; SANTOS et al., 2014).

Na literatura, existem alguns casos descritos de fármacos que possuem polimorfos com propriedades de estabilidade, solubilidade e, conseqüentemente, biodisponibilidade diferentes. Um dos casos bem conhecidos, o palmitato de cloranfenicol, um antibiótico que possui dois polimorfos relevantes: o A e o B. As propriedades de cada polimorfo são tão diferentes que influenciam a solubilidade, estabilidade, reatividade química, biodisponibilidade e atividade biológica. O palmitato de cloranfenicol é um pró-fármaco que

necessita ser hidrolisado *in vivo* por via enzimática para se transformar em sua forma ativa. A forma A, além de ser pouco solúvel, apresenta taxa de hidrólise muito baixa, interferindo na obtenção da forma ativa. Sendo assim, esta forma polimórfica é reconhecida por não possuir atividade biológica. Embora, a forma B seja mais solúvel, é instável e eventualmente transforma-se na forma A (SINGHAL; CURATOLO, 2004). Por esses motivos, monografias farmacopeicas indicam o uso da forma B em produtos farmacêuticos em quantidade mínima de 90% e tratam a forma A como uma impureza (WHO, 2018).

O mebendazol é um anti-helmíntico de amplo espectro, que possui três formas polimórficas (A, B e C), que se diferenciam pela estabilidade termodinâmica ($A > C > B$) e solubilidade ($C > B > A$). Como a forma C é estável em temperatura ambiente, apenas se convertendo na forma A em 200°C, e apresenta solubilidade adequada, essa é a forma utilizada como IFA, sendo as demais definidas como impurezas (ROQUE-FLORES et al., 2019).

Apesar da regulamentação, é necessário que métodos analíticos utilizados no controle de qualidade sejam mais eficazes e práticos para atender aos critérios estabelecidos, pois muitas vezes, os processos produtivos podem facilitar a cristalização de polimorfos. Em um estudo realizado por Garbuio et al. (2014), foram avaliados insumos e comprimidos comercializados contendo MBZ. As análises indicaram que havia uma mistura polimórfica nos insumos e dentre os comprimidos testados, a forma C foi identificada apenas em alguns.

Dessa forma, a ocorrência de polimorfismo em fármacos de forma não controlada pode gerar grandes perdas pela indústria farmacêutica e também aos pacientes que ficam privados de tratamento adequado. Em 1988, houve a retirada de Telgretol[®] do mercado por falha terapêutica, devido a ocorrência da transição da forma anidra para a forma dihidratada da carbamazepina. E em 1998, a retirada do Norvir[®] (antirretroviral ritonavir) por falha nos testes de dissolução, neste caso a perda financeira estimada foi de cerca de 250 milhões de dólares (SANTOS et al., 2014).

3.5.1 O polimorfismo do EFZ

O polimorfismo do EFZ vem sendo intensamente investigado, havendo inclusive diversas patentes registradas de novas formas polimórficas. No entanto, sabe-se, até o momento, que podem existir em temperatura ambiente apenas os polimorfos I, II e III, um solvato e dois co-cristais (MAHAPATRA et al., 2010; MARQUES et al., 2017; MELO et al., 2013; RAVIKUMAR, SHRIDAR, 2009).

Fandaruff e colaboradores (2014), por meio de ensaios de dissolução intrínseca verificaram que o polimorfo II seria 10 vezes mais solúvel que o polimorfo I, forma comumente utilizada em formulações. O uso de DSC e o aquecimento durante análises de microscopia e difração de raios-X demonstraram que o polimorfo II se manteria estável em temperatura ambiente até 100°C e que se converteria no polimorfo I em 105°C. Além disso, a entalpia de formação calculada indicou uma maior estabilidade do polimorfo II em temperatura ambiente, sendo teoricamente ratificado pelo fato de que estruturas cristalinas com maior densidade tem uma maior estabilidade termodinâmica (polimorfo I = 1,395 g/cm³ e polimorfo II = 1,486 g/cm³) (LEE, 2014; MAHAPATRA et al., 2010; RAVIKUMAR, SHRIDAR, 2009). Devido a essas propriedades de maior solubilidade e maior estabilidade termodinâmica, o polimorfo II seria uma alternativa mais vantajosa do que a forma utilizada atualmente.

3.5.2 Caracterização polimórfica

Para a caracterização do estado cristalino, muitas técnicas podem ser utilizadas. Brog et al. 2013 divide em quatro tipos principais: as de microscopia, as de análises térmicas, a de difração de raios X e as de espectroscopia vibracional. As primeiras são importantes para dar noção visual do formato e do tamanho das partículas e quando acoplados a fornos as informações resultantes são ainda mais ricas por poder haver o acompanhamento da conversão polimórfica. As de análise térmicas, embora não apresentem imagens, dão informações sobre a entalpia envolvida no processo. A difração de raios X informa sobre o tipo do padrão cristalino. Enquanto as técnicas espectroscópicas vibracionais informam sobre o estado vibracional de cada polimorfo.

3.5.2.1 Espectroscopia do Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma das técnicas vibracionais bastante utilizadas para caracterização de materiais. Baseia-se na aplicação de radiação eletromagnética na amostra e a absorção dessa radiação resulta em um espectro, onde bandas representam a absorção da radiação incidente em um determinado comprimento de onda e estão associadas a vibração de ligações químicas cujo momento dipolo seja diferente de zero, podendo identificar os grupos funcionais presentes (STUART, 2004).

A espectroscopia do infravermelho é subdividida em três tipos de acordo com a região no espectro eletromagnético que podem ser observadas na (Tabela 5).

Tabela 5 - Regiões espectrais que compreendem o Infravermelho.

Região	Número de onda (cm⁻¹)
Próximo	12821 a 4000
Médio	4000 a 400
Distante	400 a 10

* Adaptado de Workman e Weyer (2008).

A região do infravermelho médio (*Middle Infrared* - MID) traz informações sobre estiramentos e tensionamentos de ligações inter-atômicas e modificações de ângulos de ligações (Brasil, 2010b). De modo diverso em relação ao MID, a região do infravermelho próximo (*Near Infrared* – NIR) traz informações sobre sobretons e combinações de vibrações moleculares. No entanto, devido à ocorrência de sobreposição de bandas, há dificuldade de realizar a elucidação estrutural do analito, da mesma forma que o MID. Para o NIR, são utilizadas técnicas quimiométricas para extrair informações de ordem qualitativa e quantitativa, tendo sido muito utilizado no desenvolvimento de técnicas analíticas na área farmacêutica (WORKMAN; WEYER, 2008).

A Espectroscopia da região do infravermelho distante é também conhecida por Espectroscopia Terahertz (THz). Dentre os três tipos de espectroscopia, é a que se desenvolveu mais tarde, tendo atraído a atenção de pesquisadores mais recentemente, a partir dos anos 2000 (BAXTER; GUGLIETA, 2011). Esta técnica traz informações sobre vibrações moleculares, torcionais e da estrutura cristalina (STUART, 2004) e tem a vantagem de investigar diretamente as propriedades associadas ao estado cristalino, do mesmo modo que a técnica de referência, a difração de raios X. Outras técnicas vibracionais obtêm informações de forma indireta, pela avaliação da interferência das interações intermoleculares sobre as vibrações intramoleculares. Contudo, a interpretação dos espectros ainda é complexa e necessita de cálculos teóricos computacionais como os baseados em teoria do funcional da densidade (DFT) (McINTOSH et al., 2012; VIEIRA, 2016).

Na literatura, facilmente podem ser encontrados a identificação de estruturas de fármacos como o EFZ por MID, devido a maior facilidade de interpretação. Em 2012, Mishra e colaboradores utilizaram cálculos DFT associados a MID e Espectroscopia Raman para identificar os modos vibracionais apresentados pelo EFZ em cada espectro, assim como atribuir conformações estruturais. Fandaruff et al. (2014) utilizaram cálculos DFT associados a MID para a obtenção da geometria das estruturas conformacionais dos polimorfos I e II e

ainda indicaram as diferenças espectrais de cada polimorfo utilizando MID e Raman. Em 2017, Marques e colaboradores publicaram um estudo apresentando dois novos solvatos formados a partir de EFZ, tendo sido realizado o estudo vibracional utilizando MID e Raman das novas formas e do polimorfo I. Algumas informações sobre a conformação dos polimorfos I e II também são descritas. Até o momento, não foi publicado nenhum trabalho contendo informações espectrais de EFZ obtidas utilizando NIR ou THz.

3.5.2.2 *Espectroscopia Raman*

Na espectroscopia Raman, a informação útil não é a da energia absorvida, mas a que é espalhada. Ao incidir um feixe monocromático em uma amostra, a radiação colide com a matéria e se dispersa em todas as direções. O espalhamento decorrente da colisão inelástica se caracteriza por ter frequência diferente da radiação incidida, sendo um indicativo de que parte da energia foi utilizada para excitar um estado vibracional. Esse espalhamento é conhecido como Raman e se subdivide em dois tipos: Stokes e anti-Stokes.

As ondas Stokes possuem frequência menor do que a radiação incidida, pois atingem átomos em estado fundamental. Enquanto as ondas anti-Stokes, possuem uma radiação com frequência maior, por decorrer da colisão com átomos em um estado vibracional excitado. Como a população de átomos em estado excitado é menor do que o encontrado em estado fundamental, a intensidade do espalhamento anti-Stokes é menor do que o Stokes (AVILA, 2013).

O outro espalhamento, o Rayleigh, decorre da colisão elástica e se caracteriza por ter frequência igual ao da radiação incidida, indicando que não ocorre interação com a matéria. A maior parte da radiação difratada corresponde ao espalhamento Rayleigh e por isso, os espectrômetros são equipados com filtros para remover ao máximo esse espalhamento.

Dos lasers utilizados, os mais comuns são da região do infravermelho próximo, nas faixas de: 1064, 830 e 785 nm. A escolha de qual laser utilizar deve considerar que quanto menor o comprimento de onda utilizado, mais fótons espalhados são gerados. Esses fótons de menor comprimento de onda são em contrapartida mais energéticos, produzindo um efeito de fluorescência mais intenso. Esse efeito pode sobrepor as bandas do espalhamento Raman, dificultando a obtenção de informação sobre os modos vibracionais da amostra (HARGREAVES et al., 2009).

Diferente da espectroscopia de infravermelho, que a atividade ocorre quando o dipolo intrínseco da molécula é diferente de zero, na Espectroscopia Raman moléculas são consideradas ativas quando há alteração da polarizabilidade pela radiação eletromagnética.

Sendo assim moléculas com um forte dipolo intrínseco, como é o caso da água, não sofrem maiores perturbações e por isso a banda Raman proveniente é pouco intensa. Enquanto, moléculas com grande densidade eletrônica, como é o caso dos compostos aromáticos, são mais suscetíveis a perturbações do momento dipolo (BASÍLIO, 2014). Portanto, a informação obtida pela Espectroscopia Raman é considerada complementar ao Infravermelho, pois há modos vibracionais que não são ativos para o infravermelho, mas são para o Raman. No caso da água, como já citado, amostras que possuem um teor de umidade, apresentam uma banda intensa no infravermelho, sobrepondo as demais bandas e dificultando a extração de outras informações, o que não ocorre para a Espectroscopia Raman.

3.6 Quimiometria

Quimiometria possui muitas definições diferentes na literatura. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), “é a aplicação de estatística à análise de dados químicos (de química orgânica, analítica ou medicinal) e o planejamento de experimentos químicos e simulações” (IUPAC, 1997). Para Miller e Miller (2006), quimiometria é uma área multidisciplinar que envolve estatística multivariada, modelagem matemática, ciência da computação e química analítica. As principais aplicações seriam para calibração, validação, teste de significância, otimização de experimentos e para a extração da maior quantidade de informação química dos dados analíticos.

No desenvolvimento de métodos analíticos, a quimiometria tem sido bastante empregada já que não apenas otimiza experimentos como é imprescindível para análises de grande volume de dados complexos. Para isso, é seguido um roteiro que inclui a organização e preparação de dados para a aplicação na construção de modelos, sejam eles qualitativos ou quantitativos (FERREIRA, 2015).

3.6.1 Pré-processamento de dados

Para a construção de modelos quantitativos utilizando espectroscopia, uma análise prévia cuidadosa dos espectros é indicado para avaliar a ocorrência de efeitos indesejados causados por variação instrumental, dispersões do sinal, radiação espúria e fluorescência (FEARN et al., 2009; RINNAN et al., 2009).

Esses efeitos podem ser corrigidos com o uso de algumas técnicas de pré-processamento de dados, como: suavização por *Savitzky-Golay* (SG), Correção Multiplicativa de Espalhamento ou do sinal (*Multiplicative Scatter Correction*, MSC), transformação Padrão

Normal de Variação ou do sinal (*Standard Normal Variate*, SNV), métodos de derivação e outros de correção de linha de base.

3.6.1.1 Métodos de correção de linha de base

Alterações na linha de base podem ocorrer devido a causas instrumentais ou amostrais (fluorescência) e podem ser corrigidas aplicando-se diversos métodos como derivações no espectro.

A primeira derivada é indicada quando deslocamentos no eixo das ordenadas são constantes no espectro, enquanto a segunda derivada é indicada quando há uma inclinação da linha de base à medida que decresce o número de onda (FERREIRA, 2015).

Também são utilizados algoritmos como Mínimos Quadrados Ponderados (*Weighted Least Squares* - WLS) e Mínimos Quadrados Assimétricos (*Asymmetric Least Squares* - ALS). Conceitualmente, ambos são similares e fazem ajustes iterativos da linha de base para determinar quais variáveis são claramente devido a sinais espectrais e quais pertencem a linha de base. Alguns parâmetros podem ser alterados para melhor ajuste. Para o WLS, a ordem polinomial pode ser alterada, sendo a segunda ordem a mais utilizada. Enquanto o ALS, possui dois parâmetros: o λ e o P. O λ é similar a ordem polinomial, pois controla a curvatura da linha de base corrigida, sendo que quanto menor o λ , maior é a curvatura permitida. Enquanto o P, é um valor relacionado a assimetria do ajuste, quanto maior esse valor, mais regiões negativas são permitidas no ajuste (EIGENVECTOR, 2013).

3.6.1.2 Suavização por SG

A suavização ou alisamento é aplicada para reduzir ruído aleatório e consequentemente aumentar a razão sinal/ruído do sinal analítico. As técnicas mais comuns consideram uma “janela” do espectro, onde todos os pontos são usados para determinar o valor do centro da janela, esse processo é repetido até percorrer todo o espectro. Com o aumento do tamanho da janela, maior ruído será filtrado, mas maior informação pode ser perdida (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; FERREIRA, 2015).

Uma das técnicas utilizadas é pelo método de Savitzky-Golay. Neste método, calcula-se a média ponderada entre os pontos da janela selecionados e os pesos são obtidos a partir de um ajuste polinomial (FERREIRA, 2015).

3.6.1.3 Métodos de correção do espalhamento

Problemas significativos relacionados a efeitos de espalhamento podem ocorrer em espectroscopia de reflectância. Tais efeitos surgem devido a fenômenos físicos, que podem ser relacionados a sensibilidade do detector e do amplificador, variações de temperatura e pressão e até mesmo causado por variações de tamanho e forma das partículas da amostra. As técnicas mais comuns utilizadas para a correção são MSC e SNV (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; FERREIRA, 2015).

MSC trata-se da aplicação da regressão linear a cada espectro levando em consideração um espectro médio ou de referência. Os coeficientes a e b obtidos são utilizados para calcular o espectro corrigido, da seguinte forma (SOUZA; POPPI, 2012):

$$X_{ik}(\text{corrigido}) = (X_{ik}(\text{original}) - a_i) / b_i \quad \text{(Equação 1)}$$

onde: X são os valores de absorvância de cada espectro i em k comprimentos de onda; a_i e b_i são os coeficientes obtidos da regressão linear.

SNV é bastante similar ao MSC, utiliza basicamente o mesmo cálculo, ao invés de a_i é utilizado o valor médio das intensidades do i -ésimo espectro e ao invés de b_i é utilizado o desvio-padrão (FERREIRA, 2015). O resultado de ambas as técnicas é bem parecido, devendo-se avaliar posteriormente qual técnica resulta em um melhor desempenho, que permita a construção de modelos mais ajustados e com menos erros (GEMPERLINE, 2006).

3.6.1.4 Normalização

A normalização é realizada para remover variações sistemáticas presentes nas amostras e é calculada dividindo-se cada variável por uma constante (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Diferentes constantes podem ser utilizadas, como por exemplo: Normalização a área unitária, a comprimento máximo e a intensidade máxima 1.

3.6.2 Modelo de Calibração multivariada para uso em espectroscopia

Calibração multivariada é a relação entre duas ou mais respostas instrumentais com a propriedade de interesse. Dentre as vantagens que esse tipo de calibração oferece está a possibilidade de análises mesmo na presença de interferentes, desde que estes interferentes estejam presentes nas amostras de calibração (BRAGA; POPPI, 2004).

Um modelo de calibração multivariada pode ser obtido por meio do uso de cálculos matemáticos para relacionar os dados das amostras obtidos de análises instrumentais (por

exemplo: espectros MID) a propriedades da amostra (exemplo: concentração polimórfica). No entanto, o método precisa ser validado e para isso amostras que não participaram da etapa de calibração devem ser utilizadas, sendo avaliadas por várias ferramentas de diagnóstico. Por fim, avalia-se a capacidade de previsão do modelo desenvolvido (FERREIRA, 2016; SOUZA et al., 2013).

Diversos modelos de calibração multivariada vêm sendo utilizados, um dos mais comuns para uso em métodos quantitativos utilizando espectroscopia é o de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares* - PLS).

3.6.2.1 PLS

PLS é uma técnica baseada na definição de variáveis latentes para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados e correlação entre os espectros (matriz $X_{i,j}$) e as propriedades de interesse (matriz $Y_{i,l}$), onde i é o número de amostras e j é o número de variáveis. A direção do novo sistema de eixo (variáveis latentes ou fatores do PLS) é aquela que maximiza a covariância entre X e Y (SOUZA et al., 2013). Para isso, inicialmente, as matrizes são decompostas em:

$$X = T P^T + E \quad \text{Equação 2}$$

$$Y = U Q^T + F \quad \text{Equação 3}$$

Onde: P e Q são os pesos de X e Y, respectivamente; T e U são os escores de X e Y, respectivamente e E e F representam as matrizes de resíduos de X e Y, respectivamente. Os escores representam as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos e os pesos representam a contribuição relativa de cada variável original (comprimento de onda) para a formação dos mesmos.

Para selecionar o número de variáveis latentes adequado em geral se utiliza a validação cruzada (*Cross Validation* - CV) que consiste em excluir uma ou mais amostras do conjunto de calibração e fazer a previsão da propriedade com o conjunto restante. O processo é repetido até que se teste a exclusão de todas as amostras (MORGANO et al., 2007). Deste processo são calculados a raiz dos erros médios quadráticos da validação cruzada (RMSECV):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

Equação 4

Onde: n representa o número de amostras do conjunto de calibração, y_i é o valor de referência e \hat{y}_i é o valor estimado pelo modelo para a i -ésima amostra.

O valor de RMSECV é calculado para cada número de variáveis latentes (componentes principais) empregado. O valor ideal de variáveis latentes é escolhido considerando que quanto menor o RMSECV mais o valor predito se aproxima do valor medido (SOUZA et al., 2013).

Após o número de variáveis latentes ser determinado, o modelo construído pode ser testado para prever uma determinada propriedade de interesse, a partir de um conjunto de amostras (validação externa) que não foram utilizadas no conjunto de calibração (FERREIRA, 2016). Os erros médios quadráticos de previsão (RMSEP) são então estimados utilizando-se equação semelhante a equação 4, mas em vez de amostras de calibração são utilizadas as amostras do conjunto de validação externa. Os valores previstos devem ser concordantes com os valores reais e, por isso, um gráfico com essas duas grandezas é construído. Neste gráfico, os valores dessas amostras devem estar próximos a reta (obtida na regressão linear), sendo ideal uma inclinação de 45° para a reta, o intercepto (*bias*) deve ser próximo a zero e o coeficiente de determinação, R^2 , deve possuir valor próximo a 1 (SOUZA et al., 2013).

3.6.2.2 Métodos de seleção de amostras

As amostras que serão utilizados no método analítico e irão compor os conjuntos de calibração e validação devem estar em quantidade suficiente para serem representativas e cobrir todo intervalo utilizado na construção do modelo de forma uniforme (FERREIRA, 2016; ASTM, 2005).

Como um grande volume de dados são utilizados nos métodos de calibração multivariada e para que não haja tendências, as divisões dos conjuntos de amostras em calibração e validação podem ser realizadas por meios de algoritmos. Os mais comuns são o que fazem essa divisão de forma aleatória, um deles é o Kennard-Stone XY. Este algoritmo considera as distâncias Euclidianas entre as amostras (matriz X) e também entre as variáveis (matriz Y) para dividir os conjuntos de forma mais homogênea e de modo a incluir os limites mínimos e máximos no conjunto de calibração (GALVÃO et al., 2005).

3.6.2.3 Métodos de seleção de variáveis

O uso do espectro completo muitas vezes considera regiões sem informação química relevante ou até informações que podem interferir no desempenho do modelo. Dessa forma, é importante a avaliação das regiões espectrais, pois a diminuição do número de variáveis pode, não apenas melhorar a capacidade preditiva do modelo como facilitar a interpretação (ANDERSEN; BRO, 2010). Isso pode ser realizado utilizando ferramentas para a seleção de variáveis. Uma das mais utilizadas são as técnicas de Importância da Variável na Projeção (*VIP scores*) e de PLS por intervalo (iPLS) (CHONG; JUN, 2005; NORGAARD et al., 2000).

VIP representa uma medida combinada do quanto uma variável contribui para descrever dois conjuntos de dados, no caso a matriz de espectros \mathbf{X} e o vetor da propriedade de interesse (CHONG; JUN, 2005). O cálculo considera os pesos, que em um modelo PLS indica a covariância entre as variáveis dependentes (Y) e as independentes (X), e também considera a variância explicada. Em regra, variáveis com valores de *VIP* menores do que 1 indicariam que estas não seriam importantes e poderiam ser removidas do modelo (ANDERSEN; BRO, 2010).

O iPLS, considera o uso de intervalos de variáveis ao invés de testar variável por variável. O tamanho do intervalo a ser testado é definido pelo usuário, sendo que quando aplicado a dados espectrais, convém que o valor usado seja o tamanho médio de uma banda espectral. A seleção do melhor intervalo para construção do modelo de predição é feita, principalmente, através dos valores obtidos de RMSECV, mas para melhor ajuste do modelo são também considerados outros valores gerados na regressão como o R^2 (ANDERSEN; BRO, 2010; NORGAARD et al., 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, foram utilizados comprimidos ADF produzidos pelo Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, em 2011, contendo: AZT (Northeast[®], lote DY070041), 3TC (Hangzhou[®], lote 071208) e EFZ (Cristália[®], lote 1289/07), celulose microcristalina 101 (Blanver[®]), croscarmelose sódica (Blanver[®]), polivinilpirrolidona (ISP[®]), estearato de magnésio (Opção Fenix[®]), dióxido de silício coloidal (Degussa[®]), lauril sulfato de sódio (Vetec[®]). Para o sistema de solventes, foram utilizados: acetonitrila grau HPLC (LiChrosolv[®] Merck), água ultrapura, ácido acético (Dinâmica[®]), acetato de amônio (Synth[®]).

Para a degradação forçada foram utilizados os seguintes excipientes do comprimido ADF: celulose microcristalina 101 (lote INFAN 83403), croscarmelose, polivinilpirrolidona (lote IMEC PV020217), estearato de magnésio (lote INFAN 83307), dióxido de silício coloidal (Aerosil[®], lote 83231), lauril sulfato de sódio (Dinâmica[®], lote 88467); além dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs): EFZ (Cristália[®], lotes 86/16 e 1289/07), 3TC e AZT e dos produtos de degradação: citosina (Sigma-Aldrich[®]) e timina (Sigma-Aldrich[®]).

Para a investigação do polimorfo II do EFZ foram utilizadas amostras de lotes doados pelo LAFEPE, Cristália (Cristália[®], lotes 1289/07 e 86/16) e pela Nortec[®], além de Metanol grau HPLC (J.T. Baker[®]/ LiChrosolv[®] Merck).

4.2 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade

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

No desenvolvimento do método, foram testadas as colunas Ultra e Ascentis (C18 250 x 4,6 mm, 5 µm) dos fabricantes Restek[®] e Supelco[®], respectivamente. As colunas foram mantidas em temperaturas de 30 e 40°C e fase móvel no modo gradiente utilizando acetonitrila, metanol e água ultrapurificada acidificada ou não com ácido acético.

4.2.1 Preparo de amostras

As amostras foram preparadas solubilizando 75 mg de comprimido ADF em balão volumétrico de 25 mL contendo 100% de solvente orgânico (acetonitrila ou metanol) ou 50:50 solvente orgânico : água ultrapura, e sonicando por 10 min. Após aferição do balão, a solução obtida foi filtrada em papel de filtro faixa preta, sendo 0,4 mL do filtrado transferidos para um balão de 10 mL para diluição em soluções de 100% solvente orgânico ou água ultrapura ou em soluções em proporção de 50:50, 20:80 ou 10:90 solvente orgânico : água ultrapura. A solução obtida foi filtrada em membrana de 0,2 μm e transferida para *vials*.

Para o doseamento de amostras de comprimidos contaminadas pelos produtos de degradação timina e citosina, foi realizado o mesmo de amostra, sendo pesados 12,5 mg de citosina e 25 mg de timina.

4.2.2 Degradação forçada

A degradação forçada foi realizada adicionando excipientes e IFAs em quantidade equivalente a 75 mg do comprimido ADF em uma solução 50:50 fase aquosa : acetonitrila para as hidrólises em pH neutro.

Nas hidrólises ácida e básica, soluções de ácido clorídrico (Anidrol[®]) a 0,1 e a 1 mol.L⁻¹ e hidróxido de sódio (Fmaia[®]) a 0,1 mol.L⁻¹, respectivamente, foram utilizadas como fase aquosa, tendo sido testada as soluções em temperatura ambiente e a 60°C. Para realização da análise, uma alíquota de 0,4 mL foi transferida para um balão de 10 mL, onde foi modificado o pH para em torno de 5,8 (faixa de pH para amostras sem degradação) e foi realizada a aferição com solução 20:80 acetonitrila : água ultrapura.

4.3 Investigações do polimorfo II do EFZ

Foi testada a obtenção do polimorfo II dissolvendo o polimorfo I em metanol e deixando evaporar em ultrafreezer (Modelo UFR30, Liotop[®]) em temperatura de -91 a -82°C, em refrigerador (Modelo CRB36ABBNA, Consul[®]) a aproximadamente -4 a 4°C, em estufa a 60°C e em temperatura ambiente, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições utilizadas na recristalização do EFZ.

Quantidade (mg)	Volume (mL)	Béquer (mL)	Sistema*
Temperatura ambiente			
100	5	25	Fechado
Estufa			
100	5	25	Fechado
Ultrafreezer			
100	50	100	Aberto
100	5	25	Aberto
1000	500	600	Aberto
Refrigerador			
100	5	25	Fechado
100	5	25	Aberto
500	25	150	Fechado
500	25	150	Aberto
1500	75	600	Aberto
3000	150	1000	Fechado
3000	150	1000	Aberto
3000	150	600	Aberto

*O recipiente utilizado foi fechado com papel alumínio com perfurações de formato circular feitas com auxílio de pinça. Fonte: Autoria própria.

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) e no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

(CETENE), em microscópio eletrônico de varredura ambiental FEI, Quanta[®] 200 FEG, utilizando magnitude de 12000, 6000 e 2,52 K.

4.3.2 Difração de raios X

A análise foi realizada no difratômetro Shimadzu[®] (XRD-7000), equipado com anodo de cobre e em difratômetro Bruker[®] (D8 Advance), equipado com tubo de Cu K(alfa), tensão de 40 KV, corrente de 40 mA e filtro de níquel. As amostras foram analisadas com intervalo de $5 < 2\theta < 45$, incremento em $0,008^\circ$, velocidade de $1000 \text{ } \theta/\text{min}$ e tempo de tomada de vinte segundos (FANDARUFF et al., 2014).

4.3.3 Calorimetria diferencial de varredura

Amostras com peso aproximado de 2 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio fechados não hermeticamente e aquecidas entre 30 a 250°C na razão de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando o módulo de temperatura DSC-60 Shimadzu[®]. O gás de purga foi o nitrogênio com fluxo de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.3.4 Polarimetria

Para determinar a rotação específica (α_D) do EFZ foi utilizado o polarímetro Jasco p-2000[®], equipado com lâmpada de sódio (589 nm) e com cuba de 100 mm, à temperatura ambiente. O ensaio foi realizado em quintuplicata com soluções a 1,08% (p/v) em metanol.

4.3.5 Dissolução Intrínseca

Para a dissolução intrínseca, foram utilizados discos rotatórios a 100 rpm com área superficial de $0,5 \text{ cm}^2$, conforme método validado por Pinto e colaboradores (2014). O disco contendo EFZ foi preparado pela compressão de 180 mg de amostra a uma força de 1 ton durante 30s com o auxílio da prensa hidráulica (QLA 2 Ton Universal Press[®], NJ, USA). Os ensaios de dissolução foram realizados em dissolutor Varian[®] VK 7010 com 900 mL de meio contendo lauril sulfato de sódio (LSS), sendo testada a concentração de 0,5% e 0,25% (m/v), em temperatura de $37 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$. A distância entre o aparato e o fundo da cuba foi de 3.8 cm. Alíquotas de 7 mL retiradas em 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, e 300 min, sendo repostado o volume retirado com meio. A concentração de EFZ em solução foi medida por espectrofotômetro de UV em comprimento de onda de 247 nm (BRASIL, 2010b). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.6 Espectroscopia terahertz (THz)

A análise de espectroscopia THz foi realizada em espectrômetro THz-TDS ASOPS da Laser Quantum (HASSP THz), no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Para análise dos polimorfos foram produzidas pastilhas com PTFE de 200 mg com concentração de 9% (m/m) de EFZ. Anteriormente à análise, o sistema foi purgado com nitrogênio para diminuir a interferência de vapores de água. Foi incidido nas amostras, ondas eletromagnéticas com frequência de 0 a 6,2 THz. Os espectros obtidos foram o resultado da média de 500 varreduras. Pastilhas contendo apenas PTFE foram utilizadas como branco.

4.3.7 Desenvolvimento de método de quantificação de polimorfos de EFZ

4.3.7.1 Preparação de amostras

Foram misturados polimorfos I e II do EFZ em pó, após trituração utilizando gral e pistilo, nas seguintes concentrações percentuais de polimorfo II (% m/m): 0, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100. Em seguida, o material contido em eppendorf foi agitado em um agitador de tubos modelo MA-162 (Marconi).

4.3.7.2 Análises espectroscópicas

As misturas polimórficas foram analisadas por Espectroscopia na região de Infravermelho próximo (equipamentos de bancada e portátil) e médio (equipamentos de bancada) e por Raman (equipamentos de bancada e portátil) utilizando métodos e equipamentos já descritos nos itens a seguir.

4.3.7.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho médio (MID)

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier foram obtidos utilizando o equipamento Spectrum 400 (PerkinElmer®) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. Previamente a análise de cada amostra, foi realizada a varredura do cristal limpo para a obtenção do espectro de *background* e, portanto, para eliminação de interferências do ambiente como umidade e presença de CO₂ (HAACK, 2010). As amostras foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 16 varreduras entre 4000 a 650 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹. Para cada concentração, cinco espectros foram obtidos, a partir dos quais duas médias espectrais foram calculadas.

4.3.7.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR)

Os espectros NIR foram obtidos em dois espectrômetros. Foi utilizado o Spectrum 400 (PerkinElmer®) com acessório de reflectância difusa na região espectral de 750 a 2500 nm (4000 a 10000 cm^{-1}) e resolução espectral de 4 cm^{-1} ; e o MicroNIR™ 1700 (Viavi), na região espectral de 900 a 1700 nm. Ambos equipamentos pertencentes ao Laboratório de Combustíveis (LAC) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da UFPE

Os resultados foram obtidos de uma média de 32 varreduras para o Spectrum 400 e de uma média de 50 varreduras para o MicroNIR. Anteriormente às análises, foi realizada a varredura em politetrafluoroetileno (PTFE) para a obtenção do espectro de *background*.

Para cada concentração analisada, oito espectros foram obtidos, a partir dos quais duas médias espectrais foram calculadas.

4.3.7.2.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos em dois espectrômetros, um dos equipamentos foi um microscópio Raman confocal (SENTERRA, Bruker, Alemanha) equipado com três lasers de excitação (532 nm, 633 nm e 785 nm) e uma plataforma motorizada com movimentos nos eixos xyz, pertencente ao Instituto de Criminalística Professor Armando Samico. Foram utilizados: feixe de 785 nm com potência de 100 mW, objetiva de 20x, resolução espectral de 3-5 cm^{-1} , faixa espectral de 60 a 2622 cm^{-1} e tempo de exposição do laser de 30s com 2 coadições.

O outro equipamento utilizado foi o modelo portátil Mira DS (Metrohm) pertencente ao LAC/DEQ/UFPE, equipado com laser de feixe de 785 nm, faixa espectral de 400 a 2300 cm^{-1} e potência de 100 mW. Os espectros foram obtidos no modo *smart*, o qual ajustar a potência e o tempo de exposição do laser de forma automática.

Anteriormente as análises, ambos equipamentos executaram a correção automática do *background*.

Para cada concentração, cinco espectros foram obtidos, dos quais duas médias espectrais foram calculadas.

4.3.7.3 Tratamento de dados

De cada mistura foram realizadas de 5 a 8 medidas, das quais foram calculadas duas médias, obtendo assim 44 amostras. Estas amostras foram selecionadas para um conjunto de

calibração (~55%) e outro de validação (~45%) por meio do algoritmo de Kennard-Stone X Y (KSXY) (GALVÃO et al., 2005).

Diferentes técnicas de pré-processamentos foram avaliadas para minimizar efeitos indesejados nos espectros geradas por variações instrumentais, espalhamentos, radiações espúrias e fluorescência (FEARN et al., 2009; LUO et al., 2005; RINNAN et al., 2009).

Para os dados da Espectroscopia de Infravermelho, os seguintes pré-processamentos foram testados: suavização por *Savitzky-Golay* (SG), MSC, SNV, transformações de primeira e segunda derivada por SG (segunda ordem polinomial e janela de 15 pontos). Para os dados da Espectroscopia Raman, foram testados a correção por WLS (EIGENVECTOR, 2013) e por ALS (EILERS; BOELEN, 2005), além disso foram testados normalização e os outros métodos de pré-processamentos mencionados acima. Ao final da aplicação destes pré-processamentos, os dados foram centrados na média.

Para selecionar o número de variáveis latentes foi utilizado o método *venetian blinds* como método de validação cruzada.

O modelo para quantificação dos polimorfos foi feito utilizando regressão por PLS, sendo o desempenho dos modelos criados avaliado pelos seguintes parâmetros RMSEP, RMSECV, *bias* e R^2 . Valores de *bias* significativamente acima de zero indicam a presença de erros sistemáticos, enquanto os valores de RMSEP informam sobre a acurácia das predições. Testes F com 95% de confiança foram realizados para avaliar diferenças significativas entre os valores de RMSEP obtidos. Para testar a significância do valor *bias*, foi utilizado o teste t, como recomendado pela ASTM E-1655-05.

O *software* utilizado para aplicar todos esses processamentos foi o *Matlab*[®] R2015a 8.5 (*Mathworks*) e o PLS toolbox 8.5.2. (*Eigenvector*[®]).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (MIE)

O desenvolvimento do MIE foi iniciado a partir do método proposto por Soares (2011), o qual utilizou a coluna C18 250 x 4,6 mm, 5 μm (Restek®) a 40°C e gradiente representado na Tabela 7.

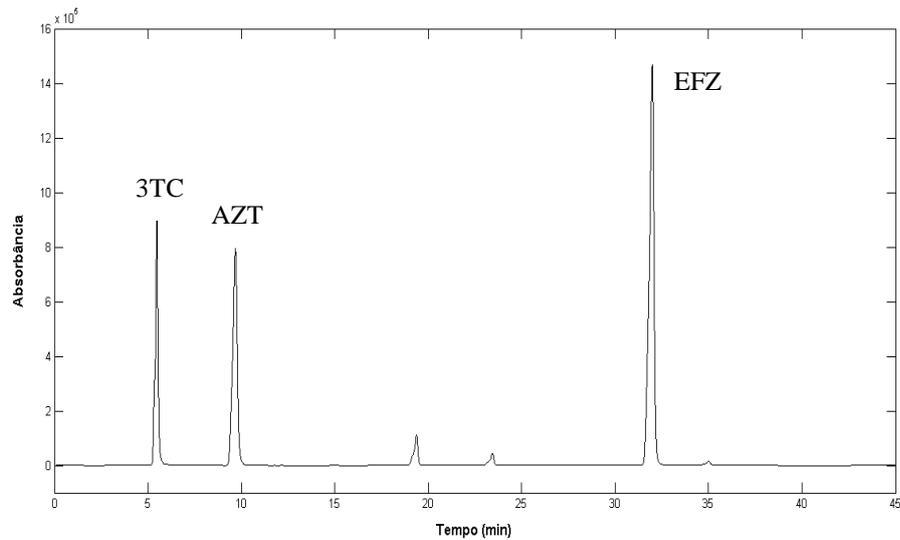
Tabela 7 – Gradiente para MIE de comprimido ADF.

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

Fonte: Soares (2011).

O uso deste método não demonstrou reprodutibilidade, sendo necessário inicialmente uniformizar o fluxo da fase móvel durante toda a análise. Além disso, por dificuldades na resolução cromatográfica, o fluxo foi reduzido para 0,8 mL.min⁻¹ e, posteriormente para 0,5 mL.min⁻¹. Com a redução do fluxo, foi elevado o tempo de análise para 45 min. Em relação à temperatura, a 40°C os picos referentes a 3TC (~5,5 min) e a EFZ (~32 min) apresentaram coeluição com outras substâncias (Figura 11). Enquanto a 30°C, apenas o pico do 3TC apareceu impuro, por isso essa temperatura foi escolhida para realizar novos testes de metodologia.

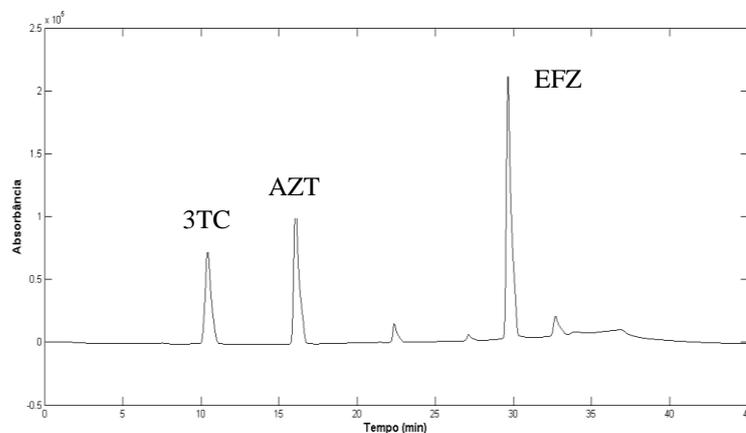
Figura 11 – Cromatograma utilizando método a 40°C.



Legenda: 3TC: lamivudina, AZT: zidovudina; EFZ: efavirenz. Fonte: Autoria própria.

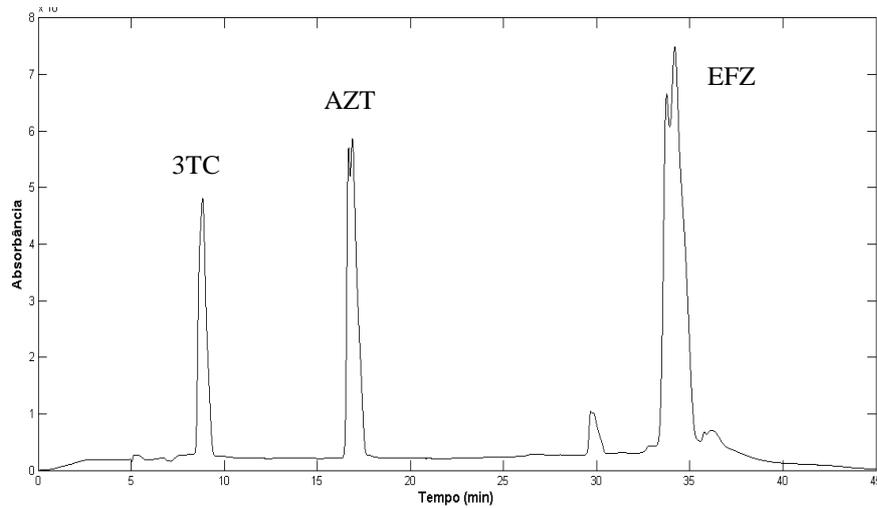
Foi testada a metodologia analítica da USP34 descrita para a quantificação de comprimidos contendo AZT e 3TC (USP, 2011). Em geral, os métodos descritos em compêndios começam com proporções de fase aquosa maiores em torno de 96% e com solução aquosa acidificada. Foram testados o pH 6,8 (sem acidificação), acidificações para pH 4,5 e 3,0 (acidificação padrão do método), mostrados respectivamente nas Figuras 12 a 14. Nas análises, foram avaliadas as purezas dos picos principais. Ao utilizar a fase aquosa com o pH 6,8, apenas o EFZ (~29,64 min) aparece impuro. Com o pH 4,5, apenas o pico da 3TC (~8,8 min) aparece puro e ocorre a divisão dos picos de AZT (~16,9 min) e EFZ (~34,2 min). Com o pH 3,0, os picos de AZT e EFZ (33,5 min) coeluem.

Figura 12 – Cromatograma utilizando gradiente da USP34 (pH 6,8) para AZT e 3TC.



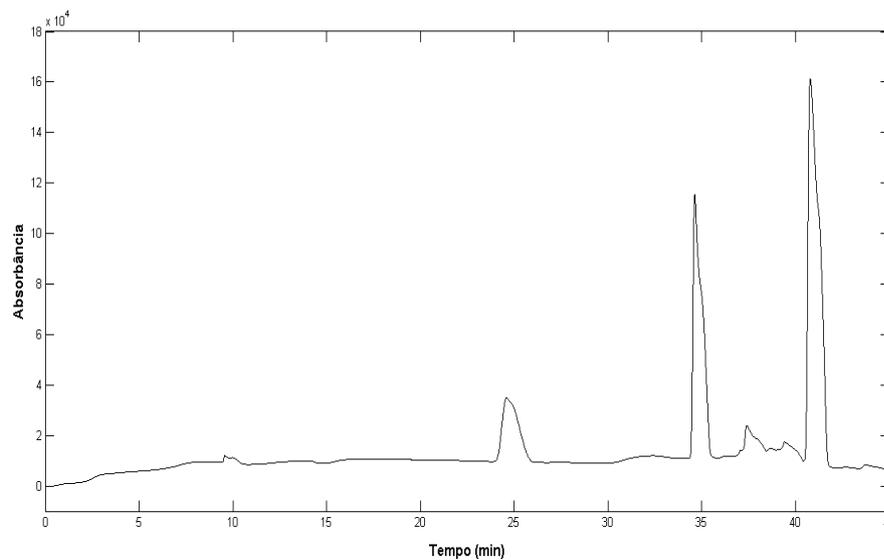
Legenda: 3TC: lamivudina, AZT: zidovudina; EFZ: efavirenz. Fonte: Autoria própria.

Figura 13 – Cromatograma utilizando gradiente da USP34 (pH 4,5) para AZT e 3TC.



Legenda: 3TC: lamivudina, AZT: zidovudina; EFZ: efavirenz. Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Cromatograma utilizando método da USP34 (pH 3,0) para AZT e 3TC.



Fonte: Autoria própria.

O comportamento semelhante da AZT e EFZ pode ser explicado pelas propriedades físico-químicas, pois ambos são ácidos fracos ($pK_{aAZT} = 9,8$; $pK_{aEFZ} = 10,2$), enquanto a 3TC é uma base fraca ($pK_{a3TC} = 4,3$). Com a diminuição do pH, os ácidos fracos tendem a permanecer não ionizados e são mais retidos pela coluna e as bases tendem a permanecer ionizadas e serem menos retidas. Os dois comportamentos foram observados. Sendo assim, a acidificação pode ser investigada posteriormente como um parâmetro de otimização do

método (JOZWIAKOWSKI, et al., 1996; RABEL et al., 1996; CORDEIRO et al., 2011; DOLAN, 2017).

O gradiente de fase móvel que se mostrou mais eficiente para a separação de analitos puros, está representado na Tabela 8.

Tabela 8 – Gradiente de fase móvel para doseamento de comprimido ADF degradado.

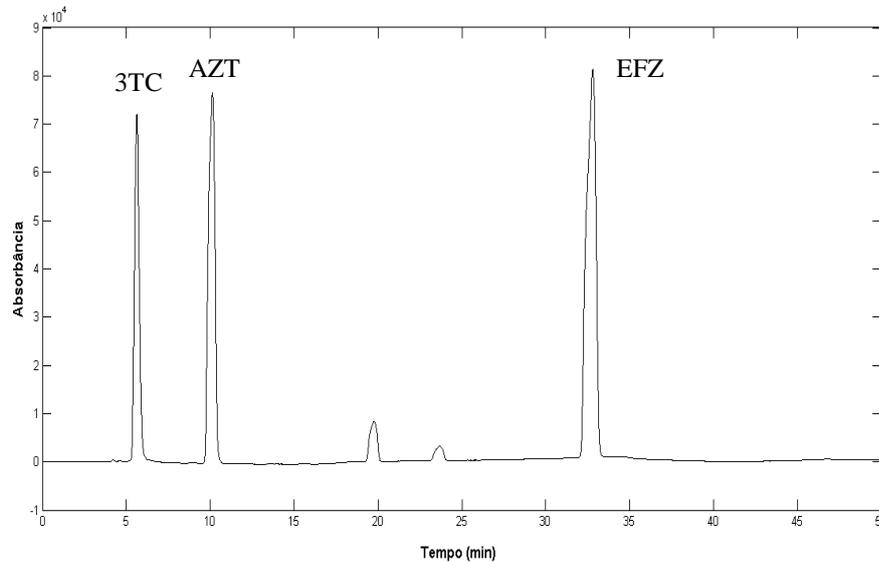
Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0	20	80
30	80	20
40	20	80
50	20	80

Fonte: Autoria própria.

Após a seleção da composição da fase móvel, foram testadas colunas de dois fabricantes. Ambas possuem características semelhantes, com exceção do teor de carbono: 20% (coluna Restek[®]) e 25% (coluna Supelco[®]) e da área superficial: 300 m²/g (coluna Restek[®]) e 450 m²/g (coluna Supelco[®]). A última coluna demonstrou melhor resolução dos analitos e isso pode explicado pela maior área superficial (MOLDOVEANU; DAVID, 2017).

Adicionalmente, foram avaliados os solventes a serem utilizados no preparo da amostra, visto a dificuldade de extração de compostos de polaridade oposta (AZT e 3TC, solúveis em água, e EFZ pouco solúvel) da matriz do comprimido ADF. Para tanto, o diluente contendo acetonitrila:água ultrapura na mesma proporção que o tempo zero do método gradiente originou picos mais simétricos (Figura 15).

Figura 15 – Cromatograma padrão de comprimido ADF degradado.



Legenda: 3TC: lamivudina, AZT: zidovudina; EFZ: efavirenz. Fonte: Autoria própria.

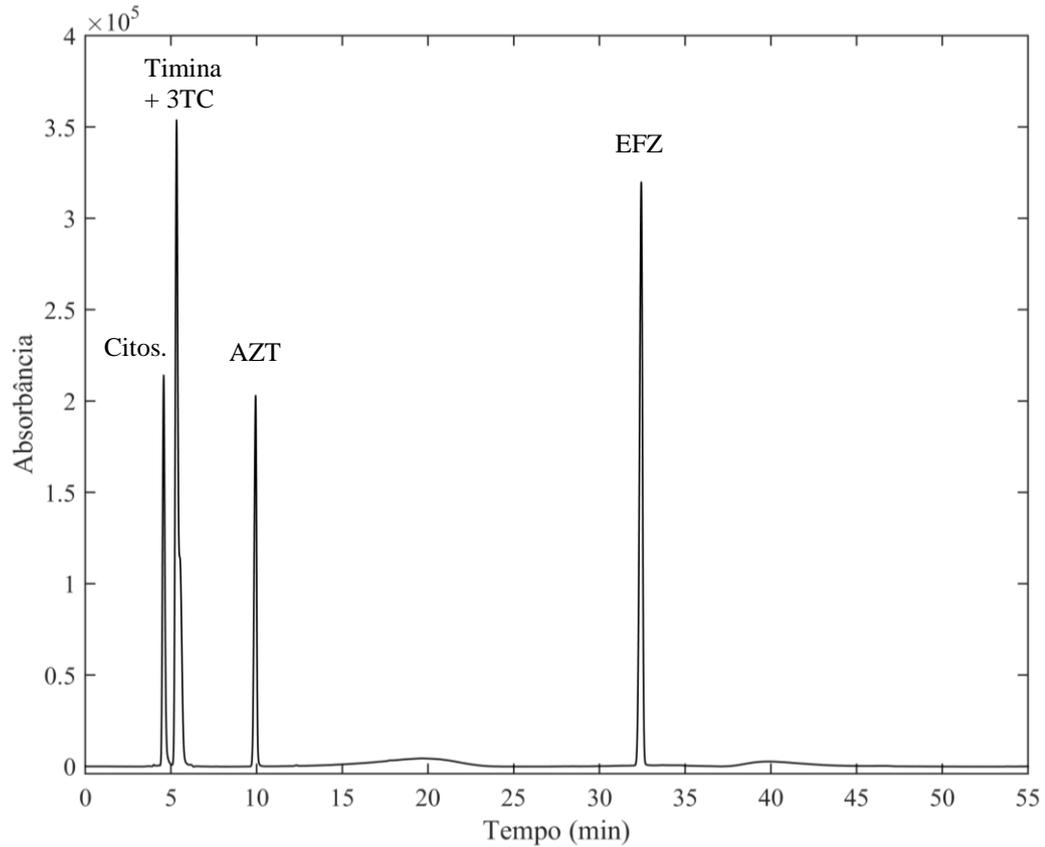
Na avaliação da adequabilidade do método desenvolvido, os parâmetros de fator de cauda e desvio padrão (DP) relativo estão dentro dos limites especificados, mas os parâmetros de resolução e fator de separação para o pico situado em 5,632 min estão abaixo do recomendável, variando de 0 a 3,4 e de 0 a 1,7, respectivamente. Segundo o Guia de Validação de Métodos Cromatográficos (USA, 1994), os parâmetros de fator de separação (acima de 2), resolução (acima de 2), desvio padrão relativo (menor ou igual a 1% para $n \geq 5$) e fator de cauda (menor ou igual a 2) são recomendados para teste de adequabilidade do sistema para métodos indicativos de estabilidade. Enquanto o Guia de Estabilidade da ANVISA (BRASIL, 2015), recomenda apenas os parâmetros de resolução, pureza do pico, assimetria e eficiência da coluna para avaliar a qualidade e a eficiência de separação cromatográfica. Sendo assim, foi escolhido avaliar adequabilidade do método pela pureza do pico, fator de cauda e pelo DP relativo a diferenças nas áreas dos picos obtidos em análises de uma mesma amostra.

5.1.1 Degradação Forçada

Na etapa de degradação forçada, os resultados iniciais da hidrólise neutra utilizando aquecimento de 80°C durante 72h não resultou em degradação significativa. Sendo assim, procedeu-se a acidificação e basificação das amostras. Nesta etapa, houveram dificuldades na resolução e pureza do pico da 3TC. Ao investigar, amostras de DFC contaminada pelos

produtos de degradação timina e citosina, foi visto que a timina coeluiu com a 3TC (Figura 16), devendo, portanto, o método ser alterado.

Figura 16 - Cromatograma de comprimido ADF contaminado com timina e citosina.



Legenda: 3TC: lamivudina, AZT: zidovudina; EFZ: efavirenz; Citos.: Citosina. Fonte: Autoria própria.

Como já descritos, os métodos farmacopeicos de doseamento da 3TC e AZT utilizam uma proporção maior de fase aquosa, acima de 80%, além da acidificação e tamponamento da fase móvel (BRASIL, 2010; USP, 2018). Diferentes condições, portanto, ainda devem ser testadas para alcançar um MIE mais adequado.

5.2 Investigação do polimorfo II do EFZ

Na literatura, é relatada a recristalização em metanol de 100 mg do polimorfo II em sete dias a partir do polimorfo I do EFZ a uma concentração de 2 mg/mL, em temperatura de congelamento (FANDARUFF et al., 2014). Como o metanol possui ponto de fusão em $-97,6^{\circ}\text{C}$, inicialmente a recristalização foi realizada em ultrafreezer em temperatura de -91 a -82°C . No entanto, nestas condições o tempo de recristalização foi, em média, quatro vezes

maior. Além disso, foi observado que a recristalização ocorre em concentração de 20 mg/mL de EFZ, o que diminuiria o volume de metanol a ser utilizado.

Tabela 9 – Tempo de recristalização do EFZ em metanol em diferentes condições.

Quantidade (mg)	Volume (mL)	Béquer (mL)	Sistema	Tempo (~dias)
Temperatura ambiente				
100	5	25	Fechado	-
Estufa				
100	5	25	Não	-
Ultrafreezer				
100	50	100	Aberto	28
100	5	25	Aberto	28
1000	500	600	Aberto	101
Refrigerador				
100	5	25	Fechado	1
100	5	25	Aberto	0,75
100	5	25	Aberto*	-
500	25	150	Fechado	9
500	25	150	Aberto	2
1500	75	600	Aberto	9
3000	150	1000	Fechado	34
3000	150	1000	Aberto	6
3000	150	600	Aberto*	-

Legenda: (-) Não houve formação do polimorfo II; (*) Temperatura maior ou igual a 4°C. Fonte: Autoria própria.

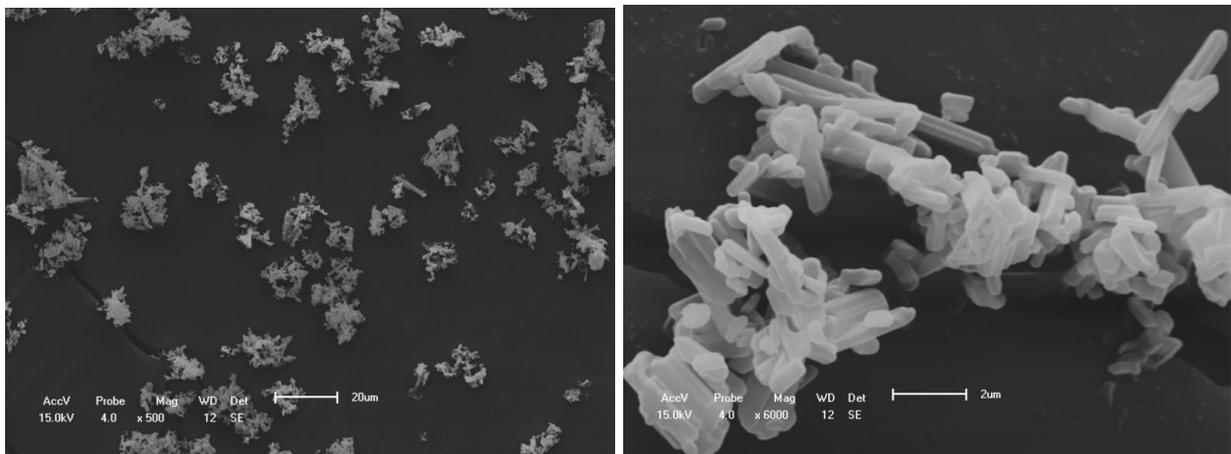
Sendo assim, com o objetivo de diminuir o tempo de cristalização, foram testadas diferentes condições em temperaturas mais altas (Tabela 9).

Pelos resultados obtidos, pode ser inferido que são inadequadas as condições que aceleram muito a evaporação, como o uso de temperaturas acima de 4°C. O que corrobora com o trabalho de Fandaruff (2016), em que houve obtenção de 1000 mg do polimorfo II em sete dias a partir da evaporação do polimorfo I em 50 mL de metanol a 4°C. Contudo, há evidências que as condições podem ser otimizadas já que foi possível obter três gramas do polimorfo II em apenas seis dias, em sistema aberto, a uma temperatura que variou de -4,5 a 4°C.

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O polimorfo I apresenta-se em estruturas muito pequenas em torno de 2 µm de comprimento e outros ainda menores (Figura 17), provavelmente decorrente do processo de micronização (Anexo A). Pode ser observado claramente o formato ortorrômbico dos cristais.

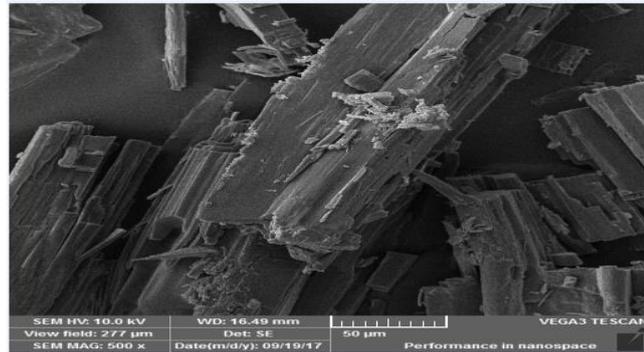
Figura 17 - Imagens de aumento, respectivamente, de 500 e de 6000 vezes do polimorfo I do EFZ.



Fonte: autoria própria.

O polimorfo II obtido por recristalização do polimorfo I, não sofreu o processo de micronização e, por isso, apresentou-se como estruturas maiores, em geral, com comprimento acima de 50 µm, em formato retangular. Podem ainda ser observados fragmentos menores (Figura 18).

Figura 18 - Imagem de aumento de 500 vezes do polimorfo II do EFZ.

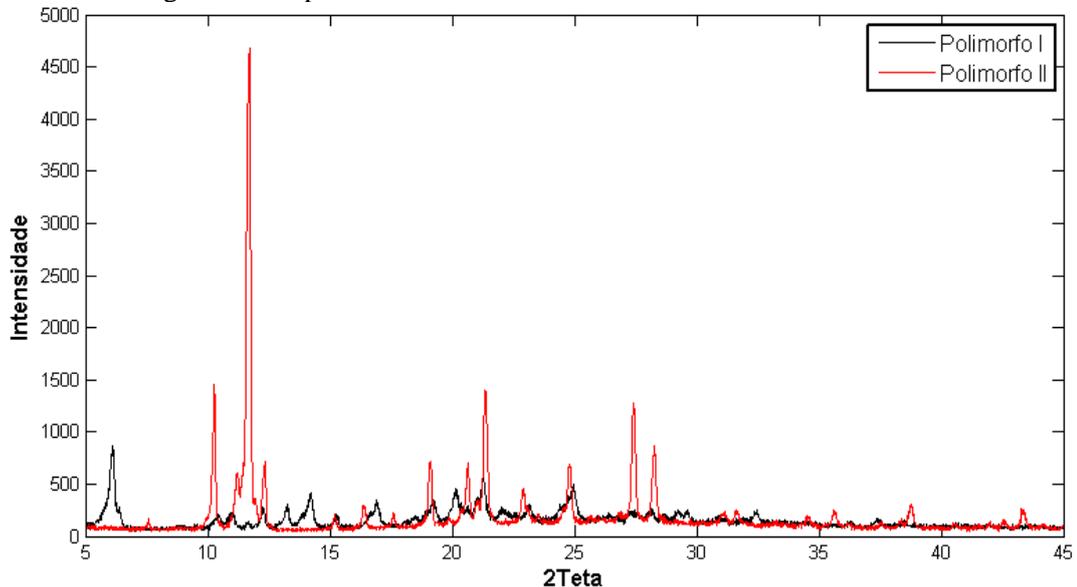


Fonte: autoria própria.

5.2.2 Difração de raios X

Os polimorfos I e II do EFZ são cristais com formato ortorrômbico que se cristalizam em diferentes grupos espaciais. O polimorfo I se cristaliza em $P2_12_12$ e o polimorfo II em $P2_12_12_1$. Na literatura, alguns autores descrevem o perfil cristalográfico dos polimorfos I e II do EFZ (MAHAPATRA et al., 2010 e RAVIKUMAR et al., 2009).

Figura 19 – Difratogramas dos polimorfos I e II do EFZ.



Fonte: Autoria própria.

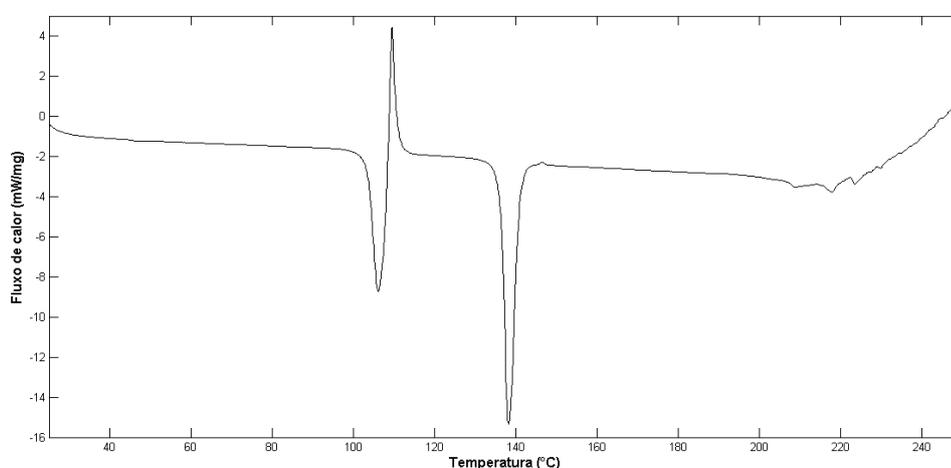
Na Figura 19 estão os difratogramas obtidos dos polimorfos I e II do EFZ utilizados neste trabalho, o perfil está em concordância ao que é encontrado na literatura. Ambos os difratogramas são típicos de substâncias cristalinas e são bastante diferentes. O polimorfo I apresenta pico característico em $6,1^\circ$, que é inexistente no difratograma do polimorfo II.

Enquanto que o polimorfo II apresenta pico intenso característico em 11,72°, e picos em 27,38° e em 28,28° que não aparecem no difratograma do polimorfo I.

5.2.3 DSC

A curva DSC da amostra de EFZ apresentou três eventos: dois são endotérmicos e um exotérmico (Figura 19).

Figura 20 – Curva DSC do polimorfo II do EFZ.



Legenda: PF = Ponto de fusão. Fonte: Autoria própria.

O primeiro evento ocorreu de 103,65°C a 107,81°C (pico em 106,05°C) e é característico do ponto fusão do polimorfo II (FANDARUFF et al., 2014). Logo, em seguida, um segundo evento com pico em 109,47°C, é correspondente à liberação de energia devido à transição de um estado mais energético para um estado de menos energético, essa etapa se caracteriza como a recristalização do polimorfo II em polimorfo I. O terceiro evento ocorreu de 136,56°C a 140,74°C com pico em 138,16°C, como o ponto de fusão do EFZ deve estar entre 136 e 141°C, esse pico é característico do polimorfo I (BRASIL, 2010b).

A curva DSC apresentada por Fandaruff (2016) apresentou apenas dois picos endotérmicos com valores próximos aos encontrados (105,52°C e 137,2°C), enquanto o pico exotérmico não foi evidenciado.

5.2.4. Polarimetria

A análise da polarimetria é importante para verificar a ocorrência de transformação enantiomérica do polimorfo II do EFZ durante o processo de recristalização. É considerado

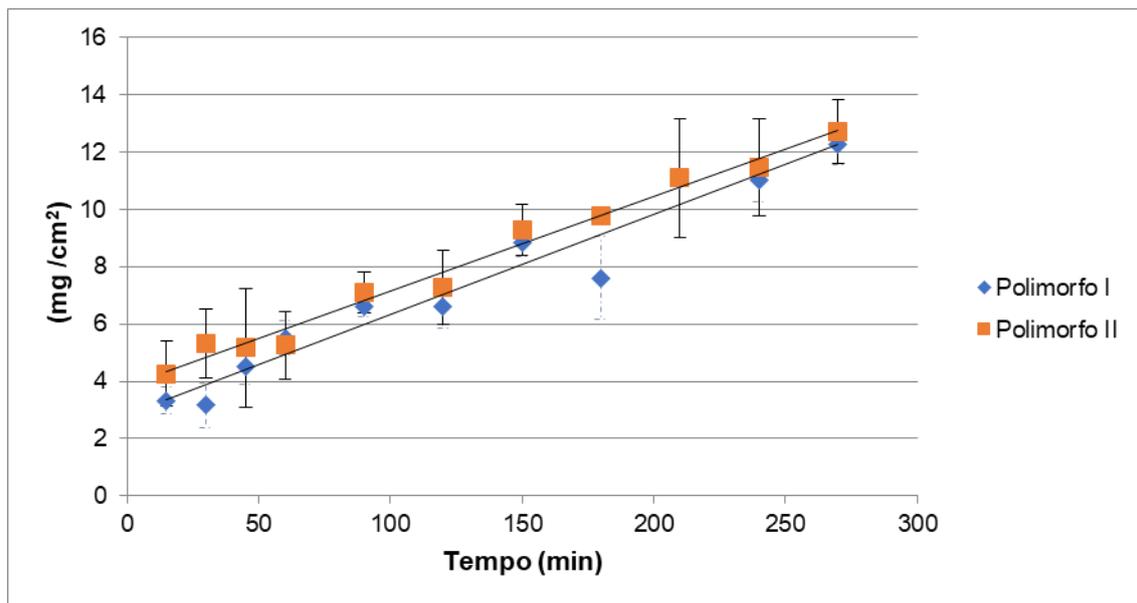
que apenas o enantiômero S possui atividade farmacológica, sendo o enantiômero R considerado uma impureza (YOUNG et al., 1995; SOUZA, 2015).

A rotação específica obtida das amostras analisadas foi de -101° para o polimorfo I e de -96° para o polimorfo II. De acordo com a monografia da Farmacopeia Brasileira (2010), o valor deve estar entre -86° e -98° , portanto a cristalização não resultou em conversão enantiomérica.

5.2.5. Dissolução intrínseca

Como pode ser observado na Figura 21, os perfis de dissolução das duas formas polimórficas não são muito diferentes, sendo liberados em 5h, $12,29 \text{ mg.cm}^{-2}$ e $12,72 \text{ mg.cm}^{-2}$ de EFZ pelo polimorfo I e II, respectivamente. Pinto e colaboradores (2014) utilizando o mesmo método de dissolução encontrou valor similar, $11,53 \text{ mg.cm}^{-2}$.

Figura 21 – Gráfico de dissolução intrínseca dos polimorfos I e II do EFZ.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 – Parâmetros da dissolução intrínseca.

Amostra	Equação	R ²	VDI (mg.cm ⁻² .min ⁻¹) ± DP
Polimorfo I	$y = 0,0331x + 3,8296$	0,9841	$0,0331 \pm 0,0037$
Polimorfo II	$y = 0,0349x + 2,8474$	0,9904	$0,0349 \pm 0,0037$

Legenda: R²: Coeficiente de determinação; DP: Desvio padrão (n = 3); VDI: Velocidade de dissolução intrínseca. Fonte: Autoria própria.

O valor da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) encontrado na literatura de $0,0369 \pm 0,0007 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ também foi similar ao encontrado para os polimorfos I e II (Tabela 10).

Fandaruff (2016) descreveu método de dissolução intrínseca utilizando 200 mL de meio contendo 0,25% LSS e aparato disco rotatório a 75 rpm. Este método evidenciou diferenças entre os perfis de dissolução intrínseca dos dois polimorfos. Em 5h, aproximadamente, 3 mg.cm^{-2} e de 15 mg.cm^{-2} de EFZ pelo polimorfo I e II, respectivamente, foram liberados. A VDI também evidenciou diferenças, foi de $0,009 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ para o polimorfo I e de $0,149 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ para o polimorfo II. Segundo a autora, o uso de concentrações de LSS acima de 0,25% (m/v) não permite discriminar os polimorfos analisados.

Dessa forma, foi testado o uso de LSS a 0,25%, no entanto utilizando o volume de meio de dissolução de 900 mL, pois para que os resultados sejam reprodutíveis seria necessário de uma cuba e de aparatos de dissolução de tamanho proporcional. As VDIs da dissolução com 0,25% LSS foram de $0,018 \pm 0,002 \text{ mg.cm}^{-2}$ para o polimorfo I e de $0,021 \pm 0,002 \text{ mg.cm}^{-2}$ para o polimorfo II. Portanto, não havendo diferenças significativas entre os polimorfos nas condições testadas, mas para constatar o desempenho o mesmo método utilizado pelos trabalhos de Fandaruff deveriam ser utilizados (FANDARUFF et al., 2014; FANDARUFF, 2016).

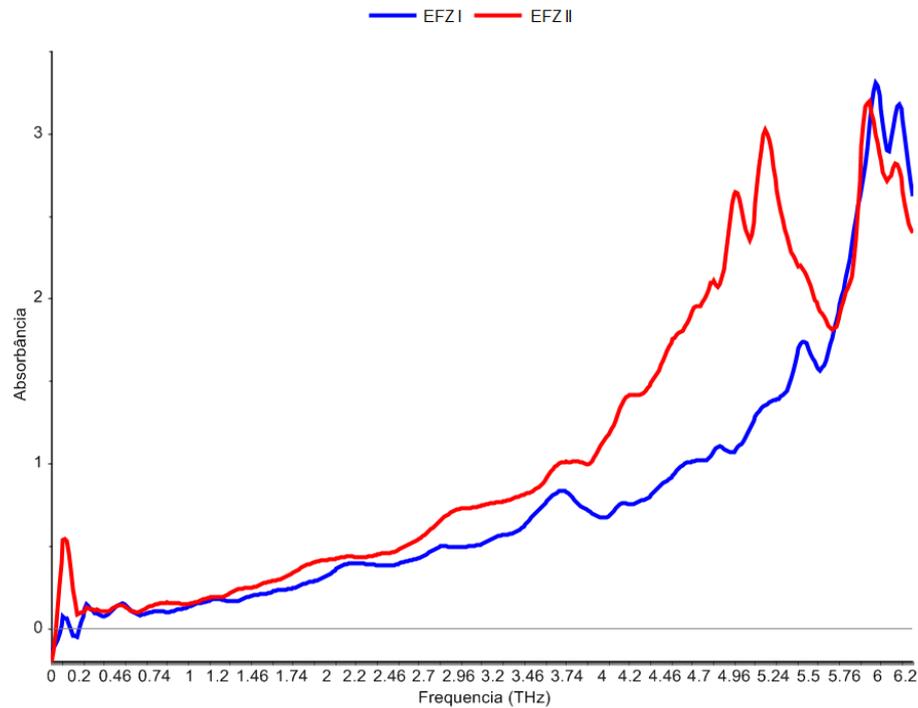
5.2.6 Espectroscopia THz

Os espectros obtidos nas análises dos polimorfos de EFZ estão apresentados na Figura 22. Foram observadas bandas características de PTFE em 3,7; 6 e 6,2 THz, enquanto a região abaixo de 0,2 THz são característicos de artefatos do equipamento e não tem informação da amostra.

Os espectros parecem exibir bandas distintas na região entre 0,74 e 3,46 THz, apesar de possuírem baixa intensidade. A diferença mais evidente são as bandas em 5 e 5,24 THz, bem intensas para o polimorfo II.

Devido a pouca disponibilidade de amostra, os resultados mostrados foram obtidos a partir de pastilha de PTFE com uma massa menor (200 mg) e em concentração menor (9% m/m de EFZ) do que o comumente utilizado (300 mg a 15% m/m de analito). Dessa forma, devem ser realizadas novas análises utilizando a preparação de amostra padrão.

Figura 22 – Espectros dos polimorfos I e II do EFZ nas faixas espectrais de THz.



Fonte: Autoria própria.

5.2.7 Desenvolvimento de método de quantificação polimórfica

5.2.7.1 MID

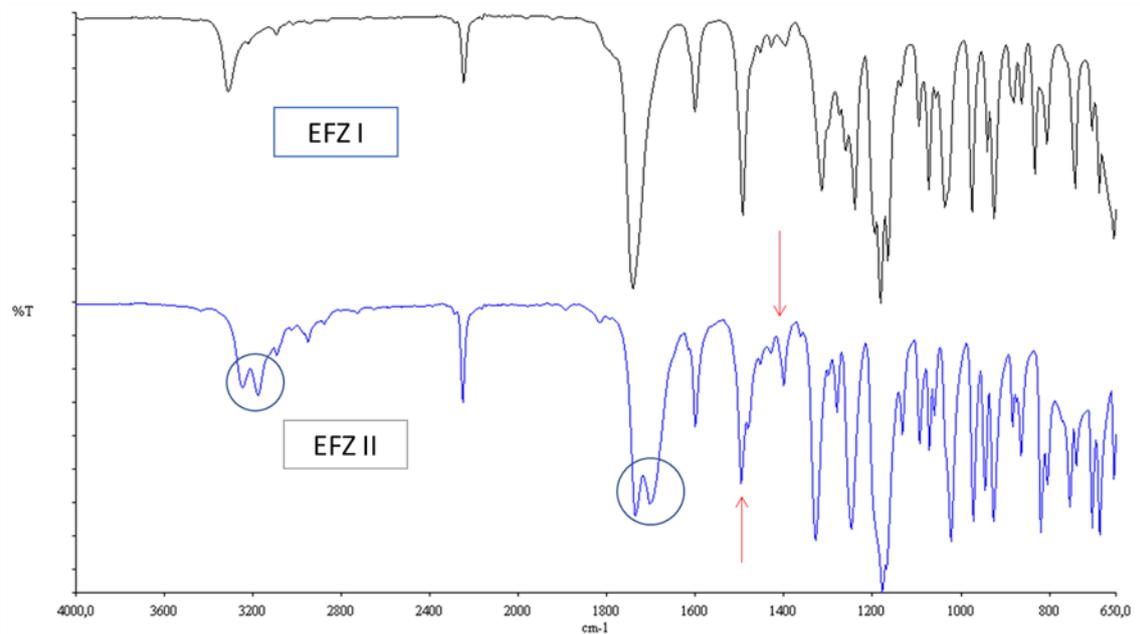
Como pode ser observada na Figura 23, a análise dos polimorfos resulta em espectros bem diferentes de acordo com o encontrado na literatura (FANDARUFF et al., 2014; FANDARUFF, 2016).

As bandas que se destacam na diferenciação dos polimorfos por aparecimento de banda dupla estão localizadas na região de:

-3300 cm^{-1} : corresponde a deformação axial N-H.

-1740 cm^{-1} : corresponde a deformação axial de C=O.

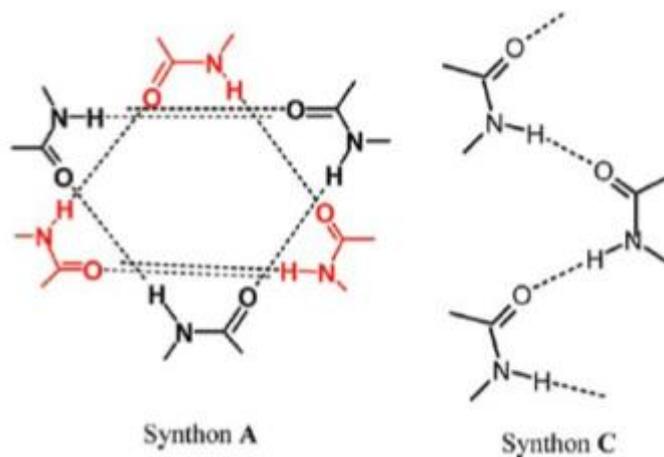
Figura 23 - Espectros de MID dos polimorfos I e II do EFZ.



Fonte: Autoria própria.

Essas diferenças dos dois grupos funcionais podem estar relacionadas às interações intermoleculares da estrutura unitária do cristal (*synthon*). Como pode ser observado na Figura 24, o EFZ se organiza no polimorfo I como *synthon A* e no polimorfo II como *synthon C*. As interações principais ocorrem entre o oxigênio da carbonila e o hidrogênio ligado ao nitrogênio.

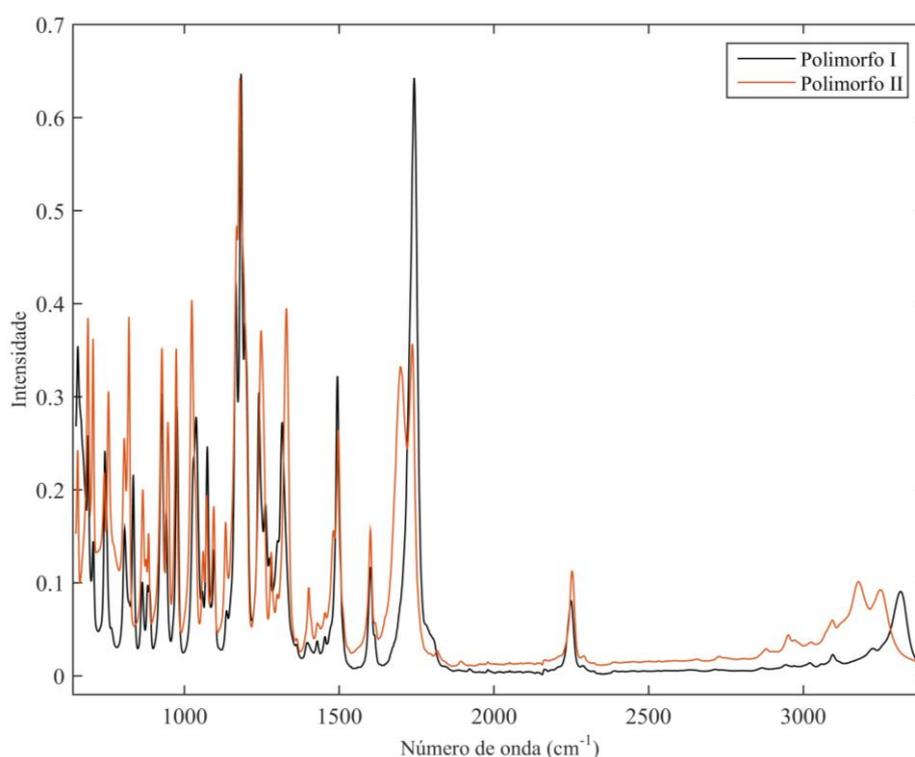
Figura 24 - Estruturas dos *synthons* A e C do EFZ.



Fonte: FANDARUFF et al., 2014.

Segundo Marques et al. (2017), o aparecimento de um segundo pico correspondente a carbonila poderia ser explicado pela dimerização do composto. Além disso, os pesquisadores afirmam que a diferença de intensidade do pico da carbonila nos polimorfos, pode ser devido ao modo de organização dos *synthons* nas células unitárias. O *synthon* A (polimorfo I) formaria uma hélice dupla, o que aproximaria mais as carbonilas, aumentando a intensidade do sinal (Figura 25).

Figura 25 - Espectros MID sobrepostos dos polimorfos I e II do EFZ.



Fonte: Autoria própria.

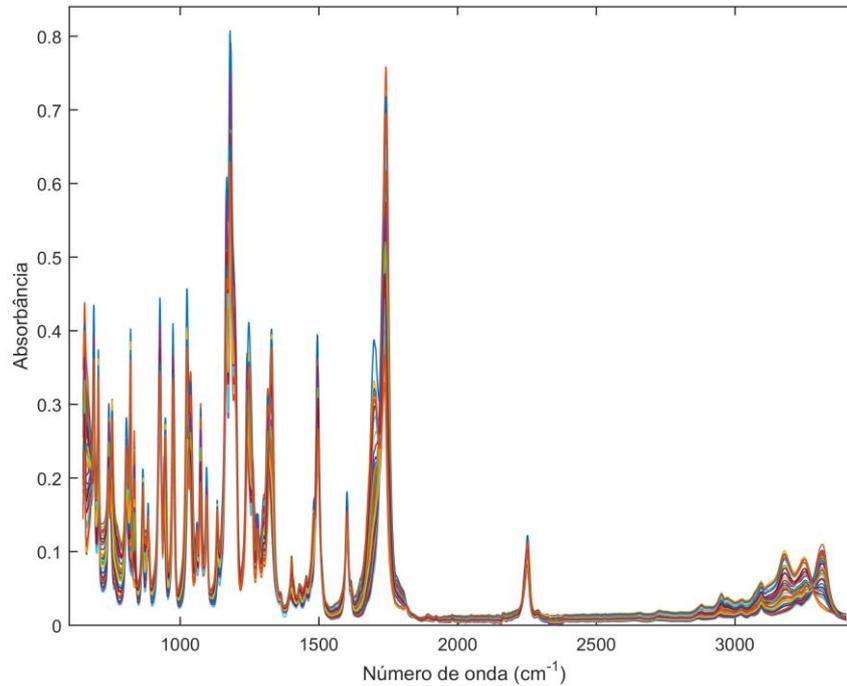
Ocorrem ainda outras diferenças nos espectros que vão da região de 1600 a 650 cm^{-1} , característico de vibrações de grupos referentes ao anel aromático e aos halogênios presentes na molécula (SOUZA, 2015).

Após a observação das principais diferenças encontradas nos polimorfos, foram realizadas as análises das misturas polimórficas, obtendo os espectros mostrados na Figura 26. Os espectros tiveram os de valores transmitância transformados em absorbância, pois este é o modo mais comum de utilizar os dados empregados para desenvolver métodos quantitativos.

Claramente as diferenças polimórficas podem ser observadas com um gradual aparecimento/desaparecimento da segunda banda da carbonila, na região por volta de 1700

cm^{-1} . No entanto, a visualização de vários espectros sobrepostos nesta e em outras regiões, demonstra a necessidade da aplicação de método para correção do espalhamento.

Figura 26 - Espectros MID obtidos da análise de misturas polimórficas de EFZ.



Fonte: autoria própria.

Tabela 11 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando MID.

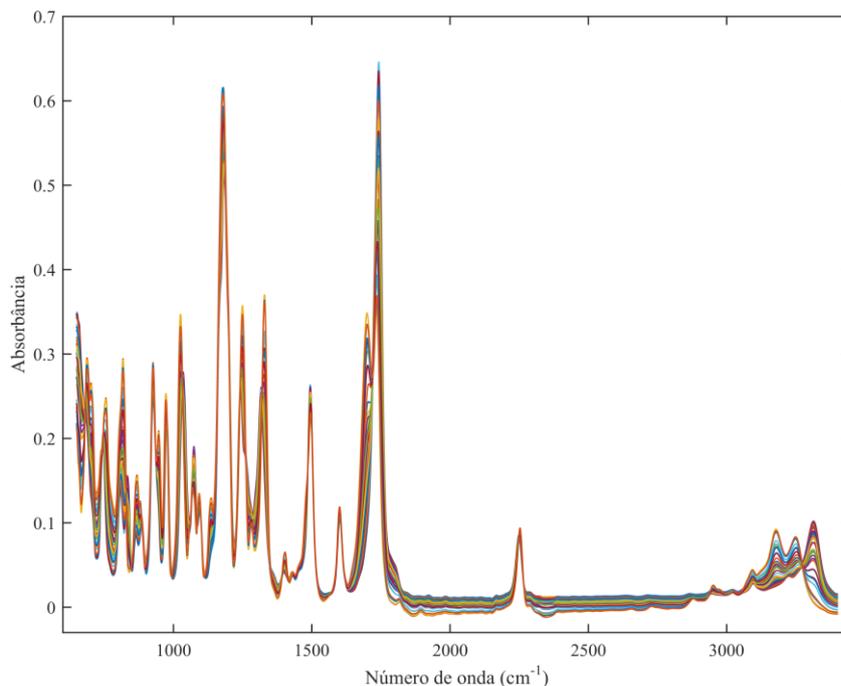
Pré-processamentos	Modelos	R^2	RMSE	Bias
Suavização + SNV	CV	0,97	5,4 (4)	0,2
	Pred	0,98	4,7	-0,9
Suavização + MSC	CV	0,97	5,4 (3)	0,4
	Pred	0,98	4,3	-0,7
1ª derivada	CV	0,98	6,2 (4)	0,5
	Pred	0,98	4,5	-0,9
2ª derivada	CV	0,97	5,8 (6)	0,3
	Pred	0,98	4,4	-1,0

*Os valores em parênteses são o número de variáveis latentes. Fonte: autoria própria.

Sendo assim, alguns métodos de pré-processamento foram testados e os valores obtidos dos modelos PLS construídos estão listados na Tabela 11. Como pode ser observado, o modelo que resultou em valores mais adequados foi o que utilizou suavização e MSC, já que este modelo foi explicado por menor número de variáveis latentes. Em relação aos valores de RMSE e *bias*, não houveram diferenças significativas entre esta forma de pré-processamento e o que utilizou Suavização e SNV.

Na Figura 27, pode ser observado que o MSC corrigiu o espalhamento em várias regiões espectrais. Após definir o modelo mais adequado, foram aplicados métodos de seleção de variáveis.

Figura 27 - Espectros MID, após aplicação de suavização (janela de 15 pontos) e MSC.

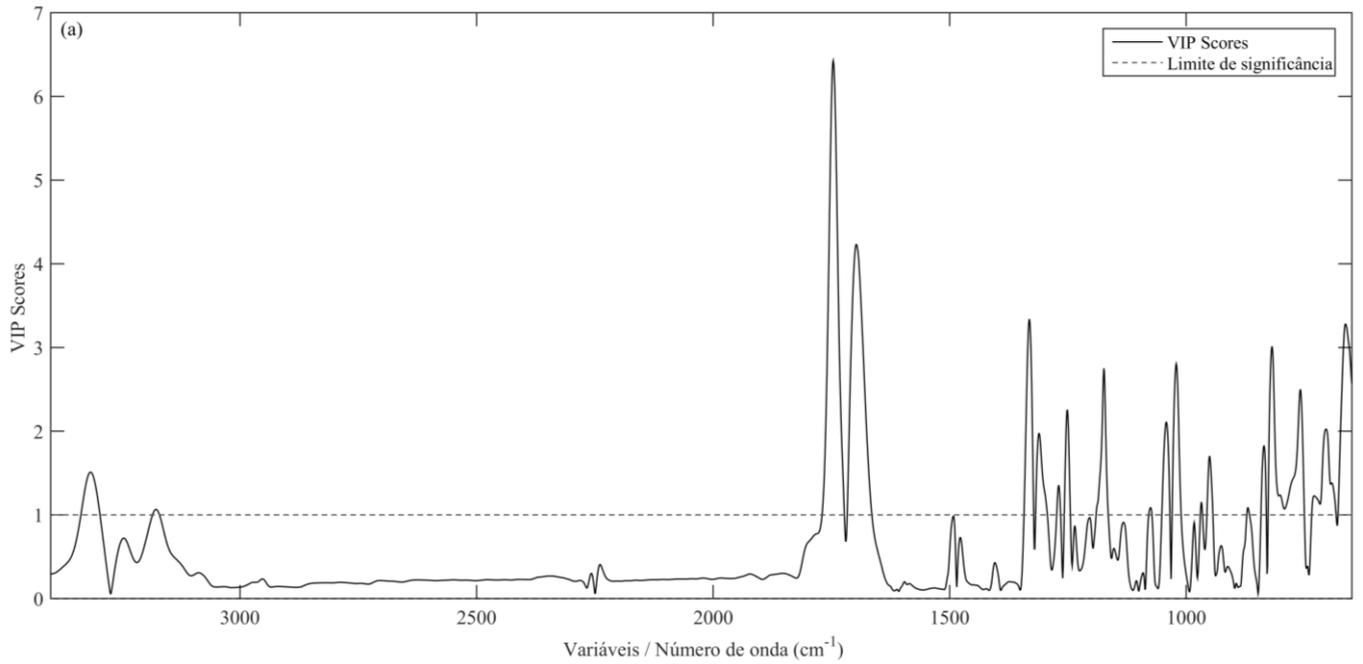


Fonte: autoria própria.

O método de VIP scores não trouxe melhoria aos modelos PLS, mas a sua aplicação auxiliou na interpretação dos espectros. A aplicação de VIP gerou um gráfico que pode ser observado na Figura 28.

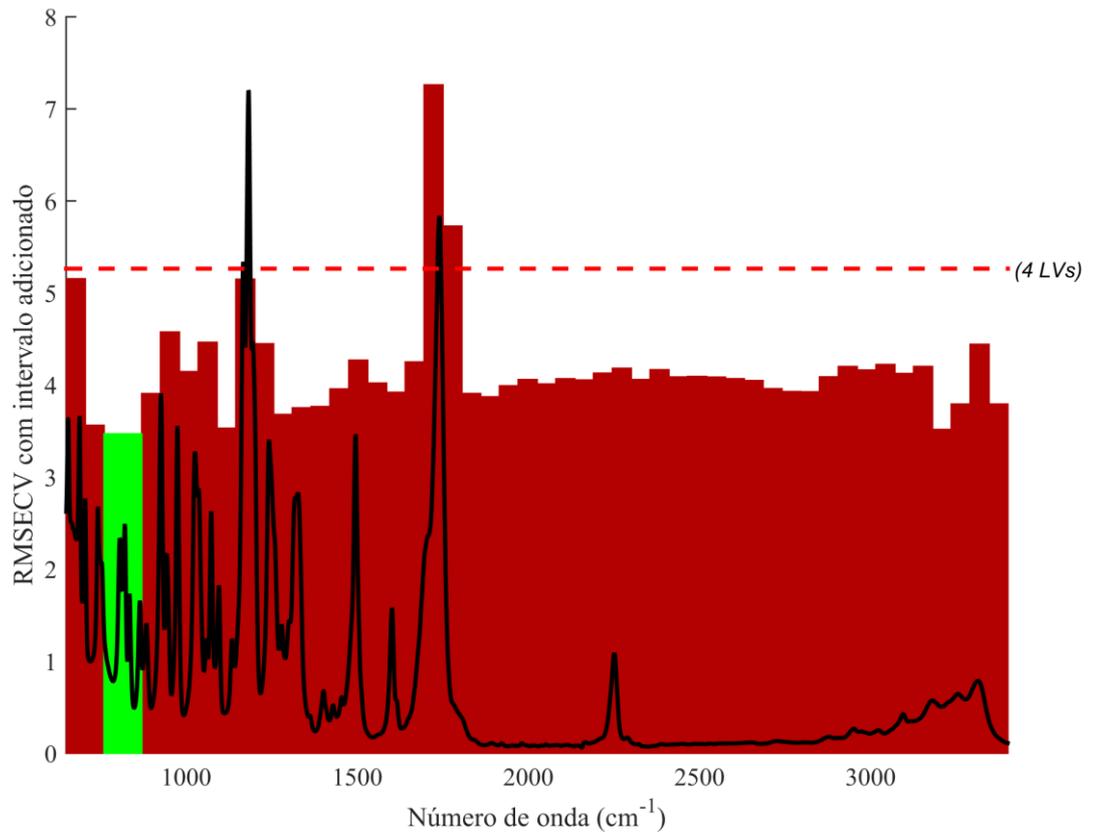
As bandas consideradas mais relevantes pelo VIP scores foram as vibrações de nitrogênio, a carbonila do grupo amida e os carbonos dos anéis. Enquanto vibrações de átomos de flúor e cloro não foram considerados relevantes para a construção do modelo. Com o uso de VIP scores, o número de variáveis foi reduzido de 2751 para 167.

Figura 28 - Gráfico de VIP scores obtido para o modelo utilizando o MID.



Fonte: autoria própria.

Figura 29 - Resultados do iPLS para os espectros MID.

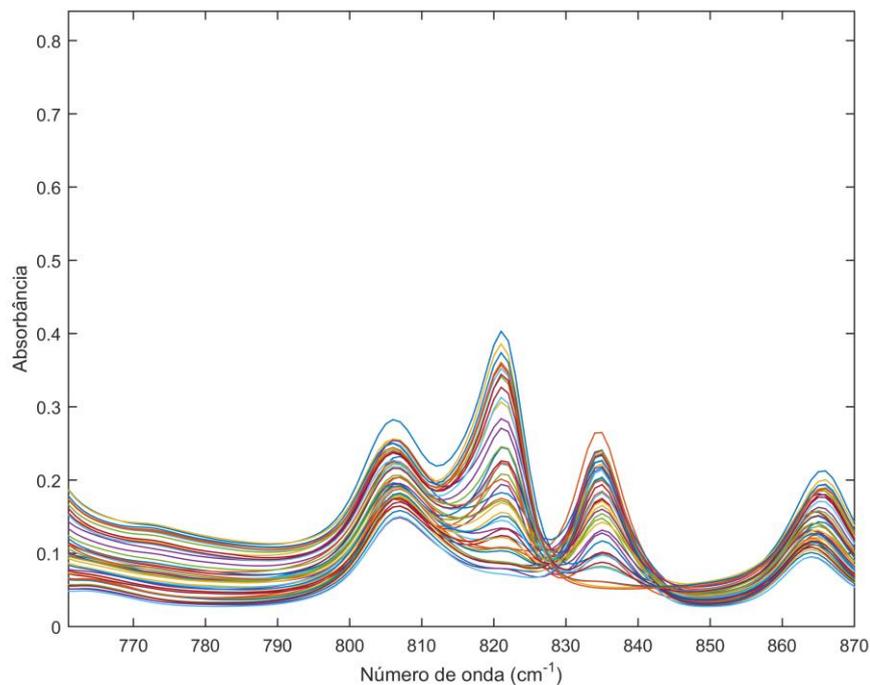


Legenda: região espectral selecionada (cor verde) e excluída (cor vermelha). Fonte: autoria própria.

Para a aplicação de iPLS aos espectros MID, foi utilizado o valor 55 como tamanho de intervalo. Como resultado, o iPLS selecionou uma região de *fingerprint* de 870 a 761 cm^{-1} , que caracteristicamente representa área de vibrações de CH fora do plano do tipo *bending* advindas de alquenos, alquinos ou grupos aromáticos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005) (Figura 29).

Analisando os espectros (Figura 30), três bandas específicas do ciclopropil são encontradas nesta área para o polimorfo I: 864 cm^{-1} (vibrações de ligações de carbono e hidrogênio), 835 cm^{-1} e 807 cm^{-1} (vibrações de CH_2 do tipo *rocking*) (Marques et al., 2017). O polimorfo II difere apenas na ocorrência de bandas em 821 cm^{-1} ao invés de em 835 cm^{-1} , o que pode ser causado pelas diferentes disposições espaciais dos polimorfos.

Figura 30 - Região espectral selecionada pelo iPLS para os espectros MID.



Fonte: autoria própria.

Quando aplicada essa restrição ao comprimento de onda, houve uma leve melhora dos parâmetros, diminuição dos erros de predição para em torno de 4% m/m e o número de variáveis latentes foi reduzido a 2. O teste F (com um nível de 95% de confiança) foi realizado e o RMSEP (4,1) dos modelos iPLS não foi considerado diferente estatisticamente comparando com o RMSEP sem seleção de variáveis, mas a diminuição do valor do RMSECV (3,9) foi considerada estatisticamente significativa.

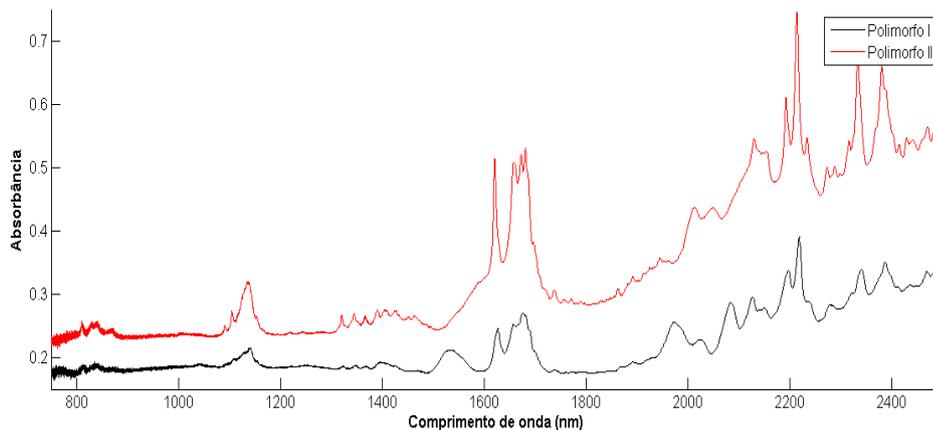
5.2.7.2 NIR

5.2.7.2.1 Instrumento de bancada

As análises realizadas nas amostras de EFZ (Figura 31) evidenciaram bandas que, segundo Stuart (2004), podem ser identificadas como:

- Sobretom de estiramento N-H: 800 a 850 nm;
- 2º sobretom de estiramento C-H: 1100 a 1200 nm;
- Bandas de combinação de estiramento C-H: 1300 a 1420 nm;
- Sobretom de amida secundária: 1350 a 1550 nm;
- 1º sobretom de estiramento C-H: 1600 a 1800 nm;
- Bandas de combinação de amida secundária: 1990 a 2250 nm;
- Bandas de combinação de estiramento C-H: 2200 a 2450 nm;

Figura 31 - Espectros NIR dos polimorfos I e II do EFZ obtidos a partir do espectrômetro de bancada.

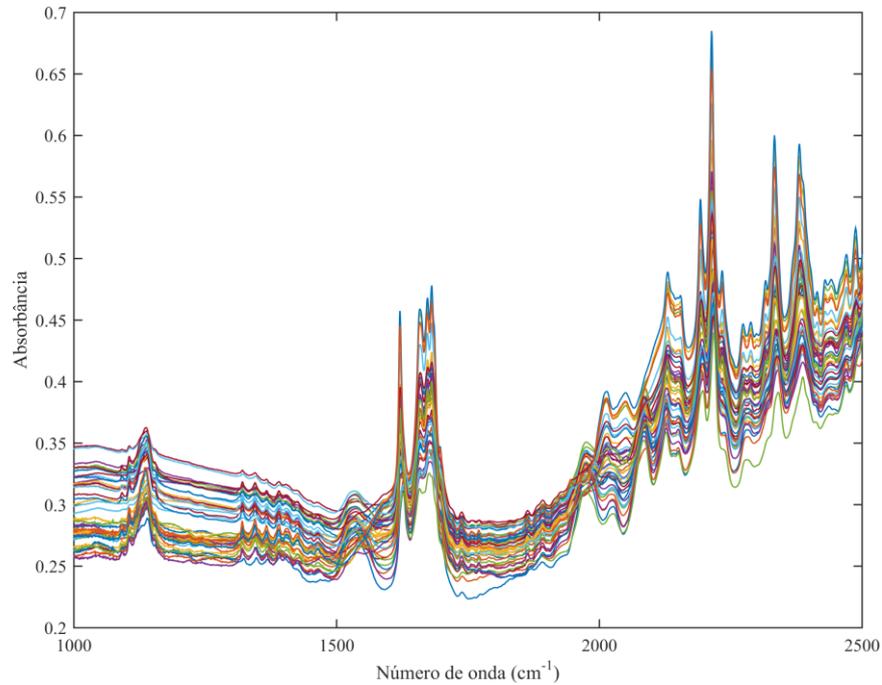


Fonte: Autoria própria.

Após verificar as principais diferenças relacionados aos dois polimorfos nos espectros NIR, fez-se a análise da mistura polimórfica (Figura 32). Pode-se observar que seria necessário a aplicação de técnicas de pré-processamento para corrigir o efeito de espalhamento, além do uso de suavização para redução de ruídos em algumas regiões. A linha de base também apresentou inclinações nas extremidades, a aplicação de derivações poderia ser utilizada. Dessa forma, foram testadas técnicas de pré-processamento (Tabela 12). Ao realizar, teste F nos parâmetros, foram considerados estatisticamente diferentes (95% de confiança) os valores *bias* dos pré-processamentos que utilizaram MSC e SNV. Os modelos mais adequados, então, foram os que utilizaram derivada, pois os valores de *bias* são

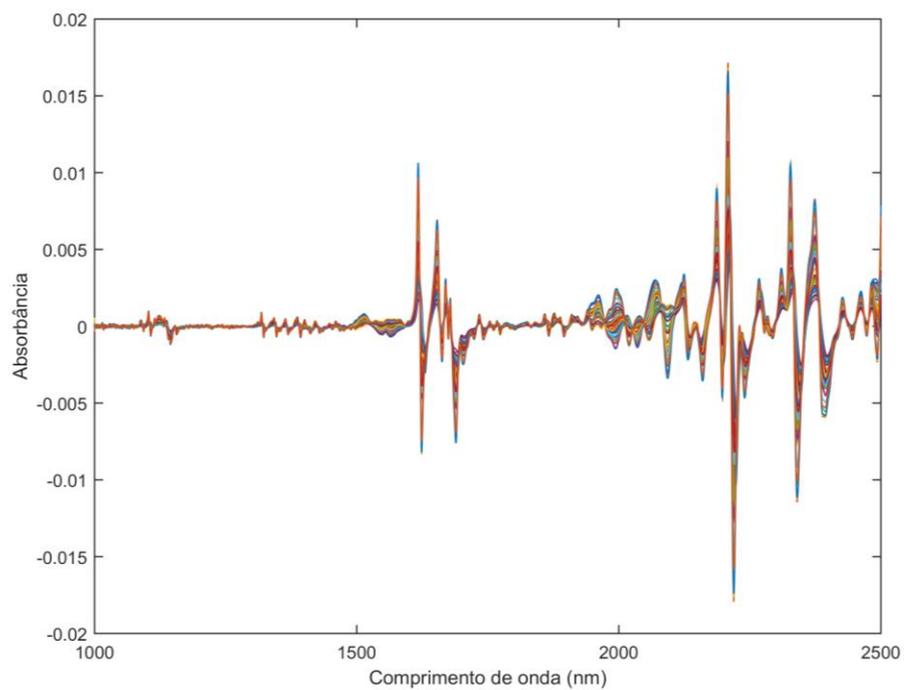
próximos a zero, o RMSEP e o RMSECV são semelhantes, em torno de 5% (m/m), os espectros derivados podem ser observados na Figura 33.

Figura 32 - Espectros NIR do instrumento de bancada de misturas polimórficas de EFZ.



Fonte: Autoria própria.

Figura 33 - Espectros NIR após aplicação da primeira derivada.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando NIR de bancada.

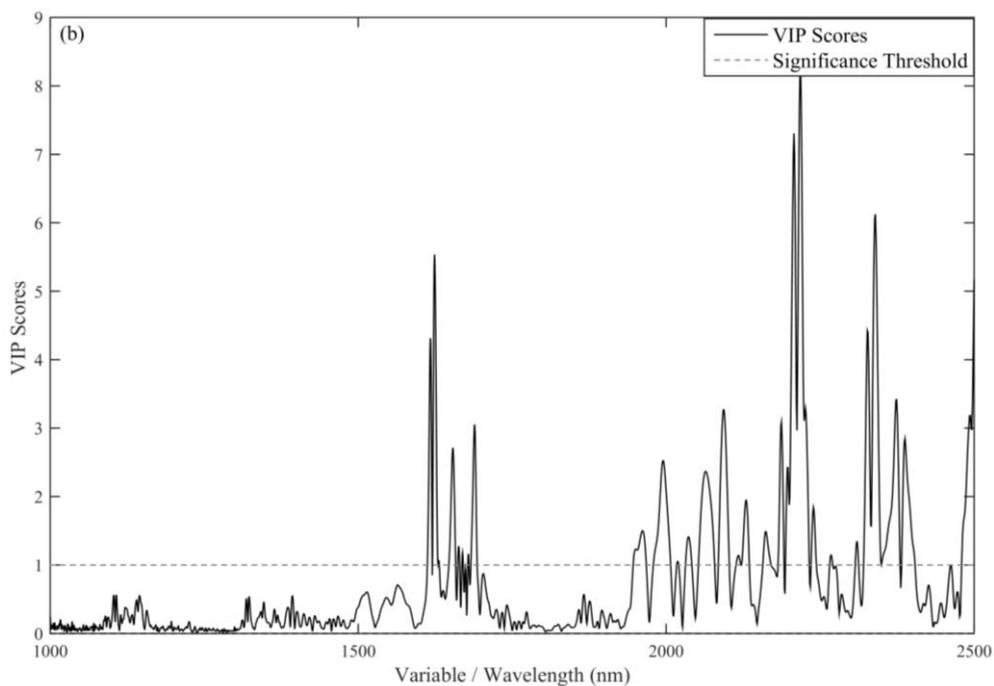
Pré-processamentos	Modelos	R ²	RMSE	Bias
Suavização + SNV	CV	0,97	5,8 (3)	0,1
	Pred	0,98	4,4	1,5
Suavização + MSC	CV	0,97	5,7 (3)	0
	Pred	0,97	4,8	1,0
1ª derivada	CV	0,97	5,0 (5)	-0,2
	Pred	0,97	5,5	0,1
2ª derivada	CV	0,96	5,8 (4)	0
	Pred	0,96	5,7	0

*Os valores em parênteses são o número de variáveis latentes.

Após o estabelecimento do pré-processamento, foi realizada a seleção de variáveis.

Com o uso de VIP scores as variáveis foram reduzidas de 3001 para 32. As regiões que foram selecionadas como importantes foram referentes ao primeiro sobretom de CH, o grupo aril-CH e as regiões de combinação NH, CH e CH₂ (Figura 34).

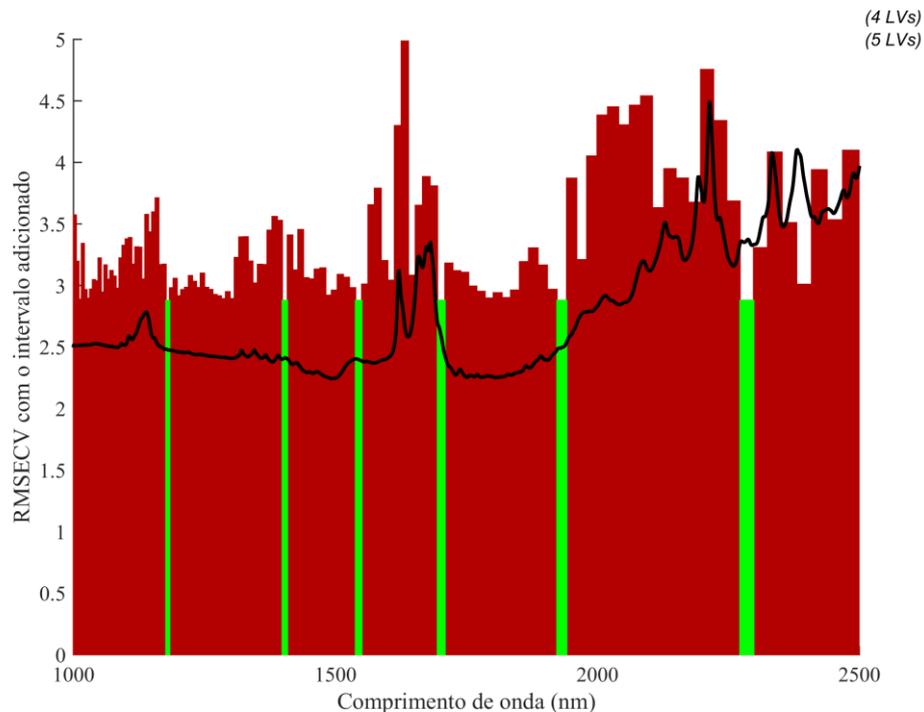
Figura 34 - Gráfico de VIP scores referente aos espectros NIR de bancada.



Fonte: Autoria própria.

Para o método iPLS, foi utilizado um intervalo com tamanho 25, o que resultou em cinco intervalos, um deles a 1183-1176 nm, sem qualquer informação espectral (Figura 35). Os outros intervalos selecionados foram de regiões de combinação de vibrações de C-H (1398-1408 nm), do metino (1538-1550 nm), estiramento de primeiro sobretom de CH (1695-1709 cm^{-1}), primeiro sobretom de CH (1695-1709), combinação de NH (1923-1940 nm) e combinação de CH e CH_2 do anel aromático (2274-2298 nm) (STUART, 2004; WORKMAN; WEYER, 2007). O modelo obtido desses intervalos não melhorou os parâmetros, pois os valores de RMSECV e RMSEP não ficaram próximos, indicando a possível ocorrência de sobreajuste.

Figura 35 - Resultados do iPLS para os espectros NIR de bancada.

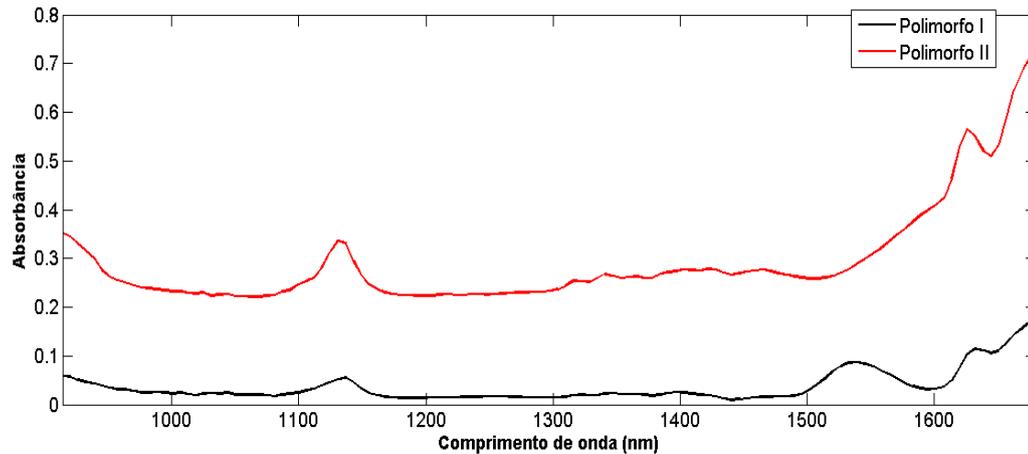


Legenda: região espectral selecionada (cor verde) e excluída (cor vermelha). Fonte: Autoria própria.

5.2.7.2.2 Instrumento portátil

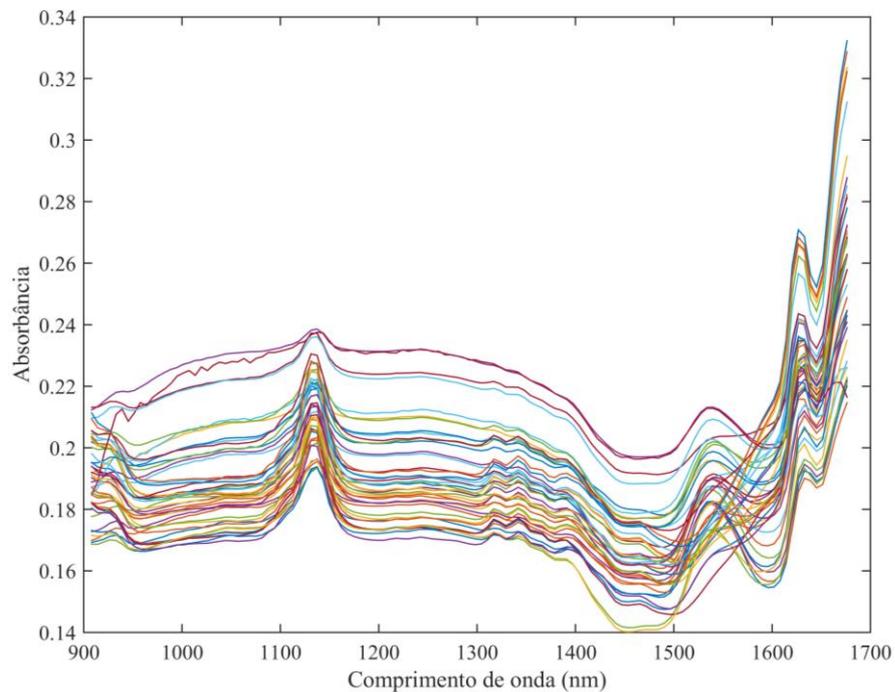
O uso do espectrômetro portátil permite maior facilidade de uso como ferramenta de monitoramento em tempo real, podendo ser utilizado na implementação de Tecnologia Analítica de Processos - PAT (do inglês, *Process Analytical Technology*) na indústria farmacêutica. Além do mais, o custo é bem inferior aos equipamentos de bancada. Sendo assim, as amostras também foram analisadas em equipamento portátil (Figura 36).

Figura 36 - Espectros NIR dos polímeros I e II do EFZ obtidos do espectrômetro portátil.



Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Espectros das misturas polimórficas do EFZ obtidos em NIR portátil.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros do equipamento portátil foram semelhantes aos obtidos no equipamento de bancada, com exceção da região entre 1300 a 1450 nm que não evidenciou os picos observados no equipamento de bancada. Apesar de realizar análise em um intervalo espectral menor, o equipamento conseguiu diferenciar os polímeros. Procedeu-se então a análise nas misturas polimórficas (Figura 37).

Como pode ser visto, há a necessidade de correções do mesmo tipo que o equipamento de bancada: correção de espalhamentos e de linha de base. Os pré-processamentos podem ser observados na Tabela 13, os métodos por derivada mostraram os melhores resultados para os parâmetros estimados, não havendo diferença estatística (95% de confiança) entre a primeira e a segunda derivada, além disso apesar do *bias* elevado, este não foi considerado estatisticamente relevante. Foi escolhida, então a primeira derivada, pois foi o pré-processamento utilizado no equipamento de bancada. Os espectros após pré-processamento podem ser observados na Figura 38.

Tabela 13 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando NIR portátil.

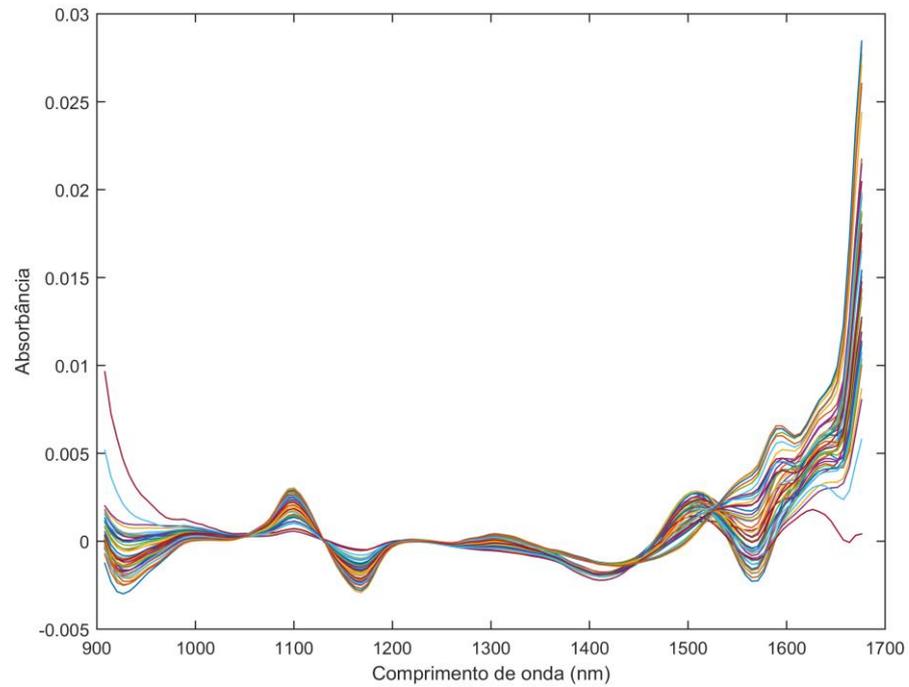
Pré-processamentos	Modelos	R ²	RMSE	Bias
Suavização + SNV (excl. 2val)	CV	0,94	7,6 (5)	0,1
	Pred	0,96	6,7	3,1
Suavização + MSC (excl. 2val)	CV	0,95	7,1 (4)	-0,1
	Pred	0,98	4,2	1,2
1ª derivada (excl. 2val)	CV	0,97	5,5 (4)	-0,1
	Pred	0,98	5,1	1,6
2ª derivada (excluded 2val)	CV	0,97	5,5 (4)	-0,1
	Pred	0,98	5,3	1,4

*Os valores em parênteses são o número de variáveis latentes.

Após estabelecer o modelo PLS adequado, foram testados os métodos de seleção de variáveis.

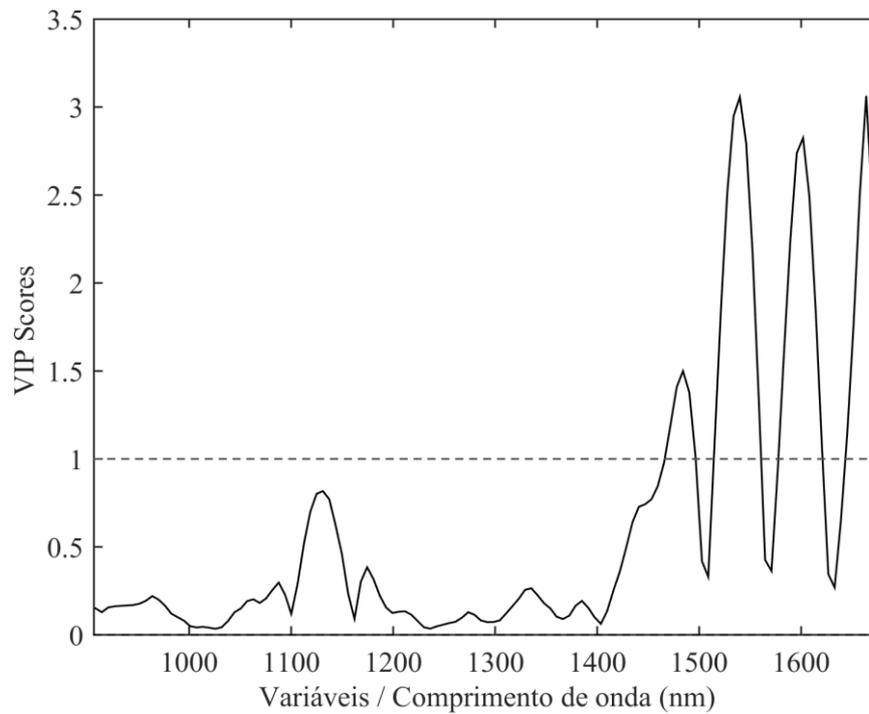
O NIR portátil possui o menor número de variáveis dentre os equipamentos testados, são apenas 125 variáveis e com VIP scores, esse número foi reduzido a 26. A área selecionada (1470 a 1678 nm) pelo VIP scores (Figura 39) abrange o primeiro sobretom dos grupos CH e aril-CH.

Figura 38 - Espectros do NIR portátil após da aplicação de pré-processamento de primeira derivada e SNV.



Fonte: Autoria própria.

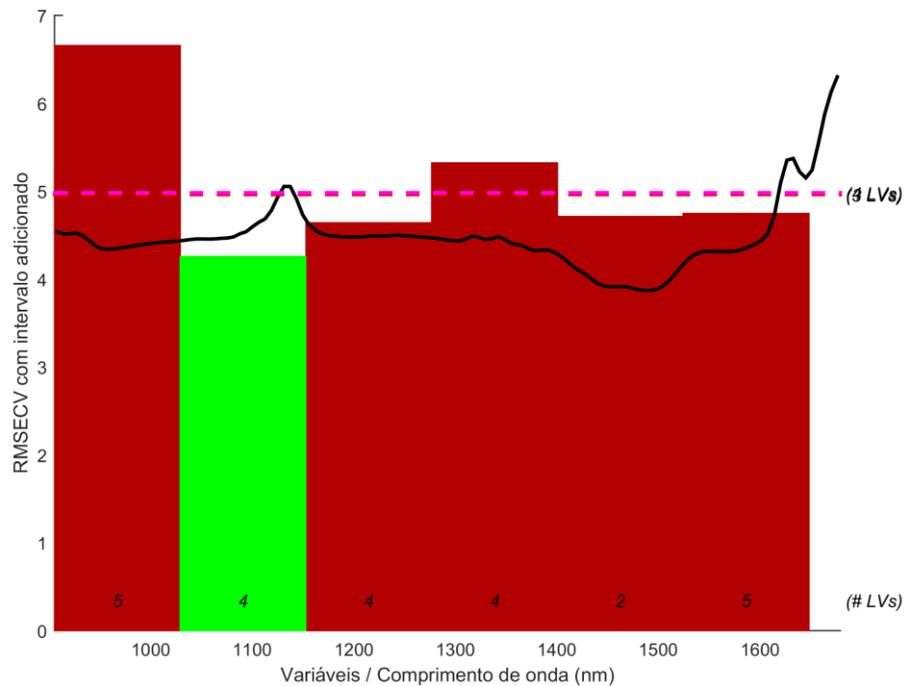
Figura 39 - Gráfico de VIP scores obtido a partir do NIR portátil.



Fonte: Autoria própria.

Para o iPLS, foi considerado importante apenas um intervalo, usando 20 como tamanho de intervalo: 1029-1153 nm (região de segundo sobretom de CH) (Figura 40). O iPLS não melhorou o modelo.

Figura 40 - Gráfico de iPLS gerado a partir do modelo obtido do NIR portátil.



Legenda: região espectral selecionada (cor verde) e excluída (cor vermelha). Fonte: Autoria própria.

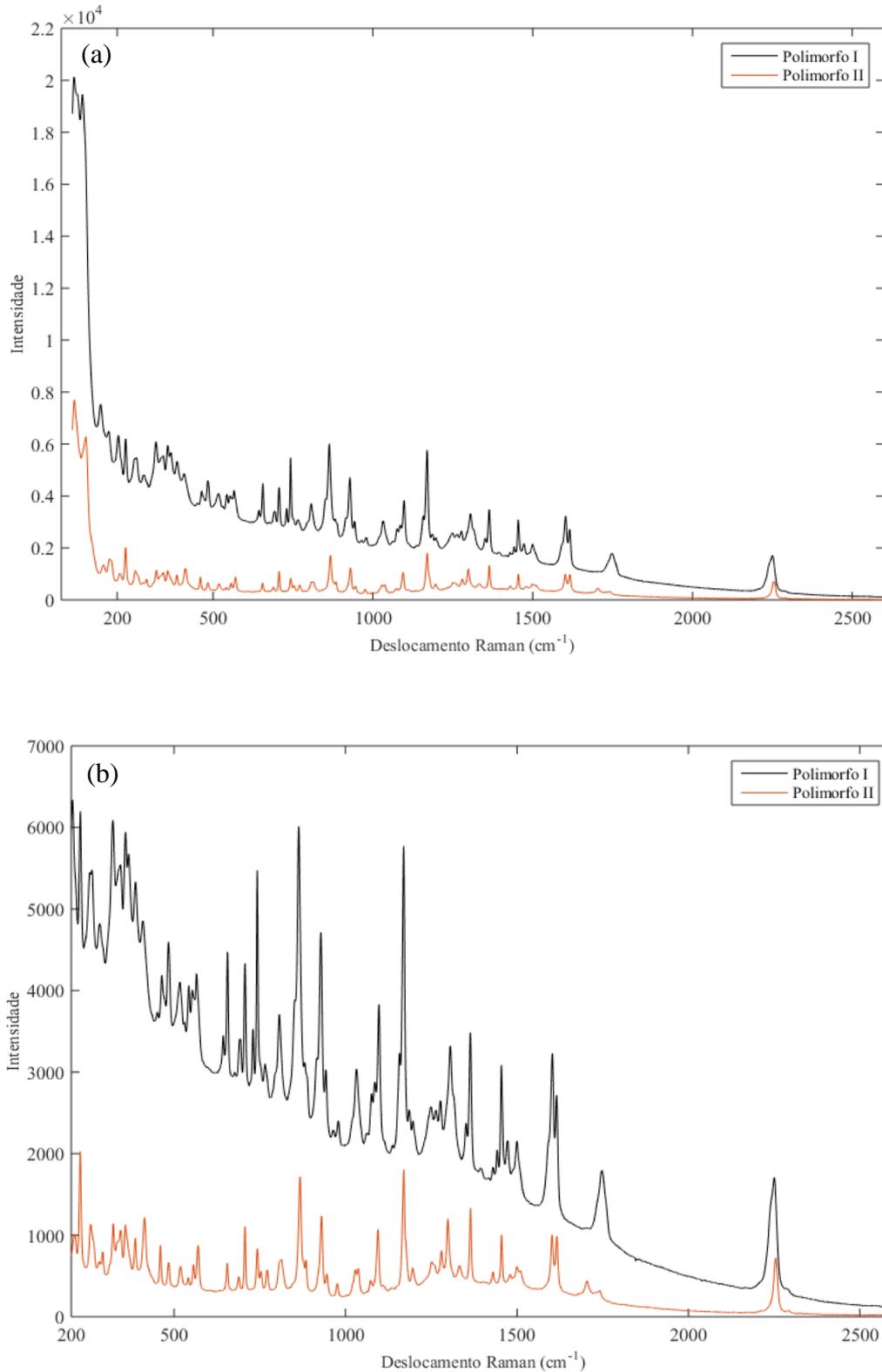
5.2.7.3 Espectroscopia Raman

5.2.7.3.1 Instrumento de bancada

Os espectros Raman (Figura 41) apresentaram alteração de linha de base que foi posteriormente corrigida por ALS.

O formato é similar ao descrito por Fandaruff e colaboradores (2014) e as diferenças de cada polimorfo são notadas na intensidade e na forma das bandas. Uma das particularidades, são as duas bandas mostradas por volta de 1740 cm^{-1} no espectro do polimorfo II, enquanto o polimorfo I mostra apenas uma banda na região ($\sim 1752\text{ cm}^{-1}$), o que corresponderia a deformação do grupo amida e estiramento do anel aromático (Marques et al., 2017).

Figura 41 - Espectro Raman obtido do espectrômetro de bancada.



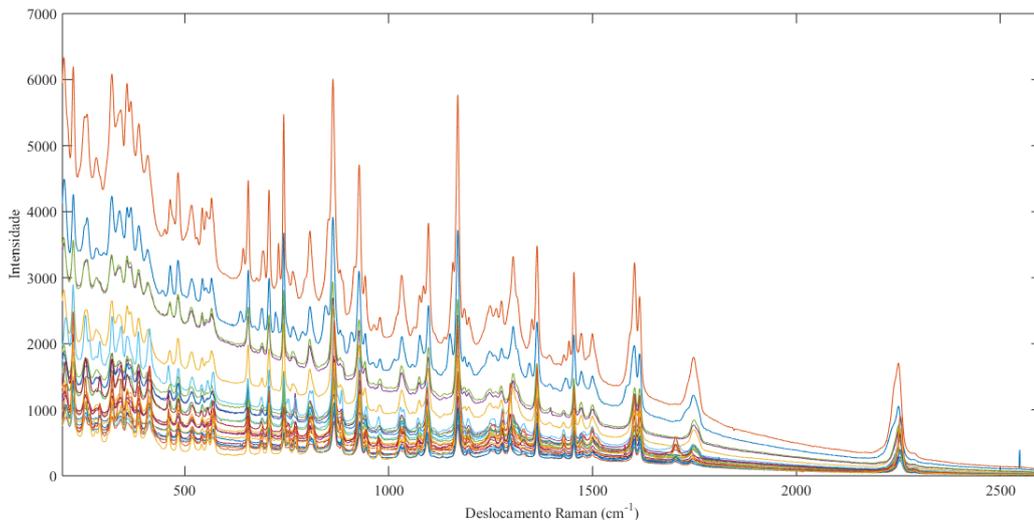
Fonte: autoria própria.

Como pode ser observado na Figura 41a, a banda abaixo de 200 cm^{-1} , está com um sinal muito intenso. Como a literatura não descreve vibração importante para essa região

(FANDARUFF et al., 2014; MARQUES et al., 2017), assumiu-se que a inclusão dessa banda poderia dar menor confiabilidade ao modelo, então ela foi excluída. Dessa forma, as diferenças espectrais podem ser melhor observadas, assim como a alteração de linha de base nas amostras com o polimorfo I (Figura 41b).

Após a verificação das diferenças espectrais, foi efetuado a análise das misturas polimórficas (Figura 42).

Figura 42- Espectros das misturas polimórficas de EFZ, obtidas do Raman de bancada.



Fonte: autoria própria.

Pode ser observado que além da correção da linha de base, é necessário um ajuste do espalhamento. Na Tabela 14, podem ser observados diversos pré-processamentos que foram testados e, pode-se ver que o erro está muito acima dos observados para os espectros de infravermelho. Considerando o *bias*, apenas os que utilizaram ALS e SNV ou MSC, não foram estatisticamente significativos e nem considerados estatisticamente diferentes (95% de confiança), sendo escolhido o método por MSC pelos menores valores de *bias* obtidos.

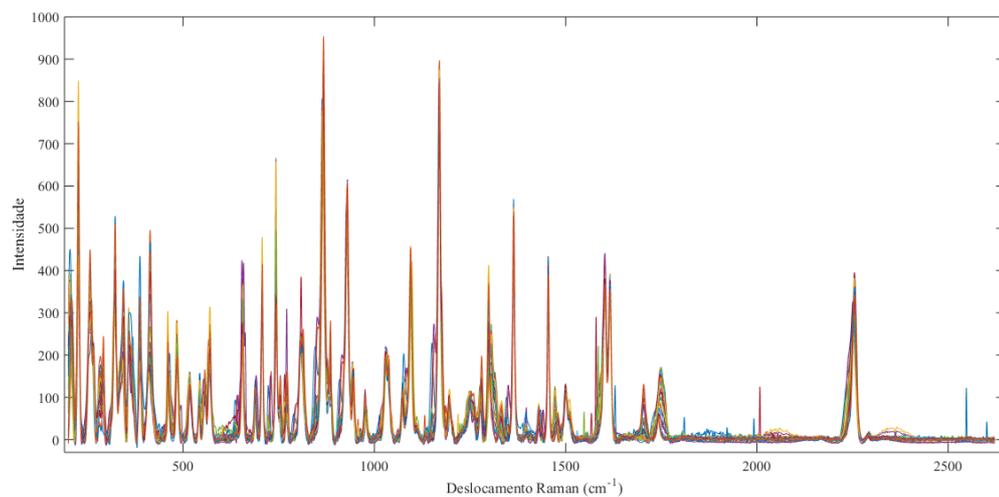
Em geral, o erro elevado nos resultados de Raman pode ser devido a fluorescência da molécula, mesmo após a correção da linha de base com WLS e ALS (EILERS; BOELEN, 2005). O aparecimento da fluorescência deve ser evitado, porque afeta a acurácia e a sensibilidade dos resultados do Raman. Para superá-la, há alguns métodos que podem ser posteriormente investigados (WEI et al., 2015). Um deles é o uso do laser 1064 nm, que tem sido descrito como um dos melhores comprimentos de onda para evitar o aparecimento de fluorescência das amostras (HARGREAVES et al., 2009; WEST; WENT, 2010).

Tabela 14 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando Raman de bancada.

Pré-processamentos	Modelos	R ²	RMSE	Bias
ALS + Suavização + SNV (excl. 2val)	CV	0,8	14,3 (7)	1,1
	Pred	0,7	15,0	0,5
ALS + Suavização + MSC (excl. 2 val)	CV	0,8	14,1 (7)	0,8
	Pred	0,7	15,3	0,8
ALS + Normalização (2 excl)	CV	0,8	14,5 (7)	1,3
	Pred	0,76	14,6	2,4
1 ^a derivada + normalização (excluded 2val)	CV	0,78	14,6 (7)	1,0
	Pred	0,78	14,4	3,5
WLS + Suavização + SNV (2 excl.)	CV	0,75	15,6 (6)	0,1
	Pred	0,71	16,6	2,2
WLS + Suavização + MSC (3 excl.)	CV	0,74	15,9 (6)	-0,2
	Pred	0,68	16,6	4,0
WLS + Normalização (2 excl.)	CV	0,75	15,5 (6)	0,8
	Pred	0,76	15,3	4,4

*Os valores em parênteses são o número de variáveis latentes.

Figura 43 - Espectros do Raman de bancada, após pré-processamento com ALS e MSC.



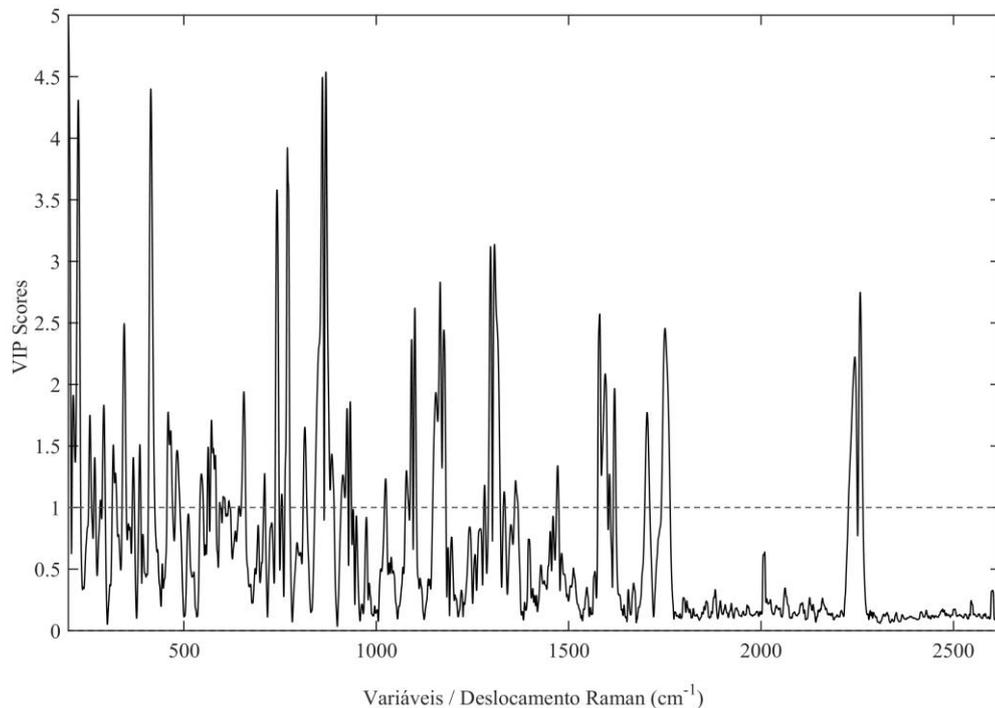
Fonte: autoria própria.

Na figura 43, podem ser observados os espectros corrigidos. A correção da linha de base que foi realizada parece aumentar ou evidenciar a ocorrência de *spikes*, que são picos estreitos resultante da interferência de raios gama.

Após a verificação do melhor modelo PLS, foi realizada a seleção de variáveis.

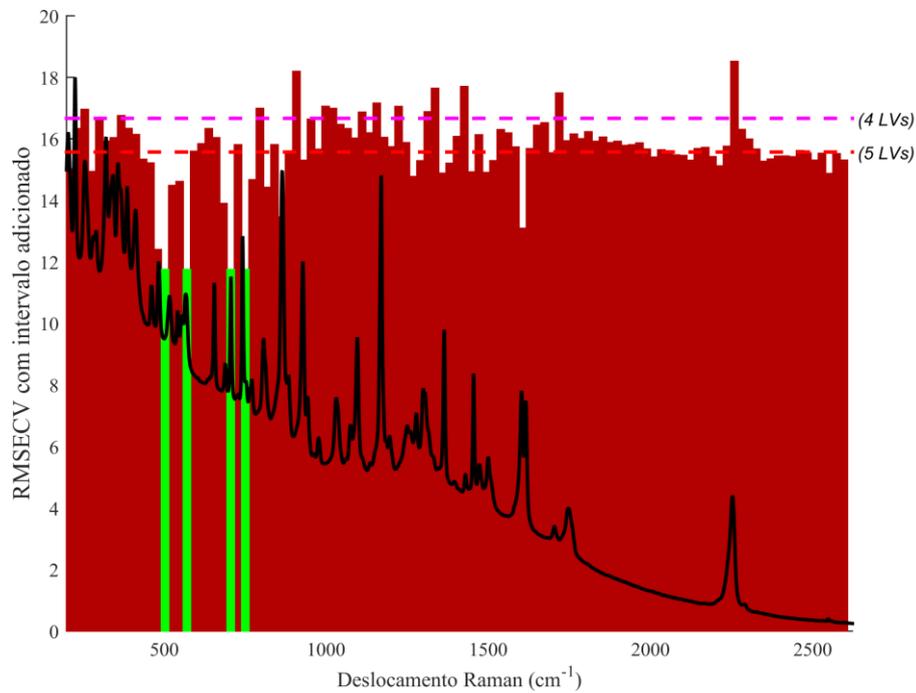
Dentre os equipamentos testados, este resultou em espectros com o maior número de variáveis: 4845. Esse número foi reduzido para 1038 quando utilizado as restrições selecionadas pelos *VIP scores*. O intervalo de comprimento de onda selecionado possui informação sobre todos os grupos funcionais, mas não apresenta melhoria nos parâmetros do modelo. Após realizar mais duas seleções por *VIP scores*, algumas bandas entre 200 e 1310 cm^{-1} foram consideradas importantes (Figura 44). Essas bandas representam vibrações de carbono dos três anéis presentes na estrutura do EFZ, além da vibração de outras ligações de carbono, nitrogênio, flúor e cloro (MISHRA et al., 2012; MARQUES et al., 2017).

Figura 44 - Gráfico de VIP scores dos espectros do Raman de bancada.



Fonte: autoria própria.

Figura 45 - Resultados iPLS para os espectros do Raman de bancada.



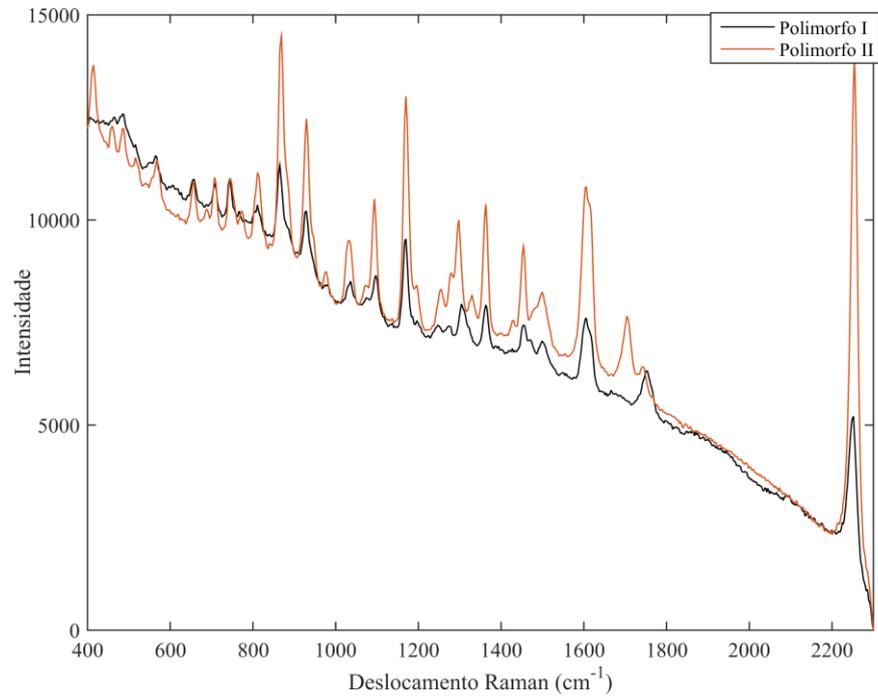
Legenda: região espectral selecionada (cor verde) e excluída (cor vermelha). Fonte: autoria própria.

Para o iPLS, foi utilizado 45 como tamanho de intervalo. Quatro intervalos foram selecionados como importantes (Figura 45): $492\text{-}515\text{ cm}^{-1}$ (deformações de grupos CF_3 e OCO), $560\text{-}582\text{ cm}^{-1}$ (ligações de carbono no anel ciclopropil, CNH e $\text{C}\equiv\text{CC}$), $695\text{-}717\text{ cm}^{-1}$ e $741\text{-}762\text{ cm}^{-1}$ (deformação simétrica de CF_3 e torsões de CCH) (Marques et al., 2017). Apesar de auxiliar na interpretação, nenhum destes dois métodos de seleção de variáveis melhorou os parâmetros do modelo para os espectros do Raman de bancada.

5.2.7.3.2 Equipamento portátil

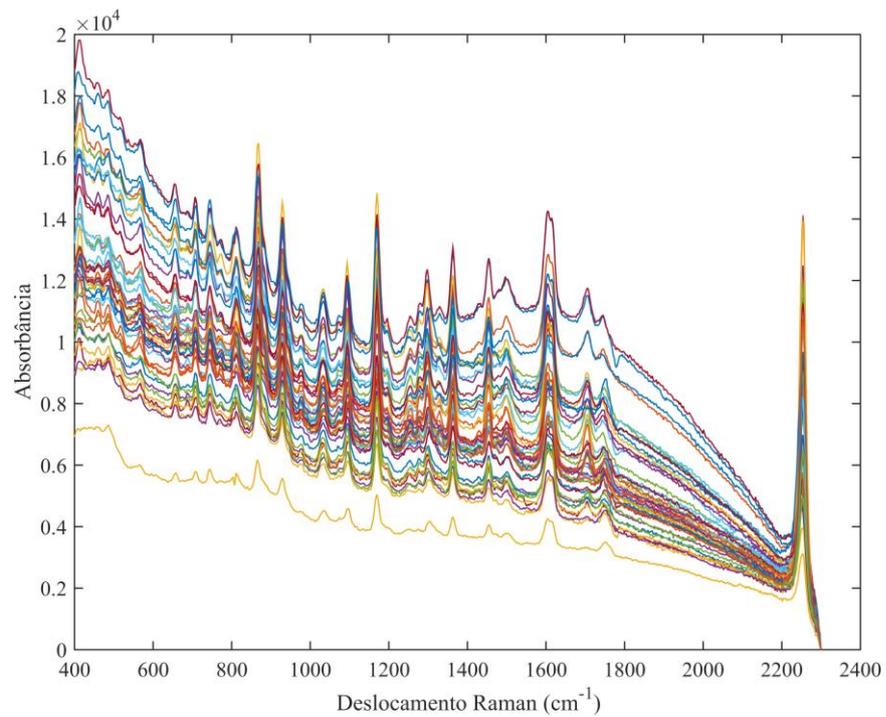
O Raman portátil (Figura 46) analisa uma menor região espectral, mas inclui modos vibracionais importantes que podem ser atribuídos a todos os grupos funcionais do EFZ (Marques et al., 2017; Mishra et al., 2012).

Figura 46 - Espectros Raman obtido do espectrômetro portátil.



Fonte: autoria própria.

Figura 47 - Espectros das misturas polimórficas do EFZ obtidas a partir do Raman portátil.

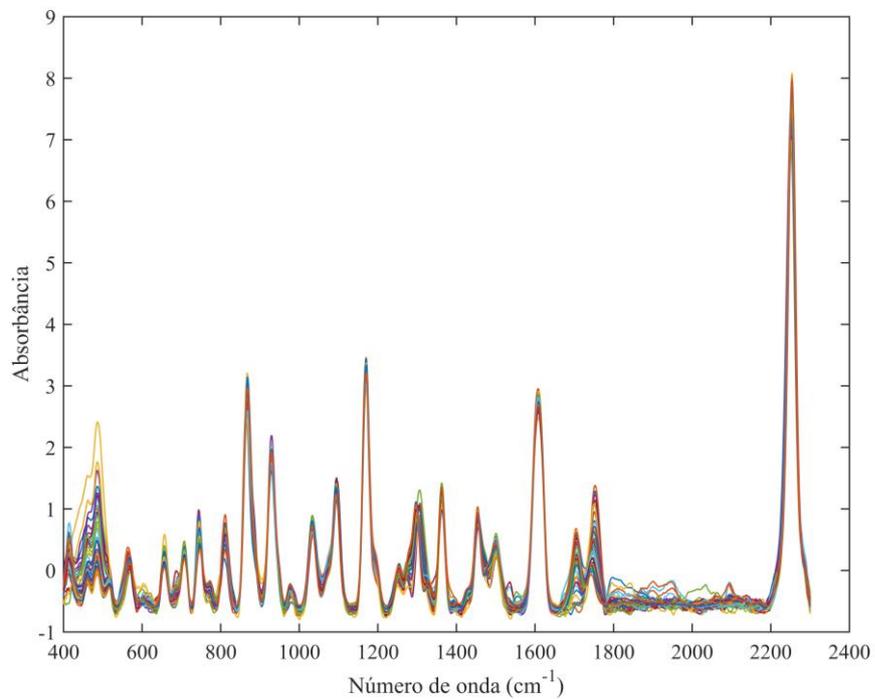


Fonte: autoria própria.

As análises das misturas polimórficas podem ser observadas na Figura 47. Os espectros apresentaram variações na linha de base. Sendo necessário, portanto, a aplicação de pré-processamentos (Tabela 15).

O melhor pré-processamento foi o obtido utilizando ALS como correção de linha de base, suavização para melhoria da razão sinal/ruído e SNV para diminuição da variação de linha de base. Os espectros corrigidos estão apresentados na Figura 48, a linha de base foi corrigida, mas ainda podem ser vistos espectros ruidosos na região de 1800 a 2200 cm^{-1} .

Figura 48 - Espectros das misturas polimórficas do EFZ em Raman portátil após pré-processamentos.



Fonte: autoria própria.

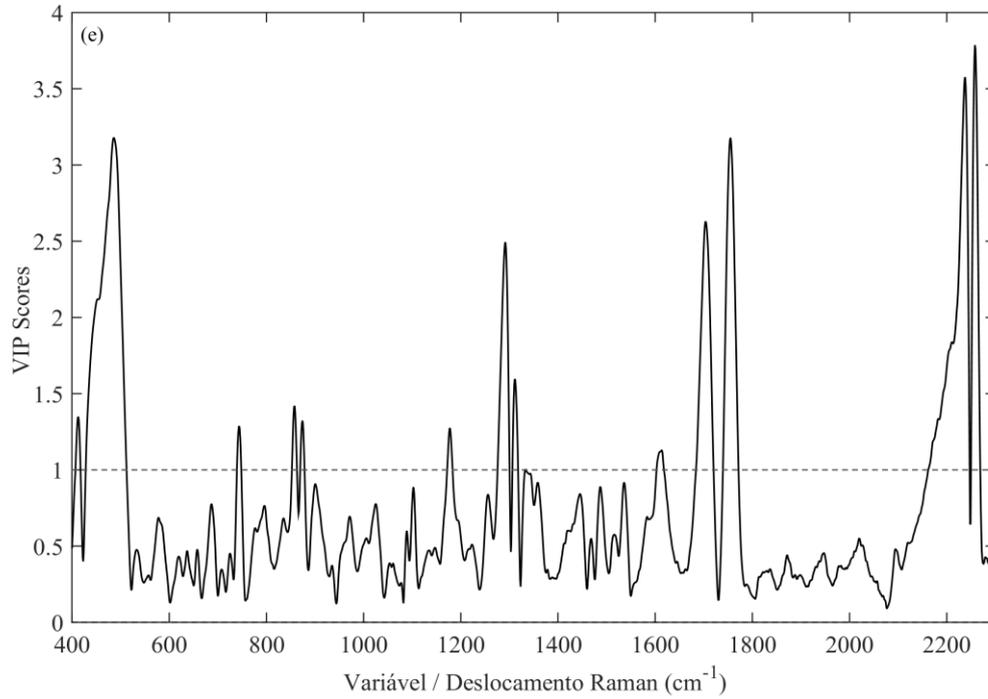
Tabela 15 - Modelos PLS obtidos para os polimorfos do EFZ usando Raman portátil.

Pré-processamentos	Modelos	R ²	RMSE	Bias
ALS + Suavização + SNV (excl. 1val)	CV	0,95	7,0 (5)	0,6
	Pred	0,92	8,6	0,8
ALS + Suavização + MSC (excl. 1 val)	CV	0,95	6,8 (5)	0,4
	Pred	0,91	8,9	0,4
ALS + Normalização (2 excl)	CV	0,91	9,6 (3)	1,0
	Pred	0,93	8,8	0
1ª derivada + Normalização (exc. 2val)	CV	0,89	10,2 (3)	0,6
	Pred	0,86	11,5	0
WLS + Suavização + SNV (1 excl.)	CV	0,77	15,2 (5)	0,3
	Pred	0,78	14,6	1,7
WLS + Suavização + MSC (1 excl.)	CV	0,70	17,8 (6)	-1,0
	Pred	0,83	13,96	1,7
WLS + Normalização (2 excl.)	CV	0,78	15,1 (5)	0,8
	Pred	0,89	10,4	-0,8

*Os valores em parênteses são o número de variáveis latentes.

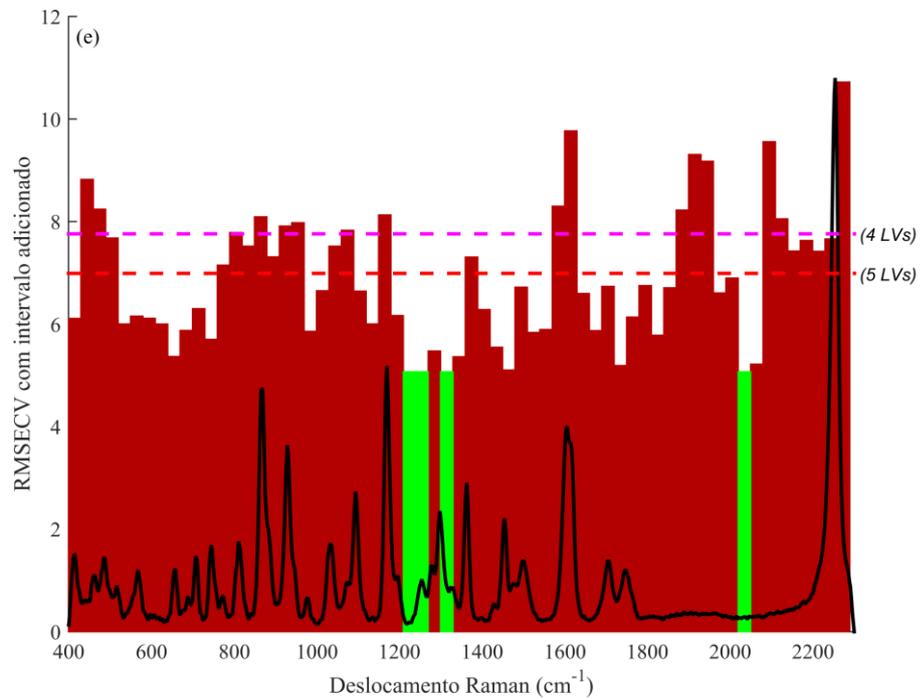
Procedeu-se a aplicação de métodos de seleção de variáveis. A aplicação da restrição escolhida pelos *VIP scores* reduziu o número de variáveis de 1901 para 355. Diferente do equipamento de bancada, os *VIP scores* do equipamento portátil consideraram importantes as vibrações da carbonila e não consideraram importantes as vibrações de grupos contendo átomos de nitrogênio e cloro (Figura 49).

Figura 49 - Gráfico de VIP scores dos espectros obtidos pelo Raman portátil.



Fonte: autoria própria.

Figura 50 - Resultados iPLS para os espectros obtidos por Raman portátil.



Legenda: região espectral selecionada (cor verde) e excluída (cor vermelha). Fonte: autoria própria.

Para iPLS, foi utilizado 30 como tamanho de intervalo. O iPLS considerou importantes três intervalos (Figura 50): 1210-1270 cm^{-1} (deformação CCH de anel aromático, deformação CN e estiramento de CC_{CF_3}), 1300-1330 cm^{-1} (estiramento do aril, NC, CO e CC_{CF_3}) e 2020-2050 cm^{-1} (sem informação espectral) (MARQUES et al., 2017). Nenhuma das duas técnicas conseguiu melhorar os parâmetros dos modelos PLS.

Em geral, o equipamento portátil teve melhor desempenho ao comparar os modelos obtidos (Tabela 15), as amostras apresentaram um menor RMSEP e os valores R^2 foram maiores do que o equipamento portátil. Este fato pode ser devido ao tamanho do *spot* do laser. O tamanho pequeno utilizado (2 μm) pelo equipamento de bancada pode não ser representativo para amostras de misturas polimórficas. Por outro lado, o equipamento portátil usou um laser com um tamanho de *spot* muito maior (2 a 2,5 mm). Na literatura, Paiva e colaboradores (2018) também observaram o efeito do *spot* do laser. Eles descreveram a ocorrência de erros maiores para análises em micro-Raman (tamanho do *spot*: 3 μm) em análises quantitativas de polimorfos de MBZ quando comparado aos resultados obtidos em macro-Raman (tamanho do *spot*: 80 e 100 μm), indicando que o tamanho do *spot* do laser é um fator importante a ser considerado.

5.2.8 Comparação das técnicas utilizadas

Para avaliar a melhor técnica que poderia ser empregada, pode ser observada a Tabela 16, com os melhores parâmetros encontrados, além dos gráficos com os valores preditos e os valores de referência (Figura 51)

Como havia sido comentado, considerando os parâmetros avaliados as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho foram os mais adequados, com o erro (RMSECV e RMSEP) em torno de 5% para o NIR e em torno de 4% para o MID.

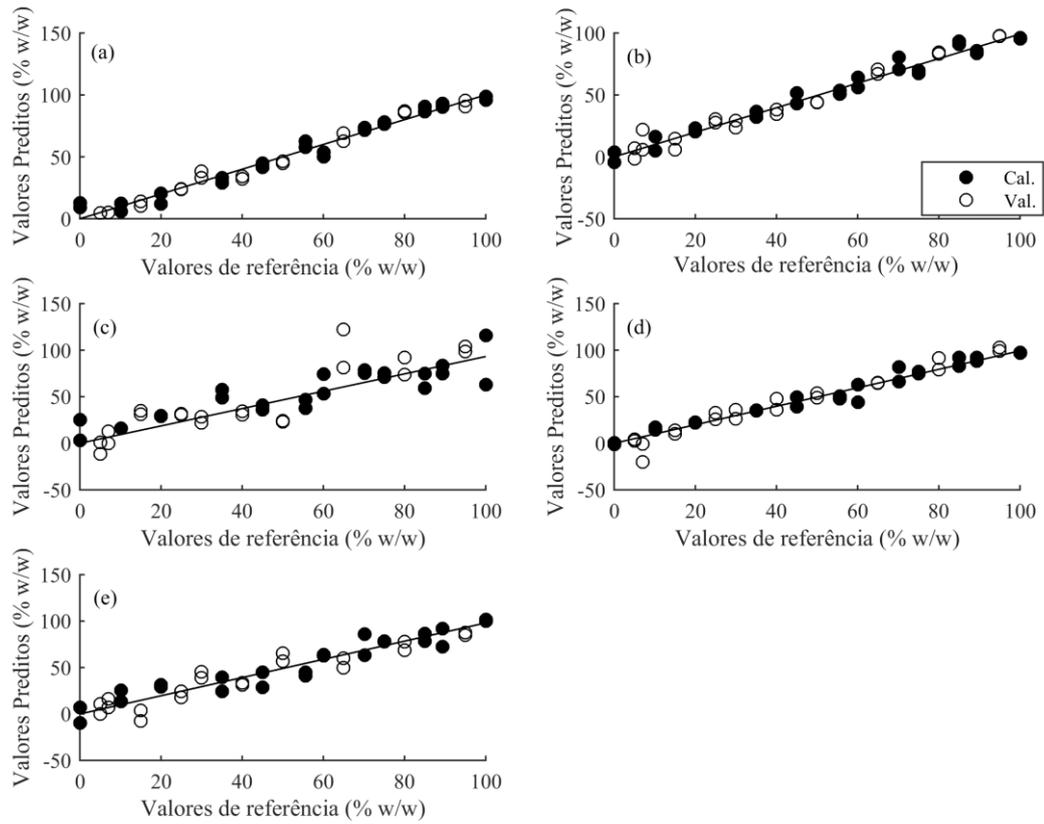
Em geral, o equipamento com melhores parâmetros foi o MID, pois apresentou bias próximo a zero, R^2 acima de 0,95 e o modelo foi explicado por 2 variáveis latentes, o valor mais baixo entre os equipamentos testados. Os valores preditos apresentam-se pouco dispersos ao longo da linha de tendência. Entretanto, pode ser destacado também os resultados do NIR portátil, já que os parâmetros estão dentro de um padrão aceitável, os valores de RMSEP, RMSECV, inclusive, não são estatisticamente diferentes (95% de confiança) dos valores obtidos para o MID e o NIR de bancada. Além disso, há vantagens de sua utilização em relação ao custo e facilidades de uso *-at*, *-in*, *-online* para controle de qualidade de insumos monitoramento do processo.

Tabela 16 - Melhores modelos obtidos por iPLS para quantificar misturas polimórficas de EFZ.

Técnicas	Modelos	R ²	RMSE	Bias	Ferramentas
MID	CV	0.98	3.9 (2)	0.1	Suavização + MSC + iPLS
	Pred	0.98	4.1	-0.6	
NIR bancada	CV	0.97	5.0 (5)	-0.2	1ª derivada
	Pred	0.97	5.5	0.1	
NIR portátil	CV	0.97	5.4 (4)	-0.1	1ª derivada
	Pred	0.98	5.0	1.6	
Raman de bancada	CV	0.80	14.1 (7)	0.8	Suavização + MSC
	Pred	0.73	15.3	0.8	
Raman portátil	CV	0.95	7.0 (5)	0.6	Suavização + SNV
	Pred	0.92	8.6	0.8	

*Os valores em parênteses são o número de variáveis latentes.

Figura 51 - Gráficos dos valores preditos e os de referência.



Legenda: (a) MID; (b) NIR de bancada; (c) Raman de bancada; (d) NIR Portátil; (e) Raman Portátil. Fonte: autoria própria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Este trabalho avaliou metodologias analíticas para uso em estudos de estabilidade de comprimido ADF contendo AZT, 3TC e EFZ.
- Foi verificadas condições que não são adequadas para a separação dos produtos de degradação. Futuramente, ainda será preciso investigar outras condições como o uso de tampões e acidificação da fase móvel. Após a adequação, o método deverá ser testado em condições de degradação forçada e, posteriormente, validado.
- Em relação ao outro foco do trabalho, foi estabelecido que não devem ser utilizadas temperaturas acima de 4°C e concentrações de EFZ em metanol abaixo de 20 mg.mL⁻¹ para obter o polimorfo II.
- O polimorfo II foi caracterizado por técnicas comumente utilizadas para avaliação de polimorfismo, inclusive por espectroscopia NIR e THz, cujo uso ainda não havia sido descrito para EFZ. Todas as técnicas utilizadas mostraram-se capazes de diferenciar os dois polimorfos, com exceção da dissolução intrínseca.
- Na avaliação da dissolução, não foi observado o incremento da dissolução quando se utiliza método contendo LSS a 0,5% ou a 0,25%, devendo ser investigado o uso de metodologia utilizando volumes menores, como o descrito na literatura, ou ainda com concentrações menores de LSS.
- Foi possível desenvolver métodos utilizando infravermelho para quantificar polimorfos I e II de EFZ, tendo sido o melhor método obtido por MID. Para o NIR, foi possível quantificar com erro em torno de 5% tanto em equipamento portátil quanto de bancada, o que traz a perspectiva de uso não apenas no estudo de estabilidade do polimorfo II do EFZ, como também no controle de qualidade em processos *-at*, *-in*, *-online*.
- Posteriormente, ainda serão calculados os limites de detecção e a sensibilidade dos métodos desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, C. M.; BRO, R. Variable selection in regression-a tutorial. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 11–12, p. 728–737, 2010.
- ARAÚJO, A. A. S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303–314, 2003.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. **STANDARD PRACTICES FOR INFRARED MULTIVARIATE QUANTITATIVE ANALYSIS** - ASTM E1655-05, 2005.
- AVILA, T. C. **Espectroscopia Raman e Quimiometria como Ferramentas no Monitoramento On-Line do Processo Fermentativo da Glicose pela *Saccharomyces cerevisiae***. 2013. 135f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Química, Campinas, 2013.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - Critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1011–1040, 2002.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 877–883, 2013.
- BEDSE, G.; KUMAR, V.; SINGH, S. Study of forced decomposition behaviour of lamivudine using LC, LC-MS/TOF and MSⁿ. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 55–63, 2009.
- BEEBE, K. R.; RANDY, J. P.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A practical guide**. Wiley Interscience: New York, 1998.
- BEZERRA, G. S. N.; PEREIRA, M. A. V.; OSTROSKY, E. A.; BARBOSA, E. G.; MOURA, M. F. V.; FERRARI, M.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1–9, 2017.
- BORKAR, M. S.; KASHID, A. A. HIV-2: an overview. **International Journal of Research in Dermatology**, v. 1, n. 1, p. 7–9, 2015.
- BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
- BRASIL. Lei nº 9.313, de 13 de novembro de 1996. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de AIDS. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de novembro de 1996. Seção 1, p. 23725.

BRASIL. ANVISA. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, nº 146, seção 1, p. 119, 2005.

BRASIL. ANVISA. **Guia para registro de novas associações em dose fixa**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 20, 2010a.

BRASIL, **Farmacopeia brasileira**. 5ª Ed. Brasília: Anvisa, 2010b.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº.45., de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da União**, nº 155, seção 1, p. 37, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos**. Brasília, nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, A. E H. V. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. Brasília: MS, 2016.

BRASIL. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das hepatites virais/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde - Nota Informativa nº 7 de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília: MS, 2018.

BAXTER, J. B.; GUGLIETTA, G. W. Terahertz spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 4342–4368, 2011.

BRAZ, V. A.; HOLLADAY, L. A.; BARKLEY, M. D. Efavirenz Binding to HIV-1 Reverse Transcriptase Monomers and Dimers. **Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 601–610, 2010.

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

BROG, J. P.; CHANEZ, C. L.; CROCHET, A.; FROMM, K. M. Polymorphism, what it is and how to identify it: A systematic review. **RSC Advances**, v. 3, n. 38, p. 16905–16931, 2013.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. **MMWR Morbidity and mortality weekly report**, v. 30, n. 21, p. 1-3, 1981.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHAPLIN – Vida e pensamentos. Brasil: Martin Claret, 1997.

CHEN, B. HIV Capsid Assembly, Mechanism, and Structure. **Biochemistry**, v. 55, n. 18, p. 2539–2552, 2016.

CHONG, I. G.; JUN, C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, n. 1, p. 103–112, 2005.

COHEN, J. Virology. Early AIDS virus may have ridden Africa's rails. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 21–22, 2014.

CORDEIRO, G. A.; NAGATA, N.; MESSERSCHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P.; RODRIGUES, L. N. C. Multivariate spectroscopic determination of the lamivudine-zidovudine association. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 2, p. 337–343, 2011.

COSTA, J. D. O.; CECATTO, M. DAS G. B.; SILVEIRA, M. R.; et al. Efetividade da terapia antirretroviral na era de medicamentos em dose fixa combinada. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, n. 87, p. 1–13, 2018.

CUEVAS, J. M.; GELLER, R.; GARIJO, R.; LÓPEZ-ALDEGUER, J.; SANJUÁN, R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. **PLoS Biology**, v. 13, n. 9, p. 1–19, 2015.

DALGLEISH, A. G.; Beverley, P. C.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F.; Weiss, R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 763–767, 1984.

DESAI, D.; WANG, J.; WEN, H.; LI, X.; TIMMINS, P. Formulation design, challenges, and development considerations for fixed dose combination (FDC) of oral solid dosage forms. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7450, n. January, p. 1–12, 2013.

DEVROUKHAKAR, P. S.; BORKAR, R.; SHASTRI, N.; SURENDRANATH, K. V. A stability indicating HPLC method of zidovudine: validation, characterization and toxicity prediction of two major acid degradation products. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, vol. 2013, 2013.

DOLAN, J. **A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection**. Disponível em: http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf, acessado em 11 de maio de 2017.

DUNGE, A.; CHAKRABORTI, A. K.; SINGH, S. Mechanistic explanation to the variable degradation behaviour of stavudine and zidovudine under hydrolytic, oxidative and photolytic conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, p. 965–970, 2004.

DUNGE, A.; SHARDA, N.; SINGH, B.; SINGH, S. Validated specific HPLC method for determination of zidovudine during stability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 1109–1114, 2005.

EIGENVECTOR. **Advanced Preprocessing: Noise, Offset, and Baseline Filtering**. 2013. Disponível em:

http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Advanced_Preprocessing:_Noise,_Offset,_and_Baseline_Filtering, acessado em 16 de março de 2019.

Eilers, P.H.C.; Boelens, H.F.M. Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing. **Life Sciences**, 2005.

ELENA, S. F.; SANJUÁN, R. Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences GUEST COMMENTARY Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences. **Journal of virology**, v. 79, n. 18, p. 11555–11558, 2005.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P.; The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 279-290, 2012.

FANDARUFF, C.; RAUBER, G. S.; ARAYA-SIBAJA, A. M.; PEREIRA, R. N.; CAMPOS, C. E. M.; ROCHA, H. V. A.; MONTI, G. A.; MALASPINA, T.; SILVA, M. A. S.; CUFFINI, S. L. Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties. **Crystal Growth & Design**, v. 14, n. 10, p. 4968-4975, 2014.

FANDARUFF, C. **Estudo da estrutura cristalina e propriedades de dissolução de fases sólidas de efavirenz e saquinavir, visando a biorrelevância e seu impacto no tratamento do HIV/ AIDS**. 2016. 205f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

FARIA, N. R.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; BAELE, G.; BEDFORD, T.; WARD, M. J.; TATEM, A. J.; SOUSA, J. D.; ARINAMINPATHY, N.; PÉPIN, J.; POSADA, D.; PEETERS, M.; PYBUS, O. G.; LEMEY, P. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 56–61, 2014.

FONTES, D. A. F. **Desenvolvimento Farmacotécnico Industrial da Forma Farmacêutica Comprimido Associação em Dose Fixa para Tratamento da AIDS**. 2011. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

FEARN, T. The Effect of Spectral Pre-Treatments on Interpretation. **NIR news**, v. 20, n. 6, p. 15–16, 2009.

FERREIRA, R. C. S.; RIFFEL, A.; SANT'ANNA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, Vol. 33, No. 8, p. 1743-1755, 2010.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Editora UNICAMP: Campinas – SP, 2015.

FERREIRA, M. R. A. **Metodologias analíticas e quimiométricas para a avaliação de impressões digitais da droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz**. 2016. 272f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

GALVÃO, R. K. H., ARAUJO, M. C. U., José, G. E., Pontes, M. J. C., Silva, E. C., & Saldanha, T. C. B. A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, 67(4), 736–740, 2005.

GARBUJO, A. Q. P.; HANASHIRO, T.; MARKMAN, B. E. O.; et al. Evaluation and study of mebendazole polymorphs present in raw materials and tablets available in the Brazilian pharmaceutical market. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2014.

GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; RESENDE, J. M.; FIALHO, S. L.; BARBOSA, J.; YOSHIDA, M. I. Chemical interactions study of antiretroviral drugs efavirenz and lamivudine concerning the development of stable fixed-dose combination formulations for AIDS treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 573–579, 2013.

GOMES, T. A.; COSTA, S. P. M.; MEDEIROS G. C. R.; SILVA C. R.; LYRA M. A. M.; SILVA K. E. R.; ALBUQUERQUE M. M.; SILVA R. M. F.; ROLIM-NETO P. J. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antirretroviral classe II: Efavirenz. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, p. 239–249, 2015.

GEMPERLINE, P. **Practical Guide to Chemometrics**. 2^a ed. Taylor & Francis: Flórida – EUA, 2006.

HAACK, M. S. **Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão da qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2010. 50f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HARGREAVES, M. D.; BURNETT, A. D.; MUNSHI, T.; CUNNINGHAM, J. E.; LINFIELD, E. H.; DAVIES, A. G.; EDWARDS, H. G. M. Comparison of near infrared laser excitation wavelengths and its influence on the interrogation of seized drugs-of-abuse by Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, n. 12, p. 1974–1983, 2009.

HEENEY, J. L.; DALGLEISH, A. G.; WEISS, R. A. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 462–466, 2006.

HÜTTER, G.; NOWAK, D.; MOSSNER, M.; GANEPOLA, S.; MÜßIG, A.; ALLERS, K.; SCHNEIDER, T.; HOFMANN, J.; KÜCHERER, C.; BLAU, O.; BLAU, I. W.; HOFMANN, W, K.; THIEL, E. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 7, p. 692–698, 2009.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. **Compendium of Chemical Terminology**, 2^a Ed., Oxford, 1997.

JOZWIAKOWSKI, M. J.; NGOC-ANH, T. N.; SISCO, J. M.; SPANCAKE, C. W. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 193–199, 1996.

KARTIKEYAN, S.; BHARMAL, R. N.; TIWARI, R. P.; BISEN, P. S. HIV and AIDS: Basic Elements and Priorities. **Springer Science & Business Media**, p. 42–43, 2007.

KLATZMANN, D.; CHAMPAGNE, E.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; GUETARD, D.; HERCEND, T.; GLUCKMAN, J.; MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 767–768, 1984.

KUMAR, A.; HERBEIN, G. The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 2014.

KURITZKES, D. R. Hematopoietic stem cell transplantation for HIV cure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 2, p. 432, 2016.

KURMI, M.; SINGH, S. Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 7: Comparative degradation pathways of lamivudine and emtricitabine and explanation to their differential degradation behaviour by density functional theory. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2017.

KURMI, M.; SAHU, A.; TIWARI, S. K.; SINGH, S. Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 6: evidence of formation of potentially toxic degradation products of zidovudine under hydrolytic and photolytic conditions. **RSC Advances**, v. 7, n. 30, p. 18803–18814, 2017.

JOHNSTON, R. Gene Therapy to Cure HIV: Where to from Here? **AIDS Patient Care and STDs**, v. 30, n. 12, p. 531–533, 2016.

LEE, E. H. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 163–175, 2014.

LEITE, R. C.; REIS, J. K. P.; OLIVEIRA, A. P.; NASCIMENTO, P. M. P.; OLIVEIRA, F. G.; NAVES, J. H. F. F.; RODRIGUES, A. P. S.; GASPARINI, M. R.; ALVES, F.; OLIVEIRA, C. H. S.; RAJÃO, D. S.; GALINARI, G. C. F. Retrovíroses Dos Animais Domésticos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 73–92, 2013.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13^a Ed., Editora AMGH, p. 365, 2016.

LILTORP, K.; LARSEN, T. G.; WILLUMSEN, B.; HOLM, R. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 424–428, 2011.

MAHAPATRA, S.; THAKUR, T. S.; JOSEPH, S.; VARUGHESE, S.; DESIRAJU, G. R. New solid state forms of the anti-HIV drug efavirenz. Conformational flexibility and high Z' issues. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 7, p. 3191–3202, 2010.

MARQUES, M. M.; REZENDE, C. A.; LIMA, G. C.; MARQUES, A. C. S.; PRADO, L. D.; LEAL, K. Z.; ROCHA, H. V. A.; FERREIRA, G. B.; RESENDE, J. A. L. C. New solid forms of efavirenz: Synthesis, vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1137, p. 476–484, 2017.

MATOS, A. P. S.; COSTA, J. S.; BONIATTI, J.; SEICEIRA, R. C.; PITALUGA-JUNIOR, A.; OLIVEIRA, D. L.; VIÇOSA, A. L.; HOLANDINO, C. Compatibility study between

diazepam and tablet excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1675–1682, 2017.

MAURIN, M. B.; ROWE, S. M.; BLOM, K.; PIERCE, M. E. Kinetics and mechanism of hydrolysis of efavirenz. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 4, p. 517–521, 2002.

McINTOSH, A. I.; YANG, B.; GOLDUP, S. M.; WATKINSONB, M.; DONNAN, R. S. Terahertz spectroscopy: a powerful new tool for the chemical sciences? **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2072–2082, 2012.

MELO, A. C. C.; AMORIM, I. F.; CIRQUEIRA, M. L.; MARTINS, F. T. Toward novel solid-state forms of the anti-HIV drug efavirenz: From low screening success to cocrystals engineering strategies and discovery of a new polymorph. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 4, p. 1558–1569, 2013.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Ed. 6, Pearson: Essex, 2010.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID. **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. Elsevier: Amsterdam, 2017.

MONTGOMERY, E. R.; EDMANSON, A. L.; COOK, S. C.; HOVSEPIAN, P. K. Development and validation of a reverse-phase HPLC method for analysis of efavirenz and its related substances in the drug substance and in a capsule formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 2, p. 267–284, 2001.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, M. M. C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 346-350, 2007

NARAYANAN, S.; CLAY, P. Adherence, Healthcare Resource Use (Hru) And Costs: A Comparison Of Single-Tablet Regimen (Str) Versus Multi-Tablet Regimen (Mtr) Containing Fixed Dose Combination (Fdc) Regimens. **Value in Health**, v. 18, n. 7, p. A577, 2015.

NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J. Interval partial least-squares regression (iPLS): a comparative chemometric study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 413–419, 2000.

PAIVA, E. M.

PEETERS, M.; D'ARC, M.; DELAPORTE, E. The origin and diversity of human retroviruses. **AIDS Reviews**, v. 16, n. 1, p. 23–34, 2014.

PETERSON, K.; ROWLAND-JONES, S. Novel agents for the treatment of HIV-2 infection. **Antiviral Therapy**, v. 17, n. 3, p. 435–438, 2012.

PINTO, E. C.; CABRAL, L. M.; SOUSA, V. P. Development of a discriminative intrinsic dissolution method for efavirenz. **Dissolution Technologies**, v. 21, n. 2, p. 31–40, 2014.

PORTSMOUTH, S. D.; SCOTT, C. J. The renaissance of fixed dose combinations: Combivir. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 4, p. 579–583, 2007.

RABEL, S. R.; MAURIN, M. B.; ROWE, S. M.; HUSSAIN, M. Determination of the pKa and pH-solubility behavior of an ionizable cyclic carbamate, (S)-6-chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1,4-dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one (DMP 266). **Pharmaceutical development and technology**, v. 1, n. 1, p. 91–95, 1996.

RAMIRO, M. A.; LLIBRE, J. M. Legal, ethical, and economic implications of breaking down once-daily fixed-dose antiretroviral combinations into their single components for cost reduction. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 9, p. 598–602, 2014.

RAVIKUMAR, K.; SRIDHAR, B. Molecular and Crystal Structure of Efavirenz, a Potent and Specific Inhibitor of HIV-1 Reverse Transcriptase, and Its Monohydrate. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 515, n. 1, p. 190–198, 2009.

RINNAN, Å.; NØRGAARD, L.; VAN DEN BERG, F.; et al. Data Pre-Processing. em **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**, Elsevier, 2009.

ROQUE-FLORES, R. L. Characterization and Kinetic Studies of the Thermal Degradation of Mebendazole Polymorphs A and C. **Journal of Pharmaceutical Innovation**. 2019.

SANKOH, O.; ARTHUR, S.; NYIDE, B.; WESTON, M. Prevention, treatment and future challenges of HIV/AIDS: A decade of INDEPTH research. **HIV and AIDS Review**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.

SANTOS, O. M. M.; REIS, M. E. D.; JACON, J. T.; LINO, M. E. S.; SIMÕES, J. S.; DORIGUETTO, A. C. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 1–24, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. Ed. 7, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2005.

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. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 71–88, 2013.

SINGHAL, D. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 335–347, 2003.

SLUIS-CREMER, N.; TACHEDJIAN, G. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. **Virus Research**, v. 134, n. 1–2, p. 147–156, 2008.

SOARES, M. F. R. **Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efavirenz**. 2011. 214f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SORIANO, V.; GOMES, P.; HENEINE, W.; HOLGUÍN, A.; DORUANA, M.; ANTUNES, R.; MANSINHO, K.; SWITZER, W. M.; ARAUJO, C.; SHANMUGAM, V.; LOURENÇO, H.; GONZÁLEZ-LAHOZ, J.; ANTUNES, F. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: Clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. **Journal of Medical Virology**, v. 61, n. 1, p. 111–116, 2000.

SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 9–19, 2004.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.

SOUZA, K. R. **Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização como padrão secundário**. 2015. 171f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: fundamentals and applications**. Ed. Wiley, p. 86–87, 2004.

UNAIDS - United Nations Programme on HIV/AIDS. Relatório informativo – Dia Mundial contra a AIDS 2018. Disponível em: <<https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2018/11/Fact-sheet-UNAIDS-novembro-2018-1.pdf>>, acessado em 18 de março de 2019.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

USA - UNITED STATES OF AMERICA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry - ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information**. 2007.

USA - UNITED STATES OF AMERICA. Food and Drug Administration. **Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection**, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/forpatients/illness/hiv aids/treatment/ucm118915.htm>>, acessado em 18 de março de 2019.

USA - UNITED STATES OF AMERICA. Food and Drug Administration. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods**, 1994. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>>, acessado em 11 de maio de 2017.

VAHLNE, A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 40, 2009.

VIEIRA, F. S. **Espectroscopia Terahertz: Instrumentação e Aplicações**. 2016. 142f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

YOUNG, S. T.; BRITCHER, S. F.; TRAN, L. O.; PAYNE, L. S.; LUMMA, W. C.; LYLE, T.A.; HUFF, J. R.; ANDERSON, P. S.; OLSEN, D. B.; CARROLL, S. S.; PETTIBONE, D. J.; O'BRIEN, J. A.; BALL, R. G.; BALANI, S. K.; LIN, J. H.; CHEN, I.; SCHLEIF, W. A.; SARDANA, V. V.; LONG, W. J.; BYRNES, V. W., EMINI, E. A. L-743,726 (DMP-266): a Novel, Highly Potent Nonnucleoside Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2602-2605, 1995.

WARREN, M. Second patient free of HIV after stem-cell therapy: Breakthrough suggests first case was not a one-off and could pave way for future treatments. **Nature**, 2019. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/d41586-019-00798-3>>, acessado em 18 de março de 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products. **WHO Technical Report Series**, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Pharmacopeia**, 8ª edição, 2018. Disponível em: < <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>>, acessado em 17 de março de 2019.

WORKMAN, J. J.; WEYER, L. **Practical Guide to interpretive Near-infrared Spectroscopy**. CRC Press: Flórida, 2008.

WOROBAY, M.; WATTS, T. D.; MCKAY, R. A.; SUCHARD, M. A.; GRANADE, T.; TEUWEN, D. E.; KOBLIN, B. A.; HENEINE, W.; LEMEY, P.; JAFFE, H. W. 1970s and "Patient 0" HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. **Nature**, v. 539, n. 7627, p. 1–17, 2016.

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DE EFAVIRENZ (CRISTÁLIA®, LOTE 86/16).

CRISTALIA PRODS.QUIMS.FARMACEUTICOS LTDA
ROD ITAPIRA LINDOIA S/N, KM 14 Itapira-SP

CERTIFICADO DE ANALISE

N. : 653.476		
PRODUTO: EFAVIRENZ MICRONIZADO		
Codigo: 10.0394	Nro. RDP: 0	Lote: 0086/16
VALIDO ATE: 03/2018		
TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
ASPECTO	PO CRISTALINO BRANCO, QUASE BRANCO OU LEVEMENTE ROSADO, INODORO (INTERNA)	PO CRISTALINO BRANCO
SOLUBILIDADE	PRATICAMENTE INSOLUVEL EM AGUA, SOLUVEL EM METANOL E DICLOROMETANO (FB)	DE ACORDO
FAIXA DE FUSAO	ENTRE 136°C E 141°C (FB)	138-139 °C
PODER ROTATORIO ESPECIFICO	ENTRE -86° E -98°, CALCULADO EM RELACAO A BASE DESSECADA (FB)	98 ° (-)
DENSIDADE APARENTE	ENTRE 0,11 g/mL E 0,20 g/mL (INTERNA)	0,15 g/mL
DENSIDADE BATIDA	MAXIMO 0,25 g/mL (INTERNA)	0,18 g/mL
TAMANHO DE PARTICULA	D 0,9: MENOR QUE 20 µm D 0,5: MENOR QUE 6 µm (INTERNA)	DE ACORDO DE ACORDO
IDENTIFICACAO	ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCAO NO INFRAVERMELHO: O ESPECTRO DE ABSORCAO NO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA CORRESPONDE AO DO PADRAO	POSITIVO
	ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCAO NO ULTRAVIOLETA: O ESPECTRO DE ABSORCAO NO ULTRAVIOLETA DA AMOSTRA EXIBE MAXIMOS EM 206 nm, 247 nm E 293 nm, IDENTICOS AOS OBSERVADOS NO DO PADRAO	POSITIVO
	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA: O TEMPO DE RETENCAO DO PICO PRINCIPAL DA SOLUCAO AMOSTRA CORRESPONDE AO DO PICO PRINCIPAL DO PADRAO (FB)	POSITIVO
	DSC: A AMOSTRA APRESENTA UM PICO DE FUSAO EM CERCA DE 140°C (INTERNA)	POSITIVO
AGUA	MAXIMO 0,5% (FB)	0,1 %
CINZAS SULFATADAS	MAXIMO 0,2% (FB)	0,0 %
METAIS PESADOS	MAXIMO 0,002% (20 ppm) (FB)	< 20 ppm
PERDA POR DESSECACAO	MAXIMO 1,0% (FB)	0,7 %
EXCESSO ENANTIOMERICO	MINIMO 99,0% (INTERNA)	100,0 %
SUBSTANCIAS RELACIONADAS	IMPUREZA B (TRANS-ALQUENO): MAXIMO 0,1% IMPUREZA INDIVIDUAL: MAXIMO 0,1% IMPUREZA TOTAL: MAXIMO 0,5% (INTERNA)	0,0 % 0,0 % 0,1 %

CRISTALIA PRODS.QUIMS.FARMACEUTICOS LTDA
 ROD ITAPIRA LINDOIA S/N, KM 14 Itapira-SP

CERTIFICADO DE ANALISE

N.: 653.476		
PRODUTO: EFAVIRENZ MICRONIZADO		
Codigo: 10.0394	Nro. RDP: 0	Lote: 0086/16
VALIDO ATE: 03/2018		
TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
SOLVENTES RESIDUAIS	CICLO-HEXANO: MAXIMO 3880 ppm ETER ETIL-TERC-BUTILICO (ETBE): MAXIMO 1000 ppm (INTERNA) ISOPROPANOL: MAXIMO 5000 ppm (USP/ ICH Q3C)	643 ppm NQ NQ
TEOR DE EFAVIRENZ	ENTRE 98,0% E 102,0% CALCULADO EM RELACAO A SUBSTANCIA DESSECADA (FB)	101,0 %

APROVADO [X]

REPROVADO []

OBSERVACOES:

Data: 07/10/2016

Este Certificado de Analise e' impresso eletronicamente. Os resultados aqui apontados foram obtidos do laudo original, que se encontra arquivado em nossos arquivos.