



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

Tecnologia de obtenção de solução oral e cápsulas moles a
base de Ritonavir



JULIANA DE SOUZA ALENCAR

Recife, 2004.

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

Tecnologia de obtenção de solução oral e cápsulas moles a base
de Ritonavir

Dissertação de mestrado submetida
ao Programa de Pós-graduação do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas da área de
concentração: Produção e Controle de
Medicamentos.

Prof^o Dr. Pedro José Rolim Neto
Orientador

Prof^a Dra. Miracy Muniz de Albuquerque
Co-orientador

Juliana de Souza Alencar
Mestranda

Recife – PE
2004

Alencar, Juliana de Souza

Tecnologia de obtenção de solução oral e cápsulas moles a base de Ritonavir / Juliana de Souza Alencar. – Recife : O Autor, 2004.

89 folhas : il., fig., tab., gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ritonavir (Antiretroviral) – AIDS. 2. Antiretroviral (Ritonavir) – AIDS. 3. Medicamentos (Ritonavir) – Forma farmacêutica – Solução oral e cápsula gelatinosa mole. I. Título.

615.3012:578.828 CDU (2.ed.)

615.19

CDD (21.ed.)

UFPE

BC2004-103



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

Recife, 19 de Fevereiro de 2004.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 19 de Fevereiro de 2004 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura:

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Miracy Muniz Albuquerque (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura:

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. André Gallembeck (**Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Celso Pinto de Melo

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Silvana Cabral Maggi

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Davi Pereira de Santana

VICE-COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dalci José Brondani

Aos meus pais por transmitirem a cada dia e em todos os momentos a sua sabedoria, o seu amor e o orgulho em dizer a todos: “esta é minha filha”. Filha que muitas vezes fez chorar, fez preocupar, fez sonhar, fez viver. Filha esta que vê a alegria no teu olhar diante de mais essa conquista. E é com grande prazer ver o teu sorriso ao me beijar dizendo: “Parabéns minha filha”. Por isso, peço que aceitem agora a minha sabedoria, o meu amor e o meu orgulho de dizer a todos: “estes são os meus pais”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fazer forte e vencer com sabedoria mais um obstáculo, obrigada por todas as oportunidades e pelo amor de todas as pessoas que de uma forma direta ou indireta me ajudaram a superar as dificuldades. Sei que toda homenagem que a ti fizer será simples demais para um só Deus, porém penso que seja profunda demais para um homem.

Aos meus mestres e em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Rolim, por ensinar e compartilhar de sua própria experiência, acreditando que sempre pode contribuir para a complementação de um profissional.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Miracy Muniz, pela orientação, atenção, incentivo e amizade em todos os momentos.

A toda equipe do LAFEPE, em especial a Flávia Moraes, pela paciência, apoio e atenção, no decorrer desses dois anos de desenvolvimento do ritonavir.

A Danilo Bedor pelo compromisso e colaboração neste trabalho.

A todos que fazem parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) pela parceria e colaboração em todas as etapas envolvidas neste trabalho.

A todos que formam o Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) – Prof^a Miracy, Ruth, Rosário, Ana Cristina, Aurenice, André, Júnior (Ceará) e Danielle Lordão, por toda colaboração, atenção, esclarecimentos, incentivo e amizade.

A Ana Amélia Moreira Lira, Tereza Raquel e Líbia Machado companheiras do laboratório Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) pelo incentivo, apoio, torcida e até mesmo pelos lamentos em nossos encontros e desencontros na pesquisa científica, muito obrigada.

A todos os laboratórios envolvidos (UDEM – UFPB, LABSINFA – UFPE, DQF – UFPE, DF – UFBE) pela colaboração dos resultados obtidos e parceria nos artigos publicados.

A Hetero Drugs, Cristália, Aurobindo, Labogen e Xiamen pelo fornecimento da matéria – prima.

A Relthy Laboratories pela parceria no desenvolvimento da cápsula mole.

A coordenação do mestrado, professores Davi e Dalci e a secretária e amiga Iguacy pelos esforços não poupados e toda ajuda durante este trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

As minhas amigas Flávia, Geisiane e Líbia que muito me incentivaram e apoiaram, nos momentos difíceis e ao longo deste trabalho sempre com muito carinho, atenção e compreensão.

A Nena, uma grande orientadora, que fez parte da base de minha formação.

A todos os amigos do mestrado Geisiane, Líbia, Rosali, Lúcio, Dani, Talita, Maricília, Osnir, Erick, Leilyane, Tereza, Aninha, Chico, Elisângela, Marcília, Vandessa, Luciana, Janaína, Risonildo, Cristiano e Cristiane, Janaína, Célio, Danielle, Nádia, Sabrina, Marcos, Thiago, Duda, Simone, Roseane, Rosiel, Eduardo, Valderes, Ana Paula.

A todos os meus alunos da disciplina de Farmacotécnica II pelo apoio e incentivo.

A toda minha família, pai, mãe, irmãos, tias e tios, primas e primos, sobrinho, que muito me incentivaram e apoiaram, mesmo que distantes, neste meu sonho, agora concretizado.

A minha grande amiga, Olga, que hoje se encontra muito distante, mas mesmo que distante sempre estará me apoiando em tudo que faço.

A Davi Santana peço um muito obrigado por sua colaboração, oferecendo toda a estrutura do laboratório em que é responsável (NUDFAC), como também o apoio de toda a sua equipe.

Em fim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“ O Senhor fez a terra produzir os medicamentos:
Homem sensato não os despreza.
Uma espécie de madeira não adoçou o amargor da água?
Essa virtude chegou ao conhecimento dos homens.
O Altíssimo deu – lhes a ciência da medicina para ser honrado com
suas maravilhas;
E dela se serve para acalmar as dores e curá – las;
O farmacêutico fez misturas agradáveis, Compõe unguentos úteis à
saúde,
E seu trabalho não terminará até que a paz divina se estenda sobre
a face da Terra...”
(Eclesiástico)*

*“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a
contornar obstáculos” Lao Tse*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ESQUEMAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xvi
ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO	20
JUSTIFICATIVA	22
OBJETIVOS	22
Artigo I	
Ritonavir: uma opção para o tratamento da AIDS	23
Artigo II	
Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.	35
Artigo III	
Caracterização do ritonavir para obtenção tecnológica de um anti – retroviral.	42
Artigo IV	
Determinação do ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.	54
Artigo V	
Ritonavir solução oral: Um estudo de desenvolvimento técnico.	69
Artigo VI	
Avaliação do processo de fabricação das cápsulas gelatinosas moles ritonavir 100 mg.	79
CONCLUSÕES	87
PERSPECTIVAS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	90
RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	102

LISTA DE FIGURAS

Artigo I - Ritonavir: uma opção para o tratamento da AIDS

Figura 1
Estrutura molecular do ritonavir. 25

Figura 2
Impurezas do ritonavir 29

Figura 3
Representação das pontes de hidrogênio Forma I: (A) e (B) 29

Figura 4
Representação das Pontes de hidrogênio Forma II 30

Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.

Figura 1
Espectros de Infra-vermelho: Forma I (A) e Forma II (B) 91

Figura 2
Espectros de RMN: Forma I (A) e Forma II (B) 92

Figura 3
Representação das Pontes de hidrogênio Forma I: (A) e (B) 93

Figura 4
Representação das Pontes de hidrogênio Forma II 93

Figura: 5
Espectro de difração de RX dos cristais de Ritonavir Forma I (A) e Forma II (B) 94

Artigo III - Caracterização do ritonavir para obtenção tecnológica de um anti – retroviral.

Figura 1
Microscopia em vídeo do cristal: Forma em barra (fornecedor A e D), Forma agulha (fornecedor E) e estrutura cristalina de forma não definida (fornecedor C e E). 46

Figura 2
Curvas DSC do fornecedor A e fornecedor B em diferentes razões de aquecimento. 49

Figura 3
Fotos A1-A2 (25°C), B1-B2 (115°C), C1-C2 (120°C), D1-D2 (121°C), E1-E2 (122°C), F1-F2 (123°C), G1-G2 (124°C) e H1-H2 (126°C) do fornecedor A e B do ritonavir, respectivamente. 50

Artigo IV - Determinação do ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.

Figura 1

(A) Cromatograma do ritonavir padrão de trabalho. (B) Cromatograma ritonavir solução oral 80 mg / mL. 57

Figura 02

Linearidade do método verificando a regressão das quatro curvas de calibração 61

Figura 3

(A) Cromatograma do placebo. (B) Cromatograma ritonavir solução oral 80 mg / mL. 64

Artigo V - Ritonavir solução oral: Um estudo de desenvolvimento técnico.

Figura 1

Diagrama de fases representado pelo óleo de castor 35, solução hidroalcoólica (85:15) e propilenoglicol. A região em destaque () representa a faixa mais estável. 75

Artigo VI - Avaliação do processo de fabricação das cápsulas gelatinosas moles ritonavir 100 mg.

Figura 1

Reator para preparar o invólucro de gelatina. 95

Figura 2

Ilustração da medida do invólucro 96

Figura 3

Ilustração do cunho, matriz e engrenagem. 97

Figura 4

Bomba de pistão. 98

Figura 5

Ilustração da secadora. 99

Figura 6

Área de secagem. 100

LISTA DE ESQUEMAS

Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.

Esquema 1

Rota sintética do Ritonavir a partir dos fragmentos

90

LISTA DE TABELAS

Artigo I - Ritonavir: uma opção para o tratamento da AIDS

Tabela 1

Parâmetros Farmacocinéticos do Ritonavir 26

Artigo III - Caracterização do ritonavir para obtenção tecnológica de um anti – retroviral.

Tabela 1

Comparação dos resultados de difração de raios – X para os polimorfos I e II e dos cinco fornecedores analisados. 47

Tabela 2

Resultados do ponto de fusão para as diferentes formas cristalinas. 48

Tabela 3

Dados do DSC convencional da forma I e II em diferentes razões de aquecimento. 49

Artigo IV - Determinação do ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.

Tabela I

Resultados da robustez com relação a forma de agitação 58

Tabela II

Resultados da ANOVA para a forma de agitação 58

Tabela III

Resultados da robustez com relação à exposição da luz 58

Tabela IV

Resultados da ANOVA à exposição da luz 58

Tabela V

Resultados da robustez com relação à proporção da fase móvel 59

Tabela VI

Resultados da ANOVA da proporção da fase móvel 59

Tabela VII

Tempos de retenção em relação à proporção da fase móvel 59

Tabela VIII

Resultados da Linearidade 60

Tabela IX

Resultados da Análise de Variância da Linearidade 60

Tabela X

Resultados da Repetibilidade 62

Tabela XI	
Resultados da Precisão Intermediária I e II	62
Tabela XII	
Resultados da ANOVA da Precisão Intermediária I e II	63
Tabela XIII	
Resultados da ANOVA da Precisão entre dias e analistas	63
Tabela XIV	
Comparação entre as variâncias dos analistas	63
Tabela XV	
Resultados da Reprodutibilidade.	63
Tabela XVI	
Resultados da Reprodutibilidade.	64
Tabela XVII	
Resumo estatístico das regressões das quatro curvas de calibração	65
Tabela XVIII	
Resultados de LD e LQ	65
Tabela XIX	
Resultados da Exatidão	66
Artigo V - Ritonavir solução oral: Um estudo de desenvolvimento técnico.	
<hr/>	
Tabela 1	
Resultados dos testes realizados para amostras dos dois fornecedores.	73
Tabela 2	
Composição da formulação para estudo comparativo do primeiro diagrama ternário.	74
Tabela 3	
Composição da formulação para estudo comparativo do segundo diagrama ternário.	74
Tabela 4	
Composição da formulação para estudo comparativo da proporção hidroalcoólica.	75
Tabela 5	
Composição da formulação para estudo comparativo da proporção hidroalcoólica.	76
Tabela 6	
Resultado do estudo de estabilidade para o tempo 0.	77

**Artigo VI - Avaliação do processo de fabricação das cápsulas gelatinosas moles
ritonavir 100 mg.**

Tabela 1

Resultados analíticos de duas formulações à base de ritonavir.

83

LISTA DE GRÁFICOS

Artigo I - Ritonavir: uma opção para o tratamento da AIDS

Gráfico 1 – Níveis do vírus no sangue

24

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
SIDA	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
RTV	Ritonavir
°C	Grau Celsius
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$C_{MÁX}$	Concentração máxima
CV	Coefficiente de Variação
DPR	Desvio padrão relativo
F. Bras.	Farmacopéia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
nM	Nanomolar
mg	Miligrama
NCQMC	Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
pH	potencial hidrogeniônico
SQ_{erp}	Soma quadrática de erro puro
SQ	Soma quadrática
SQ_r	Soma quadrática residual
SQ_{reg}	Soma quadrática da regressão linear
SQ_{tot}	Soma quadrática total
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USP	The United State Pharmacopoea

RESUMO

TECNOLOGIA DE OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO ORAL E CÁPSULAS MOLES A BASE DE RITONAVIR – PRÉ-FORMULAÇÃO, TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA, VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE.

O ritonavir, aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration – agência americana que regulamenta drogas e alimentos) em março de 1996 nas formas farmacêuticas solução oral 80 mg/mL e cápsula mole 100 mg, é um inibidor da protease (IP) do vírus da imunodeficiência humana (HIV), voltado exclusivamente para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em meados de 1998, muitos lotes do produto final do laboratório de referência, Abbott, apresentaram falha no teste de dissolução, observando a presença de cristais não solubilizados para a forma farmacêutica cápsula mole. Portanto, foram realizadas investigações que resultaram na descoberta das formas cristalinas para a molécula do ritonavir. O presente trabalho teve como objetivo introduzir no mercado um produto estável nas suas duas apresentações, seguindo procedimentos e normas preconizadas no desenvolvimento da indústria farmacêutica. Foram efetivadas avaliações físico – químicas das matérias – primas obtidas de cinco fornecedores. Nesta fase de caracterização, cada amostra foi submetida aos métodos analíticos gerais descritos nas Farmacopéias Brasileira (F. Bras. IV ed.) e Americana (USP 25) ou desenvolvidos e validados pelo laboratório de pesquisa LTM (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos). Nos resultados encontrados observou-se que a molécula de ritonavir apresentava – se sob três formas cristalinas. A forma I (barra), a forma II (agulha) e sem forma definida, onde esta última apresenta comportamento semelhante à forma II (agulha). Outro objetivo do estudo foi o desenvolvimento e a validação da metodologia analítica para quantificação da matéria – prima e produto acabado, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando coluna C₁₈, fase móvel acetonitrila: água (70:30), fluxo de 1,0 mL/min, detector 239 nm, seguindo os parâmetros descritos na Resolução 899 da ANVISA. Como continuidade do trabalho, foi realizado um estudo de pré-formulação tomando como ponto de partida o produto de referência. A formulação proposta para as duas formas farmacêuticas está sendo analisada e comparada com os resultados do produto de referência, acompanhado pelo estudo de estabilidade acelerada e de longa duração. No que se refere ao estudo de viabilidade econômica, o LAFEPE em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco tem como objetivo final fornecer o ritonavir nas suas duas formas farmacêuticas com qualidade e baixo custo para o Ministério da Saúde.

PALAVRAS – CHAVE: AIDS, ritonavir, solução oral, cápsula mole.

ABSTRACT

Ritonavir, approved in March of 1996 for FDA (Food and Drug Administration) as oral solution 80 mg/mL and soft capsule 100 mg forms Ritonavir, exclusively for the treatment of the Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), is a member of a class of anti-immunodeficiency virus (anti-HIV) drugs called the viral protease inhibitors (PI). It blocks the HIV protease, thereby reducing the viral load in the infected individual. In the middle of 1998, many lots of the reference laboratory soft capsule final product (Norvir, Abbott) failed in the dissolution test, presenting insoluble crystals. Therefore, investigations that resulted in the discovery of new ritonavir crystalline forms were accomplished. The scope of the present work was to introduce a stable product in the market, as two presentation forms, following the procedures and norms precompiled by the pharmaceutical industry. The physicochemical evaluations of the raw material obtained from five suppliers were performed. AT this characterization phase, each sample was submitted to the general analytical methods described in the Brazilian (F. Bras. IV ed.) and in the American (USP XXV) or to the method developed and validated by the research laboratory. It was observed that ritonavir presented three crystalline forms: form I (bar), form II (needle) and the amorphous form, being this last one present behavior similar to the form II (needle). The other objective of the study was the development and the validation of the analytical methodology for quantification of the raw material and finished product, by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using a mobile phase composed by acetonitrile: water (70:30), pumped at a flow rate of 1,0mL/min through the C18 column, with the UV detector set to 239 nm. The methodology followed the parameters described in the Resolution number 899 from ANVISA. After that, a pre-formulation study was accomplished taking as starting point the reference product. The proposed formulation for the two pharmaceutical forms is being analyzed and compared with the results obtained from the reference product, accompanied by the study of accelerated and long-term stability. Regarding the economical viability study, LAFEPE in partnership with the Federal University of Pernambuco has as final objective to supply the ritonavir in their two pharmaceutical forms with quality and low cost for Ministry of Health.

KEY WORDS: AIDS, Ritonavir, Oral Solution, Soft Capsule.

Introdução
Justificativa
Objetivos

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi reconhecida em meados de 1981, nos estados Unidos, com a identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais e moradores de São Francisco e Nova York, que apresentavam Sarcoma de Kaposi, Pneumonia por *Pneumocystis carinii* e comprometimento do sistema imune. Entenderam que se tratava de uma nova doença de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível. Em 1983, o agente etiológico foi identificado e tratava-se de um retrovirus humano, atualmente denominado Vírus da Imunodeficiência Humana, HIV [1].

O ritonavir, também descrito como (5S-(5R, 8R,10R,11R))10-hydroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1-(2-(1-metiletil)-4-tiazolil)-3,-dioxo-8,11-bisfenilmetil)-2,4,7,12-tetraazatridecan-3 oic ácido, 5-tiazolil-metil éster [2], é um dos mais recentes agentes anti-retrovirais que apresenta atividade seletiva pela protease do HIV, fazendo com que as partículas virais produzidas sejam imaturas e, portanto, incapazes de iniciar um novo ciclo de infecção celular [3,4]. Este fármaco é indicado isoladamente ou combinado com análogos de nucleosídeos para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) [5 – 7], sendo administrado oralmente, duas vezes ao dia, com doses de 1200mg [8].

No mercado farmacêutico, o ritonavir é produzido por uma única indústria (Abbott), com o nome comercial Novir, nas formas farmacêuticas cápsula mole e solução oral [9,10]. Com a possibilidade de quebra da patente e os recentes avanços na área, têm permitido que novas indústrias invistam em um planejamento estratégico de desenvolvimento farmacotécnico-industrial para medicamentos anti-retrovirais. No Brasil, observa-se um aumento significativo do número de pesquisas de fármacos com alto valor agregado, na tentativa de se conseguir uma forma farmacêutica bioequivalente, de custo viável e de boa qualidade. Tais desafios garantem a redução da incidência de AIDS nos diferentes segmentos populacionais em situações de risco e vulnerabilidade, garantindo, desta forma, os direitos de cidadania e uma melhor qualidade de vida para as pessoas dependentes desta medicação.

Paralelamente ao agravamento da disseminação da AIDS, surgiram muitos estudos para identificar o agente etiológico e seu mecanismo de ação e no mesmo período, agentes anti-retrovirais e processos tecnológicos foram desenvolvidos e aprovados. Todas estas

inovações e melhorias contribuíram para uma melhor qualidade dos sistemas de saúde, viabilizando uma melhor qualidade de vida aos pacientes portadores do vírus HIV.

Tendo em vista, a situação atual dos pacientes soropositivos, o Ministério da Saúde acredita, que em 2004, o País possa ter condição de produzir remédio em grande escala a partir de sua rede pública de laboratórios e com isso economizar recursos nos preços dos medicamentos [11].

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) é um dos grandes colaboradores na pesquisa anti-retroviral, buscando sempre garantir a qualidade dos seus medicamentos. Dentre as formas farmacêuticas desenvolvidas e produzidas encontram-se os inibidores da transcriptase reversa: Zidovudina (cápsulas de 100 mg), Didanosina (comprimidos de 25 e 100 mg), Estavudina (cápsulas de 30 e 40 mg), Lamivudina (comprimidos revestidos de 100 e 150 mg), Zidovudina + Lamivudina (300 mg + 150 mg), Nevirapina (comprimido de 200 mg) e Zalcitabina (comprimidos de 0,75 mg) [12].

Com o objetivo de complementar o coquetel anti-HIV, o LAFEPE em parceria com o LTM (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos) estão desenvolvendo duas formas farmacêuticas inibidora da protease: Ritonavir solução oral 80 mg/mL e cápsula gelatinosa mole 100 mg.

Neste estudo, as formas farmacêuticas desenvolvidas, utilizaram como ponto de partida a caracterização e padronização da forma cristalina, o estudo de pré-formulação para o produto acabado, sendo submetido a uma avaliação preliminar de estabilidade acelerada e de longa duração e analisado de acordo com os métodos analíticos gerais descritos no compêndio oficial (USP 25, 2003), no entanto, para o teor foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), desenvolvido e validado para a análise das amostras de ritonavir.

JUSTIFICATIVA

Introdução de novos agentes anti-retrovirais no mercado, possibilitando uma alternativa terapêutica no tratamento da AIDS.

Desenvolver diferentes formas farmacêuticas, cápsula gelatinosa mole e solução oral contendo ritonavir, está sendo de grande importância para o cenário terapêutico nacional para aumentar o elenco de produtos no combate a SIDA, colocando a disposição do programa brasileiro, uma alternativa terapêutica mais econômica e segura.

A realização deste projeto visou possibilitar a obtenção de medicamentos de qualidade e de baixo custo para a sociedade, pois o medicamento será produzido pelo Laboratório de referência estadual, LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), contando com o apoio do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético – NUDFAC, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos – NCQMC, Relthy Laboratórios LTDA e Ítaca Laboratórios Ltda (Hetero Pharmaceutical Industrie – Índia), permitindo assim, aproximar e desenvolver o potencial de materiais e recursos humanos da academia e setor industrial, o setor público privado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Desenvolver uma tecnologia de obtenção do anti-retroviral (Ritonavir) na forma farmacêutica solução oral e cápsula mole, seguindo procedimentos e normas preconizadas no desenvolvimento de medicamentos na indústria farmacêutica.

Objetivos específicos

- Caracterização e padronização do ritonavir.
- Estudo de pré-formulação para desenvolvimento das formas farmacêuticas: solução oral e cápsula mole.
- Validação da metodologia analítica para determinação do teor na matéria – prima produto acabado.
- Avaliação da estabilidade das formas farmacêuticas desenvolvidas nos modelos acelerados e de prateleira.

Artigo I

**Ritonavir: mais uma opção de
fármaco para o tratamento da AIDS.**

Ritonavir: mais uma opção de fármaco para o tratamento da AIDS

Juliana S. Alencar¹, Danilo C.G. Bedor¹; Flávia P.M. Medeiros.^{1,2}; Débora B. Monteiro^{1,2}; João Rui B. Alencar²; Miracy M. Albuquerque¹; Pedro J. Rolim Neto^{1,2*}

¹ *Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos–LTM-Deptº de Ciências Farmacêuticas-UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária - Recife - PE, CEP: 50740-521, ² Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife - PE, Cep: 52171-010, Brasil*

Resumo

A compreensão progressiva sobre a dinâmica viral e celular, e o melhor conhecimento dos mecanismos de ação farmacológica e de resistência aos medicamentos anti – retrovirais têm permitido substanciais avanços no controle clínico da imunodeficiência causada pelo HIV [1]. Embora o curso da infecção pelo HIV possa variar entre os indivíduos, padrão comum dos estágios de evolução da doença foi estabelecido. Estudos multicêntricos demonstraram as vantagens no tratamento quando o ritonavir está presente na terapia anti–retroviral, devido à ação específica de inibição da enzima protease, responsável pela clivagem da fita de poliproteína que dá origem ao novo vírus. Nesta revisão foram consideradas as principais particularidades do ritonavir, associando–as à eficácia para o tratamento terapêutico.

Unitermo: HIV, inibidor da protease e ritonavir,.

Autor para correspondência. Tel (fax).: (0XX81) 3272 - 1383
E-mail address: prolim@ufpe.br

1. INTRODUÇÃO

Várias questões foram colocadas a cerca da patogênese da AIDS, muitas delas ainda não respondidas. Desde sua primeira descrição, pode-se relacionar AIDS com importante depleção de linfócitos T auxiliares CD4⁺ no sangue periférico. Hoje sabemos que outras células, especialmente macrófagos teciduais, podem ser afetadas pelo HIV, e que considerável replicação viral ocorre nos linfonodos desde os primórdios da infecção. O HIV pode causar doença por um ou mais de uma variedade de mecanismos diretos ou indiretos.[2]

Embora a dinâmica do processo varie bastante de um paciente para outro, o padrão típico que descreve a infecção de um indivíduo pelo vírus do HIV foi observado em estudos no início da década de 1990, [3,4] revelando a existência de três fases bem características: a infecção primária, o período de latência clínica com o decréscimo gradual da contagem de células alvo e a manifestação da AIDS, descritos no Gráfico 1 [4].

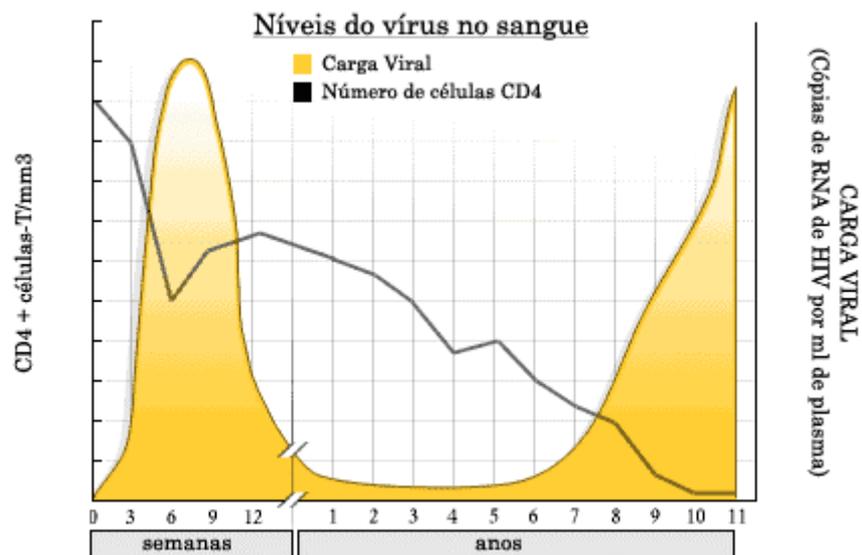


Gráfico 1 – Níveis do vírus no sangue - Após 6-12 semanas da Infecção Primária, a multiplicação do HIV atinge um pico. O Sistema Imunológico reage, os níveis virais são reduzidos, mas o vírus HIV nunca é totalmente suprimido. Na Fase Crônica (8-10 anos), o HIV pode ser detectado a níveis muito baixos. Os pacientes podem não apresentar sintomas durante anos. Mas o número de células CD4⁺ continua a declinar. Uma vez estabelecida a AIDS, as células CD4⁺ são completamente destruídas. O sistema linfático não mais consegue conter o vírus. Ele se multiplica sem controle com resultados trágicos em pacientes não-tratados. É neste estágio que caracteriza um número cada vez maior de infecções e cânceres, o que reflete a completa falência do sistema imunológico. [4]

O tratamento da AIDS objetiva combater especificamente o HIV, e prevenção e controle das inúmeras infecções oportunistas que acometem o indivíduo, principalmente a partir do momento em que apresenta deficiência imunológica grave. A avaliação dessa deficiência imunológica deve ser feita clinicamente e laboratorialmente, com mensuração periódica de linfócitos T auxiliares (CD4) e, recentemente, com a determinação da carga viral. Pacientes que apresentem número de CD4 menor que 200 células / mm³ têm maior probabilidade de desenvolver qualquer infecção. Paralelamente, considera-se que indivíduos com níveis de carga viral acima de 20.000 cópias / mL apresentam rápida deterioração do sistema imune (queda no nível de linfócitos auxiliares) e conseqüentemente deterioração clínica, caso inexista intervenção medicamentosa [2]. A decisão quanto ao esquema a ser utilizado na terapia inicial deverá ser feita de forma individualizada, baseando-se nos parâmetros clínicos, laboratoriais e farmacológicos das drogas anti-retrovirais disponíveis. A terapia inicial geralmente é composta por 2 inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), associado a um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN) ou a um inibidor da protease (IP) [5 – 11].

O ritonavir, um inibidor da protease, é usado na terapia da infecção pelo HIV, apresentando uma boa biodisponibilidade oral e em dose mais baixa é utilizado como adjuvante farmacológico do amprenavir, indinavir, lopinavir ou saquinavir, eleva substancialmente a concentração plasmática do IP combinado, permitindo a redução da quantidade diária de cápsulas e a ampliação do intervalo entre as doses, aumentando a potência e favorecendo a melhor adesão ao tratamento [12]. Visando a excelente atividade do fármaco, o presente trabalho objetiva descrever as suas principais funções, como também a forma de obtenção, apresentando as principais características que influenciam no desenvolvimento das formas farmacêuticas: solução oral e cápsula gelatinosa mole.

2. RITONAVIR

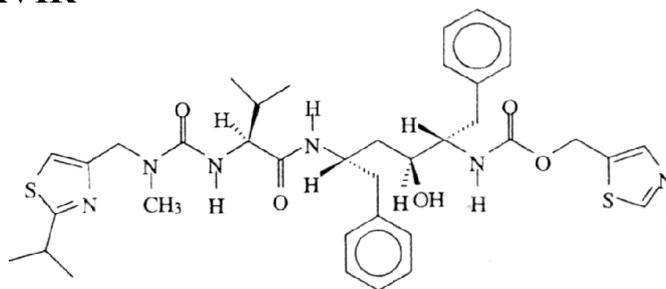


Fig. 1 – Estrutura molecular do ritonavir.

O ritonavir, 5S-(5R,8R,10R,11R)-10-hidroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1-(2-(1-metiletil)-4-tiazolil)-3,6-dioxo-8,11-bis-(fenilmetil)-2,4,7,12-tetrazatridecan-13-oic ácido 5-thiazolil-metil éster (Figura 1) é um inibidor da aspartil protease indicado no tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) [13 – 15]. A inibição da protease do HIV torna a enzima incapaz de processar o precursor da poliproteína gag-pol, fazendo com que as partículas virais produzidas sejam imaturas e portanto incapazes de iniciar um novo ciclo de infecção [16 - 17].

2.1 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética do ritonavir foi estudada em voluntários normais e em indivíduos infectados pelo HIV ($CD4 \geq 50$ células/mm³) e seus principais parâmetros estão indicados na tabela 1 [12].

Tabela 1 - Parâmetros Farmacocinéticos do Ritonavir

Parâmetros	n	Valores (média \pm d.p.)
C _{max} SS+	10	11,2 \pm 3,6 μ g/mL
C _{trough} SS+	10	3,7 \pm 2,6 μ g/mL
V _b /F++	91	0,41 \pm 0,25 l/kg
t _{1/2}	-	3 ~5 h
CL/F+	10	8,8 \pm 3,2 l/h
CL/F++	91	4,6 \pm 1,6 l/h
CL _R	62	< 0,1 l/h
Relação RBC / Plasma	-	0,14
Porcentagem de Ligação (*)	-	98 a 99%

SS+ = Estado de equilíbrio: pacientes recebendo ritonavir 600 mg a cada 12 horas.

++ Dose única de 600 mg de ritonavir.

* Principalmente ligação à albumina sérica e à alfa-1 glicoproteína ácida humana sobre concentrações séricas de ritonavir de 0,01 a 30 mcg/mL.

N = número de amostras

O ritonavir se liga à alfa-1 glicoproteína ácida (AAG) e a albumina sérica humana (HSA). Estudos de distribuição tecidual em ratos com ritonavir marcado em ^{14}C demonstraram que o fígado, as supra-renais, o pâncreas, os rins e a tireóide tinham as maiores concentrações de ritonavir e no cérebro penetra de maneira mínima. Observou-se que o ritonavir é extensamente metabolizado pelo sistema do citocromo hepático P-450, principalmente pela isoenzima CYP3A e em menor extensão pela CYP2D6. Sua eliminação se faz principalmente pela via hepatobiliar, onde aproximadamente 86% do produto foi recuperado nas fezes, sendo a eliminação renal não significativa com menos de 5% de ritonavir excretado na forma inalterada [18]. Devido a sua alta afinidade pelo citocromo P-450, garante a eficácia de sua associação com os demais IPs, isto porque, inibe o metabolismo, por exemplo, do indinavir, aumentando a meia-vida de 90 min para 5 horas. Ou seja, o ritonavir permite sinergismo de ação anti-retroviral, menores doses ingeridas, menores efeitos colaterais, maior adesão e menores custos de tratamento [18].

2.2 FARMACODINÂMICA

Ritonavir tem atividade seletiva pela protease do HIV e pouca atividade inibitória diante da aspartil-protease humana. A atividade antiviral foi avaliada *in vitro* em linhagens de células linfoblastóides e linfócitos de sangue periférico infectados ativamente. A concentração de medicação necessária para inibir 50% (EC50) da replicação viral variou de 3,8 a 153 nM, dependendo do isolado e das células utilizadas. Em células MT4, ritonavir demonstrou efeitos aditivos em combinação com zidovudina (ZDV) ou didanosina (ddl) [19 - 21].

2.3 POSOLOGIA

Os efeitos colaterais relacionados ao uso de ritonavir são transitórios e diminuem após duas semanas de tratamento. Para minimizá-los, de modo sensível, inicia-se o tratamento com posologia escalonada.

O período de escalonamento de doses não deve ser superior a 14 dias, iniciando-se em doses de 300 mg, 2 X ao dia (nunca menos), com incrementos de 100 mg, 2 X ao dia, a cada 3 ou 4 dias, até atingir a dose (máxima e nunca superior) de 600 mg, 2 X ao dia, a partir do 13º dia [22].

O escalonamento para introdução de ritonavir em associação deve ser feito em 7 dias, iniciando-se com doses de 200 mg, duas vezes ao dia, com incrementos de 100 mg, duas vezes a cada 3 ou 4 dias, até atingir a dose de 400 mg, duas vezes ao dia, a partir do 7º dia [22].

2.4 OBTENÇÃO DO FÁRMACO

A rota de síntese do ritonavir é dividida basicamente em três estágios. No primeiro estágio engloba a preparação do primeiro precursor o (2S, 3S, 5S)-5-amino-2-[N-[(5-tiazolil)metoxicarbonil]amino]-1,6-difenil-3-hidroxi-hexano. No segundo estágio o precursor ácido N-[[N-metil-N-[(2-isopropil-4-tiazolil)methyl]amino]carbonil]-S-valina é sintetizado. E na terceira etapa obtemos o ritonavir desprotegendo os dois precursores utilizando THF, hexano, acetato de etila [23, 24].

Além das impurezas voláteis (hexano e acetato de etila), são identificadas mais cinco impurezas, apresentadas na figura 2. E somente as impurezas 1, 2, 5 são passíveis de serem encontradas no produto final. A impureza IMP-1 pode ser identificada como o primeiro precursor do ritonavir. O IMP-2 como o segundo precursor do ritonavir. Estas impurezas podem ser encontradas por não serem completamente consumidas durante o terceiro estágio da formação do produto final. Já a impureza IMP-5 é encontrada também a partir do estágio crítico, em que ao invés da reação ocorrer com os dois reagentes, ocorre somente com duas moléculas de um único reagente, formando um subproduto de reação. As impurezas 3 e 4 são isômeros e somente são formadas caso o meio reacional seja submetido à condições extremamente adversas de pressão e temperatura, na etapa final de obtenção do ritonavir .

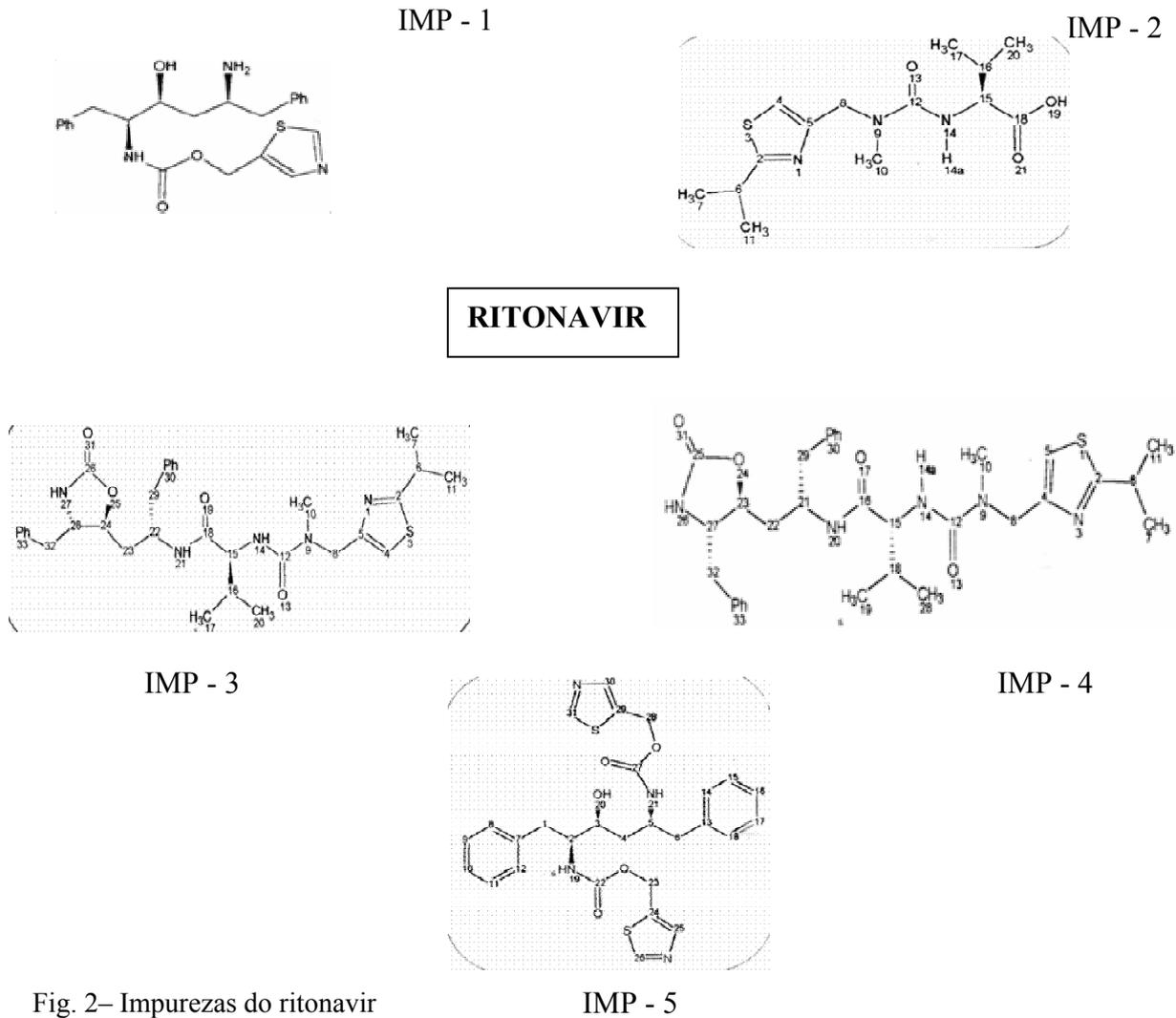
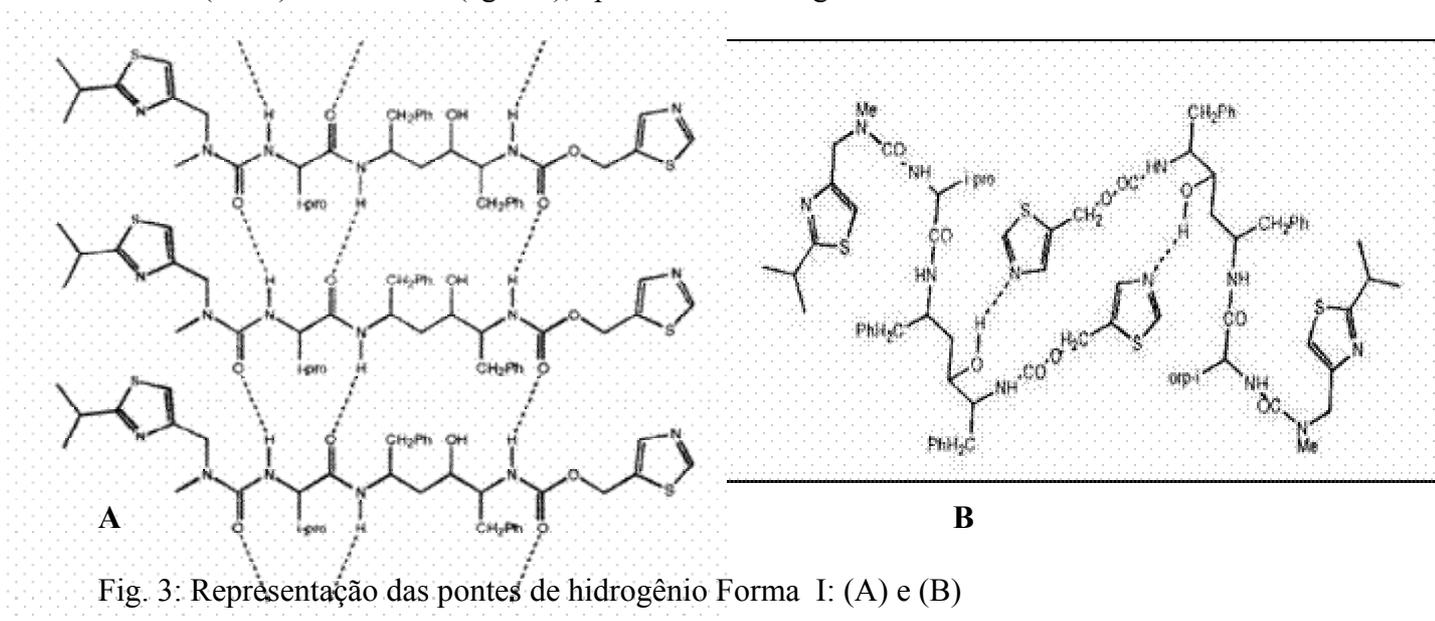


Fig. 2– Impurezas do ritonavir

Além das impurezas, o produto final pode ser encontrado sob duas formas cristalinas. A forma I (barra) e a forma II (agulha), apresentado nas figuras 3 e 4.



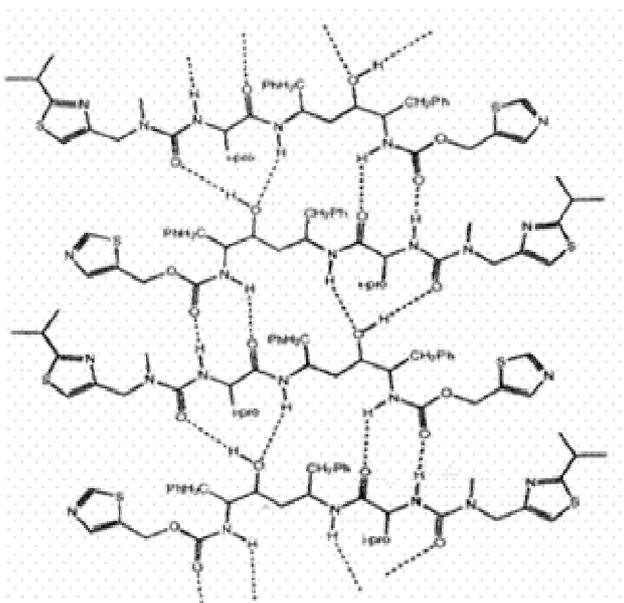


Fig. 4: Representação das Pontes de hidrogênio Forma II

O número total de ligação hidrogênio é a mesma para ambas as formas, entretanto a ligação entre as moléculas ocorre de forma diferente. As ligações hidrogênio da forma I seguem basicamente sob duas formas padrão. A primeira, a amida de uma molécula alinha-se transicionalmente com a mesma amida da próxima molécula, formando uma contínua pilha paralela para o pequeno eixo cristalográfico. A outra possibilidade é quando o radical OH de uma molécula forma ponte de hidrogênio com o anel tiazol de uma outra molécula. Para a forma II as ligações hidrogênio seguem basicamente uma única forma padrão. Na forma II todas as ligações hidrogênio doadoras e receptoras têm sido satisfeitas. Para ambas as formas existem oito pontes de hidrogênio. A ponte de hidrogênio entre o grupo OH de uma molécula e o anel tiazol da outra molécula não é a mesma da forma II. Na forma II o grupo OH apresenta-se na forma doadora e acceptora. Isto resulta em um efeito sinérgico e comparado com a forma I esta ponte de hidrogênio apresenta-se com uma maior força. Este resultado está estritamente relacionado com a solubilidade e a estabilidade do composto na forma farmacêutica, onde a forma I é a forma mais solúvel, sendo a forma cristalina preferida para a formulação [23, 25, 26, 27, 28, 29]

4.0 CONCLUSÕES

Com o advento da terapia anti-retroviral potente, as manifestações clínicas da infecção pelo HIV tornam-se menos freqüentes, ocorrendo melhora substancial do prognóstico e da qualidade de vida dos indivíduos infectados.

Regime de tratamento empregando ritonavir, como inibidor da protease, pode produzir um rápido e sustentável declínio do plasma viral e uma concomitante elevação de células CD4+ em indivíduos HIV-infectados.

Tendo em vista a descrição detalhada do inibidor da protease, verifica-se a fundamental importância deste fármaco na terapia anti-HIV. Porém, devido à exibição polimórfica conformacional, esta potente atividade pode ser influenciada. Isto nos leva a um estudo de desenvolvimento tecnológico mais profundo para obter uma forma farmacêutica estável, eficiente, de fácil administração, segura e terapeuticamente ativa.

Esta revisão técnica-científica suportou nosso interesse no desenvolvimento farmacotécnico-industrial de ritonavir nas formas cápsulas gelatinosas moles e solução oral com objetivo de ampliar o portfólio da produção pública de medicamentos anti-retrovirais.

5.0 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de suporte (LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco e LTM – Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos)

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Recomendações para terapia anti – retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, Ministério da Saúde, p. 1 – 34, 2001.
- [2] CINTRA; PRADO. *Atualização Terapêutica*, 20 ed., São Paulo: Artes Médicas – SP, p. 273 – 278, 2001.
- [3] ROITT, I.; *et al. Imunologia*, 2 ed., São Paulo: Manole, cap. 3, 1989.
- [4] PANTALEO, G.; *et al. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection*. The New England Journal of Medicine, v. 328, n. 183, p. 327 – 335, 1993.

- [5] BARTLETT, J. **Overview of the effectiveness of triple therapy in antiretroviral-naïve HIV – 1 infected adults.** AIDS, v. 15, p. 1369 – 1377, 2001
- [6] BHIVA WRITING COMMITTEE ON BEHALF OF THE BHIVA EXECUTIVE COMMITTEE. British HIV Association (BHIVA). **Guidelines for the Treatment of HIV – infected adults with antiretroviral therapy.** January 28, 2000. British HIV Association – BHIVA Disponível em :<<http://www.aidsmap.com>>. Acesso em:26 mar. 2003.
- [7] CARPENTER, C. C. J.; *et al.* **Antiretroviral therapy in adults.** Updated Recommendations of the International AIDS Society – USA Panel. JAMA, v. 283, p. 381 – 390, 2000.
- [8] DEEKS, S. **Optimizing antiretroviral therapy.** Madscape – HIV/ AIDS Disponível em: <<http://www.hiv.medscape.com>>. Acesso em:26 mar. 2003.
- [9] VEDKAMP, A. I.; *et al.* **Ritonavir enables combined therapy with rifampin and saquinavir.** Clin Inf Dis.,v. 29,p. 1586, 1999.
- [10] HAMMER, S. M., *et al.* **Advances in antiretroviral therapy and viral load monitoring.** AIDS, v. 10, 1996.
- [11] LEWIS, J. S. **Protease Inhibitors: A Therapeutic Breakthrough for the Treatment of Patients with Human Immunodeficiency Virus.** Clinical Therapeutics, v. 19, n. 2, p. 187 – 214, 1997.
- [12] LEA, A. P.; *et al.* **Ritonavir.** New Drugs Profile, v. 52, n. 4, p. 541 – 546, 1996.
- [13] The Merck Index, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 12 ed., p. 1418 – 1419, 1996.
- [14] OHTA Y.; SHINKAI, I. **New drugs – reports of new drugs recently approved by the FDA.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 5, nº3, page 461 – 462, 1997

- [15] LAW, D., *et al.* **Physicochemical considerations in the preparation of amorphous ritonavir – poly (ethylene glycol) 800 solid dispersions.** J. Pharm. Sci., v. 90, p. 1015 – 1025, 2001.
- [16] MOYLE G., *et al.* **Current knowledge and future prospects for the use of HIV protease inhibitors.** Drugs, v. 5, p. 701 – 712, 1996.
- [17] KEMPF, D. J., *et al.* **ABT – 38 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioviability in humans.** Proc. Natlycad Sci USA v. 92, p. 2484 – 2488, 1995.
- [18] KEMPF, D. J.; *et al.* **Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 41, n. 3, p. 654 – 660, 1997.
- [19] BARRY, M., *et al.* **Protease inhibitors in patients with HIV disease.** Clin. Pharmacokinet, v. 32, n. 3,;p. 194 – 209, 1997.
- [20] DEEKS, S. G.; *et al.* **HIV – 1 Protease inhibitors.** JAMA, v. 277, n. 2, p. 145 – 153, 1997.
- [21] MCDONALD, C. K., *et al.* **Human immunodeficiency virus type 1 – Protease inhibitors.** Arch Intern Med, v. 157, p. 951 – 959, 1997.
- [22] Disponível em: <http:// www.norvir.com>. Acesso em: 20 nov. 2002.
- [23] BAUER, J., *et al.* **Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development.** Organic Process Research & Development, v. 4, p. 413 – 417, 2000.
- [24] HAMADA, Y., *et al.* **New water – soluble prodrugs of HIV protease inhibitors based on O→N intramolecular acyl migration.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 10, p. 4155 – 4167, 2002.
- [25] BAUER, J., *et al.* **An extraordinary example of conformational polymorphism.** Pharmaceutical Research, v. 18, n. 6, 2001.

- [26] OSTWALD, W. *Über die vermeintliche isomeric dès roten und gelben quecksilberoxyds und die oberflashes spannung fester korper.*Z. Physical Chem., v. 34: p. 495 – 503, 1900.
- [27] BURGER, A., *et al.* *On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals I.* Mikrochim. Acta (Wien) v. 2, p. 259 – 271, 1979.
- [28] BURGER, A.; *et al.* *On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals II.* Mikrochim. Acta (Wien) v. 2, p. 273 – 316, 1979.
- [29] ROWE, R. C. *Crystal gazing – seeking that elusive polymorph.* DDT, v. 6, n. 8, 2001.

Artigo II

Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.

*** Artigo submetido para publicação na revista Química Nova**

Alencar, J. S. *Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas*

CONTROLE DA AUTENTICIDADE DO ANTI-RETROVIRAL RITONAVIR POR RMN¹H, IVTR E DIFRAÇÃO DE RX PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE FORMAS FARMACÊUTICAS

Juliana de Souza Alencar

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM, Universidade Federal de Pernambuco - PE, alencar.Juliana@ig.com.br

Ana Cristina Lima Leite, Dalci José Brondani

Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos-LABSINFA – Universidade Federal de Pernambuco – PE, dalci@ufpe.br

Pedro José Rolim Neto*

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM, Universidade Federal de Pernambuco - PE

Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE – PE, prolim@ufpe.br

Alencar, J. S. *Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas*

AUTHENTICITY CONTROL OF ANTI-RETROVIRAL RITONAVIR BY IVTF, ¹H-NMR AND RX DIFRACTION FOR OBTENTION TECHNOLOGIC OF PHARMACEUTICS FORMS.

Ritonavir, a protease inhibitor, for human immunodeficiency syndrome (AIDS) presents a polymorphism phenomenon. Two forms of crystal are known, form I and form II. The form II are the most stable that's results a much less soluble crystal. Differences in solubility between crystal forms of a pharmaceutical can lead to differences in bioavailability of solid dosage forms. In attempts to identify this phenomenon, this study provide a analytical control of five different samples of Ritonavir of five supplies (A,B,C,D and E). Spectroscopy and microscopy including IVTF, ¹H-NMR and RX Difraction was used to investigate the ritonavir polymorphism. Only the supply A, presented a polymorph form II.

Keywords: Ritonavir, polymorphism, spectroscopy.

INTRODUÇÃO

O ritonavir, também descrito como (5S-(5R, 8R, 10R, 11R))10-hydroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1-(2-(1-metiletil)-4-tiazolil)-3,-dioxo-8,11-bisfenilmetil)-2,4,7,12-tetraazatridecan-3-óic ácido, 5-tiazolil-metil éster¹, é um dos mais recentes agentes anti-retrovirais que apresenta atividade seletiva pela protease do HIV, fazendo com que as partículas virais produzidas sejam imaturas e, portanto, incapazes de iniciar um novo ciclo de infecção celular^{2,3}. Este fármaco é indicado isoladamente ou combinado com análogos de nucleosídeos para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^{4,5,6}, sendo administrado oralmente, duas vezes ao dia, com doses de 1200mg⁷.

No mercado farmacêutico, o ritonavir é produzido por uma única indústria (Abbott), com o nome comercial Novir, nas formas farmacêuticas cápsula mole e solução oral^{8,9}. Com a possibilidade de quebra da patente e os recentes avanços na área, têm permitido que novas indústrias invistam em um planejamento estratégico de desenvolvimento farmacotécnico-industrial para medicamentos anti-retrovirais. No Brasil, observa-se um aumento significativo do número de pesquisas de fármacos com alto valor agregado, na tentativa de se conseguir uma forma farmacêutica bioequivalente, de custo viável e de boa qualidade. Tais desafios garantem a redução da incidência de AIDS nos diferentes segmentos populacionais em situações de risco e vulnerabilidade, garantindo, desta forma, os direitos de cidadania e uma melhor qualidade de vida para as pessoas dependentes desta medicação.

Durante a fase de desenvolvimento farmacêutico, apenas uma forma de cristal tinha sido identificada e nenhum problema de estabilidade havia sido detectado. Em 1998, vários lotes de cápsulas revelaram problemas nos testes de dissolução, o que revelou problemas na formulação e estabilidade do produto farmacêutico final^{8,9}. Um estudo aprofundado de seus cristais revelou o fenômeno de polimorfismo, onde foi verificado a existência de duas formas cristalinas, a Forma I e Forma II. Polimorfismo é a habilidade de um composto sólido tem de existir em mais de uma forma cristalina, quase sempre diferenciando em suas propriedades físicas. Estas formas cristalinas embora quimicamente idênticas, resultam das diferentes formas de arranjo das moléculas no retículo cristalino. A forma II tem revelado maior estabilidade do cristal refletindo numa diminuição da solubilidade da matéria-prima com prejuízo no produto acabado. Um grande número de fármacos apresenta o fenômeno de polimorfismo, sendo

Alencar, J. S. *Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas*

que raramente este polimorfo tem efeito tão acentuado em suas propriedades, refletindo dramaticamente no produto farmacêutico final como no caso do ritonavir.

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) vem convergindo esforços com o intuito de incorporar o Ritonavir em sua linha de produção. Baseados nas informações acerca do fenômeno de polimorfismo e dos problemas de estabilidade do ritonavir, o LAFEPE em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), vem investigando a existência do fenômeno de polimorfismo na matéria-prima de ritonavir, sintetizado por cinco fornecedores distintos, A,B,C,D e E.

As metodologias adotadas, IV, H¹-RMN e difração de raios X têm revelado diferentes formas de cristais obtidas a partir dos fornecedores. O estudo revelou que dos cinco fornecedores, apenas um apresentou características de polimorfo na forma II.

PARTE EXPERIMENTAL

AMOSTRAS

Foram selecionadas amostras de ritonavir de cinco fornecedores (A, B, C, D e E), os quais apresentam rotas sintéticas semelhantes subdivididas em três etapas críticas.

Os diferentes fornecedores apresentam rotas sintéticas semelhantes, que envolve a condensação de fragmentos sintéticos. A reação global envolve a condensação do (2S,3S,5S)-5-(ter-butiloxicarbonil)amino-2-amino-3-hidroxi-1,6-difenilhexano com o ester ativo 5-(4-nitrofenoxicarboniloximetil)tiazol e que após desproteção, em meio ácido, fornece o fragmento (2S,3S,5S)-5-amino-2-[N-[(5-tiazolil) metoxi carbonil]amino]-1,6-difenil-3-hidroxi-hexano. Simultaneamente o segundo fragmento é obtido pela reação do éster 2-isopropil-4-[(N-metilamino) metil]tiazol com N-[(4-nitrofenil) oxi]carbonil-L-vanilnametil que após hidrólise básica fornece o segundo fragmento o N-[[N-metil-N-[(2-isopropil-4-tiazolil)metil]amino]carbonil]-L-valina. A condensação final dos dois fragmentos leva ao (2S,3S,5S)-5-[N-[N-[[N-metil-N-[(2-isopropil-4-tiazolil) metil]amino]carbonil-L-valinil]amino]-2-[N-[(5-tiazolil)metoxicarbonil]amino]-1,6-difenil-3-hydroxi-hexano, o ritonavir, mostrado no esquema 1 em ANEXO.

Esquema 1: Rota sintética do Ritonavir a partir dos fragmentos (ANEXO)

Alencar, J. S. *Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas*

Foram utilizados métodos espectroscópicos ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) com um aparelho Varian Unity plus-300 MHz; as amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado, e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ). Os espectros de infravermelho (IVTF) foram realizados num aparelho Bruker IFS66 FTIR, utilizando pastilhas de KBr e suas absorções expressas em cm^{-1} . A análise de difração de raios X, foram obtidas usando um difratômetro Siemens D-5000 Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) radiação e razão de 0,02 graus por minuto utilizando o próprio cristal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do espectro de IVTF, para o fornecedor A (forma II), revelou diferença em três bandas de forte absorção nas regiões de 1660,5; 1611,6 e 1345,2 cm^{-1} , sendo que para os restantes dos fornecedores, B, C, D e E (forma I) uma forte absorção na região de 1623,8 cm^{-1} , como representado na figura 1.

A

B

Figura 1: Espectros de Infra-vermelho: Forma I (A) e Forma II (B) (ANEXO)

A análise do espectro de RMN ¹H para o fornecedor A (forma II), revelou a ausência de um único pico largo em 4,525 ppm correspondente a hidroxila (figura 2). A ausência do grupo OH livre, sugere formação de pontes de hidrogênio mais fortes característico da forma II (figura 4). Segundo Bauer⁹, na forma II o grupo álcool atua simultaneamente como doador e receptor de hidrogênio. Isto resulta em um efeito sinérgico que promove a formação de pontes de hidrogênio mais fortes. Os hidrogênios dos grupos NH são verificados em todos os espectros analisados, tanto na forma I como na forma II, uma vez que as pontes de hidrogênios formadas a partir do NH são mais fracas, resultando em um pico largo em 6,192 ppm (figura 2). Para os fornecedores B, C, D e E, (forma I) destaca-se a presença do pico largo em 4,525 ppm, atribuído ao hidrogênio da hidroxila, uma vez que, mesmo que as hidroxilas participem de pontes de hidrogênio com o nitrogênio do anel tiazol (figura 3) (ANEXO), estas são de caráter mais fraco sendo então detectado no aparelho de RMN.

A

B

Figura 2: Espectros de RMN: Forma I (A) e Forma II (B) (ANEXO)

A

B

Figura 3: Representação das Pontes de hidrogênio Forma I: (A) e (B) (ANEXO)

Figura 4: Representação das Pontes de hidrogênio Forma II (ANEXO)

A literatura relata que os dois polimorfos do ritonavir descritos na literatura e denominados de forma I e forma II pertencem aos sistemas cristalinos monoclinico e ortorrômbico, respectivamente. Seus difratogramas apresentam um grande número de reflexões, entretanto, segundo Chemburkar *et al.*⁸ a forma I pode ser caracterizada pela presença de dois picos em valores de 2θ iguais a $3,32^\circ$ e $6,75^\circ$, enquanto a forma II apresenta picos em $9,51^\circ$, $9,88^\circ$ e $22,2^\circ$.

Para os difratogramas de raios-X das amostras dos fornecedores A, B, C, D e E são apresentados na figura 5. Por inspeção direta, a amostra A não corresponde à mesma fase das amostras B, C, D e E. Em conformidade com a literatura, a matéria-prima do fornecedor A apresenta picos em $9,67^\circ$, $10,03^\circ$ e $22,37^\circ$ indicando cristais da forma II. Já as amostras dos fornecedores B, C, D e E apresentaram picos em $3,65^\circ$ e $7,08^\circ$ característicos de cristais da forma I.

I

II

Figura: 5: Difratograma de RX dos cristais de Ritonavir Forma I (A) e Forma II (B) (ANEXO)

CONCLUSÕES

O estudo analítico realizado com as diferentes técnicas para cada um dos cinco fornecedores revelou que apenas um fornecedor A, fornece o produto na forma II e os outros quatro fornecedores B, C, D e E fornecem os seus produtos na forma I do cristal. Foram analisadas cinco amostras de matérias-primas de fornecedores diferentes do fármaco ritonavir fornecido ao laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE. A partir dos estudos realizados utilizando as técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H), infravermelho (IVTF) e análise de difração de raios X foi

Alencar, J. S. *Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas*

possível detectar que o material fornecido A, B, C, D e E para a indústria farmacêutica, LAFEPE não é apenas uma forma polimórfica, mas dois polimórfos; forma I e forma II. A análise da amostra do fornecedor A indica que o material fornecido é da forma polimórfica II. A forma II do ritonavir, por apresentar um arranjo estrutural que desfavorece a solubilidade do produto inviabilizando sua utilização na indústria farmacêutica. A partir destes resultados, formas farmacêuticas foram desenvolvidas, onde os produtos encontram-se em estudo de estabilidade acelerada, seguindo a RE 560 de 2 de abril de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, (LAFEPE) e a Central Analítica do Depto de Química Fundamental-UFPE.

REFERÊNCIAS

1. *The Merck Index*, 12th ed., 1996, p. 1418 – 1419.
2. Law, D.; Krill, S. L.; Schmitt, E. A.; Fort, J.J.; *J. of Pharmaceutical Science*. **2001**, 90, 1015.
3. McDolnald, C. K.; Kuritzkes, D. R.; *Arch Intern Med*. **1997**, 157, 951.
4. Carpenter, C. C. J.; Cooper, D. A.; *JAMA*, **2000**, 283, 381.
5. Veldkamp A. J.; Hoetelmans M. W.; Beinjinen J. H.; *Clin Inf Dis.*, **1999**, 29, 1586.
6. Lewis J. S.; Terriff C. M.; Coulston, D. R.; Garrison, M. W.; *Clinical Therapeutics*, **1997**, 19, 187.
7. Lea, A. P.; Faulds, D.; *Drugs*, **1996**, 52, 541.
8. Chemburkat, S. R., Bauer, J.; Deming, K., Spiwek, H., Patel, K., Morris, J.; Henry, R., Spanton, S.; Dzik, W., W.; Porter, Quick, J.; Bauer, P., Donaubauer, J., Narayanan, B. A., Soldani, M., Riley, D., Macfarland, K., *Organic Process Research & Development*, **2000**, 4, 413.
9. Bauer, J.; Spanton, S.; Henry, R.; Quick, J.; Dziki, W.; Porter, W.; Morris, J.; *Pharmaceutical Research*, **2001**, 18, 859

Artigo III

**Caracterização do ritonavir para
obtenção tecnológica de um anti-
retroviral.**

CARACTERIZAÇÃO DO RITONAVIR PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE UM ANTI - RETROVIRAL

J.S. Alencar^{}, D.C.G. Bedor^{*}; P.M. Medeiros.^{*,***}; D.B Monteiro^{*}; T.G. Nascimento^{**}; J.R.B. Alencar^{***}; S. D. S. Filho^{*}; A. Galembeck^{****}; R. O. Macêdo^{**}; M. M. Albuquerque^{*}; P.J. Rolim Neto^{*,***}*

* Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos- LTM-Dept^o de Ciências Farmacêuticas-UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária - Recife - PE, CEP: 50740-521, ** UDEM-Dept^o de Ciências Farmacêuticas-UFPB, Campus I, João Pessoa PB, *** Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife - PE, Cep: 52171-010, ****Dept^o de Química Fundamental - DQF-UFPE, Cidade Universitária - Recife - PE, Brasil

Resumo

Foram efetivadas avaliações físico – químicas da matéria – prima ritonavir, utilizando técnicas termo-analíticas, microscopia óptica, difração de raios-X e ponto de fusão. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Calorimetria Diferencial Exploratória fotovisual (DSC fotovisual) foram as duas técnicas utilizadas neste estudo, capazes de avaliar a presença de múltiplas formas polimórficas na molécula do ritonavir. Portanto, foram acopladas amostras de dois fornecedores (A e B) em uma célula de alumínio com massa de $2 \text{ mg} \pm 0,04$ e submetidas a uma atmosfera de nitrogênio de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, com razão de aquecimento de 5, 10, 15 e $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura de 25–400°C. Os resultados mostraram comportamentos distintos nas amostras dos dois fornecedores, comprovando a presença de duas formas cristalinas. As diferentes formas polimórficas foram confirmadas realizando testes de microscopia óptica, solubilidade, difração de raios-X e ponto de fusão, para amostras de mais três fornecedores (A, B, C, D e E).

Keywords: Polimorfismo, DSC, microscopia óptica, difração de raios-X, ritonavir e anti-retroviral.

Autor para correspondência : e-mail: prolim@ufpe.br

Introdução

O ritonavir, uma potente droga anti-HIV, está sendo desenvolvida nas formas farmacêuticas cápsula mole e solução oral pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e colaboradores, com o objetivo de aumentar o elenco de produtos para o tratamento da AIDS, fornecido ao Ministério da Saúde no Brasil. Esta droga é um inibidor da protease que age no último estágio da formação do HIV, impedindo a ação da enzima protease, fundamental para a clivagem das cadeias protéicas produzidas pela célula infectada. [1 - 4]

Descoberto em 1992 e comercializado em 1996 pela Abbott Laboratories, o ritonavir apresentou-se com inesperadas alterações nos lotes do Novir Cápsulas, sendo identificadas após dois anos, quando vários lotes da cápsula falharam na dissolução. Portanto, foram realizadas investigações que resultaram na identificação de duas formas cristalinas I e II. Segundo a literatura, os cristais da forma I apresentam forma de barra com ponto de fusão de 122°C, enquanto a forma II tem forma de agulha com mudança de estado físico a 125°C. Relatos posteriores apontaram que os dois polimorfos apresentam o mesmo ponto de fusão $122 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A análise cristalográfica dos dois polimorfos mostram que a forma I tem estrutura monoclínica e a forma II ortorrômbica, com a presença de picos de difração bem característicos em $3,32^\circ$ e $6,75^\circ$ 2θ e $9,51^\circ$, $9,88^\circ$, $22,2^\circ$ 2θ , respectivamente. [5 - 6]

Durante a análise das amostras de cinco fornecedores diferentes, identificamos que as morfologias dos diferentes polimorfos diferem do que está reportado na literatura. Assim, o presente trabalho relata a caracterização físico-química e as propriedades térmicas de amostras de ritonavir comercial, onde foram observadas as discrepâncias citadas acima.

Experimental

Seleção das amostras

As amostras de ritonavir foram obtidas através de cinco laboratórios: A (Lote: 011001), B (Lote: 020301), C (Lote: 34), D (Lote: 0110) e E (Lote: 211131).

Caracterização da matéria – prima

Estudo de microscopia

A análise microscópica e fotomicroscópica foi representada usando um microscópio óptico Zeiss (Axiolab) com câmera acoplada MC 80, objetiva achroplan 100x/1,25 Oil Ph3.

Estudo de solubilidade

Os testes de solubilidade foram realizados tentando dissolver 90 mg das amostras B e D em volumes de 0,4 e 1,0 mL de etanol P.A. Merck.

Estudo de difração de raios-X

As medidas de difração de raios-X foram realizadas usando um difratômetro Siemens D-5000 com radiação Cu K α ($\lambda = 1,54$ angstroms) e taxa de varredura de 0,02 graus por minuto, no intervalo de 3 a 30°.

Ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado utilizando um fusiômetro Polax WRS – 1 Digital Melting Point Apparatus, com taxa de aquecimento de 0,5°C/min.

Análise Térmica - Estudo Calorimétrico

O DSC foi calibrado com índio ($156,6 \pm 0,2^\circ$) e zinco ($419,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$), seguindo condições de padronização. As curvas de DSC foram obtidas em um Shimadzu calorímetro diferencial, modelo DSC-50, com atmosfera de nitrogênio de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento de 5, 10, 15 e $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura de $25 - 400^\circ\text{C}$. As amostras dos fornecedores A e B foram acopladas em uma célula de alumínio hermeticamente fechada com massa de $2 \pm 0,04 \text{ mg}$. Os dados do DSC fotovisual foram obtidos por um microscópio Olympus e conectado à câmera Sanyo, modelo VCC - D 520, com imagem interligada ao software, modelo Intel Smart Video Record II, em uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura variando $25^\circ\text{C} - 126^\circ\text{C}$, com célula de alumínio aberta e massa de $2 \pm 0,04 \text{ mg}$.

Resultados

Estudo de microscopia

A figura 1 mostra a diferença na forma dos cristais do ritonavir de diferentes fornecedores, quando examinado em um microscópio óptico com objetiva de 100x/1,25 Oil Ph3. As amostras dos fornecedores A e D apresentaram forma em barra, enquanto a amostra B apresentou forma de agulha. As amostras fornecidas por C e E não apresentam morfologia definida.

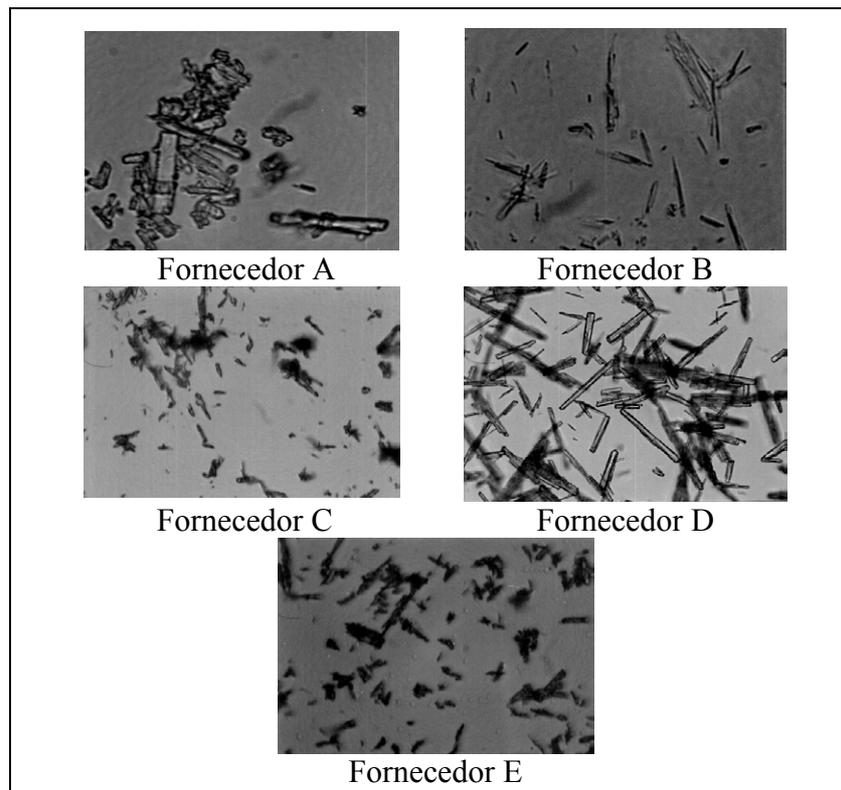


Fig. 1. Microscopia em vídeo do cristal: Forma em barra (fornecedor A e D), Forma agulha (fornecedor B) e cristais de forma não definida (fornecedor C e E).

Estudo de solubilidade

A solubilidade do ritonavir para os fornecedores B e D foi avaliada utilizando etanol P.A. Observou-se que na concentração de 90 mg/mL ambas as amostras solubilizaram. Porém, na concentração de 225 mg/mL, somente a amostra do fornecedor B obteve solubilização total.

Estudo de difração de raios - X

Os resultados dos difratogramas de raios-X das amostras fornecidas pelos fabricantes A, B, C, D e E são apresentados na tabela 1, de onde pode-se inferir que as amostras A e D não correspondem à mesma fase das amostras B, C e E.

Os dois polimorfos do ritonavir descritos na literatura e denominados de forma I e forma II pertencem aos sistemas cristalinos monoclinico e ortorrômbico, respectivamente. Seus difratogramas apresentam um grande número de reflexões, entretanto, segundo Chemburkar *et al.* a forma I pode ser caracterizada pela presença de dois picos em valores de 2θ iguais a $3,32^\circ$ e $6,75^\circ$, enquanto a forma II apresenta picos em $9,51^\circ$, $9,88^\circ$ e $22,2^\circ$.

No caso das amostras estudadas neste trabalho, as matérias - primas dos fornecedores A e D apresentaram picos em $9,67^\circ$, $10,03^\circ$ e $22,37^\circ$, enquanto as dos fornecedores B, C e E apresentaram picos em $3,65^\circ$ e $7,08^\circ$. Esses resultados, descritos na tabela 1, estão em contradição com os reportados anteriormente, já que seria de se esperar que os cristais em forma de bastão correspondem à forma I e que os cristais em forma de agulha, à forma II [5,6].

Tabela 1 – Comparação dos resultados de difração de raios-X para os polimorfos I e II e dos cinco fornecedores analisados.

FORMA I	FORMA II	A	B	C	D	E
$3,32^\circ$	$9,51^\circ$	$8,59^\circ$	$3,30^\circ$	$3,31^\circ$	$8,61^\circ$	$3,33^\circ$
$6,75^\circ$	$9,88^\circ$	$10,89^\circ$	$6,74^\circ$	$6,74^\circ$	$10,89^\circ$	$6,76^\circ$
-	$22,2^\circ$	$22,16^\circ$	-	-	$22,17^\circ$	-

Ponto de fusão

Os resultados de ponto de fusão para os cinco fornecedores podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados do ponto de fusão para as diferentes formas cristalinas.

Fornecedor	Resultados
A	123,8 – 124,5°C
B	122,7 a 123,1°C
C	120,0 a 121,7°C
D	124,8 a 125,2°C
E	121,4 a 125,5°C

As amostras A, B e D apresentaram uma maior pureza, fundindo-se em faixa estreita de temperatura. Observa-se também, uma diferença de ± 2 a 3°C do início e término da fusão comparando as amostras dos fornecedores A e D com a amostra B. Para os fornecedores C e E a faixa de fusão é larga. Isto pode indicar que as amostras C e E tem menos grau de pureza, o que pode ter conseqüências importantes na formação dos cristais.

Estudo Calorimétrico

Os resultados das diferentes faixas de aquecimento, descritos na tabela 3, calor de fusão e ponto de fusão foram obtidos através das amostras dos fornecedores A e B. As amostras do ritonavir foram agrupadas em cadinhos hermeticamente fechados. Depois deste tratamento as amostras foram escaneadas em DSC, e as curvas são apresentadas na figura 2, mostrando o comportamento térmico nas diferentes razões de aquecimento.

Tabela 3 – Dados do DSC convencional da forma I e II em diferentes razões de aquecimento.

Amostras	Fornecedor A		Fornecedor B	
	Calor de fusão (J/g)	Ponto de fusão (°C)	Calor de fusão (J/g)	Ponto de fusão (°C)
5°C.min ⁻¹	94,48	122,91	73,19	121,02
10°C.min	91,20	124,62	74,29	121,95
15°C.min	89,33	124,32	63,06	123,57
20°C.min	91,93	127,48	68,66	124,18

Uma diferença no comportamento térmico das duas formas cristalinas foi evidenciada na tabela 3. Observou-se que a amostra A necessitou de mais calor, comparado com o fornecedor B, para atingir o estágio de transição de fases; e conseqüentemente apresentou em todas as taxas de aquecimento um ponto de fusão de 1-3°C mais elevado.

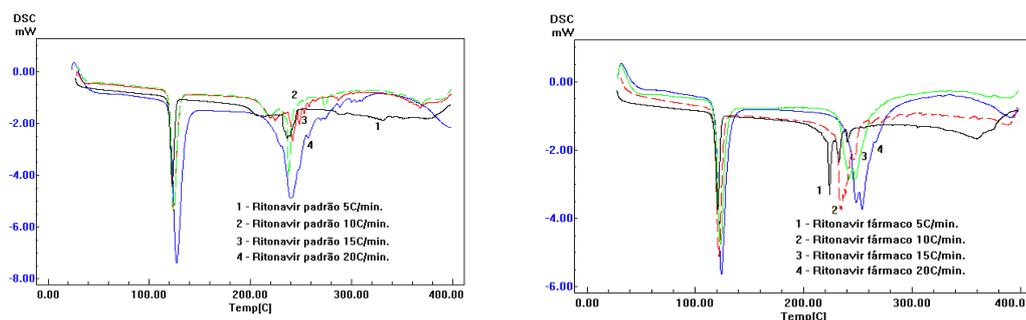


Fig. 2. Curvas DSC do fornecedor A e fornecedor B em diferentes razões de aquecimento.

A transferência de calor entre as fontes, amostra e referência, não é instantânea com alta taxa de aquecimento. Um atraso térmico ocorre entre as diferentes partes do aparato, resultando em uma menor estabilidade da linha de base e um pico de fusão largo. Portanto, uma baixa taxa de aquecimento é preferível para esta análise.

As imagens do DSC-fotovisual são mostradas na figura 3. O sistema fotovisual expõe uma imagem mais detalhada da acomodação dos cristais na célula de alumínio. Na figura 3 (fotos A₁ – A₂) mostra a captura da imagem a uma temperatura de 25°C, com amostra de mesma massa (2 mg ± 0,04), sendo a foto A₁ representada pelo Fornecedor A e a foto A₂ pelo Fornecedor B. Comprovando o que pode ser visto na microscopia

óptica, na temperatura ambiente, visualizam-se acomodações distintas para as duas formas cristalinas, onde o fornecedor A apresenta-se com cristais muito agrupados, necessitando de um menor volume espacial. Confirmando os resultados obtidos pelo DSC convencional, a figura 3 mostra também a diferença característica no ponto de fusão. Na temperatura de 120°C (fig. 3 foto C₂) visualiza-se o início da fusão para o fornecedor B do ritonavir, fluindo até a temperatura de 122°C (fig. 3 foto E₂). Para o fornecedor A essa temperatura inicial e final se estende para uma faixa de 122°C a 124°C (fig. 3 foto E₁ e G₁, respectivamente), comprovando a diferença de 2°C no início e término do ponto de fusão para as formas polimórficas

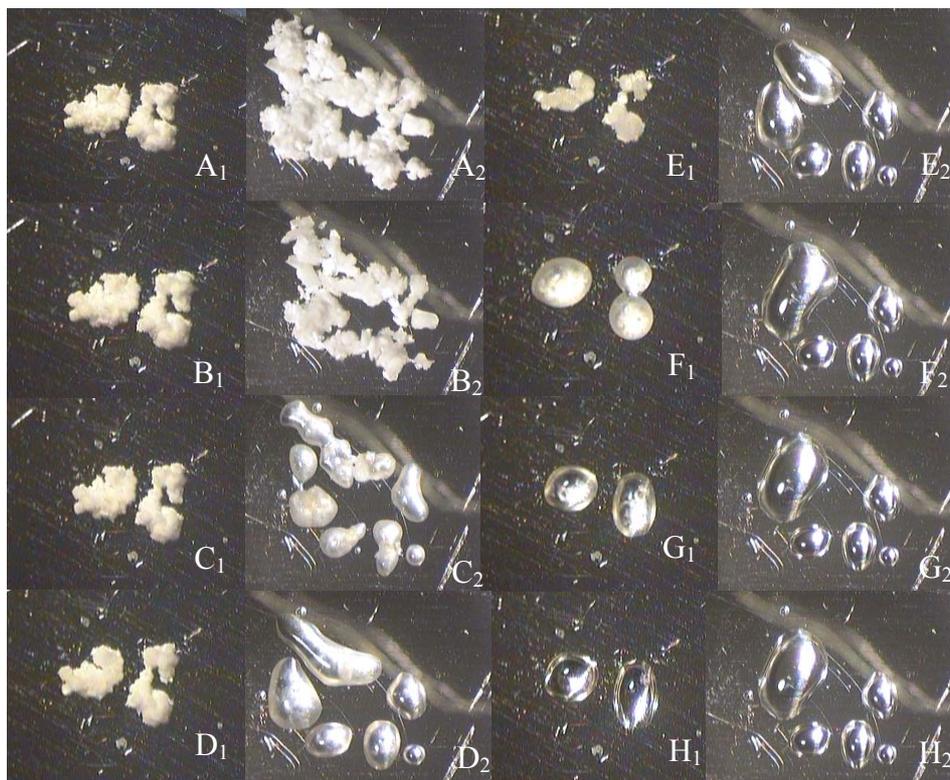


Fig. 3 – Fotos A1-A2 (25°C), B1-B2 (115°C), C1-C2 (120°C), D1-D2 (121°C), E1-E2 (122°C), F1-F2 (123°C), G1-G2 (124°C) e H1-H2 (126°C) do fornecedor A e B do ritonavir, respectivamente.

Pode ser observado diferentes comportamentos no ponto de fusão das amostras para o DSC convencional e DSC acoplado a um sistema foto-visual. Isto é devido à extensiva sublimação feita no lugar em que se encontra a amostra na ausência de tampa, acarretando um menor ponto de fusão na mesma razão de aquecimento para o sistema foto-visual.

A contribuição da análise térmica é de extrema importância na identificação da estabilidade do composto, sendo possível encontrar uma forma mais estável. O sistema foto-visual também é uma técnica térmica que pode monitorar visualmente os eventos físicos e químicos que ocorreram na amostra durante a temperatura programada, acompanhada através da captura da imagem. Por estas razões, a investigação térmica dos compostos polimórficos está sendo largamente usada na indústria farmacêutica, auxiliando no estudo de pré-formulação, especialmente se o estado sólido do composto apresentar significativa diferença na biodisponibilidade. [7 - 11]

Discussões

As diferenças da morfologia dos cristais entre formas polimórficas são, normalmente, bastante distintas, de forma que o microscópio óptico revelou a presença de uma forma em barra, agulha e uma estrutura cristalina não definida para a molécula de ritonavir. As formas cristalinas definidas mostraram na realização dos ensaios de solubilidade, uma diferença significativa no perfil de solubilidade para as formas em barra e agulha. Os estudos indicaram que a forma cristalina agulha, por apresentar um arranjo estrutural que favorece a solubilidade, é a forma cristalina que permanece em equilíbrio quando solubilizado em solvente alcoólico. No caso da difração de raios-X evidenciou a orientação aleatória da estrutura do cristal, onde levou ao desvio dos picos dos raios-X de uma forma reprodutível no ângulo 2θ . A análise simples dos cristais permitiu precisas identificações e descrições, proporcionando diferenças específicas entre as formas cristalinas do composto. As técnicas térmicas foram também de fundamental importância nos estudos de pré-formulação, revelando o grau de polimorfismo do ritonavir, mostrando existir uma diferença no início e término da fusão de 2-3°C para as formas cristalinas: barra e agulha.

Conclusões

- A microscopia óptica é uma técnica simples e de baixo custo, porém revelou ser uma técnica não confiável para certificar e aprovar as amostras comerciais de ritonavir P.A.

- Com as análises realizadas, verificou – se que os resultados de microscopia óptica entraram em contradição com os reportados anteriormente, dificultando na escolha da melhor forma cristalina para dar início ao estudo de pré–formulação.
- Os dados de análise térmica conseguiram diferenciar as duas formas polimórficas do ritonavir de forma rápida e precisa, confirmadas pelas técnicas de solubilidade, difração de raios-X e ponto de fusão.
- Os dados térmicos mostraram diferenças no ponto de fusão das formas polimórficas, as quais podem estar relacionadas com diferenças de solubilidade.
- Os dados térmicos foram essenciais na qualificação e certificação do fornecedor, dando início ao desenvolvimento planejado de formulações farmacêuticas. Dessa forma, a caracterização do insumo ativo qualifica e certifica os fornecedores, garantindo o sucesso da obtenção tecnológica dos anti–retrovirais, como alternativa de produto genérico.

* * *

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de suporte (LAFEPE-Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LTF-Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB, LTM–Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos e DQF–Departamento de Química Fundamental da UFPE-Universidade Federal de Pernambuco).

Referências

- 1 D. Steven, S. Mark, H. Marck, K. James , The Journal of the American Medical Association, 277 (1997) 145 - 153.
- 2 M. C. K. Kuritzkes, Archives of Internacional Medicine, 157 (1997) 951 - 959.
3. S. G. Deeks M. Smith, M. Holodnly, J. O. Kahn, The Journal of the American Medical Association, 277 (1997) 145 – 153.
4. R. O. Macêdo, P. J. R. Neto, R. M. F. Silva, J.S. Alencar, North American Thermal Analysis Society Conference, (2003).
- 5 S. R. Chemburkar and J. Bauer, Organic Process Research & Development, 4 (2000) 413 – 417.
6. J. Bauer and S. Spanton, Pharmaceutical Research, 6 (2001) 859 - 866.

7. M. V. Roux, J. Z. Dávalos and P. Jiménez, *Thermochimica Acta*, 394 (2002) 19 – 24.
8. De Medeiros ACD, De Cervanyes NAB, Gomes APB, R. O. Macedo, J. *Thermal Analysis Calorimetry*, 64 (2001) 745 – 750.
9. D. Giron, *Thermochimica Acta*, 248 (1995) 1-49.
10. D. Giron, *S. T. P. Pharma*, 4 (1988) 330.
11. J. L. Ford & P. Timmins, *Pharmaceutical Thermal Analysis*, Ellis Horwood, Chichester, 1989.

Artigo IV

**Validação da metodologia analítica
para ritonavir em formulação
farmacêutica, por cromatografia
líquida de alta performance.**

Validação da metodologia analítica para ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.

Juliana S. Alencar¹, Danilo C.G. Bedor¹; Flávia P.M. Medeiros.^{1,2}; Geisiane M^a C. Alves^{1,2}; Luis R. P. de Abreu¹; Miracy M. Albuquerque¹; Pedro J. Rolim Neto^{1,2*}

¹ *Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos- LTM-Deptº de Ciências Farmacêuticas- UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária - Recife - PE, CEP: 50740-521, ² Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife - PE, Cep: 52171-010, Brasil*

Resumo

Durante o processo de concepção do medicamento o método de cromatografia líquida de alta performance foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa do ritonavir em formulações farmacêuticas. As condições do trabalho seguiram os parâmetros descritos na Resolução 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, sendo utilizadas as condições: coluna Shimadzu Shim-pack CLC (M) ODS 46mm I.D. x 25cm com partículas esféricas de 5µm de diâmetro e 100Å de diâmetro do poro; fase móvel acetonitrila-água (70:30; v/v) (pH 7,0); fluxo de 1,0 mL/min.; volume de injeção de 20 µL; temperatura 25°C e detecção em 239 nm. O método desenvolvido foi empregado com alto grau de precisão e exatidão para a estimativa do conteúdo total de droga contida na forma farmacêutica ritonavir solução oral 80mg/mL, desenvolvida para o LAFEPE. De acordo com os resultados obtidos, verificou – se que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação e controle, pois apresenta sensibilidade, precisão, robustez, linearidade e exatidão, demonstrando confiabilidade requerida para um método analítico.

Unitermo: ritonavir, HPLC, validação.

Autor para correspondência. Tel (fax).: (0XX81) 3272 - 1383
E-mail address: prolim@ufpe.br

1. INTRODUÇÃO

O ritonavir é um inibidor da protease do vírus HIV, aprovado em 1996 pela Food and Drugs Administration (FDA) para uso único ou em combinação com análogos nucleosídeos em pacientes apresentando estágio avançado da AIDS. (D.J. KEMPF, 1995; S.A. DANNER, 1995; M. MARKOWITZ, 1995; CPMP/527/96, R.M.W. HOETELMANS, 1998). Apresenta potência, seletividade e biodisponibilidade oral, com potente atividade *in vitro* e *in vivo* para HIV – 1 (D.J. KEMPF, 1995; K.C. MARSH, 1997).

A combinação das principais atividades é dependente da forma farmacêutica e da estrutura do composto. Desde de que foi descoberto até a aplicação, conhecia – se a existência de uma única forma cristalina do ritonavir e somente durante o estudo de estabilidade observou – se a formação de um outro tipo de cristal. Esta nova forma cristalina apresenta propriedades físicas substancialmente diferentes, influenciando na solubilidade e conseqüentemente na atividade do composto (J.Bauer, 2001).

Tendo em vista a dimensão dos fatos, o presente estudo visou desenvolver um método analítico rápido, econômico, preciso e exato no controle do melhor registro de detecção para a estimacão do ritonavir na sua forma solúvel. O método utilizado foi por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), validado adequadamente, apresentando sensibilidade, precisão, robustez, linearidade e exatidão. A metodologia analítica proposta mostra garantir, através de estudos experimentais, às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 EQUIPAMENTOS

O sistema cromatográfico consiste num cromatógrafo líquido de alta eficiência HP (Hewlett-Packard®) Série 1100 equipado com sistema de bombas quaternário, degaseificador por ultra-som, detector UV-VIS e injetor automático, acoplado a um integrador de dados HP 3395 (Hewlett-Packard®). A coluna utilizada foi uma Shim-pack 100 CLC(M) ODS (C₁₈) de fase reversa, com 46mm x 25cm e partículas esféricas de 5µm de diâmetro (Shimadzu Corporation®).

Alencar, J. S. *Validação da metodologia analítica para ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.*

2.2 MATERIAIS

Ritonavir (RV010803), padrão de trabalho, fornecido pelo laboratório A. Solução oral ritonavir 80 mg/mL (LAFEPE).

Acetonitrila, grau HPLC (Tedia do Brazil[®]) e água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q[®] Plus (Millipore[®]) foram utilizados para preparação da fase móvel, amostras e curva controle.

Unidades filtrantes Millex[™] tipo HV com 13mm de diâmetro e 0.45µm de diâmetro do poro (Millipore[®]) foram utilizadas para filtração das amostras.

2.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fase móvel foi acetonitrila – água (70:30; v/v) (pH 7,0); fluxo de 1,0 mL/min.; volume de injeção de 20 µL; temperatura 25°C e detecção monitorado em 239 nm.

2.4 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO

A solução foi preparada dissolvendo exatamente 25 mg de ritonavir (padrão de trabalho) em um balão de volumétrico de 25 mL com fase móvel, previamente preparada, obtendo –se, assim, uma concentração de 1.0 mg / mL.

2.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A partir da solução padrão foram obtidas sete concentrações da curva de calibração. As concentrações usadas foram: 10, 30, 50, 80, 100, 120 e 160 µg / mL.

2.6 PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA

A partir de 1 mL da solução oral 80mg/mL de ritonavir transferir para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida transferir para um balão de 50 mL, 4 mL da solução previamente preparada. Concentração final: 80 µg / mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A figura 1 mostra os cromatogramas típicos para o ritonavir padrão de trabalho e solução oral ritonavir 80 mg / mL, dentro das condições especificadas, apresentando os seguintes tempos de retenção: 5.238 min e 5.309 min. A assimetria do pico, fator de capacidade e pratos teóricos da coluna resultaram nos seguintes valores: 1.40, 2.03, 5384.402, respectivamente.

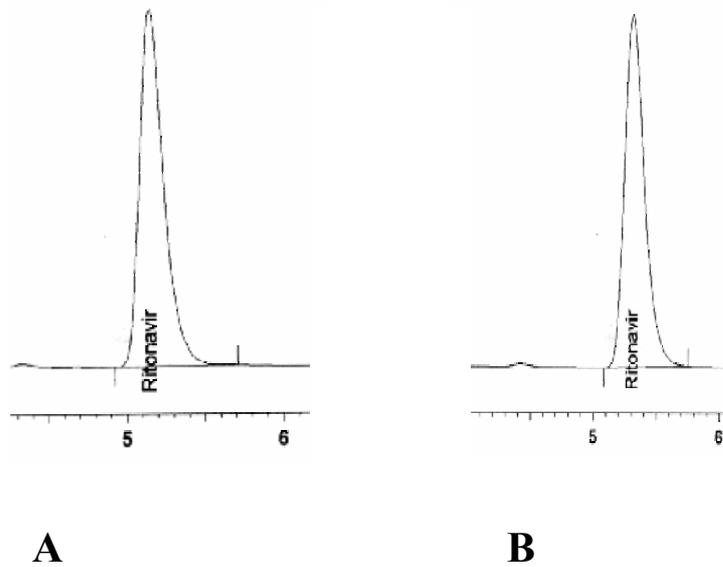


Figura 1 – (A) Cromatograma do ritonavir padrão de trabalho. (B) Cromatograma ritonavir solução oral 80 mg / mL.

3.1 ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica confiança durante o uso na rotina (RE 899, 2003). Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

Os parâmetros analisados foram forma de solubilização, exposição à luz e proporção da fase móvel, pois poderiam resultar em variação na resposta do método. Todas as amostras utilizadas nos estudos de robustez apresentavam concentração de 80 µg / mL de ritonavir.

- Forma de solubilização

Realizou - se análises em triplicata, utilizando agitação magnética e manual, como descrito na tabela I.

Tabela I – Resultados da robustez com relação a forma de agitação

Forma de agitação	1	2	3	Média	CV %
Magnética (10 min)	80,19	81,19	80,08	80,49	0,7599
Manual	81,40	81,31	81,32	81,34	0,0606

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância one-way e os resultados estão descritos na Tabela II.

Tabela II – Resultados da ANOVA para a forma de agitação

Fonte de variação	MQ	F	F crítico
Entre grupos	1,0839	5,7581	7,709
Dentro dos grupos	0,18824		

Como F calculado foi menor que o F crítico foi comprovado que não há diferença estatisticamente significativa entre as proporções da fase móvel avaliadas, com um intervalo de confiança de 95%.

- Exposição à luz

Foram realizadas análises, em triplicata, com variação à luz, como descrito na tabela III.

Tabela III – Resultados da robustez com relação à exposição à luz

Tipo de exposição	1	2	3	Média	CV %
Presença	80,65	80,64	79,21	79,21	1,0335
Ausência	81,14	80,86	79,94	79,94	0,7785

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância one-way e os resultados estão descritos na Tabela IV.

Tabela IV – Resultados da ANOVA exposição à luz

Fonte de variação	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,3456	0,6396	7,709
Dentro dos grupos	0,5403		

Como F calculado foi menor que o F crítico foi comprovado que não há diferença estatisticamente significativa entre as proporções da fase móvel avaliadas, com um intervalo de confiança de 95%.

- Proporção da fase móvel

Foram realizadas análises, em triplicata, com variação da composição da fase móvel em relação ao percentual de acetonitrila e água. Os resultados estão descritos na Tabela V.

Tabela V – Resultados da robustez com relação à proporção da fase móvel

Acetonitrila: Água	1	2	3	Média	CV %
75 . 25	81,39	81,27	81,33	81,33	0,0738
70 . 30	80,83	81,79	81,78	81,46	0,6768
65 . 35	81,06	81,03	80,92	81,00	0,0910

Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância one-way e os resultados estão descritos na Tabela VI.

Tabela VI – Resultados da ANOVA da proporção da fase móvel

Fonte de variação	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,1689	1,61868	5,143
Dentro dos grupos	0,1043		

Como F calculado foi menor que o F crítico foi comprovado que não há diferença estatisticamente significativa entre as proporções da fase móvel avaliadas, com um intervalo de confiança de 95%.

Houve um deslocamento esperado do tempo de retenção do ritonavir quando se variou a proporção da fase móvel devido a mudança da polaridade, quanto mais apolar a fase móvel menor o tempo de retenção (Tabela VII).

Tabela VII – Tempos de retenção em relação à proporção da fase móvel

Proporção da Fase Móvel	Tempo de Retenção (minutos)
Acetonitrila:água (75:25)	5,182
Acetonitrila:água (70:30)	5,905
Acetonitrila:água (65:35)	7,07

Alencar, J. S. *Validação da metodologia analítica para ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.*

O método de determinação do ritonavir na solução oral 80 µg / mL é robusto, pois de acordo com os resultados obtidos, não apresentou diferença significativa nos parâmetros avaliados.

3.2 LINEARIDADE

Este ensaio foi realizado com a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (B.B. NETO , 2001) dos pontos médios de quatro curvas autênticas contendo 7 pontos nas concentrações de 10, 30, 50, 80, 100, 120 e 160 µg / mL.

Os resultados da linearidade estão agrupados na Tabela VIII. A análise de variância da linearidade dos resultados esta agrupada na Tabela IX.

Tabela VIII - Resultados da Linearidade

Concentrações (µg / mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Média	CV (%)
10	1184597	1173726	1176179	1171285	1176446,75	0,4921
30	3462336	3420408	3449946	3457021	3447427,75	0,5429
50	5752346	5770627	5737440	5795616	5764007,25	0,4349
80	9349971	9108442	9240794	9320256	9254865,75	1,1664
100	11527152	11519304	11742640	11833544	11655660	1,3503
120	13917952	13944048	14372560	14168472	14100758	1,5124
160	18791624	18652656	18586512	18745824	18694154	0,4930

Tabela IX - Resultados da Análise de Variância da Linearidade

ANOVA					
Fonte	SQ	GL	MQ	F	F-crítico
Modelo	9,17734E+14	1	9,17734E+14	68777,87	4,2252
Residual	3,4693E+11	26	13343454046	Curva Linear	
Falta de ajuste	72702858812	5	14540571762	1,113501	2,6848
Erro puro	2,74227E+11	21	13058426018	Não há falta de ajuste	
Total	9,18081E+14	27	3,4003E+13		

O resultado dos pontos das quatro curvas de linearidade foram plotados na Figura 02 (x,y), concentração de ritonavir X, área Y e pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação da reta.

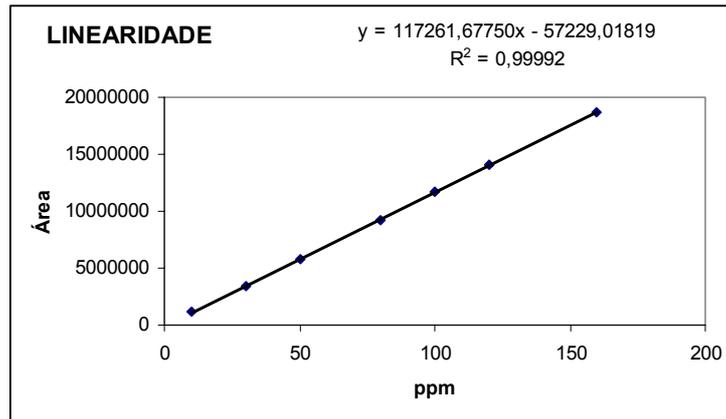


Figura 02- Linearidade do método verificando a regressão das quatro curvas de calibração

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados demonstrou um coeficiente de correlação muito próximo da unidade (0,99992), afirmando que há correlação linear entre as variáveis X e Y, o que significa que 99,99% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, restando 0,01% para ser explicado pelos resíduos.

3.3 PRECISÃO

A precisão foi realizada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Nos ensaios de repetibilidade foram efetuados seis determinações consecutivas de uma amostra da solução oral de ritonavir de concentração 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ que corresponde a 100% da concentração. A precisão intermediária foi determinada a partir da concentração 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em dias consecutivos e analistas diferentes. A reprodutibilidade, ou seja, o ensaio interlaboratorial foi realizado nas mesmas concentrações com aparelhos e laboratórios diferentes, verificando desta forma a capacidade do método de resistir a variações operacionais e ambientais permitindo assegurar a reprodutibilidade do método.

Os resultados da repetibilidade estão agrupados na Tabela X.

Tabela X - Resultados da Repetibilidade

Amostra	Concentrações ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
1	80,71
2	80,77
3	80,80
4	80,81
5	80,86
6	80,90
Média	80,81
CV(%)	0,0826

(b) Precisão intermediária (precisão inter-corridas). Foi realizado tratamento estatístico por análise de variância one-way dentro do dia e two-way entre os dias e analistas, além da verificação da precisão dos analistas avaliada pela comparação das variâncias. Os resultados estão agrupados nas Tabelas XI -XIV.

Tabela XI - Resultados da Precisão Intermediária I e II

Amostras	Precisão intermediária I		Precisão intermediária II	
	Solução oral ritonavir		Solução oral ritonavir	
	<u>Concentração 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$</u>		<u>Concentração 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$</u>	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	81,62	81,52	81,29	81,01
2	81,48	81,50	81,25	81,45
3	81,58	80,85	81,35	81,46
Média	81,56	81,29	81,30	81,31
CV (%)	0,0884	0,4689	0,0619	0,3160

Tabela XII - Resultados da ANOVA da Precisão Intermediária I e II

Fonte da variação	Precisão intermediária I			Precisão intermediária II		
	MQ	F	F crítico	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,10935			0,00021534		
Dentro dos grupos	0,07525	1,4532	7,709	0,03428	0,0062818	7,709

Tabela XIII - Resultados da ANOVA da Precisão entre dias e analistas

Fonte de variação	MQ	F	F crítico
Analista	0,0169	0,8622	161,4
Dia	0,0144	0,7347	161,4
Residual	0,0196		

Tabela XIV – Comparação entre as variâncias dos analistas

Análise de Variâncias	F	F crítico
Precisão Intermediária 1 - Analista 1 e Analista 2	27,94	39,00
Precisão Intermediária 2 - Analista 1 e Analista 2	26,07	
Precisão Intermediária do Analista 1	2,0526	
Precisão Intermediária do Analista 2	2,1998	

(c) Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). Foi realizada em triplicata comparando os resultados obtidos no Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos – NCQM e no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) na UFPE. Os resultados estão descritos na Tabela XV e o tratamento estatístico por análise de variância one-way estão na Tabela XVI.

Tabela XV - Resultados da Reprodutibilidade.

	1	2	3	Média	CV (%)
NCQM	79,93	80,68	80,09	80,23	0,4923
NUDFAC	80,59	80,82	80,84	80,75	0,0017

Tabela XVI - Resultados da Reprodutibilidade.

Fonte de variação	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,405616	4,6268	7,709
Dentro dos grupos	0,087667		

Conforme o tratamento estatístico da ANOVA (análise de variância) não houve diferença significativa entre os resultados obtidos durante a realização da metodologia, no intervalo de confiança de 95%, para as médias das análises quando comparado laboratórios (equipamentos), dias e analistas diferentes e repetibilidade, demonstrando que o método é preciso para os três níveis avaliados.

Na comparação entre as variâncias dos analistas, obtido pelos resultados da precisão intermediária, verificou – se que o valor do F calculado é menor que o valor do F tabelado sendo a hipótese nula (H_0) aceita, afirmando que não há diferença estatisticamente significativa entre a precisão dos analistas nem no mesmo dia nem em dias diferentes, com um intervalo de confiança de 95%.

3.4 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Este ensaio foi realizado com tempo de corrida de 7,5 min, a análise em triplicata de placebo e solução oral contendo ritonavir 80 mg /mL foram analisadas, onde foi verificado no placebo ausência do pico de ritonavir no tempo de retenção previsto, demonstrando que o método referido é seletivo e específico (Figura 3).

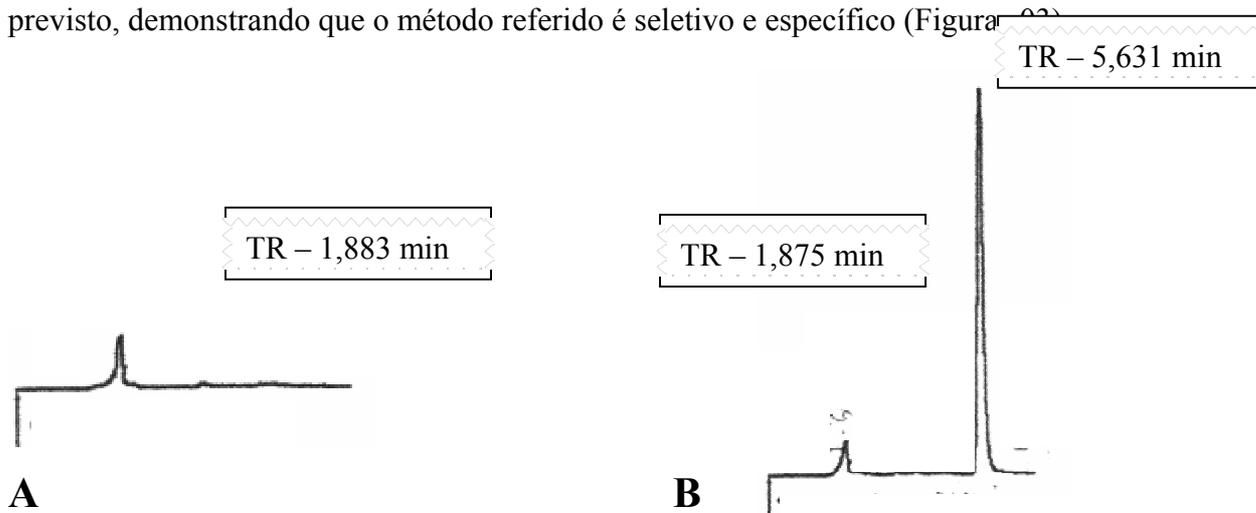


Figura 3 – (A) Cromatograma do placebo.

(B) Cromatograma ritonavir solução oral 80 mg / mL.

3.5 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das quatro curvas de calibração dos ensaios de linearidade pelas médias dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicado por 3 e 10, respectivamente. O limite de detecção multiplica-se por 3 com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. O limite de quantificação multiplica-se por 10, pois neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (RE 899, 2003).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XVII.

Tabela XVII - Resumo estatístico das regressões das quatro curvas de calibração

Coeficientes	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Média	Desvio
Angular	117069,64272	116560,91832	117560,98134	117855,16764	117261,6797	568,5550
Linear	57475,07106	74184,86815	50352,67637	46903,45719	57229,01819	12130,71414

Os limites LD e LQ (Tabela XVIII) obtidos de acordo com o tratamento descrito mostram que o método é bastante sensível ao princípio ativo e que na ordem de grandeza que foi obtido, poderão servir como um excelente critério de aceitação para a validação de limpeza dos equipamentos NO processo de fabricação seguramente evitando a contaminação cruzada.

Tabela XVIII- Resultados de LD e LQ

Resultados ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	
LD	0,3103
LQ	1,0345

3.6 EXATIDÃO

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três)

Alencar, J. S. *Validação da metodologia analítica para ritonavir em formulação farmacêutica, por cromatografia líquida de alta performance.*

concentrações: baixa (50% - 40 µg / mL), média (100% - 80 µg / mL) e alta (150% - 120 µg / mL), com 3 (três) replicatas cada.

Os resultados estão descritos na Tabela XIX.

Tabela XIX – Resultados da Exatidão

Concentração (%)	Recuperação ± CV (%)
40	100,075 ± 0,5425
80	101,175 ± 0,3537
120	99,692 ± 0,2148

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações diferentes onde a exatidão apresentou-se com média em torno de 100% ± 1%, garantindo que o método é exato.

4.0 CONCLUSÕES

O método apresentado é considerado o método de escolha para dar continuidade aos estudos realizados com esse ativo, visto que não está registrado em nenhum compêndio oficial de metodologia analítica para doseamento e identificação do ritonavir.

O mesmo foi validado segundo a Legislação em vigor, Resolução 899 de 29 de maio de 2003. Os resultados obtidos mostram que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação, e controle pois apresenta sensibilidade, precisão, robustez, linearidade e exatidão, demonstrando confiabilidade requerida para um método analítico.

5.0 ABSTRACT

During the process of conception of the medication, the method high – performance liquid chromatographic was developed and validated for the quantitative determination of the ritonavir in pharmaceutical formulation. The conditions of the work followed the parameters described in the Resolution 899 of ANVISA, being used the conditions: column Shimadzu Shim-pack CLC (M) ODS 46mm I.D. x 25cm with spherical particles of 5 μ m of diameter and 100Å of diameter of the pore; phase mobile acetonitrila - water (70:30; v/v) (pH 7,0); flow of 1,0 mL/min.; volume of injection of 20 μ L; temperature 25°C and detection in 239 nm. The developed method was used with high degree of precision and accuracy for the estimate of the total content of drug contained in the form pharmaceutical ritonavir oral solution 80mg/mL, developed for LAFEPE. In agreement with the obtained results, it verified - if that the method assists to the requirements of Good Manufacture of Production and control, because it presents sensibility, precision, robustness, linearidade and accuracy, demonstrating reliability requested for an analytic method.

Keywords: ritonavir, HPLC, validation.

6.0 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de suporte (LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LTM – Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos e NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético da UFPE - Universidade Federal de Pernambuco), NCQMC – Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. B.B. NETO, et al. Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Ed. UNICAMP (2001).
2. BRASIL, Resolução 899, de 29 de maio de 2003, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, *Diário Oficial da União*, Brasília, de 02 de junho de 2003 .
3. Committe for Proprietary Medicinal Products, European Public Assessment Report (EPAR), Novir, 16, August 1996, CPMP/527/96.
4. D.J. KEMPF, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 2484.
5. J.Bauer, et al. S., *Pharmaceutical Research*, 6 (2001) 859 - 866.
6. K.C. MARSH, et al, Determination of ritonavir, a new HI protease inhibitor, in biological samples using reversed – phase high – performance liquid chromatography. *J.of Chromatography B*, 704 (1997) 307 – 313.
7. M. MARKOWITZ, et al, *New Engl. J. Méd.* 333 (1995) 1534.
8. R.M.W. HOETELMANS, et al, High – performance liquid chromatographic determination of ritonavir in human plasma, cerebral fluid and saliva. *J.of Chromatography B*, 705 (1998) 119 – 126.
9. S.A. DANNER, et al, *New Engl. J. Méd.* 333 (1995) 1528.

Artigo V

**Desenvolvimento farmacotécnico
industrial do anti-retroviral ritonavir.**

Desenvolvimento farmacotécnico industrial do anti-retroviral ritonavir

Juliana S. Alencar^{*}, Danilo C.G. Bedor^{*}; Flávia P.M. Medeiros.^{*,***}; Débora B. Monteiro^{*}; João Rui B. Alencar^{***}; Miracy M. Albuquerque^{*}; Pedro J. Rolim Neto^{*,***}

** Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos- LTM-Deptº de Ciências Farmacêuticas-UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária - Recife - PE, CEP: 50740-521, *** Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife - PE, Cep: 52171-010, Brasil*

Resumo

Para desenvolver uma formulação estável, a base de ritonavir uma droga potencial no tratamento da AIDS, os autores avaliaram três abordagens: seleção da forma cristalina ritonavir, avaliação do comportamento de fases para sistemas contendo propilenoglicol, solução hidroalcoólica como fase aquosa e óleo de castor com diferentes graus de etoxilação e avaliação da proporção hidroalcoólica na composição final, e o estudo de pré-formulação a partir do ritonavir dissolvido em uma solução hidroalcoólica 85:15, óleo de castor 35 e propilenoglicol, foi armazenado em embalagens de vidro transparente e âmbar e submetidos ao estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa) e em prateleira (temperatura ambiente). As técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho, pH e aspectos macro e microscópicos foram utilizadas para monitorar a qualidade da preparação. A formulação deverá apresentar estabilidade para ser produzida em escala industrial.

Palavras - chave: AIDS, ritonavir, solução oral, estabilidade.

Autor para correspondência. Tel (fax).: (0XX81) 3272 - 1383

E-mail address: prolim@ufpe.br

1. Introdução

A AIDS, hoje, constitui a maior e mais grave pandemia deste século (Cintra; P., 2001). A compreensão progressiva sobre a dinâmica viral e celular, e o melhor conhecimento dos mecanismos de ação farmacológica e de resistência aos medicamentos anti – retrovirais têm permitido substanciais avanços no controle clínico da imunodeficiência causada pelo HIV (Bhiva, 2000, Carpenter, C. C. J.; 2000; Deeks, S.; Bartlett, J., 2001) Portanto, o Brasil, mais especificamente o Ministério da Saúde e a Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil (ALFOB) estão comprometidos em desenvolver produtos sem patentes e permitir o acesso dos portadores do vírus aos medicamentos necessários para o tratamento. O aporte financeiro envolvido na pesquisa, produção e distribuição destes produtos é bastante alto, mesmo assim, o modelo brasileiro para tratamento e combate a AIDS é referência em todo o mundo.

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) em Recife-PE-Brasil é um dos grandes colaboradores na pesquisa anti-retroviral, buscando sempre garantir a qualidade dos seus medicamentos. Dentre as formas farmacêuticas desenvolvidas e produzidas encontram-se os inibidores da transcriptase reversa: Zidovudina (cápsulas de 100 mg), Didanosina (comprimidos de 25 e 100 mg), Estavudina (cápsulas de 30 e 40 mg), Lamivudina (comprimidos revestidos de 100 e 150 mg), Zidovudina + Lamivudina (300 mg + 150 mg), Nevirapina (comprimido de 200 mg) e Zalcitabina (comprimidos de 0,75 mg). <<http://www.fisepe.pe.gov.br/lafepe/lfhist.htm>>.

Com o objetivo de complementar o coquetel anti-HIV, o LAFEPE em parceria com o LTM estão desenvolvendo mais uma forma farmacêutica inibidora da protease: Ritonavir solução oral 80 mg/mL.

Neste estudo, a forma farmacêutica foi desenvolvida numa estratégia em três etapas, utilizando como ponto de partida a caracterização da forma cristalina, o estudo de diagrama ternário, com a pré-formulação para o produto acabado, numa escala de bancada de 2.000 mL, sendo submetido ao estudo de estabilidade acelerada e de longa duração preliminares e analisado de acordo com os métodos analíticos gerais descrito no compêndio oficial (USP 25, 2003), no entanto, para o teor foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) desenvolvido e validado para a análise das amostras de ritonavir.

2. Materiais e métodos

A fim de evitar problemas mais comuns às soluções, como características organolépticas indesejáveis, formação de cristais e possível precipitação do princípio ativo, foram escolhidos, de acordo com um plano qualitativo e quantitativo, componentes capazes de gerar um produto que atendesse os aspectos acima observados. Para tanto, procederam - se estudos sistemáticos recorrendo - se aos diagramas ternários, resultando em um método planejado e um produto definido.

A metodologia como ferramenta de obtenção do produto desejado foi subdividida em três etapas. O desenvolvimento inicial fundamentou - se na caracterização rigorosa do princípio ativo. Nesta fase foram selecionadas matérias - primas de dois fornecedores: A (lote: 1090) e B (lote:0010303). Para estas amostras realizou - se análises descritas nos métodos gerais dos compêndios oficiais (USP 25, 2003), como: descrição microscópica, solubilidade, ponto de fusão, teor de água, metais pesados, perda por secagem e resíduo por ignição. O teor foi determinado utilizando o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) validado para a análise das amostras de ritonavir. As condições utilizadas para quantificar a substância, compreendeu o uso de uma fase estacionária utilizando uma coluna Shimadzu Shim-pack CLC (M) ODS 46mm I.D. x 25cm com partículas esféricas de 5µm de diâmetro e 100Å de diâmetro do poro; fase móvel acetonitrila - água (70:30; v/v) (pH 7,0); fluxo de 1,0 mL/min.; volume de injeção de 20 µL; temperatura 25°C e detecção em 239 nm.

Na segunda etapa, o estudo baseou - se na medida das amostras por dois diagramas de fases distintos. Nesta fase, os três vértices do triângulo equilátero corresponderam aos principais componentes da formulação (solução hidro-alcoólica 85:15, óleo de castor e propilenoglicol). A solução hidroalcoólica 85:15 foi fixada em uma proporção de 43% em todo o estudo, variando apenas, os dois outros vértices que correspondem ao óleo de castor e ao propilenoglicol. O estudo comparativo do diagrama ternário, apresentado na tabela 2 e 3, foi investigado através de um único vértice do triângulo, onde avaliou-se a influência do grau de etoxilação do óleo de castor empregado (Chroduret 50® e Ethocas 35®). Para cada piloto realizou - se a mesma técnica, aquecendo o óleo de castor e o propilenoglicol até 60°C e em seguida resfriando à 35°C, sob constante agitação (fase I). Na solução hidroalcoólica 85:15 foi solubilizado o ritonavir, sob aquecimento até atingir uma temperatura de 35°C (fase II). Após total solubilização do princípio ativo,

verteu –se a fase II na fase I, agitando até a solução tornar - se completamente límpida (Handbook of Pharmaceuticals, 1986).

A terceira etapa do estudo foi uma avaliação da proporção da solução hidroalcoólica, utilizando álcool PA (Merck) a 85% e a 100% na composição final. A avaliação final foi criteriosamente observada por inspeção visual e confirmada na literatura USP 25, 2003, de modo a se obter o resultado esperado para cada componente. O produto final (com álcool à 85%) foi armazenado em embalagens de vidro transparente e âmbar, submetidos à realização de estudo de estabilidade de longa duração e acelerado em câmara climática com $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa, sendo realizado controles com análise de teor, pH e aspecto microscópio, descritos pela legislação vigente para esta forma farmacêutica (RE – 560, 2002).

3. Resultados

3.1 Primeira etapa

O perfil individual para as amostras dos fornecedores A e B é apresentado na Tabela 1. Os resultados indicaram uma diferença significativa nas análises de microscopia óptica, solubilidade e ponto de fusão, confirmando o que já havia sido reportado na literatura (Chemburkar, S. R ,2000; Bauer, J., 2001). Segundo Bauer *et al*, o ritonavir apresenta – se sob duas formas cristalinas com o mesmo número de ligações hidrogênio, entretanto a cadeia de ligações hidrogênio é diferente. Este fato resulta na diferença de solubilidade para cada polimorfo, quando formulado em sistemas de solventes hidroalcoólicos.

Tabela 1

Resultados dos testes realizados para amostras dos dois fornecedores.

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	
		FORNECEDOR A	FORNECEDOR B
Análise microscópica	Forma agulha	Forma barra	Morfologia não definida
Solubilidade	Imediatamente solúvel em álcool PA (Merck) na concentração de 225 mg/mL	reprovado	aprovado
Ponto de fusão	120 °C a 122°C	124,6°C a 125,3°C	121,2°C a 121,6°C
Teor de água (Karl Fischer)	Máx. 1,0%	0,7450%	0,8718%
Metais Pesados	Máx. 0,002%	aprovado	aprovado
Perda por secagem	500 mg – 60°C – Máx. 0,5%	0,44%	0,48%
Resíduo por ignição	Máx. 0,2%	0,12%	0,08%
Doseamento	98,0% a 102%	100,52	99,34

3.2 Segunda etapa

Investigou – se sistematicamente os efeitos da variação dos tipos e proporção do óleo de castor em um ponto fixo da solução hidroalcoólica 85:15. Foram realizados um total de oito pilotos, apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os resultados revelaram que para os pilotos formulados com Chroduret 50® em todas as proporções apresentaram – se com um grau de turbidez não característico para a forma farmacêutica solução oral.

A figura 1 mostra uma visão espacial mais detalhada dos resultados obtidos para os pilotos formulados com Ethocas 35®. A visualização deste parâmetro é explorada quando observamos a estabilidade do composto em relação ao agente emulsificante utilizado. Nas formulações em que houve a utilização de óleo de castor 35 acima de 14,17 % apresentaram – se com aparência instável, não sendo aprovado pela inspeção visual. Portanto, foi realizado mais um piloto com concentração de 4,67% de Ethocas 35®, determinado pelo ponto mediano da faixa considerada possivelmente estável do diagrama ternário. A formulação proposta foi aprovada por inspeção visual e submetida à transposição de escala para dois pilotos de bancada com quantidade suficiente para 2.000 mL, sendo utilizado como substância ativa as amostras dos fornecedores A e B. Nos produtos finais realizou – se o estudo de estabilidade acelerada e de longa duração.

Tabela 2

Composição da formulação para estudo comparativo do primeiro diagrama ternário.

Componente	Concentração (%)			
	P.I	P.II	P.III	P. IV
Ritonavir	8,0	8,0	8,0	8,0
Solução hidroalcoólica (85:15)	43,0	43,0	43,0	43,0
Chroduret 50®	14,17	29,83	43,33	4,67
Propilenoglicol	29,42	13,76	0,26	38,92
Outros componentes				
Sacarina sódica	0,6	0,6	0,6	0,6
Ácido cítrico industrial	0,3	0,3	0,3	0,3
Corante amarelo FD&C n°6 (E110)	0,01	0,01	0,01	0,01
Água	3,0	3,0	3,0	3,0
Essências				
Hortelã – pimenta	0,5	0,5	0,5	0,5
Caramelo	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabela 3

Composição da formulação para estudo comparativo do segundo diagrama ternário.

Componente	Concentração (%)			
	P.V	P.VI	P.VII	P. VIII
Ritonavir	8,0	8,0	8,0	8,0
Solução hidroalcoólica (85:15)	43,0	43,0	43,0	43,0
Ethocas 35®	14,17	29,83	43,33	4,67
Propilenoglicol	29,42	13,76	0,26	38,92
Outros componentes				
Sacarina sódica	0,6	0,6	0,6	0,6
Ácido cítrico industrial	0,3	0,3	0,3	0,3
Corante amarelo FD&C n°6 (E110)	0,01	0,01	0,01	0,01
Água	3,0	3,0	3,0	3,0
Essências				
Hortelã – pimenta	0,5	0,5	0,5	0,5
Caramelo	1,0	1,0	1,0	1,0

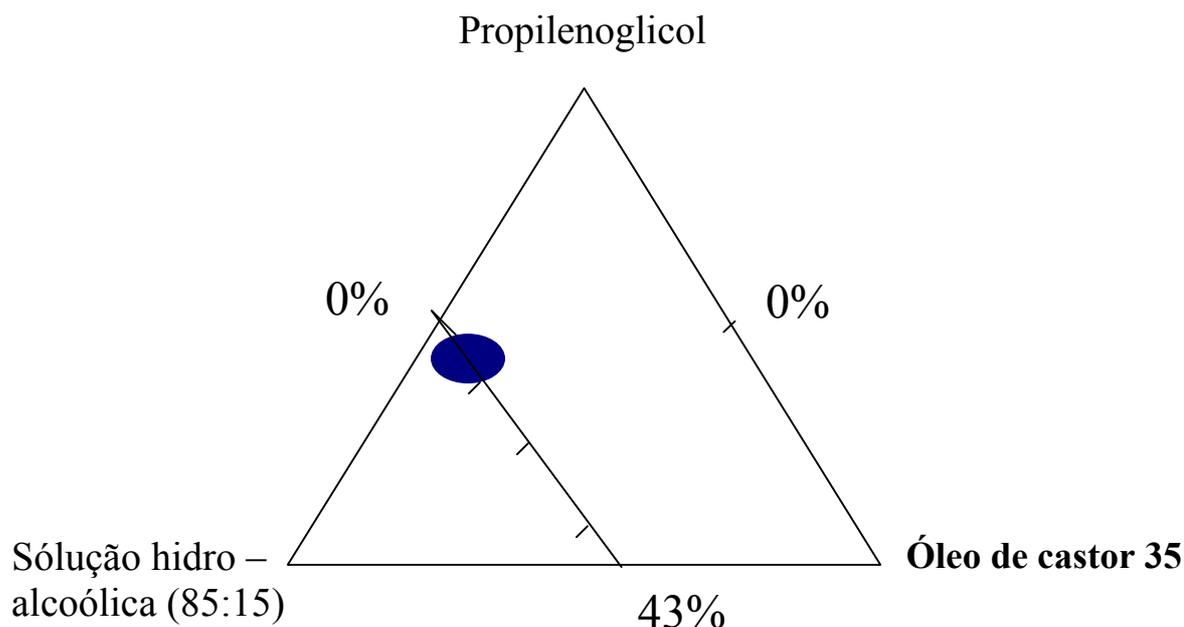


Fig. 1 – Diagrama de fases representado pelo óleo de castor 35, solução hidroalcoólica (85:15) e propilenoglicol. A região em destaque () representa a faixa mais estável.

3.3 Terceira etapa

A terceira etapa foi realizada somente como comprovação da publicação de Bauer *et al.* Os autores revelaram existir uma diferença na solubilidade das duas formas cristalinas, como também na proporção da solução hidroalcoólica utilizado no sistema. Portanto, esta fase prosseguiu-se utilizando o fornecedor B dissolvido com álcool PA a 100% e na solução hidroalcoólica (85:15), representados na Tabela 4 e 5. Os resultados revelaram não serem satisfatórios para o piloto IX, apresentando turbidez constante durante o armazenamento.

Tabela 4

Composição da formulação para estudo comparativo da proporção hidroalcoólica.

Componente	Concentração (%)
	P. VIII
Ritonavir	8,0
Solução hidroalcoólica (85:15)	43,0
Ethocas 35®	4,67
Propilenoglicol	38,92
Outros componentes	
Sacarina sódica	0,6
Ácido cítrico industrial	0,3
Corante amarelo FD&C n°6 (E110)	0,01
Água	3,0
Essências	
Hortelã – pimenta	0,5

Caramelo

1,0

Tabela 5

Composição da formulação para estudo comparativo da proporção hidroalcoólica.

Componente	Concentração (%) P. IX
Ritonavir	8,0
Álcool PA (100%)	43,0
Ethocas 35®	4,67
Propilenoglicol	38,92
Outros componentes	
Sacarina sódica	0,6
Ácido cítrico industrial	0,3
Corante amarelo FD&C n°6 (E110)	0,01
Água	3,0
Essências	
Hortelã – pimenta	0,5
Caramelo	1,0

4. Discussões

Na etapa de caracterização, as matérias – primas dos fornecedores A e B atenderam as especificações referidas ao teor de água, metais pesados, perda por secagem, resíduo por ignição e doseamento, sendo selecionadas no estudo de desenvolvimento técnico. Entretanto, as amostras apresentaram diferenças significativas nos resultados de microscopia óptica, solubilidade e ponto de fusão. Partindo destes resultados verificou – se a necessidade de um estudo mais profundo da estabilidade do composto. Portanto, com o planejamento estratégico, utilizando um diagrama ternário foi possível desenvolver a forma farmacêutica possivelmente estável. A formulação proposta foi submetida ao estudo de estabilidade e os resultados para o tempo 0 são apresentados na tabela 6.

Verifica – se, no tempo 0, não ocorrer nenhuma diferença no teor, pH e solubilidade do composto, porém no momento da transposição de escala para 2.000 mL o ritonavir do fornecedor A apresentou – se com uma maior dificuldade na solubilização.

As formulações passarão ainda por análises em todos os tempos de estabilidade, previstos na resolução (RE – 560, 2002).

Tabela 6
Resultado do estudo de estabilidade para o tempo 0.

FORNECEDOR B EMBALAGENS	FORNECEDOR A			
	transparente/âmbar	transparente/âmbar	transparente/âmbar	transparente/âmbar
ANÁLISE MICROSCÓPICA	ausência de cristais		ausência de cristais	
DOSEAMENTO (%)	102,77 /	102,93	102,86 /	101,91
pH	4,17 /	4,24	4,18 /	4,15

5. Conclusões

Cada fase do estudo nos levaram a uma análise particular e coerente no desenvolvimento técnico da solução oral ritonavir 80 mg/mL. O fármaco em estudo, nos revelou a necessidade de uma análise crítica e profunda dos fornecedores de matérias – primas disponíveis para atender a indústria farmacêutica nacional.

A técnica empregada, utilizada para a análise do tipo e das proporções dos excipientes, obteve um rápido sucesso e baixo custo no desenvolvimento da forma farmacêutica proposta.

A formulação mostrou – se adequada para a administração oral, por não ter mostrado evidências de precipitação quando armazenado em embalagens transparentes e âmbar no tempo 0 para as amostras dos fornecedores A e B.

Está sendo evidenciada a importância da certificação do fornecedor da matéria-prima, para conseqüente qualidade do produto final.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de suporte (LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LTM – Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos e NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético da UFPE - Universidade Federal de Pernambuco).

7. Referências

- Cintra; P., 2001. Atualização terapêutica, 20 ed., artes médicas – SP.
- Bartlett, J., 2001. Overview of the effectiveness of triple therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults. *Aids*, 15, 1369 – 1377.
- BHIVA WRITING COMMITTEE ON BEHALF OF THE BHIVA EXECUTIVE COMMITTEE. British HIV Association (BHIVA), 2000. Guidelines for the Treatment of HIV – infected adults with antiretroviral therapy. British HIV Association – BHIVA Disponível em :<<http://www.aidsmap.com>>. Acesso em:26 mar. 2003.
- Carpenter, C. C. J.; Cooper, D. A.; Fischl, M. A., 2000. Antiretroviral therapy in adults. Updated recommendations of the international aids society – USA panel. *Jama*. 283, 381 – 390.
- Deeks, S. Optimizing antiretroviral therapy. *Medscape – HIV/ AIDS* Disponível em <<http://www.hiv.medscape.com>>. Acesso em:12 ago 2002.
- Disponível em: <<http://www.fisepe.pe.gov.br/lafepe/lfhist.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2002.
- The united states pharmacopeial convention inc. U.S. Pharmacopeia 25, 2003.
- Chemburkar, S. R. and Bauer, J., 2000. *Organic Process Research & Development*. 4, 413–417.
- Bauer, J. and Spanton, S., 2001. *Pharmaceutical Research*. 6, 859-866.
- American pharmaceutical association and the pharmaceutical society of grat britain. *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*, 1986. First edition, USA, The Pharmaceutical Press,.
- RE – 560 2 abr. 2002

Artigo VI

**Avaliação do processo de fabricação de
cápsula gelatinosa mole: caso do
ritonavir.**

Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.

Juliana S. Alencar^{*}, Danilo C.G. Bedor^{*}; Flávia P.M. Medeiros.^{*,***}; Rosali M. F. Silva^{*,***}; João Rui B. Alencar^{***}; Miracy M. Albuquerque^{*}; Pedro J. Rolim Neto^{*,***}

** Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos- LTM-Dept^o de Ciências Farmacêuticas- UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária - Recife - PE, CEP: 50740-521,
*** Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife - PE, Cep: 52171-010, Brasil*

Resumo

Foi avaliado o processo de fabricação das cápsulas gelatinosas moles à base de ritonavir de duas formulações. Os componentes dessas formulações continham um percentual fixo de gelatina e plastificante, porém o conteúdo variou nos percentuais de álcool, óleo de castor 35 e ácido oléico. Variações no comportamento analítico foram observadas. Os resultados dos aspectos macro e microscópico, peso médio, teor de água do conteúdo e doseamento foram profundamente relacionadas com as etapas críticas do processo.

Palavras - chave: Processo de fabricação, ritonavir, cápsula gelatinosa mole.

Autor para correspondência. Tel (fax).: (0XX81) 3272 - 1383
E-mail address: prolim@ufpe.br

1. Introdução

Pressões sociais para reduzir os custos com tratamentos de saúde, juntamente com a necessidade da indústria de manter seu incentivo econômico para desenvolver fármacos, têm requerido que a indústria acelere a comercialização e reduza o número de falhas e custo total dos seus produtos. Essa necessidade tornou – se básica para a indústria usar métodos de aproximação eficientes e sistemáticos no desenvolvimento de formulações [1].

As cápsulas gelatinosas moles ocupam um papel central no desenvolvimento de fármacos. Em geral, são consideradas uma das melhores formas farmacêuticas para veicular substâncias ativas. Entre as suas principais vantagens estão a proteção contra o oxigênio, a luz e a umidade. Apresentam facilidade na administração, possibilidade de associação de substâncias normalmente incompatíveis e mascaramento de sabor e/ou odor desagradáveis de fármacos [2].

Fármacos poucos solúveis em água geralmente têm problemas em relação à biodisponibilidade. Essa situação é intensificada, principalmente, se o composto apresentar formas cristalinas diferentes. Por exemplo, a solubilidade de diferentes polimorfos de alguns compostos reflete na diferença de energia livre entre os respectivos estados cristalinos [3]. Assim, estas diferenças podem conduzir para a cristalização do conteúdo das cápsulas gelatinosas moles. O fenômeno do polimorfismo é muito comum no meio farmacêutico e tem sido largamente descrito na literatura [4–12]. Entretanto, raramente conhece – se a existência de múltiplas formas que apresentam efeito dramático na estabilidade da forma farmacêutica como é o caso do antiretroviral ritonavir.

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos das etapas críticas no processo de fabricação do ritonavir cápsula mole, quando preparada com filme de gelatina bovina como principal componente do invólucro e etanol, ácido oléico e óleo de castor 35 para a obtenção da solução contida na cápsula.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Ritonavir (Hetero), Etanol (Merck), Óleo de castor 35 (Cremophor ELP®), ácido oléico (Merck), butil hidroxil tolueno (Degussa), gelatina bovina, glicerina, metilparabeno, propilparabeno, dióxido de titânio (Ritilo RKB.2), água deionizada.

2.2 Método

Na zona de preparação da gelatina, esta é pesada e misturada com uma quantidade bem determinada do componente líquido (água), resfriada (7°C) em equipamento adequado. A massa resultante é transferida para tanques, onde a fusão vai ocorrer a 93°C e sob vácuo (74 mm Hg) (Figura 1). Uma amostra do produto resultante é comparada visualmente com uma cor-padrão adicionando-se mais opacificante caso seja necessário. A massa é mantida a 57-60°C antes e durante o processo de encapsulação.

Fig.1 – Reator para preparar o invólucro de gelatina (ANEXO).

A área de preparação dos materiais para enchimento possui uma zona de pesagem e de mistura, com o equipamento e as instalações necessárias para a preparação de uma variedade de misturas que podem ser encapsuladas. Do equipamento fazem parte tanque de inox aquecidos com capacidade variável, misturadores para a mistura inicial de sólidos com o líquido base. Após a mistura inicial, esta é obrigada a passar através de um moinho ou de um homogeneizador. A finalidade da operação de moagem não é reduzir o tamanho das partículas, mas quebrar aglomerados de sólidos que existam e contribuir para que todos os sólidos fiquem molhados com o líquido transportador para se alcançar uma mistura homogênea.

A seguir à operação de moagem, todas as misturas são submetidas a um desarejamento, sobretudo se a máquina de enchimento estiver equipada com uma bomba de pistão. Com o desarejamento pretende-se assegurar uma massa de enchimento uniforme, evitar que haja degradação do fármaco devido à oxidação antes ou durante o enchimento. A massa de gelatina alimenta, por ação da gravidade, um dispositivo dosador que controla o escoamento da massa para os tambores rotativos, resfriados por ar (13 -14°C), formando fitas de espessura controlada ($\pm 10\%$). A espessura do invólucro pode variar entre 0,55 e 1,13 mm, mas mais freqüentemente entre 0,63 e 0,8

mm (Figura 2). Os invólucros mais espessos são usados para produtos de uma resistência mecânica maior.

Fig. 2 – Ilustração da medida do invólucro (ANEXO)

As fitas passam, por ação de rolos orientadores, por um banho de óleo lubrificante, caindo entre o cunho e os rolos das matrizes (Figura 3).

Fig. 3 – Ilustração do cunho, matriz e engrenagem (ANEXO).

O material a ser encapsulado escorre por gravidade para uma bomba de pistão que dosea rigorosamente o material e obriga-o a passar através de tubos até atingir as fitas de gelatina que passam entre rolos da matriz (Figura 4). A parte inferior do cunho possui orifícios pequenos alinhados na vertical com os alvéolos dos rolos das matrizes. A cápsula encontra-se metade cheia quando a pressão do material bombeado força a gelatina para as bolsas das matrizes. Os invólucros são cheios, moldados, fechados hermeticamente e cortados da fita de gelatina. O fecho da cápsula é conseguido por aplicação mecânica e de temperatura (37 - 40°C) sobre as fitas pelo cunho.

Fig. 4 – Bomba de pistão (ANEXO).

Imediatamente após a produção, as cápsulas são transportadas automaticamente através de uma unidade de lavagem com nafta para remoção do óleo mineral usado como lubrificante. As cápsulas lavadas podem ser submetidas automaticamente a uma fase de secagem preliminar com infravermelho (Figura 5) que retira entre 60 a 70% da água que deve ser removida ou, simplesmente serem espalhadas diretamente sobre tabuleiros. As cápsulas obtidas no secador de infravermelho também podem ser espalhadas sobre um tabuleiro. Todas as cápsulas são forçadas a entrar em equilíbrio com ar numa umidade relativa entre 20 e 30% e um intervalo de 21 - 24°C.

Fig. 5 – Ilustração da secadora (ANEXO).

As cápsulas em equilíbrio com 20 - 30% de umidade relativa a 21 - 24°C são consideradas secas e o invólucro dessa cápsula contém cerca de 6 10% de água dependendo da formulação de gelatina usada (Figura 6).

Fig. 6 – Área de secagem (ANEXO).

Após a secagem, as cápsulas são transferidas para a área de inspeção e retiradas até à sua liberação pelo controle de qualidade. As fases de inspeção e controle de qualidade nos dois pilotos de cápsulas de ritonavir são idênticas às de outras formas farmacêuticas, sendo avaliados os aspectos macroscópicos do invólucro, aspectos microscópicos do conteúdo e teor de água como também o doseamento por HPLC.

3 Resultados e discussões

Os resultados para os dois pilotos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados analíticos de duas formulações à base de ritonavir.

Testes	Especificações	P.I	P.II			
		T ₀	T ₀	T ₃₀		
				5°C	25°C	40°C
Aspectos macroscópicos	Sem deformações	Deformação do invólucro	Não ocorreu deformação do invólucro			
Aspectos microscópicos	Conteúdo límpido	Não apresentou formação de cristais				
Peso médio	0,900 g ± 2%	0,9245 g	0,8815 g	0,8796 g	0,8715 g	0,8741 g
Teor de umidade do conteúdo		x	x	5,49%	3,67%	4,56%
Teor	95 – 105%	99,1 %	94,676%	92,745%	92,29%	87,172%

As cápsulas de gelatina mole de ritonavir entram em equilíbrio rapidamente com as condições atmosféricas em que estão armazenadas. Estas características justificam a discussão dos efeitos da temperatura e umidade sobre estes produtos, sugerindo a necessidade de armazenagem e embalagem adequadas. A qualidade do conteúdo pré-formulado para o interior das cápsulas, sugere avaliação criteriosa, pois a consistência e estabilidade do invólucro dependem de uma boa interação entre a composição das partes envolvidas.

A estabilidade física das cápsulas de gelatina mole está associada, sobretudo com a absorção ou eliminação de água pelo invólucro. Com o aumento da umidade, dentro de uma gama de temperatura, o invólucro da cápsula de controle, deve absorver umidade na proporção do seu teor de glicerina e gelatina. A alteração é devida a uma interação entre o plastificante e a gelatina. Os resultados comprovaram que a elasticidade da gelatina provavelmente foi alterada para o piloto II, pois ocorreu cedência do teor de água para o conteúdo da cápsula.

Nos testes de estabilidade acelerada, realizados para as cápsulas em desenvolvimento, mostraram determinações do efeito do conteúdo sobre o invólucro. Os efeitos mais notórios como: rigidez, amolecimento e perdas de teor, são as mudanças mais evidentes que passam pela perda de um ingrediente volátil, como por exemplo o etanol, o qual pode ser detectado por uma pequena diminuição da cápsula, pelo enegrecimento ou alargamento da costura ou por, uma alteração ligeira da tonalidade da cor. É freqüente, as cápsulas apresentarem uma marca de amolecimento no local em que se apóiam sobre o tabuleiro ou contra uma cápsula. Esta marca resulta de uma secagem mais lenta não tendo qualquer conseqüência na cápsula, uma vez que estas enrijecem, não apresentando defeitos do invólucro. Por outro lado, se estas áreas não se tornam resistentes o que se deve, normalmente, a ação do conteúdo da cápsula, pode-se prever problemas durante a armazenagem do produto. Esses efeitos devem ser corrigidos antes de se passar a uma fase de produção. A maioria dos defeitos pode ser corrigida por mudanças apropriadas na gelatina ou na formulação do material de enchimento, mas, em alguns casos, diferentes velocidades de máquinas ou matrizes diferentes tem que ser usados.

4 Conclusões

Conhecer os materiais e o equipamento utilizados na produção de invólucros, durante o processamento das cápsulas e seu controle é de fundamental importância para obtenção de um produto de qualidade. O sucesso das formulações deve-se principalmente ao desenvolvimento do processo de fabricação que permite a estabilidade da substância ativa durante o seu prazo de validade.

Dessa forma, pode – se avaliar que a obtenção de cápsulas moles à base de ritonavir exige extrema atenção não só no que se refere às particularidades do fármaco e do estudo de pré-formulação, mas também as etapas críticas do processo, selecionando os componentes da formulação quanto aos seus parâmetros físico-químicos e controlando também cada etapa do processo de fabricação, desde as condições de processo e armazenamento (temperatura e umidade) até as possíveis incompatibilidades entre o invólucro e o conteúdo ou até mesmo entre os componentes do conteúdo.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de suporte (LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LTM – Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos-UFPE e Relthy Laboratórios.

6 Referências

- [1] Mintong, G. Gunjan, K., Wendy, W., Yun, P., 2002. Protótipo de um sistema híbrido inteligente para desenvolvimento de formulação em cápsulas gelatinosas. *P Technology*. 6, 4–18.
- [2] Seager. H., 1985. Soft gelatin capsules: a solution to many tableting problems. *Pharmaceutical technology*.
- [3] Yugue. V, 1999. Cápsulas gelatinosas moles: características e benefícios. *Fármacos & Medicamentos*. 1, 30–35.
- [4] Bauer, J. and Spanton, S., 2001. *Pharmaceutical Research*. 6, 859-866.
- [5] Haleblan. J, McCrone. W, 1969. Pharmaceutical applications of polymorphism. *J. Pharm. Sci*. 58, 911–929.
- [6] Dunitz. J., Berstein. J, 1995. Disappering polymorphs. *J. Acc. Chem. Res*. 28, 193–200.
- [7] Hassan M. ,Salem. M. S, 1997. Characterization of famotidine polymorphs. *Int. J. Pharm*. 149, 227–232.
- [8] Phadnis. N. V., Suryanarayanan. R., 1997. Polymorphism in anhydrous theophylline – Implications on the dissolution rate of theophylline tablets. *J. Pharm. Sci*. 86, 1256–1263.
- [9] Li. R., Mayer P. T., 1996. Polymorphism and crystallization behavior of Abbott – 79175, a second generation 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Pharm. Sci*. 85, 773–780.
- [10] Apperley. D., Fletton. R., 1999. Sulfathiazole polymorphism studied by magic-angle spinning NMR. *J. Pharm. Sci*. 88, 1275–1280.
- [11] Kuhnert-Brandstätter. M., 1999. Demonstration of terms enantiotropy and monotropy in polymorphism research exemplified by flubiprofen. *J. Pharm. Sci*. 88, 103–108.
- [12] Spancake. C., 1996. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. *J. Pharm. Sci*. 85, 193–199.

[13] Carima. L., 1998. Crystal forms of piroxicam pivalate: Preparation and characterization of two polymorphs. *J. Pharm. Sci.* 87, 333–337.

[14] Sham. H., Zhao. C., 1996. A novel picomolar inhibitor of HIV type 1 protease. *J. Med. Chem.* 39, 392–397.

Conclusões

CONCLUSÕES

∞ Considerações gerais relatadas na literatura, revelaram mecanismos sistemáticos de pesquisa e desenvolvimento, visando os aspectos técnicos do projeto, abrangendo o produto, processo e tecnologia para o desenvolvimento subsequente.

∞ Na etapa de qualificação dos fornecedores identificou-se, através de várias técnicas, as formas polimórficas I e II do ritonavir. Os estudos indicaram que a forma II, por apresentar um arranjo estrutural que desfavorece a solubilidade, é a forma cristalina inviabilizada para a utilização na indústria farmacêutica. Dessa forma, a caracterização do insumo ativo qualificou e certificou os fornecedores, garantindo a qualidade final do produto e redução de custos no desenvolvimento tecnológico.

∞ Os resultados obtidos na validação da metodologia analítica mostraram que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório, pois apresenta sensibilidade, precisão, robustez, linearidade e exatidão, demonstrando confiabilidade requerida para um método analítico.

∞ O desenvolvimento técnico coerente, utilizando diagrama ternário como ferramenta de estudo para a solução oral de ritonavir, mostrou-se como fonte adequada para a obtenção da forma farmacêutica proposta, por não ter mostrado evidências de precipitação quando armazenado em embalagens transparentes e âmbar no tempo 0 para as amostras dos fornecedores A e B.

∞ Verificou-se que a obtenção das cápsulas gelatinosas à base de ritonavir revelou exigir extrema atenção em todas as etapas críticas, selecionando os componentes da formulação quanto aos seus parâmetros físico-químicos e controlando também cada etapa do processo de fabricação, desde as condições de processo e armazenamento (temperatura e umidade) até as possíveis incompatibilidades entre o invólucro e o conteúdo ou até mesmo entre os componentes do conteúdo.

∞ O desenvolvimento do produto nos revelou a necessidade da padronização da qualidade e rastreabilidade dos fármacos fornecidos para a comercialização, otimizando, desta maneira, o processo de desenvolvimento de medicamentos.

Perspectivas

PERSPECTIVAS

- ↘ Otimização da forma farmacêutica cápsula mole (verificar quanto à dissolução).

- ↘ Transposição de escala industrial e elaboração do registro de lote, como medicamento genérico.

- ↘ Estudo de estabilidade para o produto acabado, comparando as duas formas do cristal.

- ↘ Equivalência Farmacêutica.

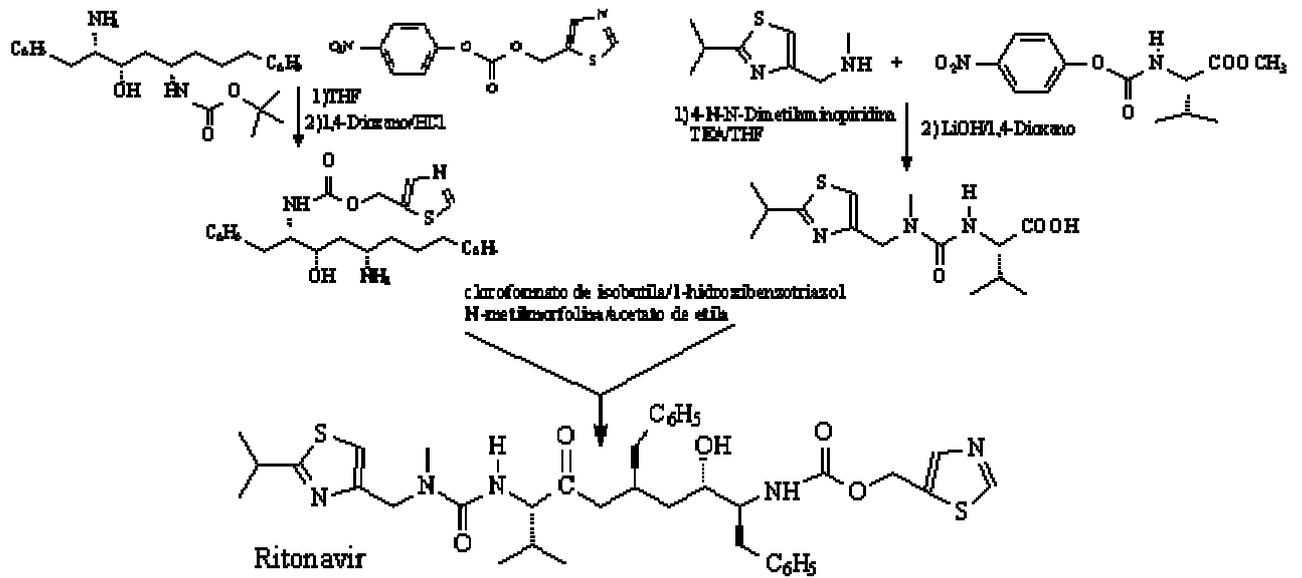
Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MONDO, C. *Aids – Epidemia na China relembra anos 80*. Ciência & Tecnologia, v. 1, n. 6, p. 10-15, 2003.
- [2] *The Merck Index*, 12th ed., p. 1418 – 1419, 1996.
- [3] LAW, D.; *et al. J. of Pharmaceutical Science.*,v. 90, p. 1015, 2001.
- [4] MCDOLNARD, C. K., *et al. Arch Intern Med.*, v. 157, p. 951, 1997.
- [5] CARPENTER, C. C. J., *et al. JAMA*, v. 283, p. 381, 2000.
- [6] VELDKAMP A. J., *et al. Clin Inf Dis.*, v. 29, p. 1586, 1999.
- [7] LEWIS J. S., *et al. Clinical Therapeutics*, v. 19, p. 187, 1997.
- [8] LEA, A. P., *et al. Drugs*, v. 52, p. 541, 1996.
- [9] CHEMBURKAT, S. R., *et al. Organic Process Research & Development*, v. 4, p. 413, 2000.
- [10] BAUER, J., *et al. Pharmaceutical Research*, v. 18, p. 859, 2001.
- [11] Assessoria de Imprensa da Secretaria de Saúde de Pernambuco. ***Acordo reduz preço de remédio para Aids***. Diário de Pernambuco A8, 19 nov. 2003.
- [12] Disponível em: <<http://www.fisepe.pe.gov.br/lafepe/lfhist.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2002.

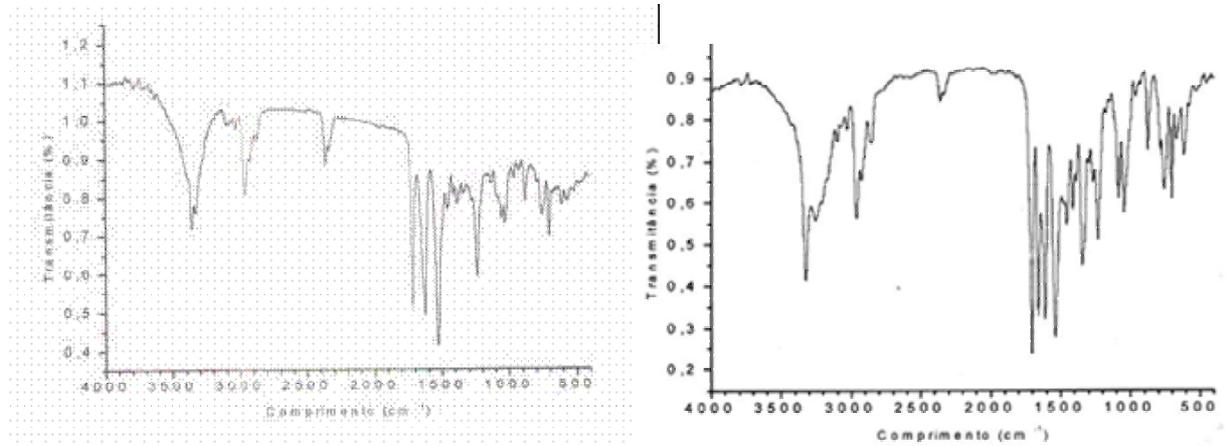
Anexos

ANEXO. Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.



Esquema 1: Rota sintética do Ritonavir a partir dos fragmentos

ANEXO. Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.

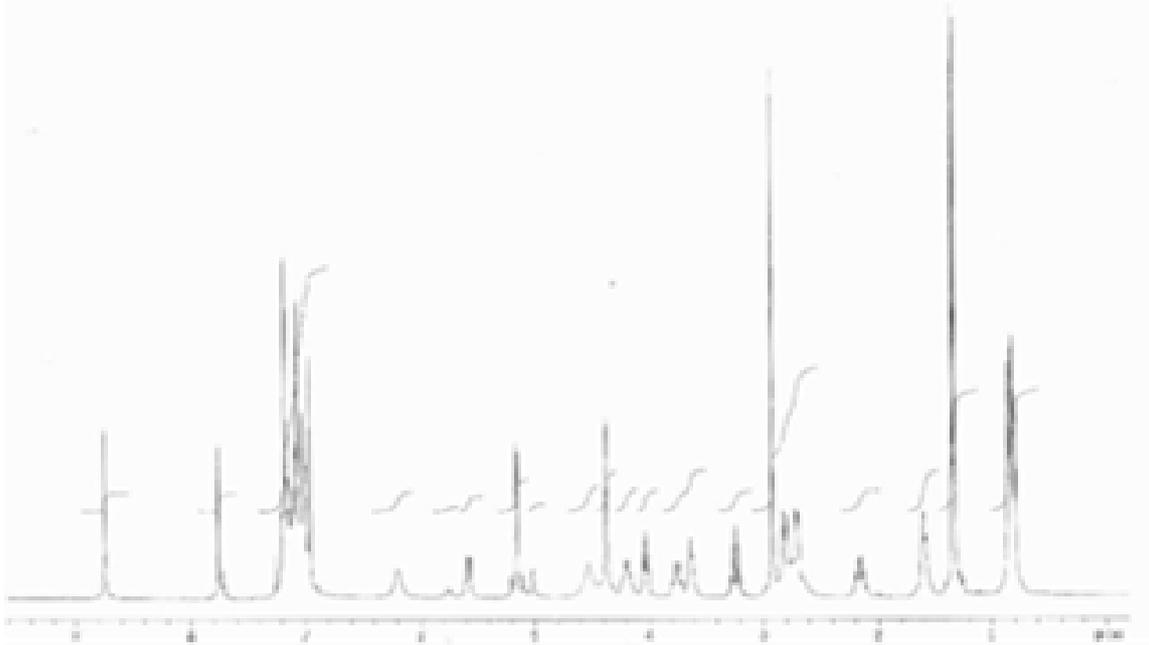


A

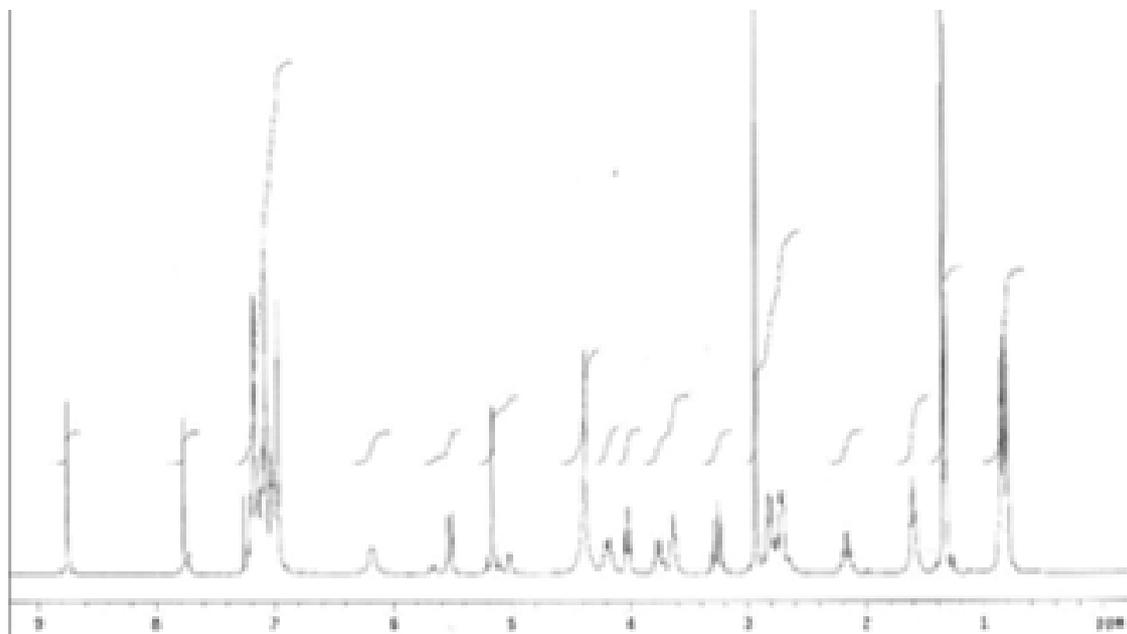
B

Figura 1: Espectros de Infra-vermelho: Forma I (A) e Forma II (B)

ANEXO. Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.



A



B

Figura 2: Espectros de RMN: Forma I (A) e Forma II (B)

ANEXO. Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.

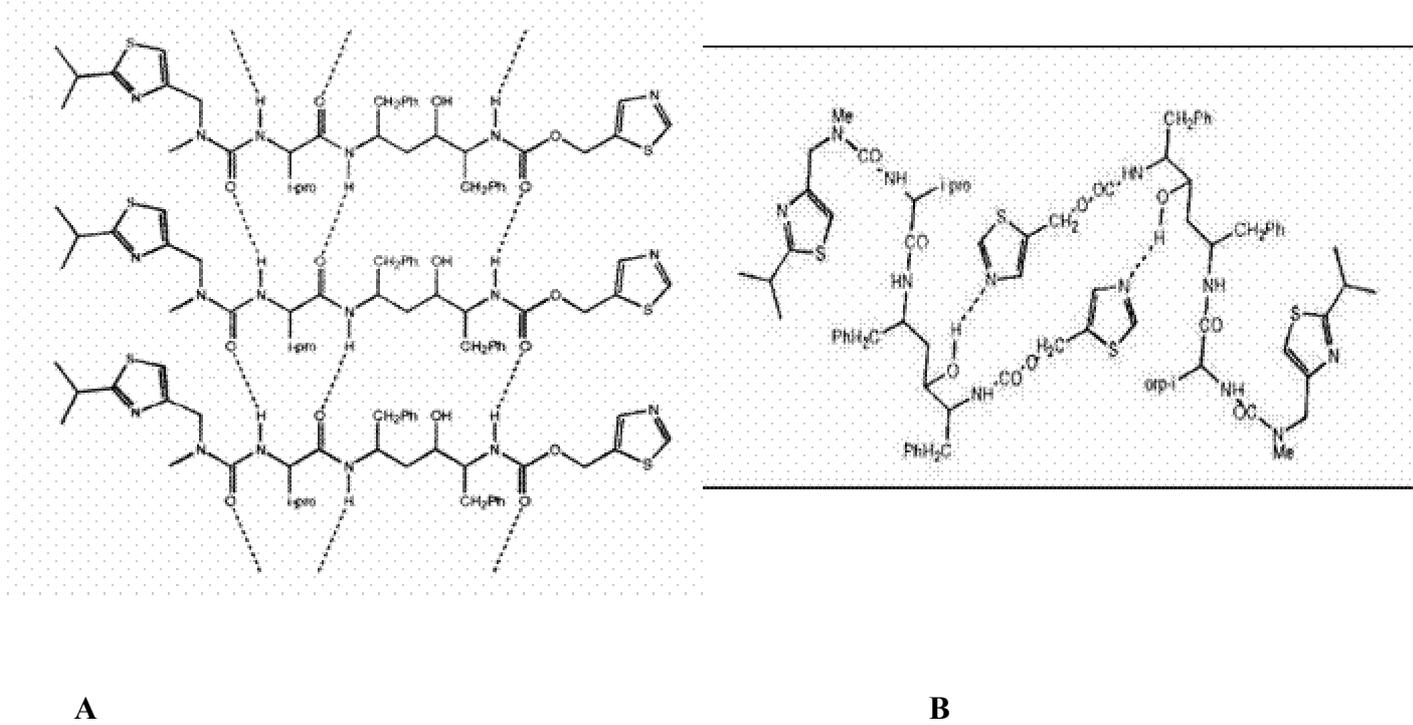


Figura 3: Representação das Pontes de hidrogênio Forma I: (A) e (B)

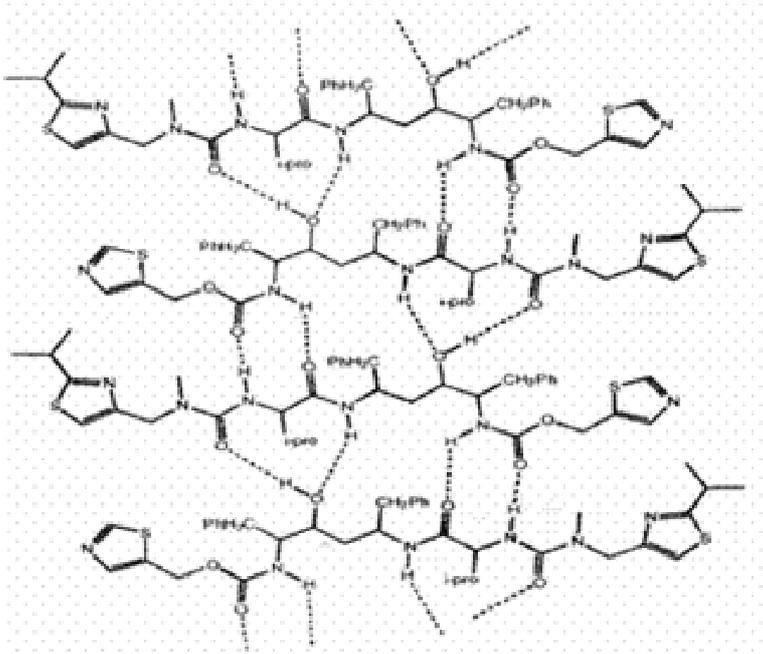
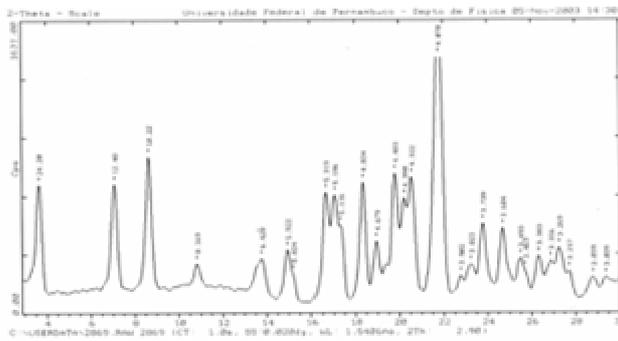
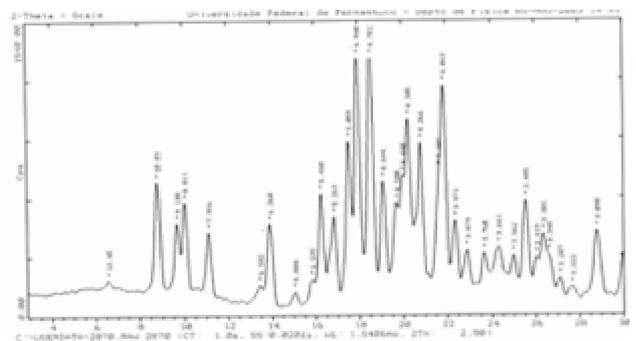


Figura 4: Representação das Pontes de hidrogênio Forma II

ANEXO. Artigo II - Controle da autenticidade do anti-retroviral ritonavir por RMN¹H, IVTR e difração de RX para obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.



I



II

Figura 5: Espectro de difração de RX dos cristais de Ritonavir Forma I (A) e Forma II (B)

ANEXO Artigo VI-Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.



Fig.1 – Reator para preparar o invólucro de gelatina.

ANEXO Artigo VI-Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.

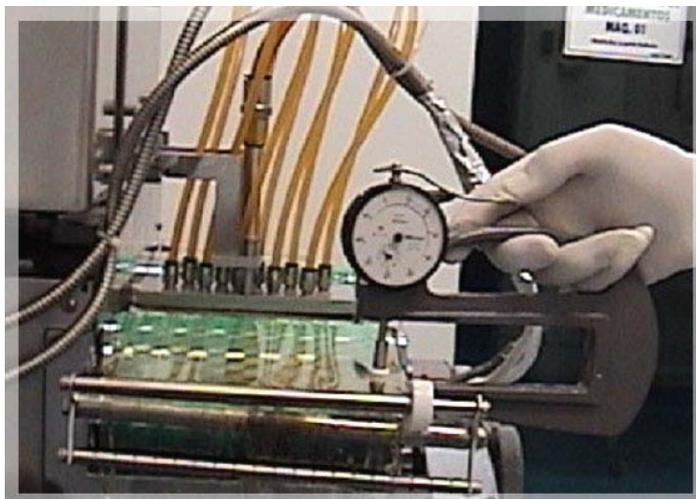


Fig. 2 – Ilustração da medida do invólucro

ANEXO Artigo VI-Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.

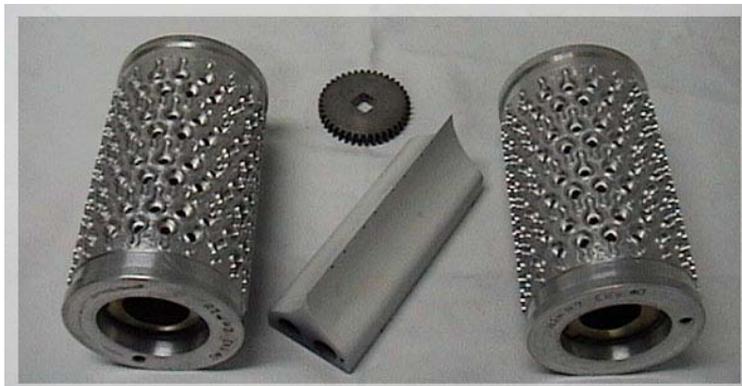


Fig. 3 – Ilustração do cunho, matriz e engrenagem.

ANEXO Artigo VI-Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.

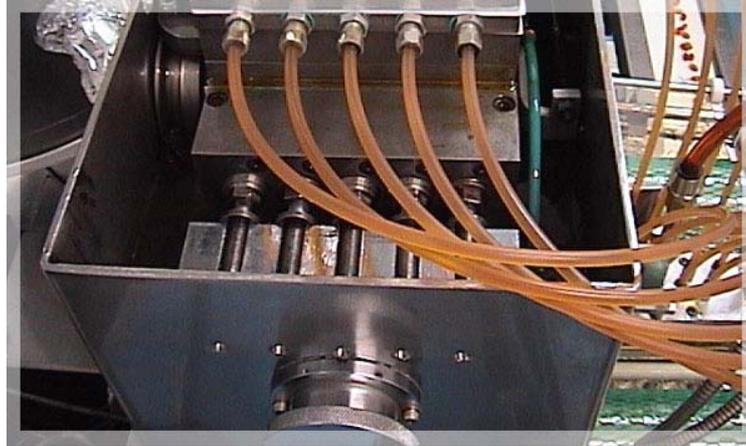


Fig. 4 – Bomba de pistão.

ANEXO Artigo VI-Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.



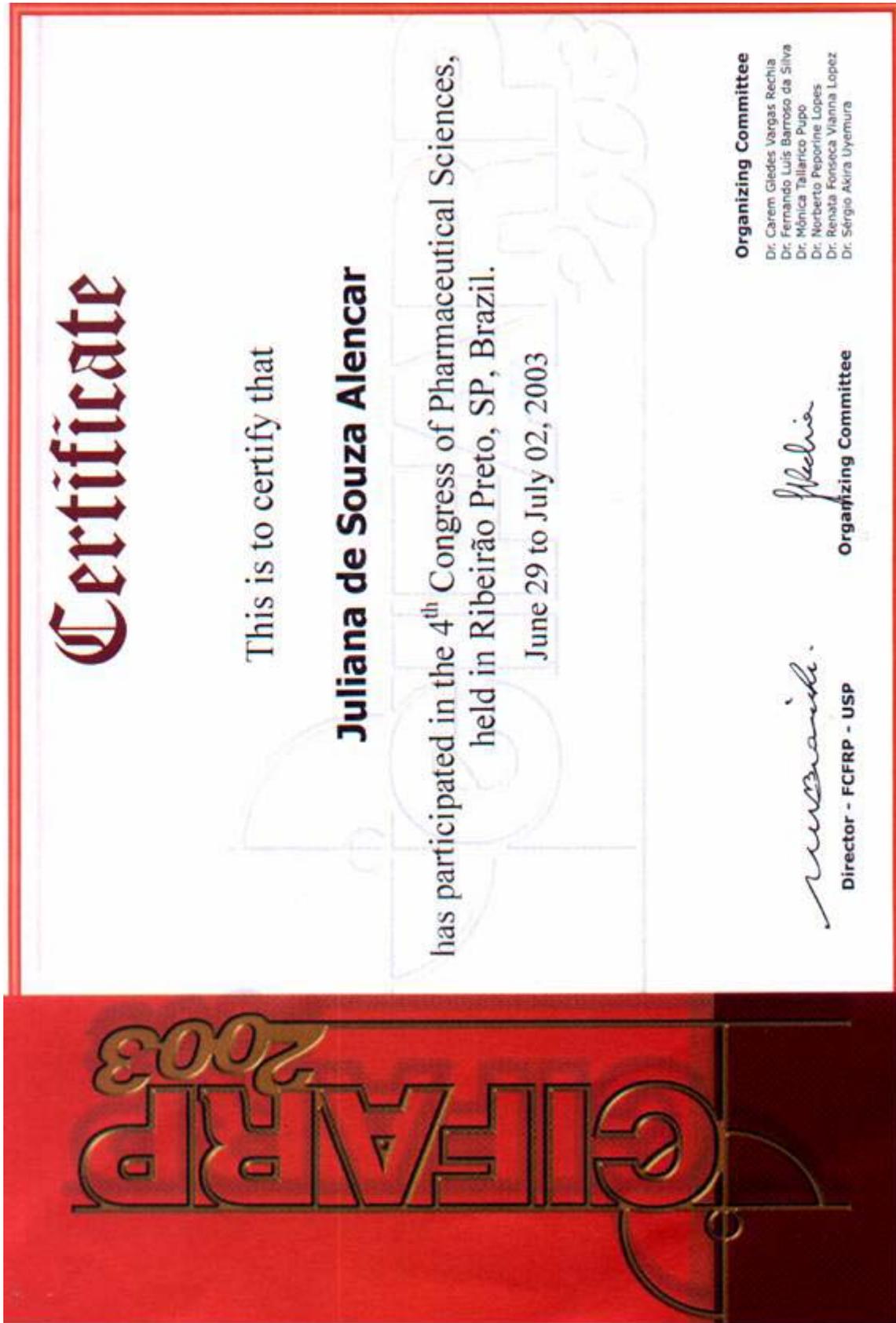
Fig. 5 – Ilustração da secadora.

ANEXO Artigo VI-Avaliação do processo de fabricação de cápsula gelatinosa mole: caso do ritonavir.



Fig. 6 – Área de secagem.

**Resumos
apresentados em
congressos**



Certificate

This is to certify that

Juliana de Souza Alencar

has participated in the 4th Congress of Pharmaceutical Sciences,
held in Ribeirão Preto, SP, Brazil.

June 29 to July 02, 2003



Director - FCFRP - USP



Organizing Committee

Organizing Committee

Dr. Carem Gledes Vargas Rechia
Dr. Fernando Luis Barros da Silva
Dr. Mônica Tallarico Pupo
Dr. Norberto Pepporine Lopes
Dr. Renata Fonseca Vianna Lopez
Dr. Sérgio Akira Uyemura

TF27 – INFLUENCE OF RITONAVIR POLYMORPHIS ON THE TECHNICAL DEVELOPMENT PROCESS OF DIFFERENT PHARMACEUTICAL FORMS

JULIANA ALENCAR (PG) *, TICIANO NASCIMENTO (PG)**, FLÁVIA MEDEIROS (PQ)*,***, RUI ALENCAR (PQ)***, DÉBORA MONTEIRO (PQ)*, RUI MACHADO (PQ)**, MIRACY M. DE ALBUQUERQUE (PQ), PEDRO ROLIM (PQ)****

Deptº de Ciências Farmacêuticas-UFPE*, UDEM-UFPB**, LAFEPE***

Ritonavir is a protease inhibitor, used to produce a rapid and sustainable reduction of the viral RNA in plasma as well as an increase of CD4 cells in HIV-infected persons. Discovered in 1995 and approved by the FDA in 1996 the final product was introduced into the market in the pharmaceutical forms of soft capsules and oral solutions, of a low stability, and showing a large quantity of formed crystals during the validity period. Due to this, the internal structure of the drug was investigated using techniques of optical microscopy (a sensible detection test was developed), thermal analyses and powder X-ray Diffraction. Two different crystallized structures were shown, the first described, as the first form (bar) and the second form (needle). The conformational polymorphism exhibited by both crystals has a significant influence on physico-chemical attributes, including the point of fusion, space accommodation, hydrophobic, with consequent impact on the solubility of the component. From the evidence of the polymorphism form of ritonavir it was possible to start developing a technical program for both pharmaceutical proposes.

Financial support: CAPES/LAFEPE

TF28 – TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF *BACILLUS SPHAERICUS* LARVICIDE TABLETS ACTIVE AGAINST *CULEX QUINQUEFASCIATUS*.

OSNIR DE SÁ VIANA (IC)*, FLÁVIA P. M. DE MEDEIROS(PQ)***, DEBORAH B. MONTEIRO*, EUGÊNIA M. M. RIOS***, LÊDA N. REGIS***, MARIA ALICE V. DE M. SANTOS***, PEDRO JOSÉ ROLIM NETO(PQ) ***

*Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE; **Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), Departamento de Antibióticos***

Bacillus sphaericus possesses larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*, the mosquito responsible for transmitting filariasis. The *Bacillus sphaericus* produces protoxins during sporulation that, when ingested by the larvae of some dipterous species, become activated causing fatal alterations at the cellular level. This study aims to develop tablets of *Bacillus sphaericus* for culicicide control. The bacteria was cultured and centrifuged. The biomass was separated and suspensions of 20, 40 and 60% in a water/alcohol solution at 60:40 were obtained. These suspensions were mixed, separately, with microcrystalline cellulose 250 and dried at 4-40°C for 4 hours and subsequently submitted to direct compression, after calibration. Physicochemical parameters were tested and the formulations are currently being evaluated for biological efficacy. All the solid formulations obtained using the above-described method, met pharmacological parameters of durability, friability and disintegration.

Financial Support: CNPq, LAFEPE

Ritonavir characterization using optic microscopy, X-ray diffraction and analysis.

ALENCAR JS^{*}, BEDOR DCG. ^{*}; MEDEIROS PM. ^{****}; MONTEIRO DB ^{*}; NAS TG^{**}; ALENCAR JRB^{***}; MACEDO RÓ^{*}; ALBUQUERQUE MM; ROLIM NETC

^{*} Dept^o de Ciências Farmacêuticas-LTM-UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária - Recife - PE, 50740-521, ^{**} Dept^o de Ciências Farmacêuticas UDEM-UFPB, Campus 1, João Pessoa PB, ^{***} LAFEPE, Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife - PE, Cep: 52171-010

Introduction. Ritonavir is an approved protease inhibitor used in anti-HIV therapy for adults and children. This drug has demonstrated a potent anti-retroviral effect, increasing the concentration of nucleoside analogues and guaranteeing the effectiveness of other protease inhibitors. This permits lower doses to be used, reduces adverse effects, increases compliance and reduces cost of treatment (1). Ritonavir is being developed by LAFEPE in soft capsule and oral solution form to act as an integral part of the AIDS treatment cocktail.

Aim. The aim of this study was to evaluate the physico-chemical characteristics of Ritonavir and thereby guarantee, through standardization of its specifications and certification of the suppliers, the quality of the final product.

Methods. Samples were received from two suppliers: A and B. These samples were submitted to thermal analysis by conventional DSC, photo-visual DSC and TGA, optic microscopy and X-ray diffraction. The DSC curves were obtained using a Shimadzu differential calorimeter, model DSC-50, with a nitrogen atmosphere of 50ml/min and heating ratio of 5, 10, 15 and 20C/min in a temperature range of 25-400C. The samples were coupled in an aluminum cell that was hermetically sealed with a mass of 2mg \pm 0,04. The DSC photo-visual data was obtained using an Olympus microscope and connected to a Sanyo camera, model VCC-D 520 with an image connected to the Intel Smart Video Record II software, in a heating ratio of 10C/min in a temperature range of 25C-126C, with an open aluminum cell with a mass of 2mg \pm 0,04.

using a Shimadzu thermo-balance 50H, in a synthetic air atmosphere of 20ml/min, with a heating ratio of 5, 10, 15 and 20C/min in a temperature range of 25- 900C. The samples were packed into an aluminum cell of 5.18mg and 5.06mg for the Rit samples from the laboratories A and B respectively. The photo-microscope was represented using a Zeiss (Ax microscope with a coupled MC 80 achroplan objective 100x/1.25 Oil ray diffraction results were obtained using a diffractometer – 5000 CuK α (1.54 angstroms) radiation and ratio 0.02 using the DIFRAC-AT software, version 1.0.

Results. The methods used demonstrated the presence of two crystalline structures differing in dimensions and forms (I and II), which are influencing the physicochemical characteristics of the compound, including fusion and solubility.

Conclusion. The results demonstrate the importance of these analyses for the certification of Ritonavir. Ritonavir does not have a reference pharmacopoeia and analytical certificates from the laboratory do not provide data concerning its poly-morphic characteristics. This characterization is extremely important given that it may influence its bio-availability.

Acknowledgements. This work was supported by a Grant from CAPES / LAFEP [1]. Richard E., Chaisson M.D. (2001) *Johns Hopkins University AIDS Study* 6-16