

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO  
PARA O RITONAVIR CÁPSULAS UTILIZANDO  
CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO***

ROCHELE CASSANTA ROSSI

PORTO ALEGRE, 2006



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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO  
PARA O RITONAVIR CÁPSULAS UTILIZANDO  
CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO***

*Dissertação apresentada por*  
***Rochele Cassanta Rossi***  
*para obtenção do GRAU DE MESTRE*  
*em Ciências Farmacêuticas*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado/Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17/07/2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Maria Bergold  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

R833s Rossi, Rochele Cassanta  
Desenvolvimento e validação de ensaio de dissolução para o ritonavir cápsulas utilizando correlação *in vitro-in vivo* / Rochele Cassanta Rossi – Porto Alegre: UFRGS, 2006. - 118p.: il., tab., gráf.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Ritonavir: cápsulas. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Dissolução. I. Fröhlich, Pedro Eduardo. II. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

**Ao meu esposo, Luís Antonio,  
pelo amor, companheirismo e incentivo.**

**Aos meus pais, Gabriel e Alvenir,  
meus irmãos, Rodrigo e Rossana,  
que sempre confiaram em mim,  
apoiaram meus sonhos e deram toda a base  
e força para enfrentar os desafios da vida.**



## Agradecimentos

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

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

Aos meus pais, pelo amor, confiança e apoio em todas as horas.

Ao meu esposo, pelo carinho, paciência e por sempre acreditar em mim.

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Silvane e meu sobrinho Gabriel, pelo incentivo, apoio incondicional, amizade e pela acolhida em sua casa.

À minha irmã e grande amiga Rossana, pelo convívio, paciência, incentivo e amizade.

Às colegas e amigas de Pós-Graduação Andréia, Carolina, Eliane, Inara, Marinês e Vanessa, pela amizade sincera, apoio e cooperação.

Aos amigos do LAPPS, Samuel, Alexandre, Sirlei, Marquinhos, Luiz, Tiago, Lúcia, Laura, Gilséia e Jéferson, pela amizade e convívio.

À colega Letícia Colomé, pelo apoio, incentivo e amizade durante o transcorrer deste trabalho.

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

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, pelo fornecimento da substância química de referência.

Ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo fornecimento, sob o consentimento da Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, dos dados *in vivo*.





## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
<b>3. REVISÃO.....</b>	<b>11</b>
3.1 VIH.....	13
3.1.1 Morfologia do VIH.....	13
3.1.2 Ciclo de VIH.....	14
3.2 Medicamentos Anti-retrovirais.....	15
3.2.1 Inibidores da transcriptase reversa.....	16
3.2.2 Inibidores de protease.....	17
3.2.3 Inibidores de fusão.....	17
3.3 Ritonavir.....	18
3.3.1 Descrição.....	18
3.3.2 Propriedades físico-químicas.....	19
3.3.3 Farmacocinética.....	19
3.3.4 Interações medicamentosas.....	20
3.3.5 Posologia.....	20
3.3.6 Quantificação.....	21
3.4 Dissolução.....	22
3.4.1 Dissolução e absorção.....	22
3.4.2 Fatores que afetam a dissolução <i>in vitro</i> .....	23
3.4.2.1 Tamanho de partícula.....	24
3.4.2.2 Surfactantes.....	24
3.4.2.3 pH.....	25
3.4.2.4 Velocidade de agitação.....	25
3.4.2.5 Natureza química.....	26
3.5 Ensaio de dissolução.....	29
3.5.1 Especificações de dissolução.....	30
3.5.2 Tipos de equipamentos.....	31
3.6 Comparação de perfis de dissolução.....	32
3.7 Correlação <i>in vitro-in vivo</i> .....	33
3.7.1 Níveis de correlação.....	33

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Amostras.....	37
4.1.1 Substância química de referência (SQR).....	37
4.1.2 Produto farmacêutico.....	37
4.2 Análise quantitativa.....	38
4.2.1 Preparo das soluções.....	38
4.2.1.1 Solução amostra.....	38
4.2.1.2 Solução padrão.....	38
4.2.2 Validação do método de doseamento do ritonavir por CLAE.....	38
4.2.2.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	39
4.2.2.2 Especificidade.....	40
4.2.2.3 Linearidade.....	42
4.2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	43
4.2.2.5 Exatidão.....	43
4.2.2.6 Precisão.....	45
4.2.2.7 Robustez.....	46
4.3 Estudo <i>in vivo</i> .....	47
4.3.1 Dados do estudo <i>in vivo</i> .....	47
4.3.2 Metodologia analítica para amostras de plasma.....	48
4.3.3 Fração absorvida da dose.....	49
4.4 Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	50
4.4.1 Equipamento de dissolução.....	50
4.4.2 Determinação da solubilidade do ritonavir em diferentes meios.....	50
4.4.3 Condições do ensaio de dissolução.....	51
4.4.4 Estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio.....	51
4.5 Validação do método de dissolução.....	51
4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	52
4.5.1.1 Especificidade.....	52
4.5.1.2 Linearidade.....	52
4.5.1.3 Precisão e exatidão.....	53
4.5.2 Espectrofotometria ultravioleta derivada.....	53
4.5.2.1 Especificidade.....	54
4.5.2.2 Linearidade.....	54
4.5.2.3 Precisão e exatidão.....	55
4.5.3 Análise comparativa dos métodos.....	55
4.6 Comparação de perfis de dissolução.....	56
4.6.1 Método modelo independente empregando $f_1$ e $f_2$ .....	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
5.1 Análise quantitativa.....	61
5.1.1 Validação do método de doseamento por CLAE.....	61
5.1.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	64
5.1.1.2 Especificidade.....	65
5.1.1.3 Linearidade.....	70
5.1.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	72

5.1.1.5 Precisão.....	72
5.1.1.6 Exatidão.....	74
5.1.1.7 Robustez.....	75
5.2 Estudo <i>in vivo</i> .....	78
5.2.2 Metodologia analítica para amostras de plasma.....	78
5.2.2 Dados do estudo <i>in vivo</i> .....	79
5.2.3 Modelagem matemática.....	79
5.2.4 Fração absorvida da dose.....	81
5.3 Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	81
5.3.1 Determinação da solubilidade do ritonavir em diferentes meios.....	82
5.3.2 Desenvolvimento do teste de dissolução.....	83
5.3.3 Estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio.....	90
5.4 Validação do método de dissolução.....	90
5.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	91
5.4.1.1 Especificidade.....	91
5.4.1.2 Linearidade.....	91
5.4.1.3 Exatidão.....	93
5.4.1.4 Precisão.....	94
5.4.2 Espectrofotometria ultravioleta derivada.....	95
5.4.2.1 Especificidade.....	95
5.4.2.2 Linearidade.....	97
5.4.2.3 Exatidão.....	100
5.4.2.4 Precisão.....	101
5.4.3 Análise comparativa dos métodos.....	101
5.5 Comparação de perfis de dissolução.....	102
5.5.1 Método modelo independente empregando $f_1$ e $f_2$ .....	103
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>

## **ANEXOS**



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

ADN – ácido desoxirribonucléico

ANOVA – análise de variância

ARN – ácido ribonucléico

ASC – área sob a curva

CIVIV – correlação *in vitro-in vivo*

DAD – detector de arranjo de diodos

DPR – desvio padrão relativo

FA – fração absorvida

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

LSS – lauril sulfato de sódio

MeOH – metanol

SCB – sistema de classificação biofarmacêutica

SQR – substância química de referência

TR – transcriptase reversa

UV-D – espectrofotometria ultravioleta derivada

UV-D<sup>2</sup> – espectrofotometria ultravioleta derivada segunda

VIH – vírus da imunodeficiência humana



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> – Morfologia do VIH.....	13
<b>Figura 3.2</b> – Ciclo do VIH.....	15
<b>Figura 3.3</b> – Estrutura molecular do ritonavir.....	18
<b>Figura 3.4</b> – Microfotografia dos polimorfos do ritonavir.....	28
<b>Figura 5.1</b> – Cromatograma da solução de ritonavir SQR (50 µg/ml).....	62
<b>Figura 5.2</b> – Cromatograma da solução das cápsulas Norvir® (50 µg/ml).....	63
<b>Figura 5.3</b> – Especificidade: (A) cromatograma do branco; (B) cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à hidrólise alcalina por 24 horas.....	66
<b>Figura 5.4</b> – Especificidade: (A) cromatograma do branco; (B) cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à hidrólise ácida por 24 horas.....	67
<b>Figura 5.5</b> – Especificidade: (A) cromatograma do branco; (B) cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à oxidação por 24 horas.....	68
<b>Figura 5.6</b> – Cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida a 80 °C por 24 horas.....	68
<b>Figura 5.7</b> – Cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à fotólise.....	69
<b>Figura 5.8</b> – Especificidade: (A) cromatograma da solução de ritonavir SQR; (B) cromatograma dos excipientes.....	70
<b>Figura 5.9</b> – Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir SQR obtida por CLAE.....	71
<b>Figura 5.10</b> – Robustez: variação do fluxo da fase móvel: 1,6 ml/min.....	76
<b>Figura 5.11</b> – Robustez: variação do fluxo da fase móvel: 1,4 ml/min.....	76
<b>Figura 5.12</b> – Determinação da robustez: fase móvel acetonitrila:metanol:água (52:41:7).....	77

<b>Figura 5.13</b> – Determinação da robustez: fase móvel acetoneitrila:metanol:água (54:39:7).....	78
<b>Figura 5.14</b> – Curva média de concentração plasmática (ng/ml) <i>versus</i> tempo (h) após a administração de cápsulas de ritonavir (Norvir <sup>®</sup> , 100 mg) (n= 12).....	79
<b>Figura 5.15</b> – Perfil plasmático médio do ritonavir modelado para um compartimento aberto pelo programa Scientist <sup>®</sup> .....	80
<b>Figura 5.16</b> – Fração absorvida <i>versus</i> tempo (h) de cápsulas de ritonavir (Norvir <sup>®</sup> , 100 mg) utilizando o método de Wagner-Nelson.....	81
<b>Figura 5.17</b> – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir <sup>®</sup> (n= 4) nos meios de dissolução H <sub>2</sub> O + 0,5% LSS e HCl 0,1 M, equipamento USP 2 a 50 rpm.....	84
<b>Figura 5.18</b> – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir <sup>®</sup> (n= 4) nos meios de dissolução H <sub>2</sub> O + 0,3% LSS e HCl 0,01 M, equipamento USP 2 a 50 rpm.....	85
<b>Figura 5.19</b> – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir <sup>®</sup> (n= 4) nos meios de dissolução H <sub>2</sub> O + 0,5% LSS, HCl 0,1 M e HCl 0,01 M, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.....	86
<b>Figura 5.20</b> – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir <sup>®</sup> (n= 4) em diferentes concentrações de LSS, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.....	88
<b>Figura 5.21</b> – Curva média da percentagem da dose absorvida <i>versus</i> a percentagem da dose dissolvida para as cápsulas de Norvir <sup>®</sup> . A melhor linha de ajuste é demonstrada para cada meio de dissolução.....	88
<b>Figura 5.22</b> – Especificidade: solução de ritonavir SQR, excipientes e meio de dissolução.....	91
<b>Figura 5.23</b> – Representação gráfica da curva padrão do ritonavir obtida por CLAE.....	92
<b>Figura 5.24</b> – Espectro de absorção de ordem zero das soluções amostra, SQR, excipientes do conteúdo da cápsula e excipientes da cápsula.....	96
<b>Figura 5.25</b> –Espectro de absorção de derivada de segunda ordem do ritonavir.....	96



<b>Figura 5.26</b> – Espectro de absorção de ordem zero do ritonavir para soluções de 5, 25, 50, 75, 100 µg/ml em H <sub>2</sub> O + 0,7% LSS.....	98
<b>Figura 5.27</b> – Espectro de absorção de segunda derivada do ritonavir para soluções de 5, 25, 50, 75, 100 µg/ml em H <sub>2</sub> O + 0,7% LSS.....	98
<b>Figura 5.28</b> – Representação gráfica da curva padrão do ritonavir obtida por UV-D <sup>2</sup> . Condições espectrofotométricas: λ= 260 nm, Δλ= 4 nm e fator de escala 100.....	99
<b>Figura 5.29</b> – Comparação dos perfis de dissolução: Norvir <sup>®</sup> (n= 12) e Ritovir (n= 12). Condições do ensaio de dissolução: meio de dissolução H <sub>2</sub> O + 0,7% LSS a 37 °C ± 0,5, equipamento USP 2 a 50 rpm.....	104



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Resumo de ensaios utilizados para a determinação do ritonavir por cromatografia líquida de alta eficiência.....	21
<b>Tabela 3.2</b> – Tipos de equipamentos preconizados pela USP.....	32
<b>Tabela 4.1</b> – Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.....	44
<b>Tabela 5.1</b> – Parâmetros cromatográficos relativos ao cromatograma da Fig. 5.1.....	63
<b>Tabela 5.2</b> – Parâmetros cromatográficos relativos ao cromatograma da Fig. 5.2.....	63
<b>Tabela 5.3</b> – Valores recomendados para os parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.....	64
<b>Tabela 5.4</b> – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do ritonavir.....	72
<b>Tabela 5.5</b> – Valores experimentais obtidos no doseamento do ritonavir por CLAE, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.....	73
<b>Tabela 5.6</b> – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o ritonavir.....	74
<b>Tabela 5.7</b> – Parâmetros cromatográficos relativos ao pico do ritonavir obtidos na avaliação da robustez do método – variação do fluxo da fase móvel.....	75
<b>Tabela 5.8</b> – Parâmetros cromatográficos relativos ao pico do ritonavir obtidos na avaliação da robustez do método – modificação da fase móvel.....	77
<b>Tabela 5.9</b> – Percentagem dissolvida de ritonavir SQR em diferentes meios de dissolução.....	82
<b>Tabela 5.10</b> – Análise de regressão para a CIVIV.....	89
<b>Tabela 5.11</b> – Condições selecionadas para o ensaio de perfil de dissolução de cápsulas de Norvir® .....	89
<b>Tabela 5.12</b> – Estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio de dissolução.....	90

<b>Tabela 5.13</b> – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do ritonavir.....	93
<b>Tabela 5.14</b> – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o ritonavir.....	94
<b>Tabela 5.15</b> – Valores experimentais obtidos no doseamento do ritonavir por CLAE, em dois dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.....	94
<b>Tabela 5.16</b> –Valores de absorvância obtidos por espectrofotometria de segunda derivada.....	97
<b>Tabela 5.17</b> – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do ritonavir.....	99
<b>Tabela 5.18</b> – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por UV-D <sup>2</sup> para o ritonavir.....	100
<b>Tabela 5.19</b> – Valores experimentais obtidos no doseamento do ritonavir por UV-D <sup>2</sup> , em dois dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.....	100
<b>Tabela 5.20</b> – Resultados obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas por UV-D <sup>2</sup> e CLAE.....	100
<b>Tabela 5.21</b> – Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	102

## RESUMO

### **Desenvolvimento e validação de ensaio de dissolução para o ritonavir cápsulas utilizando correlação *in vitro-in vivo***

Os testes de dissolução têm surgido no campo farmacêutico como uma ferramenta muito importante para caracterizar o desempenho de um medicamento. O ritonavir (ABT-538) é um inibidor peptidomimético tanto do HIV-1 quanto do HIV-2, sendo aprovado pelo FDA em 1996. Embora utilizado por quase dez anos, em todo o mundo, o ritonavir (cápsula mole) não está incluído em nenhuma farmacopéia ou código oficial e somente o FDA sugere uma condição para o teste de dissolução. Sendo um fármaco pouco solúvel e com uma biodisponibilidade oral em torno de 70%, o ritonavir é um candidato ao desenvolvimento de um método de dissolução baseado em uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV). Neste trabalho, um ensaio de dissolução para ritonavir na forma farmacêutica cápsula foi desenvolvido e validado de acordo com o guia proposto pelo Fórum Farmacopéico. Diversas condições foram avaliadas, tais como, composição do meio, pH, concentração de surfactante e velocidade de agitação. O método foi desenvolvido utilizando o mesmo lote de Norvir<sup>®</sup> usado no estudo de bioequivalência e os dados *in vivo* foram utilizados para selecionar as melhores condições para o ensaio de dissolução, baseado em uma CIVIV. Um método seletivo por HPLC também foi desenvolvido. Para esta formulação, as melhores condições encontradas foram: equipamento USP 2, 900 ml de meio de dissolução contendo H<sub>2</sub>O com 0,7% de lauril sulfato de sódio a uma velocidade de agitação de 25 rpm. Após plotar a percentagem absorvida *versus* a percentagem dissolvida do fármaco, obtida através das condições selecionadas, uma boa correlação linear foi obtida ( $r= 0,997$ ). O método de dissolução foi validado utilizando a CLAE e UV derivada. Desta forma, as especificações do teste de dissolução baseadas em uma CIVIV podem ser utilizadas como um método de controle de qualidade para avaliar o perfil de dissolução de cápsulas de ritonavir.

**Palavras-chave:** ritonavir, dissolução, validação, correlação *in vitro-in vivo*.



## ABSTRACT

### Development and validation of dissolution test for ritonavir capsules using *in vitro-in vivo* correlation

Dissolution testing has emerged in the pharmaceutical field as a very important tool to characterize drug product performance. Ritonavir (ABT-538) is a peptidomimetic inhibitor of both HIV-1 and HIV-2. It was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 1996. Although being used for almost ten years all over the world, ritonavir soft gel capsules is not included in any pharmacopoeia or official code and only FDA has a suggestion for dissolution test condition. Being a poorly soluble drug with an oral bioavailability around 70%, it is candidate for the development of a dissolution method based on *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC). In the present work, a dissolution test for ritonavir soft gel capsules was developed and validated according to the guidelines proposed by the Pharmacopeial Forum. Several conditions such as medium composition, pH, surfactant concentration and rotation speed were evaluated. The method was carried out using the same lot of Norvir<sup>®</sup> used in a bioequivalence study and the *in vivo* data was used to select the best dissolution test conditions based on IVIVC. Also a selective HPLC was developed. For this formulation, the best dissolution conditions were achieved using USP Apparatus 2, 900 ml of medium containing water with 0.7% (w/v) of sodium lauryl sulfate at a rotation speed of 25 rpm. After plotting the percentage of drug absorbed versus the percentage of drug dissolved under the conditions described above a very good linear correlation was obtained ( $r = 0.997$ ). The dissolution test was validated using both HPLC and UV derivate assay methods. Considering the results, the proposed conditions established here based on an IVIVC could be used as a quality control to evaluate the dissolution profile of ritonavir soft gel capsules.

**Key words:** ritonavir, dissolution, validation, *in vitro-in vivo* correlation.





## **1. INTRODUÇÃO**

---



## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 40,3 milhões de pessoas no mundo já foram infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (VIH) (OMS, 2005).

No Brasil, cerca de 660 mil pessoas já foram infectadas pelo VIH sendo que, atualmente, mais de 140 mil indivíduos estão em fase de tratamento. Isso tem sido possível devido à distribuição de medicamentos anti-retrovirais fornecidos pelo programa brasileiro de combate à SIDA, desenvolvido pela rede pública de saúde. Através desta e de outras iniciativas de assistência aos indivíduos infectados pelo VIH, foi possível uma redução do número de mortes causadas pela SIDA, bem como de infecções oportunistas e de internações hospitalares (UNAIDS/WHO, 2004; CHEQUER *et al.*, 2004).

O Brasil distribui cerca de 15 tipos de medicamentos anti-retrovirais através da rede pública de saúde. Com a regulamentação da lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996, que versa sobre os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, e prevê a quebra compulsória de patentes e a fabricação de genéricos, ficou viabilizado o acesso ao tratamento, o que proporcionou uma considerável economia para o país (BRASIL, 1996).

A utilização da terapia de anti-retrovirais combinados tem apresentado resultados positivos em todos os países onde os pacientes infectados pelo VIH têm acesso a esses medicamentos. Apesar de não existirem fármacos capazes de eliminar por completo o vírus depois de instalado, o tratamento antiviral combinado atrasa a evolução da doença, proporcionando aos soropositivos maior expectativa de vida e melhor condição física e emocional (CHEQUER *et al.*, 2004).

O VIH é um lentivírus, gênero pertencente à família *Retroviridae*, que inclui um grande número de diferentes vírus que causam infecções em animais (AMATO *et al.*, 1996). A infecção pandêmica pelo VIH levou à intensa pesquisa

em busca de agentes anti-retrovirais capazes de controlar esta doença. Em 1996, na 11<sup>a</sup> conferência internacional sobre SIDA (Vancouver, Canadá), foi apresentada uma mistura conhecida como coquetel de fármacos, que diminui 100 vezes o ritmo de reprodução do vírus em relação à monoterapia até então empregada. Esta combinação de medicamentos utiliza fármacos capazes de inibir diferentes etapas da replicação viral (SOUZA & ALMEIDA, 2003).

O ritonavir é um medicamento anti-retroviral pertencente à classe dos inibidores de protease (IP) e age na última etapa do ciclo do VIH, inibindo a ação da enzima protease que é responsável pela clivagem de poliproteínas estruturais e funcionais, necessárias para produção de um novo vírus maduro e infeccioso.

Esse fármaco foi aprovado pelo FDA em 1996, sendo sintetizado pelo laboratório Abbott e comercializado nas formas farmacêuticas de cápsula mole e solução oral, ambos sob o nome de NORVIR<sup>®</sup>.

Diversos estudos de quantificação do ritonavir foram realizados em amostras de plasma (MARSH *et al.*, 1997; FRAPPIER *et al.*, 1998; HOETELMANS *et al.*, 1998; REZK *et al.*, 2004), mas poucos foram direcionados a formulações farmacêuticas contendo o fármaco isolado ou em associação, tanto para a quantificação quanto para testes de controle de qualidade.

Dentre os diferentes testes de controle de qualidade aplicados a medicamentos, destacam-se os ensaios de dissolução *in vitro*. Estes testes visam a garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações, assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento depois de determinadas alterações e indicar problemas potenciais de biodisponibilidade (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

As especificações de formas farmacêuticas sólidas normalmente incluem testes para medir a liberação do(s) princípio(s) ativo(s) a partir da

forma farmacêutica. Para formas farmacêuticas de liberação imediata, como o ritonavir, em que alterações na velocidade de dissolução afetam a biodisponibilidade, as condições do teste de dissolução devem ser capazes de distinguir alterações de formulação que venham a comprometer a biodisponibilidade (ICH, 1999).



## **2. OBJETIVOS**

---





## 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar ensaio de dissolução para o ritonavir na forma farmacêutica cápsula, comparando os resultados *in vitro* com dados *in vivo*.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método de doseamento do ritonavir por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Verificar a solubilidade do ritonavir frente a diferentes meios, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;
- Desenvolver um teste de dissolução para controle de qualidade do ritonavir na forma farmacêutica cápsula através do estabelecimento de uma correlação *in vitro-in vivo*;
- Verificar a estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio de dissolução;
- Validar o ensaio de dissolução utilizando os métodos analíticos: cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria derivada;
- Comparar estatisticamente os resultados dos métodos analíticos;
- Comparar os perfis de dissolução do medicamento referência e do medicamento similar.



### **3. REVISÃO**

---



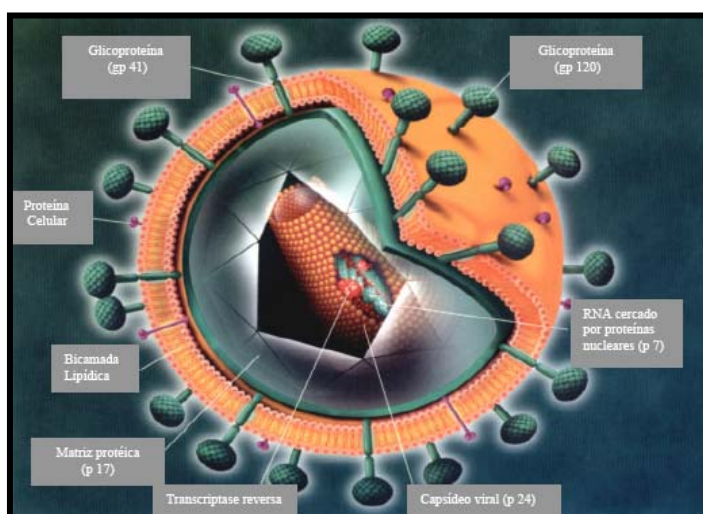
## 3.1 VIH

### 3.1.1 Morfologia do VIH

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

O mapa genético do VIH mostra três regiões principais: a região GAG p55, que codifica as proteínas estruturais internas p17 (matriz), p24 (capsídeo) e p7 (núcleo capsídeo); a região GAG-POL p160, que codifica a protease (p11), transcriptase reversa (p66/p51, RT) e integrase (p31, IN); e a região env, responsável pela codificação das proteínas do envoltório, gp120 e gp41 (FRANKEL & YOUNG, 1998).

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



**Figura 3.1** – Morfologia do VIH (adaptado de [www.cipladoc.com/medicalslides/download/hiv.ppt](http://www.cipladoc.com/medicalslides/download/hiv.ppt), acessado em janeiro de 2006).

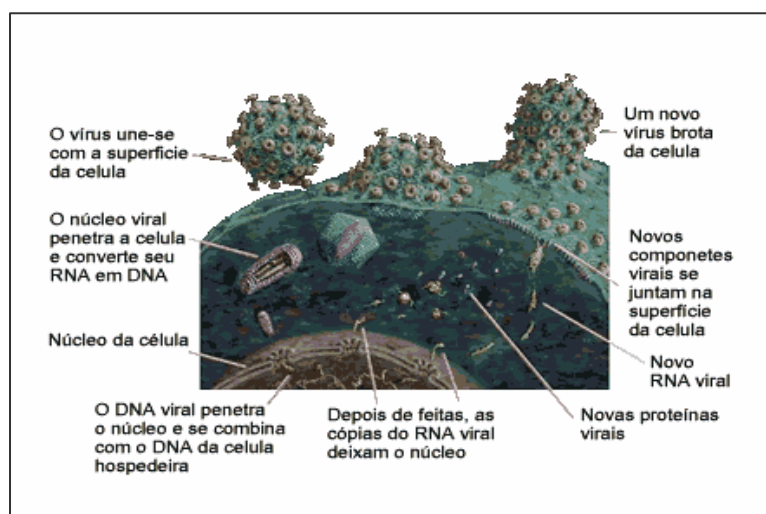
### 3.1.2 Ciclo do VIH

O VIH é um retrovírus que atua infectando linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, comprometendo tanto o sistema nervoso central quanto o sistema imunológico (GOODMAN & GILMAN, 2001).

A etapa inicial da infecção envolve ligação e fusão de membranas. O VIH penetra na célula através de interações entre glicoproteínas do envelope do vírus (gp41 e gp120) e receptores específicos da célula hospedeira (CD4). Após a ligação à membrana celular, a proteína gp120 dissocia-se da proteína gp4, que passa por modificações conformacionais, promovendo a fusão vírus-célula e, assim, permitindo a entrada do capsídeo na célula hospedeira (GUBERT, 2004; PERVES *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Após a fusão, ocorre a transcrição reversa mediada pela enzima transcriptase reversa (TR), que promove a síntese de uma cópia de ADN a partir do ARN viral. A TR atua também como polimerase de ADN, produzindo uma segunda cadeia de ADN. A dupla fita de ADN formada penetra no núcleo da célula hospedeira através de poros na membrana nuclear. Por ação da enzima integrase, a cadeia de ADN é integrada ao genoma da célula hospedeira (GOODMAN & GILMAN, 2001; PERVES *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2004).

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



**Figura 3.2** – Ciclo do VIH (Disponível em [www.chemsoc.org/entries/2003/hull\\_bradley/](http://www.chemsoc.org/entries/2003/hull_bradley/), acessado em agosto de 2005).

### 3.2 MEDICAMENTOS ANTI-RETROVIRAIS

A infecção pandêmica pelo VIH levou à intensa pesquisa em busca de agentes antivirais para controlar esta doença (GUBERT, 2004). Quatro diferentes classes de fármacos têm se mostrado eficazes no tratamento da doença causada pelo VIH:

- Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTRs);
- Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR);
- Inibidores de protease (IP);
- Inibidores de fusão (IF).

### **3.2.1 Inibidores da transcriptase reversa**

Os fármacos utilizados com melhores resultados até o momento são os que inibem a ação da enzima transcriptase reversa. Apesar de exercerem ação parcial, são capazes de diminuir a carga viral, melhorar os sintomas clínicos, retardar a progressão da doença e prolongar a sobrevivência de pacientes com SIDA (GOODMAN & GILMAN, 2001). Estes fármacos são divididos em dois grupos: os análogos de nucleosídeos e os não análogos de nucleosídeos.

#### — Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTRs)

Os fármacos pertencentes a esta classe de medicamentos atuam como substrato para a transcriptase reversa (TR), enzima que converte o ARN viral em uma molécula de ADN viral (GOODMAN & GILMAN, 2001).

Os INTRs são análogos dos di-desoxinucleosídeos e não possuem o grupamento 3'-hidroxila, essencial para a adição de bases subsequentes à fita do ADN em crescimento e sua incorporação pela TR. Dessa forma, os INTRs não permitem o alongamento da cadeia de ADN. Esses agentes também possuem um efeito competitivo, inibidor da própria TR (GUBERT, 2004).

Os INTRs disponíveis atualmente são: zidovudina, didanosina, estavudina, zalcitabina, lamivudina, abacavir, entricitabina e tenofovir.

#### — Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs)

Os NNRTIs inibem a replicação viral por se ligarem a um sítio da TR, o que leva a uma alteração conformacional na enzima e sua subsequente inativação (GUBERT, 2004). Os medicamentos disponíveis, desta classe, são: delavirfina, nevirapina e efavirenzo.



### 3.2.2 Inibidores de protease

Durante o último estágio do ciclo de desenvolvimento do VIH, os produtos gênicos GAG e GAG-POL são traduzidos em poliproteínas, transformando-se, a seguir, em partículas imaturas de brotamento. Uma enzima específica, a protease, é responsável por clivar as poliproteínas em várias proteínas estruturais e funcionais, produzindo, assim, vírus maduro e infeccioso. Como essa protease não ocorre no hospedeiro, trata-se de um bom alvo para intervenção quimioterápica (RANG *et al.*, 2004; GUBERT, 2004).

Os inibidores de protease, ao tornarem a partícula viral não-infecciosa, impedem novos episódios de infecção (KATZUNG, 2001). Os medicamentos pertencentes a esta classe disponíveis atualmente são: saquinavir, ritonavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, tipranavir, fosamprenavir, amprenavir e atazanavir.

### 3.2.3 Inibidores Fusão

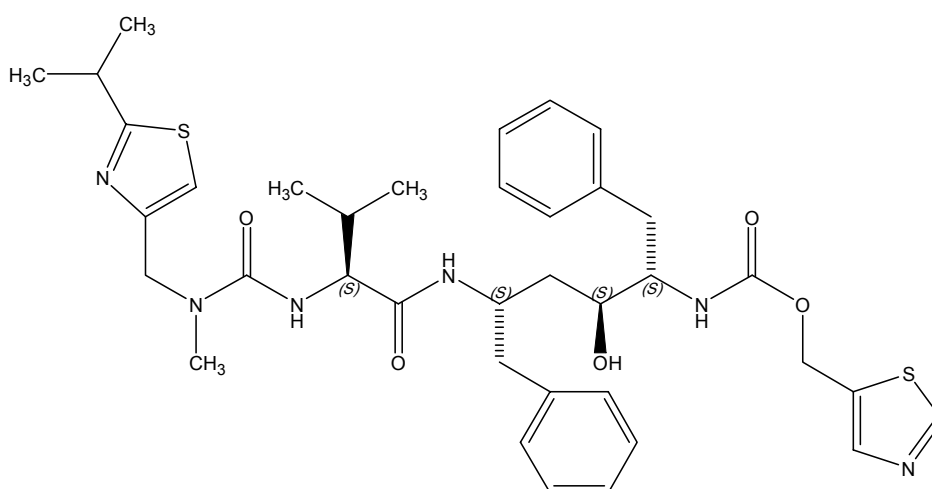
Os inibidores de fusão são uma nova classe de medicamentos anti-retroviral que age impedindo o vírus de se ligar e entrar nas células humanas CD4. Atuam numa fase do ciclo de vida do VIH, antes da entrada do vírus na célula, impedindo, desta forma, infecção de novas células.

Em março de 2003, foi aprovado pelo FDA o primeiro medicamento pertencente a esta nova classe de medicamentos anti-VIH, a enfurvitida.

### 3.3 RITONAVIR

#### 3.3.1 Descrição

O ritonavir (figura 3.3) é um inibidor de protease, aprovado pelo FDA em 1996, utilizado no tratamento de infecções por VIH-1 e VIH-2.



**Figura 3.3** – Estrutura molecular do ritonavir (BUDAVARI, 2001)

É um fármaco lipofílico, solúvel em metanol, etanol e isopropanol, sendo praticamente insolúvel em água (BUDAVARI, 2001; ABBOTT, 2003). Apresenta valores de  $pK_a$  1,8 e 2,6, referentes aos nitrogênios fracamente básicos dos anéis tiazólicos (LAW *et al.*, 2001). Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que tem como base a permeabilidade e a solubilidade dos fármacos, o ritonavir é classificado como pertencente à classe IV, ou seja, é um fármaco de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (LINDENBERG *et al.*, 2004).

### 3.3.2 Propriedades físico-químicas (BUDAVARI, 2001)

- Nome químico: éster 5-tiazolil-metil do ácido (5*S*,8*S*,10*S*,11*S*)-10-hidroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1-[2-(1-metiletil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11-bis(fenilmetil)-2,4,7,12-tetra-azatridecano-13-óico.
- Fórmula molecular: C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>.
- Massa molecular: 720,96 g/mol.
- Descrição: pó branco ou quase branco, de sabor amargo-metálico.

### 3.3.3 Farmacocinética

O ritonavir apresenta biodisponibilidade oral entre 66% e 75% e tempo de meia-vida de eliminação de 3 a 5 horas. Após a administração oral de 600 mg, a concentração plasmática máxima atingida é de 11,2 mg/ml, a concentração mínima, de 3,7 mg/ml e um volume de distribuição de 0,41 l/kg. Apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas (98-99%) ligando-se principalmente à albumina sérica e à glicoproteína- $\alpha$ 1 ácida (GUBERT, 2004; WILLIAMS & SINKO, 1999; FRANÇA, 2003).

A absorção do fármaco é afetada pela presença de alimentos. A administração do ritonavir (cápsula) com alimentos resulta em um aumento de 13% na extensão da absorção.

O ritonavir sofre efeito de primeira passagem, sendo metabolizado pelas isoformas do citocromo P450. As isoformas CYP3A4 e CYP2D6 metabolizam este fármaco, produzindo três produtos oxidados M1, M2 (ativo) e M11. O ritonavir e seus metabólitos são eliminados predominantemente nas fezes (88%) e na urina (12%) (GOODMAN & GILMAN, 2001; FRANÇA, 2003).

### 3.3.4 Interações medicamentosas

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o ritonavir é um potente inibidor do citocromo P450. Dessa forma, o uso concomitante do ritonavir com fármacos que sofrem extenso metabolismo pelas isoformas CYP2D6 e CYP3A4 do citocromo P450 pode resultar em elevado aumento das concentrações plasmáticas e da área sob a curva desses últimos, sendo necessária a redução proporcional da dose (FRANÇA, 2003).

O ritonavir pode produzir elevações acentuadas nas concentrações plasmáticas de certos fármacos, razão pela qual a sua co-administração é especificamente contra-indicada com alguns agentes cardíacos (amiodarona, encainida, flecainida, propafenona, quinidina), analgésicos (meperidina, propoxifeno, piroxicam), sedativos (diazepam, estazolam, midazolam, triazolam), antidepressivos (bupropiona, desipramina) e neurolépticos (clozapina, pimozida) (KATZUNG, 2001).

O uso de fármacos que induzem a atividade da CYP3A4 (fenobarbital, carbamazepina, fenitoína, dexametasona, rifabutina, nevirapina, rifampicina) aumenta a depuração do ritonavir diminuindo a sua concentração plasmática. Certos fármacos, como claritromicina, fluconazol, efavirenz e delavirdina, resultam em níveis elevados de ritonavir (KATZUNG, 2001).

### 3.3.5 Posologia

A dose recomendada para adultos é de 600 mg de ritonavir, o que corresponde a seis cápsulas ou 7,5 ml da solução oral, divididos em duas doses ao dia. Na eventualidade de intolerância gastrointestinal, o fármaco pode ser administrado aumentando-se progressivamente as doses, no decorrer de um período de 4 a 5 dias (FRANÇA, 2003; KATZUNG, 2001).

### 3.3.6 Quantificação

Diversos estudos de quantificação do ritonavir, isolado ou em combinação, utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A tabela 3.1 apresenta alguns dos métodos utilizados para a quantificação deste fármaco.

**Tabela 3.1** – Resumo de ensaios utilizados para a determinação do ritonavir por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Coluna	Fase Móvel	Detecção	Autores
Norvir <sup>®</sup> (cápsula)	LiChrospher <sup>®</sup> C <sub>8</sub>	metanol:H <sub>2</sub> O (67:33, V/V)	Ultravioleta 210 nm	DIAS <i>et al.</i> , 2005
Plasma	Zorbax <sup>®</sup> C <sub>18</sub>	(A) metanol:tampão fosfato monobásico (85:15) (pH 4,5) (B) fase móvel (A):acetonitrila: metanol (25:60:15, V/V)	Ultravioleta 210 nm	REZK <i>et al.</i> , 2004
Plasma	—	triethylamina (2%), fosfato de potássio em acetonitrila:H <sub>2</sub> O (52:48, V/V) pH 6,4	Ultravioleta 240 nm	WASHINGTON <i>et al.</i> , 2003
Plasma	Pack (Waters) C <sub>18</sub>	acetonitrila (140 ml) : triethylamina (75 µl) : tampão diidrogenofosfato de sódio 5 mM (160 ml - pH 6,0)	Ultravioleta 210 nm e 239 nm	JUSTESEN <i>et al.</i> , 2003
Plasma	Luna C <sub>18</sub>	acetonitrila:água (gradiente)	Ultravioleta 250 nm	SIMON <i>et al.</i> , 2001
Plasma, fluido cerebrospinal e saliva	Zorbax <sup>®</sup> SB C <sub>18</sub>	acetonitrila:H <sub>2</sub> O (44:56, V/V), contendo 25 mM de acetato de sódio e 25 mM de ácido sulfônico-1-Hexano, pH 4,0	Ultravioleta 239 nm	HOETELMANS <i>et al.</i> , 1998
Plasma	Kromasi <sup>®</sup> I C <sub>8</sub>	acetonitrila:5 mM tampão fosfato de potássio monobásico (55:45, V/V), pH 8	Ultravioleta 240 nm	FRAPPIER <i>et al.</i> , 1998
Plasma	ODS-AQ C <sub>18</sub>	acetonitrila:metanol: tetrametilamônio perclorado em 0,1% ácido tetrafluoracético (40:5:55, V/V)	Ultravioleta 205 nm	MARSH <i>et al.</i> , 1997

### 3.4 DISSOLUÇÃO

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

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

#### 3.4.1 Dissolução e absorção

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

Se o processo de dissolução de uma partícula de fármaco for rápido, a velocidade em que começa a ser absorvido torna-se primeiramente dependente de sua capacidade de atravessar a membrana gastrointestinal (permeabilidade) e do esvaziamento gástrico. Contudo, se a velocidade de dissolução for lenta, devido às suas características físico-químicas ou da forma farmacêutica, o processo de dissolução torna-se uma etapa limitante da velocidade de absorção (SIRISUTH & EDDINGTON, 2004; AULTON, 2005; ANSEL *et al.*, 2000).

### 3.4.2 Fatores que afetam a velocidade de dissolução *in vitro*

Noyes, Whitney e outros pesquisadores estudaram a velocidade de dissolução de formas sólidas e estabeleceram a seguinte equação (Equação 1) (SHARGEL & YU, 2005):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \times A \times (C_s - C_t)}{h} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

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

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

- $A$ , área superficial de sólido não-dissolvido: presença de surfactantes, tamanho das partículas sólidas;
- $C_s$ , solubilidade do sólido no meio: hidrossolubilidade, pH, natureza química do sólido e surfactantes;
- $C$ , concentração do soluto na solução: volume de meio;
- $D$ , constante de difusão: viscosidade do meio;
- $h$ , espessura da camada de saturação: velocidade de agitação, da forma e posição do agitador (*in vitro*).

### 3.4.2.1 Tamanho da partícula

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

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

### 3.4.2.2 Surfactantes

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

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

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



### 3.4.2.3 pH

O ajuste do pH do meio de dissolução proporciona um aumento na solubilidade do fármaco, se o composto for ionizável. Para estes compostos, as equações 2 e 3 governam a solubilidade (ROHRS, 2001).

$$\text{Base livre: } C_{\text{Total}} = C_i \times (1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}) \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Ácido livre: } C_{\text{Total}} = C_i \times (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$C_{\text{Total}}$ : Solubilidade total

$C_i$ : Solubilidade intrínseca do composto neutro

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

### 3.4.2.4 Velocidade de agitação

A velocidade de dissolução de uma forma farmacêutica está relacionada com as condições do teste de dissolução. Entre essas condições, propriedades hidrodinâmicas, como a intensidade da força de agitação, são

---

fatores determinantes do comportamento de dissolução de formas farmacêuticas sólidas (KAMBA *et al.*, 2003).

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

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

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

#### **3.4.2.5 Natureza química**

Os materiais farmacêuticos sólidos podem ocorrer como substâncias cristalinas puras de estrutura identificável e definida. Alguns princípios ativos que existem na forma cristalina são capazes de formar diferentes tipos de cristais, dependendo das condições (temperatura, solvente, tempo) sob as

---

quais a cristalização é induzida. Essa propriedade pela qual uma única substância química pode existir em mais de uma forma cristalina é denominada polimorfismo (SHARGEL & YU, 2005; ANSEL *et al.*, 2000).

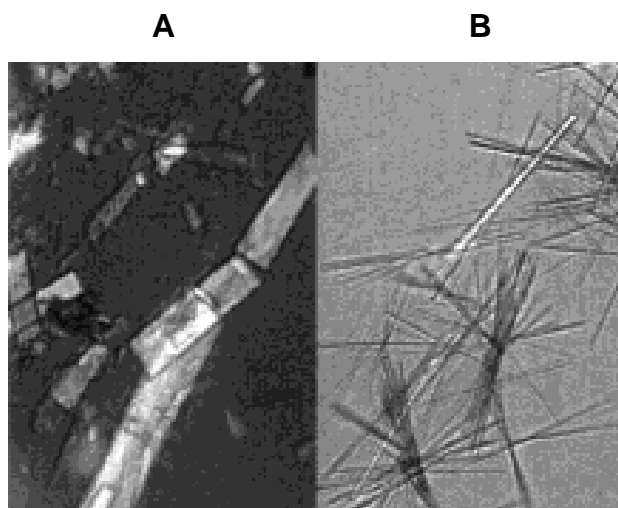
As formas polimórficas apresentam algumas propriedades físico-químicas diferentes, como solubilidade, dissolução, densidade, ponto de fusão. Sob condições de temperatura e pressão definidas, apenas uma das possíveis formas polimórficas de uma substância pura é estável, sendo as outras formas denominadas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

A presença de polimorfismo em compostos farmacêuticos pode ter um impacto direto sobre a qualidade e o desempenho de fármacos, tais como a estabilidade, a dissolução e a biodisponibilidade do medicamento (RAW *et al.*, 2004; ICH, 1999). O inesperado aparecimento ou desaparecimento de uma forma polimórfica pode produzir sérias conseqüências, resultando em um atraso no desenvolvimento de um produto e na interrupção da produção comercial, como aconteceu com o ritonavir (RAW *et al.*, 2004).

O ritonavir é um fármaco que apresenta polimorfismo estrutural. Primeiramente, foi identificada somente uma forma de cristal do ritonavir (cristal monoclínico). Essa forma não é suficientemente biodisponível no estado sólido para a administração oral, necessitando ser formulada na forma farmacêutica solução oral ou cápsula preenchida com solução hidroalcoólica contendo o fármaco dissolvido (BAUER *et al.*, 2001).

Em 1998, alguns lotes de cápsulas do ritonavir foram reprovados em especificações de dissolução. A análise destas cápsulas por microscopia e difração por raios-x identificou uma nova forma de polimorfo do ritonavir. Estudos realizados por Bauer e colaboradores (2001) permitiram a identificação e caracterização desta nova forma de cristal, denominada forma II (cristal ortorrômbico), que apresenta solubilidade 50% menor em relação à forma I

(cristal monoclinico). A figura 3.4 reproduz uma microfotografia das formas polimórficas I e II do ritonavir.



**Figura 3.4** — Microfotografia dos polimorfos do ritonavir: (A) forma I, (B) forma II (retirado de BAUER *et al.*, 2001).

Recentemente, Morissette e colaboradores (2003) identificaram cinco formas de cristais do ritonavir, sendo duas já conhecidas (formas I e II) e outras três novas, denominadas formas III, IV e V. A forma III (cristal monoclinico) se apresenta como um cristal solvatado e, quando exposta em meio aquoso, se converte na forma V (cristal monoclinico), tri-hidratada que, por sua vez, se interconverte espontaneamente na forma I.

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

### 3.5 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

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

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

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

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

- Classe I: alta solubilidade (AS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe II: baixa solubilidade (BS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe III: alta solubilidade (AS) e baixa permeabilidade (BP);
- Classe IV: baixa solubilidade (BS) e baixa permeabilidade (BP).

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

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

### 3.5.1 Especificações de dissolução

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

- Especificação de um único ponto

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

- Especificação de dois pontos

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

- Perfil de dissolução

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

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

### **3.5.2 Tipos de equipamentos**

Diferentes tipos de equipamentos são preconizados pela USP (The United States Pharmacopeia) e pela Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. IV) para a realização de ensaios de dissolução. A seleção do mais adequado para a realização destes testes depende da forma farmacêutica em que o medicamento foi formulado (USP 29, 2006). A tabela 3.2 apresenta os tipos de equipamentos utilizados para a realização de ensaios de dissolução de acordo com a forma farmacêutica.

**Tabela 3.2** – Tipos de equipamentos preconizados.

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

<sup>1</sup>Pela F. BRAS. IV, <sup>2</sup>Pela USP

### 3.6 COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO

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

Para a avaliação dos perfis de dissolução empregam-se os métodos modelo independente e modelo dependente (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b). Os métodos modelo independente podem ser divididos em procedimentos baseados na ANOVA (análise de variância), testes de razão (razão de porcentagem dissolvida, área sob a curva ou tempo de dissolução médio) ou testes combinados (fatores  $f_1$  e  $f_2$  e índices de Rescigno –  $\xi_1$  e  $\xi_2$ ). Alguns métodos modelo dependente aplicáveis à comparação de perfis de dissolução são: ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, Gompertz, Baker-Ionsdale e Korsmeyer-Peppas (POLLI, 1996).



### 3.7 CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

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

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

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

#### 3.7.1 Níveis de correlação

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

— Nível A: representa uma relação ponto a ponto entre os dados de dissolução *in vitro* e os dados de absorção *in vivo*. Geralmente esta correlação é linear,

entretanto, correlações não-lineares são aceitáveis. Correlação nível A é considerado o tipo de correlação mais informativa.

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

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

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

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---



## 4.1 AMOSTRAS

### 4.1.1 Substância Química de Referência (SQR)

Como substância química de referência (SQR) utilizou-se ritonavir com teor declarado de 99,53% e identificado pelo lote 1022/03, gentilmente cedido pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brasil).

### 4.1.2 Produto Farmacêutico

Cápsulas de Norvir<sup>®</sup> (referência) utilizadas para os testes *in vivo* e *in vitro*, número de lote 074672E21, foram adquiridas no mercado. Cápsulas de Ritovir<sup>®</sup> (lote 03051656) foram obtidas por intermédio da Secretaria Estadual de Saúde (POA).

Cada cápsula de Norvir<sup>®</sup> contém:

- 100 mg de ritonavir;
- Componentes do conteúdo da cápsula: álcool, ácido oleico, butilidroxitolueno (BHT) e óleo de rícino polioxil 35;
- Excipientes do invólucro da cápsula: gelatina, sorbitol, glicerina, dióxido de titânio (cor branca), triglicerídeos de cadeia média, lecitina e tinta preta. A tinta preta contém: propilenoglicol, óxido de ferro negro, ftalato de acetato de polivinil, polietilenoglicol 400 e hidróxido de amônio.

## **4. 2 ANÁLISE QUANTITATIVA**

### **4.2.1 Preparo das soluções**

#### **4.2.1.1 Solução amostra**

Transferiu-se, quantitativamente, o conteúdo de 10 cápsulas de Norvir<sup>®</sup> com auxílio de metanol para um balão volumétrico de 200 ml e completou-se o volume com metanol. A solução foi homogeneizada, filtrada, armazenada em vidro âmbar e mantida sob refrigeração.

#### **4.2.1.2 Solução padrão**

Todas as soluções da SQR de ritonavir (estoque) foram preparadas, analiticamente, utilizando metanol como solvente. As soluções finais de trabalho foram preparadas a partir de diluições da solução estoque e aferidas com o diluente acetonitrila:água:metanol (53:24:23). A solução estoque foi armazenada em vidro âmbar e mantida sob refrigeração.

### **4.2.2 Validação do método de doseamento do ritonavir por CLAE**

Para a análise do fármaco empregou-se cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10AD, equipado com detector de arranjo de diodos SPD-M10AVvp, desgaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10Avp e injetor manual RHEODYNE. O software CLASS-VP foi utilizado para a aquisição e análise dos dados.

Foram utilizados reagentes grau CLAE e água ultrapura obtida por sistema MILLI-Q PLUS (Millipore<sup>®</sup>). As condições cromatográficas selecionadas

no método de doseamento do ritonavir por CLAE estão apresentadas no Quadro 4.1.

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

Coluna	Phenomenex® C <sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna Phenomenex®
Fase móvel	Acetonitrila: água: metanol (53:40:7)
Diluyente	Acetonitrila: água: metanol (53:24:23)
Detecção	Ultravioleta ( $\lambda = 210$ nm)
Volume de injeção	20 µl
Fluxo	1,5 ml/min

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

#### 4.2.2.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foram avaliados os seguintes parâmetros: fator de cauda (T), fator de capacidade (K') e número de pratos teóricos (N).

Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram efetuados injetando-se cinco vezes a solução SQR de ritonavir (50 µg/ml) e a solução amostra (50 µg/ml).

#### **4.2.2.2 Especificidade**

Para a avaliação da especificidade do método, a SQR de ritonavir foi submetida a condições de estresse com o objetivo de forçar a formação de produtos de degradação.

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

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

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

##### **a) Hidrólise alcalina**

Partiu-se de uma solução metanólica da SQR de ritonavir (5 mg/ml). Foi transferido 1,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 10 ml (500 µg/ml), adicionou-se 4,0 ml de NaOH 0,1 M e completou-se o volume com metanol. Agitou-se a solução e deixou-se em repouso por 24 h. Após este período, transferiu-se 1,0 ml desta solução resultante para um balão volumétrico de 10 ml (50 µg/ml), neutralizou-se a solução com HCl 0,1 M e completou-se o volume com o diluente. Preparou-se um branco sob as mesmas condições descritas acima.



### **b) Hidrólise ácida**

Partiu-se de uma solução da SQR de ritonavir (5 mg/ml). Foi transferido 1,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 10 ml (500 µg/ml), adicionou-se 4,0 ml de HCl 0,1 M e completou-se o volume com metanol. Agitou-se a solução e deixou-se em repouso por 24 h. Após este período, transferiu-se 1,0 ml da solução resultante para um balão volumétrico de 10 ml (50 µg/ml), neutralizou-se a solução com NaOH 0,1 M e completou-se o volume com o diluente. Preparou-se um branco sob as mesmas condições.

### **c) Oxidação com peróxido de hidrogênio**

Partiu-se de uma solução da SQR de ritonavir (5 mg/ml). Transferiu-se 1,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 10 ml (500 µg/ml), adicionou-se 4,0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% e completou-se o volume com metanol. Agitou-se a solução e deixou-se em repouso por 24 h. Após este período, transferiu-se 1,0 ml desta solução resultante para um balão volumétrico de 10 ml (50 µg/ml) e completou-se o volume com o diluente. Um branco foi preparado sob as mesmas condições descritas acima.

### **d) Fotólise**

Transferiu-se 1,0 ml da solução SQR de ritonavir (5 mg/ml) para uma cubeta de quartzo (UV-CUVETTE, MICRO-BRAND). Deixou-se em repouso por 24 h exposto à lâmpada de radiação UV 352 nm (Black Light Blue Lamp-Orion UV-A, 30 W, 130 V,  $1,26 \times 10^{-3}$  watts/cm<sup>2</sup>) em câmara espelhada (100x16x16 cm).

Após este período, transferiu-se toda a solução, quantitativamente, para um balão volumétrico de 100 ml. Preparou-se uma outra amostra da

mesma forma descrita acima, que foi submetida às mesmas condições, porém protegida da ação da luz com papel alumínio.

#### **e) Estufa 80 °C**

Transferiu-se 1,0 ml da solução SQR de ritonavir (5 mg/ml), para um balão volumétrico de 10 ml (500 µg/ml) e completou-se o volume com diluente. Agitou-se a solução, colocou-se em estufa pré-aquecida a 80 °C e deixou-se em repouso por 24 h. Após este período, aferiu-se novamente a solução com diluente devido à evaporação de certa quantidade do diluente. Transferiu-se 1,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 10 ml (50 µg/ml) e completou-se o volume com o diluente.

#### **f) Excipientes do conteúdo da cápsula**

Preparou-se uma solução contendo os excipientes do conteúdo da cápsula do Norvir<sup>®</sup>. As concentrações de cada excipiente foram baseadas na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas a partir do peso médio de 20 cápsulas (939,1 mg).

#### **4.2.2.3 Linearidade**

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

Primeiramente, preparou-se uma solução de ritonavir SQR contendo 1 mg/ml em metanol. A seguir, com auxílio de bureta, alíquotas de 0,2; 1,7; 3,2; 4,7 e 6,2 ml foram transferidas para balão volumétrico de 50 ml e completou-se

o volume com o diluente. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 4, 34, 64, 94 e 124 µg/ml. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata.

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

#### 4.2.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção e quantificação foi calculado a partir dos dados obtidos da equação da reta da curva padrão, pelas equações apresentadas a seguir:

$$LD = \frac{3,3 \times s}{b} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{b} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

s= desvio padrão do intercepto;

b= coeficiente de regressão linear.

#### 4.2.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração.

Preparou-se uma solução amostra contendo 1 mg/ml de ritonavir e uma solução da SQR a 1 mg/ml.

Para a análise, foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,0 ml da solução amostra para balões volumétricos de 50 ml e estes foram denominados A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionadas alíquotas de 0,75 ml; 1,5 ml e 2,25 ml da solução de ritonavir SQR aos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente, e completou-se o volume com o diluente.

O preparo das soluções para o teste de recuperação está representado, esquematicamente, na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.

Balão Volumétrico	Volume amostra 1 mg/ml (ml)	Volume SQR 1 mg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	1,0	—	20
R <sub>1</sub>	1,0	0,75	35
R <sub>2</sub>	1,0	1,50	50
R <sub>3</sub>	1,0	2,25	65
P	—	1,00	20

As soluções denominadas A, P, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> foram preparadas em triplicada. Para cada solução foram realizadas três determinações.

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

$$R\% = \frac{R_x - C_A}{C_P} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

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

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

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

#### 4.2.2.6 Precisão

A precisão do método foi avaliada através de 6 ensaios diários completos, realizados em três dias diferentes. Verificou-se a precisão intermediária e a repetibilidade do método nas amostras de ritonavir (cápsula de Norvir<sup>®</sup>). As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir.

Transferiram-se 500  $\mu\text{l}$  de uma solução amostra (5 mg/ml), preparada conforme descrito no item 4.2.1.1, para balão volumétrico de 50 ml e diluiu-se com o diluente, obtendo-se uma concentração final de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Preparou-se solução padrão na mesma concentração da amostra.

Os resultados de precisão foram avaliados pelo desvio padrão relativo (DPR). A concentração do ritonavir foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$C_s = \frac{A_s \times C_{SRQ}}{A_{SR}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

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

$A_s$  = área absoluta obtida para a solução;

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

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

#### **4.2.2.7 Robustez**

A robustez do método cromatográfico foi avaliada pela variação nas condições cromatográficas como: variação do fluxo da fase móvel e modificação na composição da fase móvel.

##### **a) Variação do fluxo da fase móvel**

O fluxo da fase móvel foi modificado para 1,4 ml/min e 1,6 ml/min. Injetou-se uma solução contendo 50 µg/ml de ritonavir SQR para cada fluxo testado. Verificaram-se os seguintes parâmetros cromatográficos relativos ao pico do fármaco: tempo de retenção, fator de capacidade, área absoluta, assimetria e número de pratos teóricos.

##### **b) Modificação da fase móvel**

Para cada fase móvel testada injetou-se uma solução contendo 50 µg/ml de ritonavir SQR. Verificaram-se os seguintes parâmetros cromatográficos relativos ao pico do fármaco: tempo de retenção, fator de capacidade, área absoluta, assimetria e número de pratos teóricos. Foram testadas as seguintes modificações na fase móvel: ACN:H<sub>2</sub>O:MeOH (54:39:7) e ACN:H<sub>2</sub>O:MeOH (52:41:7).

### 4.3 ESTUDO *IN VIVO*

Para o desenvolvimento do método de dissolução para o ritonavir e o estabelecimento de uma correlação *in vitro-in vivo*, utilizou-se dados *in vivo* relativos à formulação referência (Norvir<sup>®</sup>). As informações *in vivo* foram obtidas através do estudo de bioequivalência realizado pelo Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde uma nova formulação de cápsulas gelatinosas de ritonavir foi avaliada. Os dados foram utilizados com o consentimento da Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brasil).

#### 4.3.1 Dados do estudo *in vivo*

O estudo farmacocinético foi desenvolvido utilizando 12 voluntários do sexo masculino, idade entre 20 a 35 anos e peso entre 60 a 80 Kg. Os voluntários foram informados da proposta, protocolo e riscos do estudo. Todos os voluntários apresentavam valores clínicos laboratoriais normais. O protocolo do estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas.

Os indivíduos não ingeriram qualquer medicação ou álcool por pelo menos 14 dias anteriores ao estudo e durante todo o período do estudo. Os voluntários foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos e cada grupo recebeu uma dose oral de 100 mg (1 cápsula Norvir<sup>®</sup> ou do medicamento teste) em cada um dos períodos, com 200 ml de água, após jejum noturno. O jejum continuou nas primeiras quatro horas após a administração da dose e posteriormente uma refeição leve foi providenciada.

Foram coletadas amostras de sangue antes da administração do fármaco. Após a administração amostras foram coletadas nos tempos 0,33; 0,66; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 h. O plasma

foi separado por centrifugação e estocado a -80 °C, para subseqüentes análises.

#### 4.3.2 Metodologia analítica para amostras de plasma

Alíquota de 25 µl de padrão interno (saquinavir) e 0,5 ml de tampão fosfato (pH 7,0) foram adicionados a 0,5 ml de plasma e tratado com uma mistura de acetonitrila:ácido fórmico (99,95:0,05). A mistura foi agitada por 15 minutos utilizando um vortex, sonicada por 10 minutos e centrifugada a 2000 x g por 10 minutos.

Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante foi transferida para um vial e injetada em um sistema cromatográfico SHIMADZU LC 10 ADvp utilizando uma coluna ShimPark-RP 18 (4 µm, 4,6 mm x 15 cm). A fase móvel foi constituída de uma mistura de ácido fórmico em água (0,05%, V/V) e acetonitrila (20:80). A temperatura do amostrador automático e do forno foram 10 °C e 30 °C, respectivamente. A detecção foi realizada utilizando detector de massas (Quattro-LC<sup>®</sup>, Micromass).

O espectrômetro de massas foi utilizado no modo de ionização positiva por eletronebulização (ES+). Os íons monitorados a partir das análises desenvolvidas encontram-se no Quadro 4.2 abaixo:

**Quadro 4.2:** Condições do detector de massas

<b>Fármaco</b>	<b>Ion principal</b>	<b>Ion filho</b>	<b>Cone (V)</b>	<b>Energia (eV)</b>
ritonavir	670,6	295,8	30	34
saquinavir	720,5	569,5	30	34



### 4.3.3 Fração absorvida da dose

Os pontos experimentais médios da curva de concentração plasmática *versus* tempo foram obtidos através de modelagem matemática utilizando o programa de regressão não linear Scientist<sup>®</sup> versão 2.0 (MicroMath<sup>®</sup>). Foi utilizado modelo de um compartimento aberto descrito pela Equação 5 e os parâmetros foram utilizados para estimar os pontos dos dados de concentração plasmáticos intermediários.

A fração absorvida da dose (FA) foi calculada utilizando o método de Wagner-Nelson, de acordo com a Equação 6.

$$C = \frac{F \cdot D \cdot K_a}{V_d \cdot (K_a - K_e)} \cdot (e^{-K_e \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}) \quad \text{Equação 5}$$

$$FA = \frac{C + k \cdot [ASC]_0^t}{k \cdot [ASC]_0^\infty} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

$C$  = concentração plasmática

$F$  = biodisponibilidade

$D$  = dose

$K_a$  = constante de absorção

$K_e$  = constante de eliminação

$V_d$  = volume de distribuição

$ASC$  = área sob a curva

## 4.4 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

### 4.4.1 Equipamento de dissolução

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

### 4.4.2 Determinação da solubilidade do ritonavir em diferentes meios

A solubilidade do ritonavir SQR foi determinada nos meios HCl 0,1 M, HCl 0,01 M, H<sub>2</sub>O + 0,5% de lauril sulfato de sódio (LSS), tampão fosfato (pH 6,0) e tampão acetato (pH 4,0).

Foram pesados cerca de 50 mg de ritonavir SQR e transferidos, quantitativamente, para um béquer contendo 125 ml do meio, pré-aquecidos a 37 °C. As amostras foram agitadas lentamente. Uma alíquota de 10 ml foi retirada após 1 e 2 horas e filtrada. 1,0 ml da alíquota filtrada foi transferida para um balão volumétrico de 5 ml, diluída com o diluente acetonitrila:água:metanol (53:24:23) e injetada no CLAE. As alíquotas foram neutralizadas, quando necessário.

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

#### **4.4.3 Condições do ensaio de dissolução**

Os ensaios de dissolução das cápsulas de ritonavir foram desenvolvidos utilizando o equipamento USP 2 (pá) e 900 ml do meio de dissolução a 37 °C ± 0,5. A influência da velocidade de agitação, meio de dissolução e concentração de lauril sulfato de sódio foram avaliados.

Alíquotas de 8 ml da amostra foram coletadas nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. O volume do meio de dissolução retirado foi repostado com o próprio meio, a fim de manter um volume constante. Um filtro de 10 µm, acoplado ao amostrador automático, foi utilizado para filtrar as amostras durante a coleta.

O uso de âncoras (sinkers) foi necessário para auxiliar na centralização da forma farmacêutica sob a pá.

#### **4.4.4 Estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio**

A estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio foi verificada. Submeteu-se 3 cápsulas de Norvir® ao ensaio de dissolução sob condições previamente selecionadas. As amostras foram coletadas após 2 h e injetadas nos tempos 0, 12 e 24 horas.

### **4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO**

O método de dissolução foi validado de acordo com o Pharmacopeial Forum — <1092>The Dissolution Procedure: Development and Validation, a guia ICH (1996) e o segundo fascículo de atualização da USP (SECOND SUPPLEMENT TO USP 29, 2006).

#### **4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Para a validação do método de dissolução, por CLAE, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão e precisão. Os parâmetros cromatográficos utilizados são demonstrados no quadro 4.1 do item 4.2.2.

##### **4.5.1.1 Especificidade**

A especificidade do método foi determinada utilizando-se amostras do placebo, sendo este constituído por mistura de excipientes do conteúdo da cápsula, uma cápsula vazia (previamente lavada) e uma âncora. As concentrações de cada excipiente do conteúdo das cápsulas foram baseadas na literatura (KIBBE, 2000) e calculadas a partir do peso médio de 20 cápsulas (939,1 mg).

Em uma cuba de dissolução contendo 900 ml do meio de dissolução selecionado pré-aquecido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , foram adicionados todos os excipientes referidos acima e agitados por 1 hora a 150 rpm, utilizando o equipamento USP 2. Alíquotas de 8 ml foram coletadas e analisadas por CLAE. As amostras foram preparadas em triplicata.

##### **4.5.1.2 Linearidade**

Para a construção da curva padrão foi preparada, em metanol, uma solução contendo 1 mg/ml de ritonavir SQR. A partir desta solução, alíquotas de 0,2; 1,7; 3,2; 4,7 e 6,2 ml foram transferidas para balão volumétrico de 50 ml e aferidas com o meio de dissolução selecionado. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 4, 34, 64, 94 e 124  $\mu\text{g/ml}$ . Cada ponto da curva foi injetado em triplicata.

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

#### **4.5.1.3 Exatidão e precisão**

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, onde quantidades de ritonavir SQR foram adicionadas ao placebo. A partir de uma solução de 10 mg/ml, alíquotas de 0,72; 4,5 e 9,0 ml foram adicionadas em uma cuba contendo 900 ml do meio de dissolução pré-aquecido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$  e agitadas a 150 rpm por 1 hora. Concentrações finais teóricas de 8,0  $\mu\text{g/ml}$ , 50,0  $\mu\text{g/ml}$  e 100,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, foram obtidas.

Alíquotas de 8 ml foram retiradas e analisadas por CLAE. As soluções foram preparadas em triplicata e em diferentes dias. O placebo foi preparado conforme descrito no item 4.5.1.1.

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

#### **4.5.2 Espectrofotometria ultravioleta derivada (UV-D)**

As condições espectrofotométricas para a validação do método de UV-D foram selecionadas a partir de ensaios preliminares com soluções do

ritonavir SQR, das cápsulas e da amostra do placebo. A partir disto, determinou-se a ordem da derivada, o comprimento de onda ( $\lambda$ ), a atenuação ( $\Delta\lambda$ ) e o fator de escala a ser utilizado na validação do método.

Foi utilizado espectrofotômetro SHIMADZU UV-2201 e cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 260 nm ( $\Delta\lambda = 4$  nm e fator de escala 100), utilizando o meio de dissolução como branco.

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

#### **4.5.2.1 Especificidade**

As amostras para o teste de especificidade foram preparadas conforme descrito no item 4.5.1.1. Alíquotas de 8 ml foram coletadas e centrifugadas a 3500 rpm e em seguida analisadas por UV-D. As amostras foram preparadas em triplicata.

#### **4.5.2.2 Linearidade**

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

Primeiramente, preparou-se uma solução de ritonavir SQR contendo 1 mg/ml em metanol. A seguir, com auxílio de uma bureta, alíquotas de 0,25; 1,25; 2,5; 3,75 e 5,0 ml foram transferidas para balão volumétrico de 50 ml e aferidas com o meio de dissolução. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g/ml}$ . Foram realizadas três leituras para cada solução.

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

#### **4.5.2.3 Exatidão e precisão**

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, onde quantidades de ritonavir SQR foram adicionadas ao placebo. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.5.1.3. Todas as amostras foram centrifugadas antes da análise.

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

#### **4.5.3 Análise comparativa dos métodos**

Os resultados obtidos no método de doseamento por CLAE e por espectrofotometria ultravioleta derivada foram comparados estatisticamente, empregando-se o teste *t-student*.

## 4.6 COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO

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

Para a avaliação dos fatores  $f_1$  e  $f_2$  submeteram-se 12 cápsulas do medicamento referência (Norvir<sup>®</sup>) e do medicamento similar (Ritovir<sup>®</sup>) ao ensaio de dissolução, sob condições previamente selecionadas.

Amostras foram coletadas nos tempos 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos, gerando o perfil de dissolução de ambos os medicamentos.

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

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

Equação 7

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

Equação 8

Onde:

$n$  = número de tempos de coleta.

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

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



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

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

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



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



## **5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA**

O ritonavir (ABT 538) foi aprovado pelo FDA em 1996 e é amplamente utilizado no tratamento do VIH (ABBOTT, 2004). Porém, mesmo sendo comercializado há quase 10 anos, a primeira monografia farmacopéica para controle de qualidade da matéria-prima surgiu em 2005, na Farmacopéia Internacional (WHO, 2005). Em 2006, foi publicada uma monografia, também para matéria-prima, no primeiro fascículo de atualização da USP (FIRST SUPPLEMENT TO USP 29, 2006).

Conforme descrito em 3.3.6, a maioria dos trabalhos publicados refere-se à determinação do ritonavir em fluidos biológicos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Recentemente, Dias e colaboradores (2005) desenvolveram um método para a quantificação do ritonavir cápsulas por CLAE, utilizando coluna C<sub>8</sub>, fase móvel metanol e água (64:33), detecção em 210 nm e tempo de retenção de 7,8 minutos. Porém, devido à necessidade de um tempo de análise relativamente curto e viável para aplicação em rotina, na quantificação das amostras de ensaios de dissolução, e considerando a adição do meio de dissolução ao ensaio, optou-se por desenvolver e validar um novo método de doseamento do ritonavir cápsulas por CLAE.

### **5.1.1 Validação do método de doseamento para o ritonavir por CLAE**

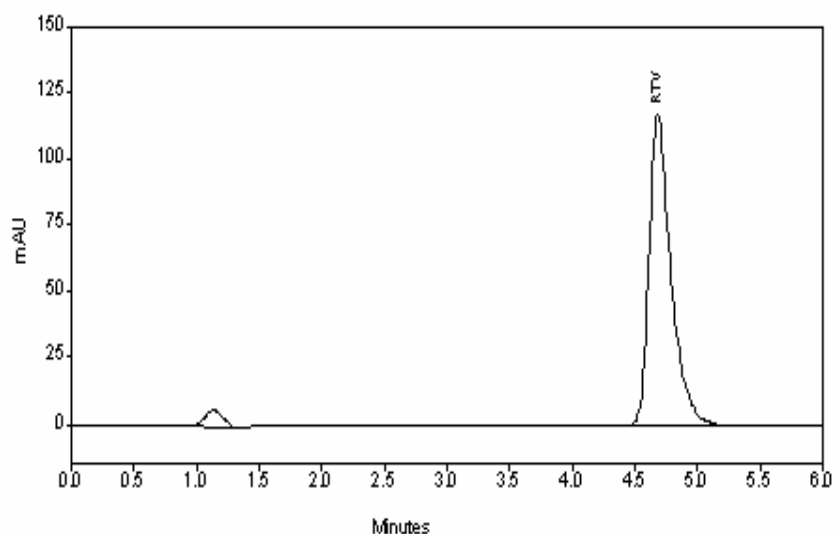
O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez adequadas à análise (BRASIL, 2003).

Com o objetivo de desenvolver e validar um método para o doseamento do ritonavir, foram realizados testes preliminares a fim de otimizar

as condições cromatográficas para a análise quantitativa do fármaco. Foram testados diferentes solventes, proporções dos componentes da fase móvel e diluente, colunas, fluxos e comprimentos de onda.

As condições cromatográficas selecionadas para o método de doseamento do ritonavir por CLAE são descritas no item 4.2.2.

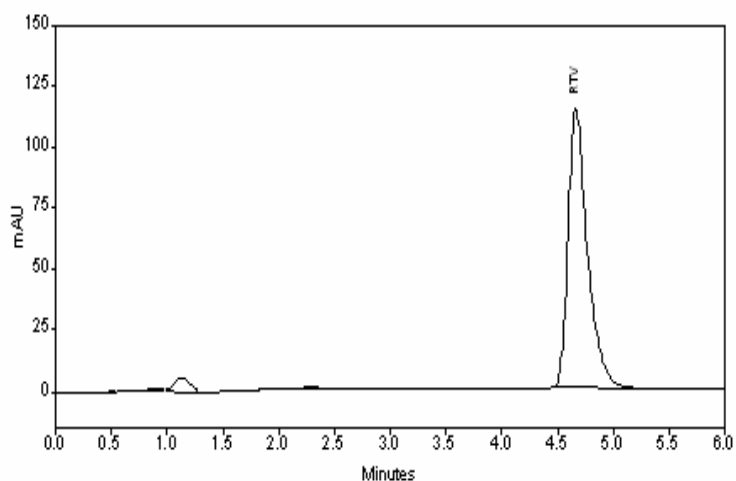
Nas Tabelas 5.1 e 5.2 encontram-se os valores médios dos parâmetros obtidos após 5 injeções da solução SQR (50 µg/ml) e da solução amostra (50 µg/ml) a partir das condições cromatográficas selecionadas. As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam um dos picos cromatográficos obtidos com a solução de ritonavir SQR e a solução amostra, respectivamente.



**Figura 5.1** — Cromatogramas da solução de ritonavir SQR (50 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); fluxo de 1,5 ml/min.; λ= 210 nm.

**Tabela 5.1** – Parâmetros cromatográficos relativos ao cromatograma da Figura 5.1.

Parâmetro	Valor observado	Valor recomendado (ICH, 1996)
Tempo de retenção	4,7	—
Fator de capacidade	3,12	> 2
Assimetria	1,62	≤ 2
Números de pratos teóricos	4255	> 2000

**Figura 5.2** – Cromatograma da solução das cápsulas Norvir® (50 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); fluxo de 1,5 ml/min.; λ = 210 nm.**Tabela 5.2** – Parâmetros cromatográficos relativos ao cromatograma da Figura 5.2.

Parâmetro	Valor observado
Tempo de retenção (min.)	4,7
Fator de capacidade	3,12
Assimetria	1,63
Números de pratos teóricos	4272

Os resultados demonstram que os valores encontrados para todos os parâmetros cromatográficos avaliados estão em conformidade com os valores preconizados pela ICH (1996).

### 5.1.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

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

Os testes de adequabilidade do sistema são essenciais para medir o desempenho do sistema cromatográfico. Os parâmetros determinados e seus limites recomendados são apresentados na Tabela 5.3 (FDA, 1994; ICH, 1996).

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

Parâmetro	FDA (1994)	ICH (1996)
Resolução (Rs)	$R_s > 2$	$R_s > 2$
Fator de capacidade (k')	$K' > 2$	$K' > 2$
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$	$TF < 2$
Números de pratos teóricos (N)	$N > 2000$	$N > 2000$
Repetibilidade (DPR)	$\leq 1\%$ ( $n \geq 5$ )	$\leq 1\%$ ( $n \geq 5$ )



Nas Tabela 5.1 e 5.2 encontram-se os resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico, utilizando soluções SQR e amostra. Os resultados experimentais obtidos, referentes a cinco injeções consecutivas de cada solução, demonstram que estes estão em conformidade com os valores preconizados.

A metodologia analítica por CLAE foi validada através da avaliação dos seguintes parâmetros: precisão, exatidão, especificidade, linearidade, robustez, limite de quantificação e limite de detecção.

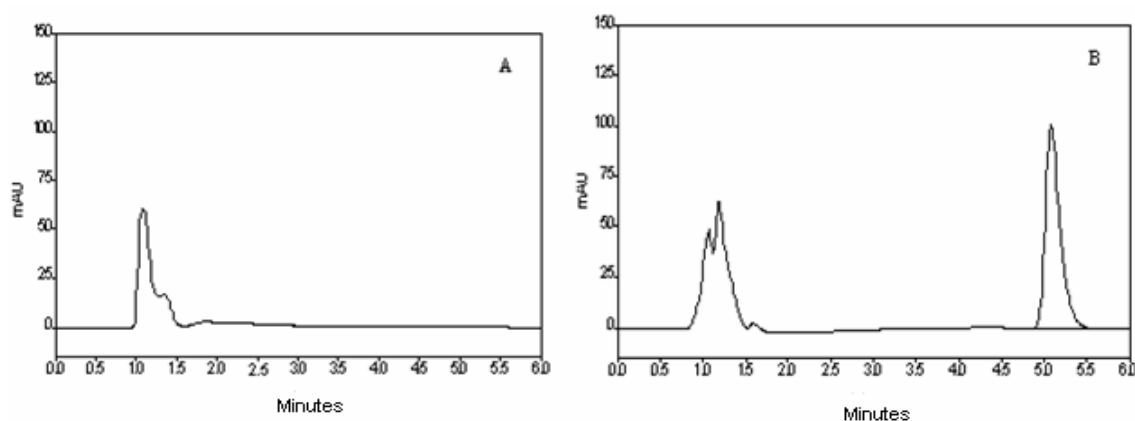
#### **5.1.1.2 Especificidade**

A especificidade de um método instrumental é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a(s) substância(s) em exame na presença de espécies como outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação (ICH, 1996).

Com o objetivo de investigar potenciais produtos de degradação, submeteu-se a SQR a condições de estresse conforme descrito em 4.2.2.2. Com auxílio de detector de arranjo de diodos (DAD) foi verificada a pureza do pico cromatográfico do fármaco. Os cromatogramas obtidos para cada condição testada são apresentados a seguir.

### a) Hidrólise Alcalina

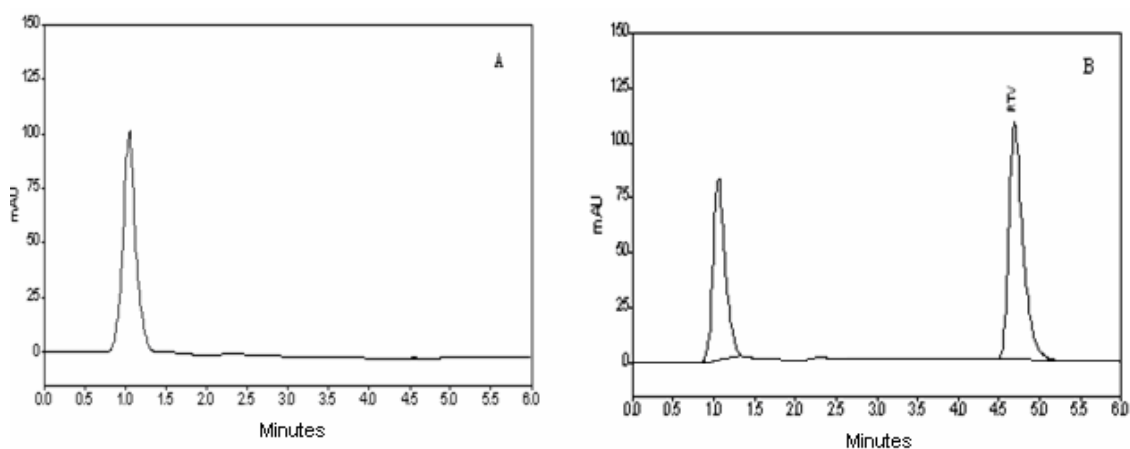
A Figura 5.3 apresenta os cromatogramas obtidos do branco e do ritonavir SQR submetido à hidrólise alcalina (NaOH 0,1 M) por 24 horas. O formato do pico em  $\pm 1$  minuto indica que pode haver ali algum produto de degradação, porém este não interfere na quantificação do ritonavir.



**Figura 5.3** — Especificidade: (A) cromatograma do branco; (B) cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à hidrólise alcalina por 24 horas. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7);  $\lambda$ = 210 nm.

### b) Hidrólise Ácida

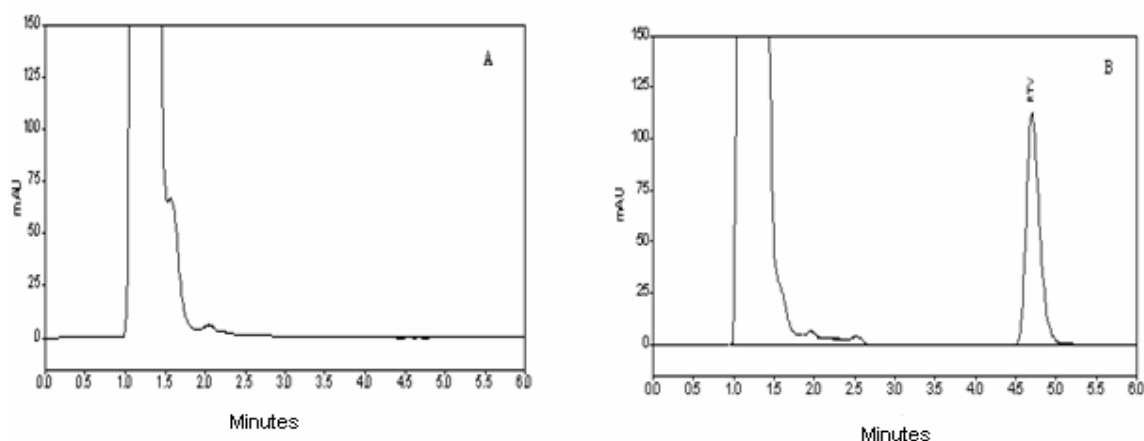
A Figura 5.4 apresenta os cromatogramas obtidos para o branco e o ritonavir SQR submetidos à hidrólise ácida (HCl 0,1 M) por 24 horas. Não foi observada a formação de nenhum produto de degradação, porém ocorreu uma diminuição de cerca de 6% do teor do fármaco. Apesar disso, a pureza do pico do fármaco foi de 1,0000.



**Figura 5.4** — Especificidade: (A) cromatograma do branco; (B) cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à hidrólise ácida por 24 horas. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); fluxo de 1,5 ml/min.; λ= 210 nm.

### c) Oxidação

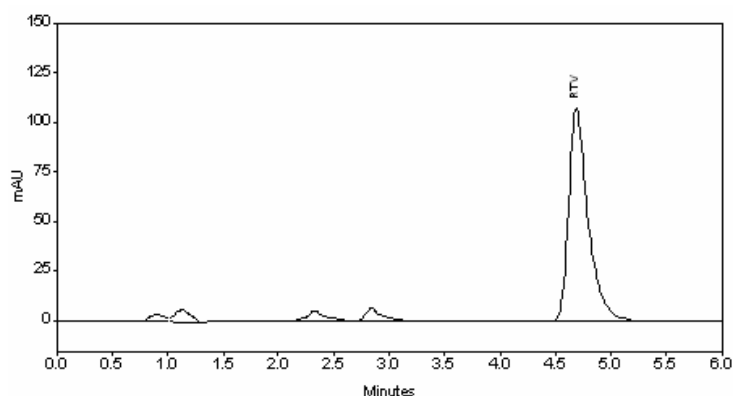
A figura 5.5 apresenta os cromatogramas obtidos para o branco e o ritonavir submetidos à oxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) por 24 horas. Observou-se o aparecimento de pelo menos um pico de degradação no tempo de retenção de 2,5 minutos. Ocorreu uma diminuição de cerca de 8% no teor do fármaco. A pureza do pico do ritonavir analisada foi de 0,9999.



**Figura 5.5** — Especificidade: (A) cromatograma do branco; (B) cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à oxidação por 24 horas. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); fluxo de 1,5 ml/min.; λ= 210 nm.

#### d) Temperatura

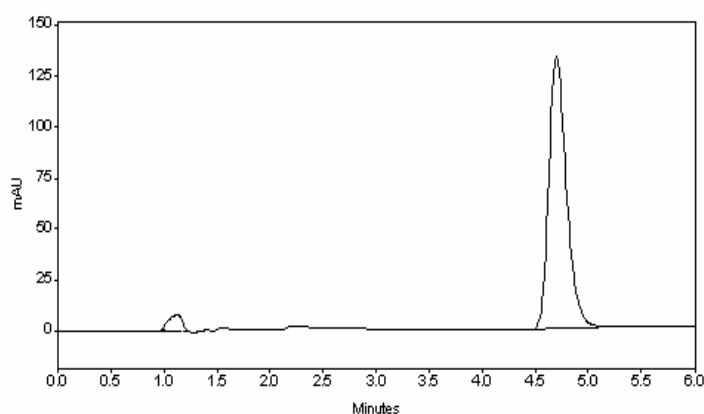
A figura 5.6 apresenta o cromatograma obtido do ritonavir submetido a 80 °C por 24 horas. Observou-se o aparecimento de picos de degradação nos tempos retenção de 0,9; 2,3; 2,8 minutos. Uma diminuição cerca de 10% do teor do fármaco foi observada.



**Figura 5.6** — Cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida a 80 °C por 24 horas. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); λ= 210 nm.

### e) Fotólise

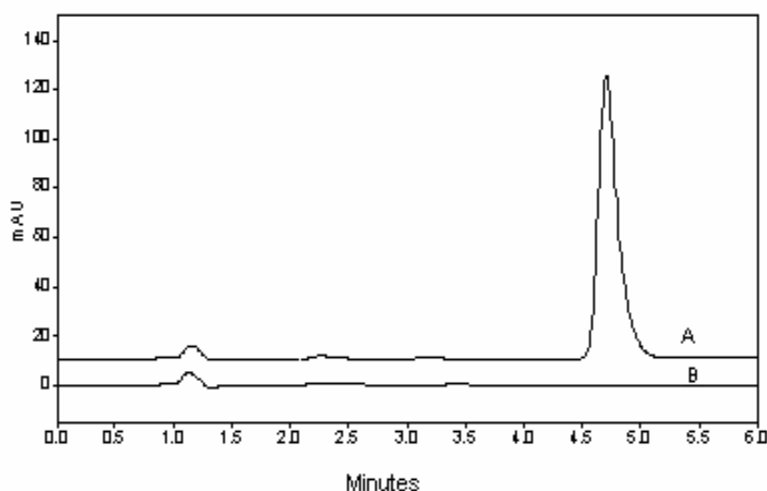
A figura 5.7 apresenta o cromatograma obtido do ritonavir submetido à fotólise por 24 horas. Não se observou a formação de nenhum produto de degradação ou diminuição do teor do fármaco nestas condições. A pureza do pico do fármaco foi de 1,0000.



**Figura 5.7** — Cromatograma da solução de ritonavir SQR submetida à fotólise. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); fluxo de 1,5 ml/min.; λ = 210 nm.

### e) Interferência dos excipientes

A interferência dos excipientes do conteúdo da cápsula do Norvir<sup>®</sup> também foi investigada. A figura 5.8 apresenta o cromatograma obtido da solução dos excipientes e da SQR. Como pode ser observado, nenhum componente dos excipientes interfere na determinação do ritonavir.



**Figura 5.8** — Especificidade: (A) cromatograma da solução de ritonavir SQR; (B) cromatograma dos excipientes. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); fluxo de 1,5 ml/min.; λ= 210 nm.

Os resultados obtidos pelo estudo de degradação sob condições de estresse demonstram que nenhum produto de degradação formado afeta o pico do ritonavir, o que foi confirmado pela análise da pureza do pico do composto através do detector de arranjo de diodos.

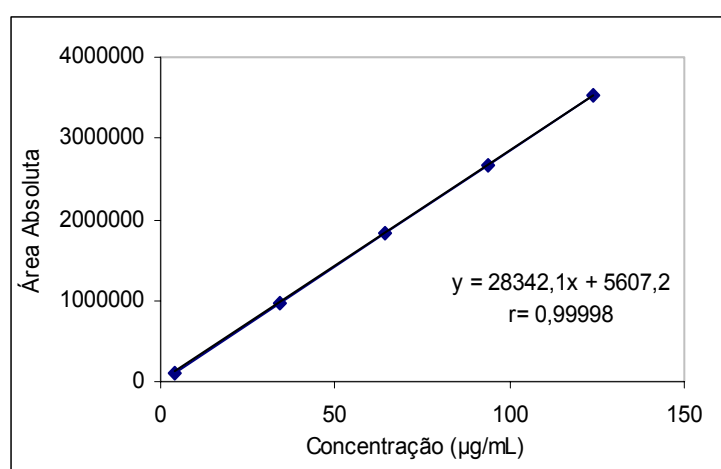
A análise dos resultados obtidos pelo estudo de degradação, juntamente com a avaliação da interferência dos excipientes da formulação demonstram que o método proposto é específico para a determinação do ritonavir.

### 5.1.1.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância. A

linearidade é avaliada através da construção de curvas padrão com, no mínimo, 5 níveis de concentração (ICH, 1996; USP 29, 2006).

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão da SQR contendo cinco níveis de concentração, realizada em dias diferentes. Na Figura 5.9 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de correlação.



**Figura 5.9** — Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir SQR obtida por CLAE.

As Tabelas 1, 2 e 3 do anexo 1 apresentam as áreas médias absolutas e os DPR de cada concentração, obtidas na elaboração das curvas padrão do ritonavir em três diferentes dias.

A linearidade da curva padrão foi avaliada através a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.4.

Os resultados demonstram que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação de 0,99998, indicam que o método é linear na faixa de concentração de 4 a 124 µg/ml de ritonavir.

**Tabela 5.4** – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do ritonavir.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre	4	21688986884241	5422246721060	80686,1*	3,48
Regressão linear	1	21688435481387	21688435481387	322736,3*	4,96
Desvio de linearidade	3	551402854	183800951	2,74	3,71
Dentro	10	672017293	67201729		
Total	14	21689658901534			

\*Significativo para  $p < 0,05$ 

#### 5.1.1.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação representa a menor concentração da substância que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis (USP 29, 2006; ICH, 1994; FDA, 1994).

Tendo em vista que a faixa de concentração de trabalho está acima do limite de quantificação do ensaio, quando observada a relação sinal/ruído, os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir dos dados obtidos da equação da reta da curva padrão pelas Equações 1 e 2 descritas no item 4.2.2.4. Os resultados obtidos foram: LD= 0,17 µg/ml e LQ= 0,52 µg/ml.

#### 5.1.1.5 Precisão

A precisão de um método representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Usualmente, é expressa através do desvio padrão relativo (DPR) (ICH, 1994; USP 29, 2006).



A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas, sob as mesmas condições; a precisão intermediária expressa variações no laboratório: dias, analistas ou equipamentos diferentes, etc.; a reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos inter-laboratoriais (ICH, 1994; USP 29, 2006).

A precisão do método foi avaliada através dos DPR intradia (repetibilidade) e interdía (precisão intermediária) conforme descrito em 4.2.2.6. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5** — Valores experimentais obtidos no doseamento do ritonavir por CLAE, em três dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdía.

	n	1	2	3	4	5	6	Média	DPR (%)
<b>Teor (%)</b>	<b>Dia 1</b>	99,01	98,48	98,88	98,87	98,35	99,04	98,88	0,29
	<b>Dia 2</b>	99,49	99,89	98,56	99,55	98,24	98,12	99,03	0,76
	<b>Dia 3</b>	98,70	98,92	98,09	97,79	98,09	98,55	98,32	0,43
<b>Média dos três dias</b>								98,7%	
<b>DPR dos 3 dias (%)</b>								0,57	

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

### 5.1.1.6 Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É expressa em termos de percentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na amostra (ICH, 1996; USP 29, 2006).

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na amostra, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 4.2.2.5. Os valores experimentais obtidos são apresentados na Tabela 5.6.

**Tabela 5.6** – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o ritonavir.

	Concentração (µg/ml)		Recuperação (%)	Faixa (%)
	Adicionada	Recuperada*		
R1	15	14,8	98,7	98,7-101,5
R1	15	15,2	101,3	
R1	15	14,8	98,7	
R2	30	29,8	99,3	
R2	30	29,7	99,0	
R2	30	30,3	101,0	
R3	45	44,5	98,9	
R3	45	44,7	99,3	
R3	45	45,7	101,5	

\*cada valor representa a média de três injeções.

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

### 5.1.1.7 Robustez

A robustez de um método mede a capacidade deste de fornecer resultados confiáveis mesmo com pequenas variações nas condições analíticas (ICH, 1996).

Modificações na composição da fase móvel e variações no fluxo da fase móvel foram avaliadas. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

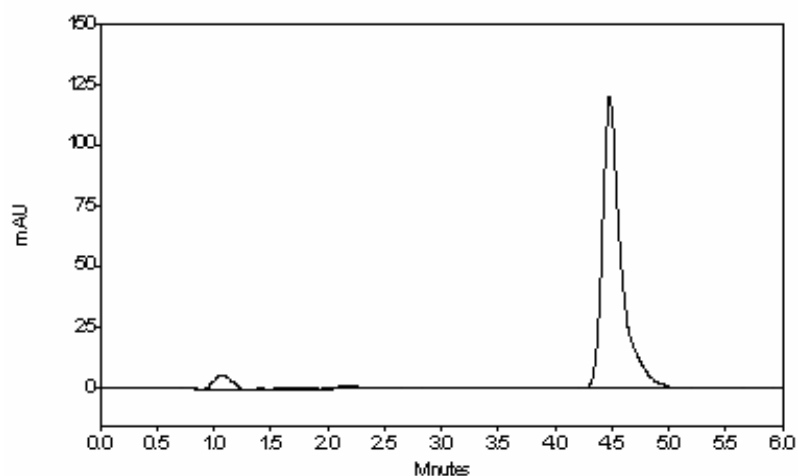
#### a) Variação do fluxo da fase móvel

Os parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da robustez em cada fluxo testado encontram-se na Tabela 5.7. Verificou-se que as mudanças realizadas não alteram significativamente os parâmetros cromatográficos do pico ritonavir e estes continuam em conformidade com aqueles preconizados pela ICH (1996).

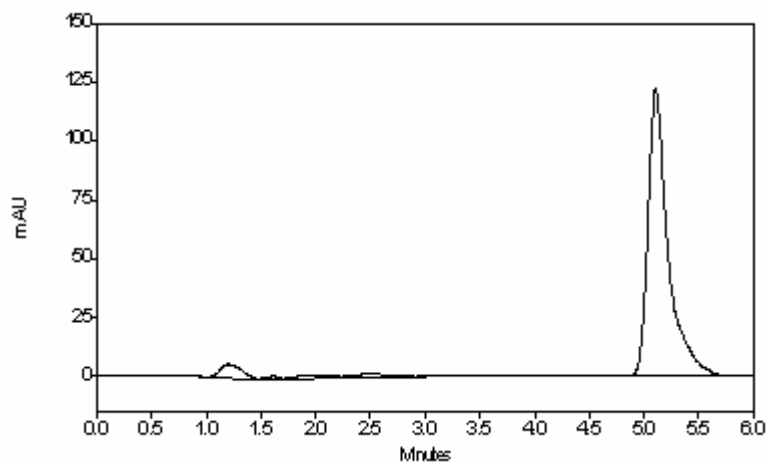
As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam os cromatogramas obtidos no teste de robustez variando o fluxo da fase móvel.

**Tabela 5.7** — Parâmetros cromatográficos relativos ao pico do ritonavir obtidos na avaliação da robustez do método — variação do fluxo da fase móvel.

Modificações	Tempo de retenção (min.)	Assimetria	Fator de capacidade	Nº pratos teóricos
Fluxo 1,4 ml/min	4,5	1,72	4,61	4523
Fluxo 1,6 ml/min	5,1	1,78	5,38	4745



**Figura 5.10** — Robustez: variação do fluxo da fase móvel: 1,6 ml/min. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7).



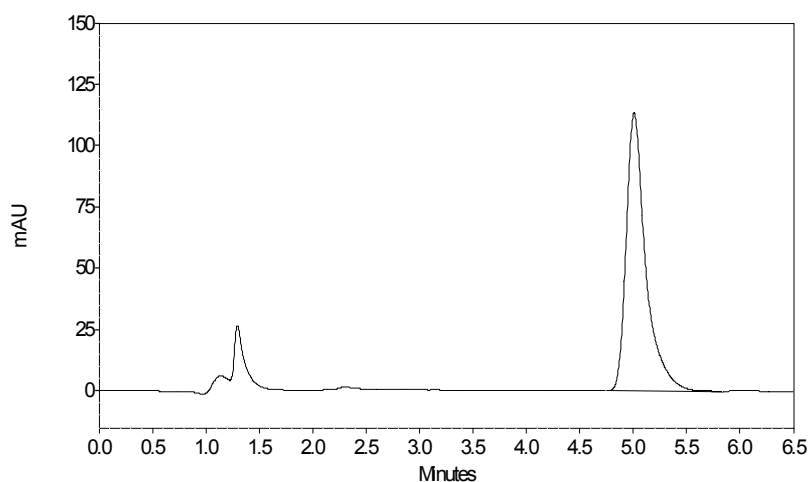
**Figura 5.11** — Robustez: variação do fluxo da fase móvel: 1,4 ml/min. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7).

### b) Modificação na fase móvel

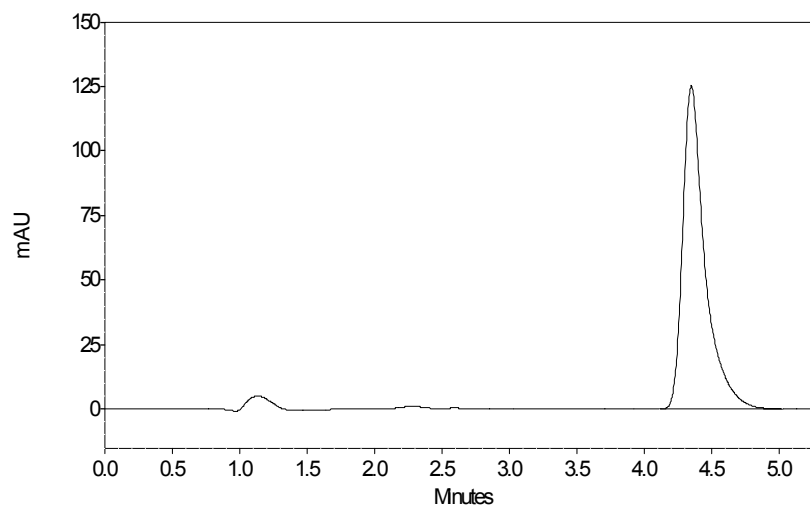
Os parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da robustez em cada fase móvel testada encontram-se na Tabela 5.8. Os resultados demonstram que alterações na fase móvel não acarretam mudanças significativas nos parâmetros cromatográficos do ritonavir.

**Tabela 5.8** – Parâmetros cromatográficos relativos ao pico do ritonavir obtidos na avaliação da robustez do método – modificação da fase móvel.

Modificações	Tempo de retenção (min.)	Assimetria	Área	Fator de capacidade	Nº pratos teóricos
acetonitrila:metanol:água (53:40:7) (original)	4,7	1,6	1434084	3,12	4257
acetonitrila:metanol:água (54:39:7)	4,3	1,7	1436588	2,78	4032
acetonitrila:metanol:água (52:41:7)	5,0	1,6	1436460	3,35	4327



**Figura 5.12** – Determinação da robustez: fase móvel acetonitrila:metanol:água (52:41:7).



**Figura 5.13** — Determinação da robustez: fase móvel acetonitrila:metanol:água (54:39:7).

## 5.2 ESTUDO *IN VIVO*

Os dados *in vivo* obtidos através do estudo de bioequivalência de uma nova formulação de cápsulas gelatinosas de ritonavir foram utilizados para o desenvolvimento do ensaio de dissolução para cápsulas de Norvir<sup>®</sup> através do estabelecimento de uma correlação entre os dados *in vivo* e *in vitro*. O mesmo lote da substância referência (Norvir<sup>®</sup> 100 mg, Laboratório Abbot Ltda., São Paulo) utilizado no estudo de bioequivalência foi também utilizado no desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução.

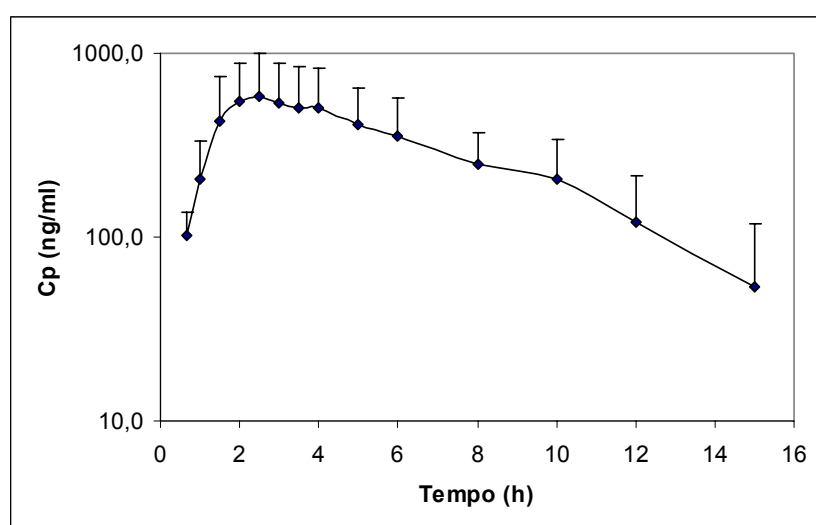
### 5.2.1 Metodologia analítica para amostras de plasma

O método foi validado de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), demonstrando ser linear na faixa de 20-5000 ng/ml, sendo o limite de detecção determinado de 50 ng/ml. Os RSD para os controles de qualidade (150, 1500 e

4000 ng/ml) foram todos abaixo de 6% e o limite de quantificação apresentou um RSD de 12%.

### 5.2.2 Dados do estudo *in vivo*

Na figura 5.14 está apresentada a curva média de concentração plasmática *versus* tempo obtida após a administração de uma dose oral de 100 mg de ritonavir (Norvir®) em 12 voluntários sadios. As amostras foram coletadas nos tempos: 0,33; 0,66; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 h.



**Figura 5.14** — Curva média de concentração plasmática (ng/ml) *versus* tempo (h) após a administração de cápsulas de ritonavir (Norvir®, 100 mg) (n= 12).

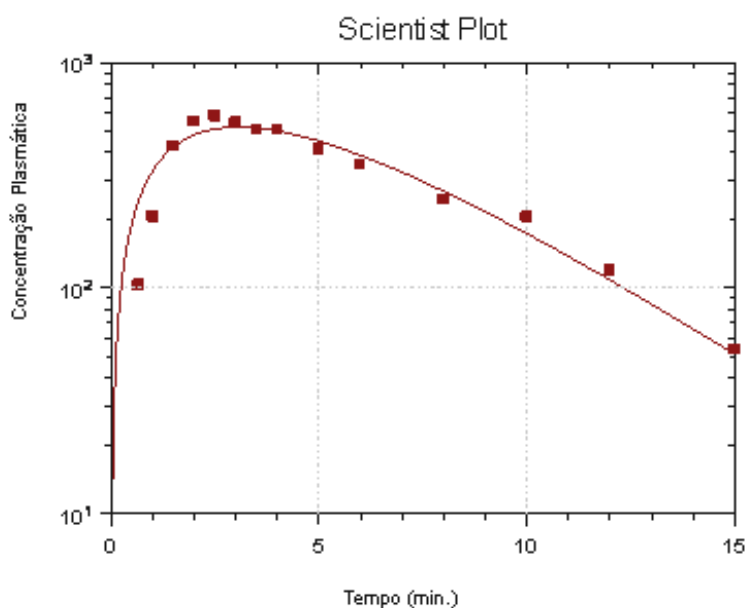
### 5.2.3 Modelagem matemática

O corpo pode ser representado como sistemas de compartimentos que se comunicam reversivelmente entre si. O compartimento não é uma região fisiológica ou anatômica, mas representa um tecido ou grupo de tecidos que

tem o mesmo fluxo sangüíneo e a mesma afinidade pelo fármaco. O fármaco é distribuído uniformemente dentro de cada compartimento. A distribuição é rápida e homogênea e, desta forma, a concentração medida representa a concentração média (SHARGEL, 2005).

O modelo compartimental para a análise dos dados foi escolhido de acordo com o melhor ajuste gráfico, utilizando o Critério de Seleção do Modelo (MSC), calculado pelo programa Scientist<sup>®</sup> (Micromath, v. 2.0). O modelo que apresentou melhor ajuste para os valores experimentais foi o modelo aberto de um compartimento, descrito pela equação 5 do item 4.3.3.

O perfil plasmático médio modelado pelo programa pode ser visualizado na Figura 5.15.

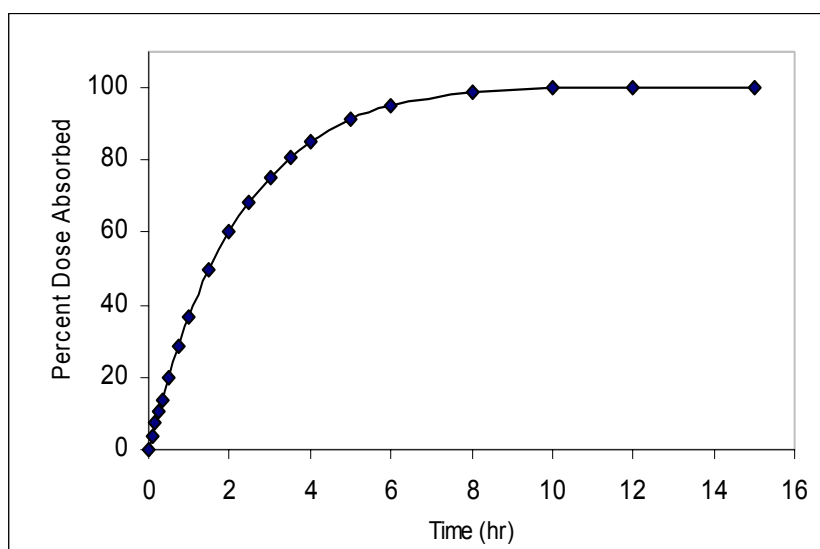


**Figura 5.15** — Perfil plasmático médio do ritonavir modelado para um compartimento aberto pelo programa Scientist<sup>®</sup>.



### 5.2.4 Fração da dose absorvida

Os dados de concentração plasmática *versus* tempo foram transformados em fração da dose absorvida (FA), utilizando o método de Wagner-Nelson, de acordo com a equação 6, descrita no item 4.3.3. Na Figura 5.16 pode ser visualizada a curva da fração absorvida *versus* tempo (h), obtida a partir da administração de uma dose 100 mg de ritonavir (Norvir<sup>®</sup>, 100 mg), empregando o método de Wagner-Nelson.



**Figura 5.16** — Fração absorvida versus tempo (h) de cápsulas de ritonavir (Norvir<sup>®</sup>, 100 mg) utilizando o método de Wagner-Nelson.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

O desenvolvimento de um método de dissolução significativo para compostos com solubilidade limitada em água tem sido desafiador (NOORY *et al.*, 2002). Devido à sua baixa dissolução inerente, fármacos pouco solúveis são excelentes candidatos para o desenvolvimento de correlações *in vitro-in*

*vivo*, se a dissolução do fármaco é o mecanismo controlador da liberação deste da forma farmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995).

### 5.3.1 Determinação da solubilidade do ritonavir em diferentes meios

Os dados de solubilidade foram utilizados como base para a seleção do meio de dissolução para o ritonavir SQR. A solubilidade do fármaco foi determinada em diferentes meios conforme descrito no item 4.4.2 e foi expressa através da percentagem dissolvida da dose. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9** – Percentagem dissolvida de ritonavir SQR em diferentes meios de dissolução.

Meio de Dissolução*	% dissolvida	
	1 hora	2 horas
HCl 0,1 M	74,2	92,9
HCl 0,01 M	6,20	14,8
Tampão fosfato (pH 6,0)	22,1	26,9
Tampão acetato (pH 4,0)	1,61	2,12
H <sub>2</sub> O + 0,5% LSS	84,3	99,7

\* volume de meio: 125 ml

De acordo com os resultados da Tabela 5.9, o ritonavir SQR apresentou alta solubilidade nos meios HCl 0,1 M e H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS. Desta forma, esses meios foram escolhidos para estudos preliminares de ensaio de dissolução, com a finalidade de selecionar as melhores condições para o teste de dissolução para as cápsulas de ritonavir.

Baseado nos resultados de seleção do meio de dissolução e considerando a solubilidade e a faixa de dosagem do fármaco, as condições *sink* foram satisfeitas. O termo condição *sink* é definido como sendo pelo

menos três vezes o volume do meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (BROWN *et al.*, 2004; ROHRS *et al.*, 2001; PHARM. FORUM, 2004). As condições *sink* devem ser mantidas a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES & BROWN, 2002).

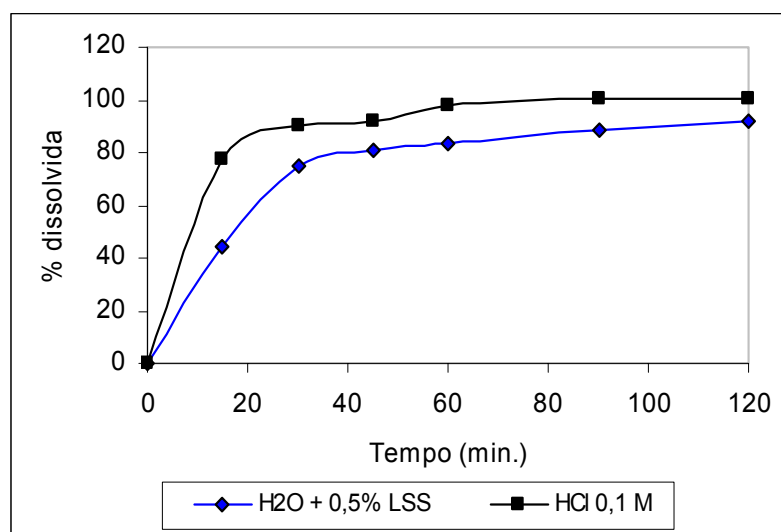
### 5.3.2 Desenvolvimento do teste de dissolução

A partir dos meios pré-selecionados no teste de solubilidade, cápsulas de Norvir<sup>®</sup> (n= 4) foram submetidas ao ensaio de dissolução. As condições utilizadas foram: equipamento USP 2 a 50 rpm e 900 ml meio de dissolução a 37 °C ± 0,5.

As amostras foram coletadas e analisadas em diversos tempos (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) a fim de gerar curvas do perfil de dissolução *versus* tempo para cada meio testado. Para assegurar que a forma farmacêutica liberará o fármaco completamente, o FDA geralmente requer, para fármacos de liberação imediata, que 75% a 80% da quantidade declarada seja dissolvida em 1 hora. Porém, este período pode ser ajustado de acordo com os dados de biodisponibilidade disponíveis (SHAH *et al.*, 1989).

Foi necessária a utilização de âncoras (*sinkers*) para auxiliar na centralização da forma farmacêutica sob a pá. O uso de âncoras pode ser necessário quando se utiliza o equipamento USP 2. No caso de comprimidos e cápsulas esses dispositivos são utilizados quando a forma farmacêutica flutua ou para auxiliar sua centralização sob a pá (PHARM. FORUM, 2004).

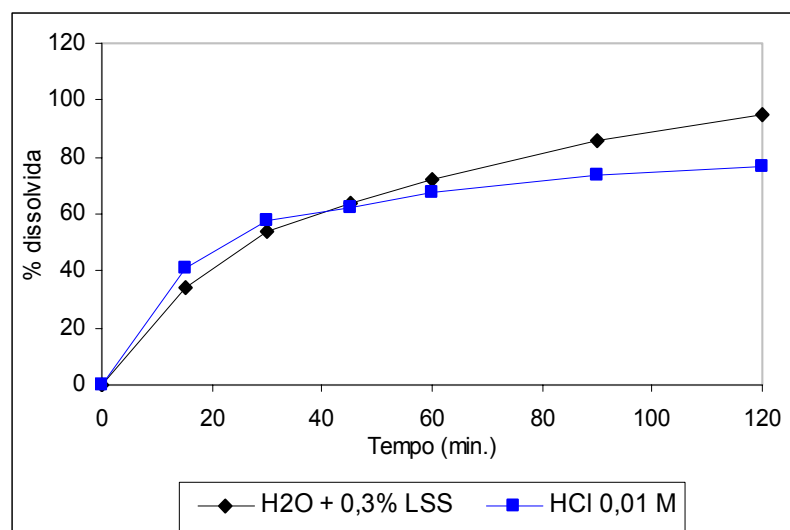
O perfil de dissolução obtido nos meios HCl 0,1 M e H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS é apresentado na Figura 5.17 a seguir.



**Figura 5.17** – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir® (n= 4) nos meios de dissolução H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS e HCl 0,1 M, utilizando equipamento USP 2 a 50 rpm.

Os perfis de dissolução obtidos em ambos os meios demonstram uma rápida velocidade de dissolução do ritonavir. Mais de 80% do fármaco é dissolvido em 15 minutos em HCl 0,1 M e em 45 minutos em H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS. Devido à rápida velocidade de dissolução *in vitro*, quando comparada com a velocidade de absorção *in vivo*, nenhuma correlação pôde ser estabelecida para os dois meios testados.

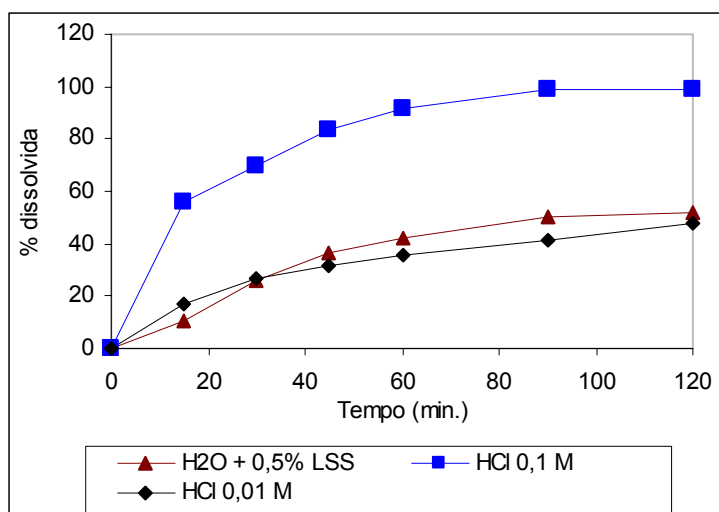
Na tentativa de retardar a velocidade de dissolução, testaram-se outros dois meios. A Figura 5.18 apresenta os perfis obtidos para os meios: HCl 0,01 M e H<sub>2</sub>O + 0,3% LSS a uma velocidade de agitação de 50 rpm.



**Figura 5.18** – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir® (n= 4) nos meios de dissolução H<sub>2</sub>O + 0,3% LSS e HCl 0,01 M, utilizando equipamento USP 2 a 50 rpm.

Os resultados apresentados na figura 5.18 demonstram uma diminuição na velocidade de dissolução em relação aos meios anteriormente testados, porém, quando comparado com a percentagem absorvida, principalmente nos primeiros minutos, a velocidade de dissolução *in vitro* do fármaco ainda é muito rápida.

Considerando a rápida velocidade de dissolução atingida em todos os meios testados a 50 rpm, principalmente nos primeiros minutos, uma nova velocidade de agitação (25 rpm) foi avaliada para os meios HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS. Os perfis obtidos são apresentados na Figura 5.19 a seguir.



**Figura 5.19** – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir<sup>®</sup> (n= 4) nos meios de dissolução H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS, HCl 0,1 M e HCl 0,01 M, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.

Os resultados demonstram que mesmo com a diminuição da velocidade de agitação para 25 rpm, a velocidade de dissolução no meio HCl 0,1 M continuou muito rápida. Porém, para os meios contendo H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS e HCl 0,01 M, a velocidade de dissolução foi mais lenta e uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) razoável pôde ser estabelecida com o meio H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS (r= 0,97).

A velocidade de agitação comumente utilizada quando se emprega o equipamento USP 2 é entre 50 e 75 rpm. Velocidade de rotação acima de 150 rpm (turbulência) ou abaixo de 25 rpm (inconsistência de hidrodinâmica) não é usualmente aceitável. Outras velocidades podem ser empregadas, se o perfil de dissolução refletir melhor o desempenho *in vivo* e/ou o poder discriminatório do método (PHARM. FORUM, 2004).

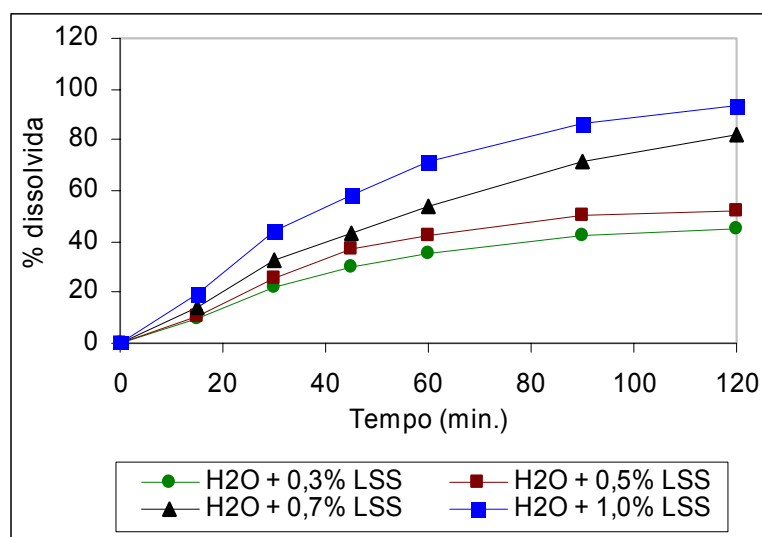
Nas figuras 1, 2, 3 do anexo 2 consta o perfil de dissolução obtido com outros meios que foram testados durante o desenvolvimento do ensaio de dissolução, sendo que nenhuma correlação significativa pôde ser estabelecida.

Uma vez selecionado o meio de dissolução, no qual pôde ser estabelecida uma correlação (H<sub>2</sub>O + 0,5% LSS), a concentração do surfactante foi ajustada a fim de maximizar a sensibilidade do método que está sendo desenvolvido e obter a melhor CIVIV (NOORY *et al.*, 2002).

A utilização de surfactantes no meio de dissolução para fármacos pouco solúveis em água é bem documentada. Surfactantes que ocorrem naturalmente (ácidos biliares, sais biliares e lecitina) auxiliam tanto na solubilização de fármacos pouco solúveis no organismo quanto no processo de absorção deste fármaco. O uso de surfactante no meio de dissolução é fisiologicamente relevante. Meio de dissolução contendo surfactante pode simular melhor as condições do trato gastrintestinal do que um meio contendo solventes orgânicos ou outra substância não fisiológica (NOORY *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 1989).

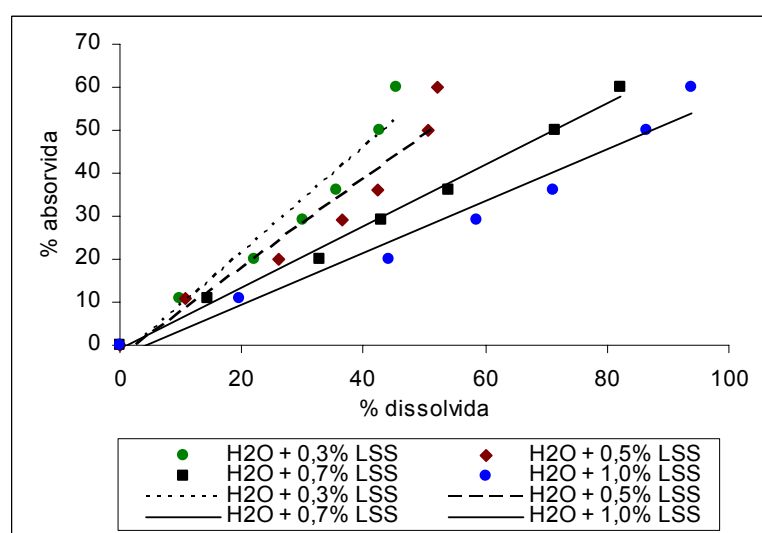
Dentre os surfactantes comuns utilizados, o lauril sulfato de sódio (LSS) é o tensoativo mais amplamente utilizado devido a sua excelente capacidade solubilizante, baixo custo e fácil utilização como um sólido (ZHAO *et al.*, 2004). A concentração do LSS comumente utilizada em meios de dissolução é de 0,1 a 3% (NOORY *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 1989).

A Figura 5.20 apresenta os perfis obtidos a partir de diferentes concentrações de LSS.



**Figura 5.20** – Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir® (n= 4) em diferentes concentrações de LSS, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.

O gráfico de CIVIV foi obtido plotando a porcentagem absorvida *versus* porcentagem dissolvida do fármaco e a melhor linha de ajuste é demonstrada para cada meio de dissolução. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 5.21.



**Figura 5.21** – Curva média da porcentagem da dose absorvida *versus* a porcentagem da dose dissolvida para as cápsulas de Norvir®. A melhor linha de ajuste é demonstrada para cada meio de dissolução.



Análise de regressão dos dados (Tabela 5.10) foi obtida a partir dos resultados apresentados na Figura 5.21.

**Tabela 5.10** – Análise de regressão<sup>a</sup> para a CIVIV.

Meio de dissolução	Inclinação (m)	Intercepto (b)	Coefficiente de correlação (r)
H <sub>2</sub> O + 0,3% LSS	1,22	-2,955	0,976
H <sub>2</sub> O + 0,5% LSS	1,03	-2,596	0,967
H <sub>2</sub> O + 0,7% LSS	0,72	-0,994	0,997
H <sub>2</sub> O + 1,0% LSS	0,60	-2,807	0,981

<sup>a</sup>  $y = mx + b$

Através da análise de regressão, uma correlação nível A pôde ser estabelecida entre a percentagem absorvida versus percentagem dissolvida da dose, para a formulação avaliada. A correlação de nível A é o nível de correlação mais alto que pode ser obtido. Representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* e a absorção *in vivo* (UPPOOR *et al.*, 2001).

O meio de dissolução que apresentou melhor CIVIV foi H<sub>2</sub>O + 0,7% LSS (r= 0,997), conforme pode ser observado na Tabela 5.10.

Desta forma, selecionaram-se as melhores condições para o ensaio de perfil de dissolução para as cápsulas de Norvir<sup>®</sup> (,Tabela 5.11).

**Tabela 5.11** – Condições selecionadas para o ensaio de perfil de dissolução de cápsulas de Norvir<sup>®</sup>.

Meio de dissolução	Velocidade de agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Volume de meio (ml)	Tempo (h)
H <sub>2</sub> O + 0,7% LSS	25	37 ± 0,5	900	2

### 5.3.3 Estabilidade do ritonavir nas condições de ensaio

Os resultados de estabilidade do ritonavir nas condições de ensaio são apresentados na Tabela 5.12. Conforme pode ser observado o ritonavir permaneceu estável durante o período de 24 horas, uma vez que os valores obtidos encontram-se entre 98% a 102% do valor inicial, conforme preconizado pelo PHARM. FORUM (2004) e o SECOND SUPPLEMENT TO USP 29, 2006.

**Tabela 5.12** – Estabilidade do ritonavir nas condições do ensaio de dissolução.

Tempo (h)	% recuperada*
0	100,32
10	99,81
24	99,63

\* n= 3

## 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

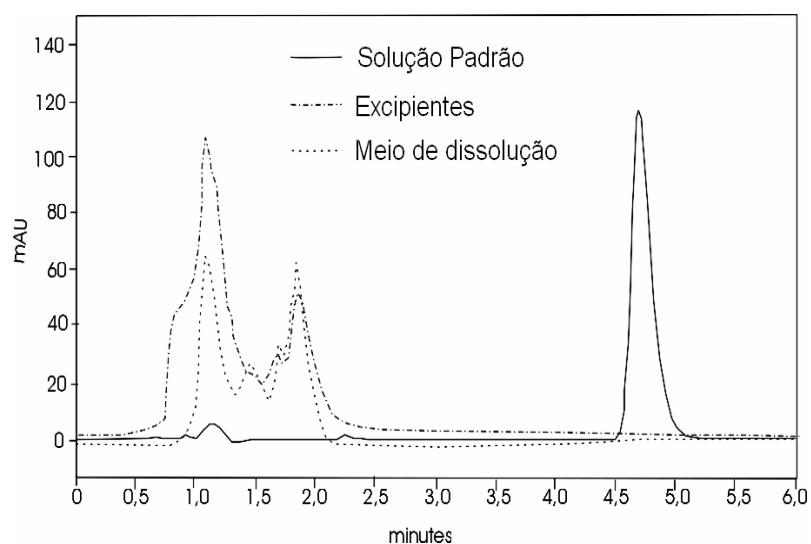
Conforme o capítulo geral da ICH (Text on Validation of Analytical Procedures, 1994), o ensaio de dissolução pertence à categoria III — teste de desempenho. Os parâmetros exigidos para a validação deste tipo de ensaio são: precisão, exatidão, especificidade e linearidade.

Desta forma, o método de dissolução foi validado utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria ultravioleta derivada.

## 5.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

### 5.4.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da análise de interferência dos excipientes, conforme descrito no item 4.5.1.1. A Figura 5.22 apresenta os cromatogramas obtidos para a solução dos excipientes, solução padrão (50 µg/ml) e meio de dissolução (branco). Os resultados demonstram que nenhum excipiente interfere no pico do ritonavir.



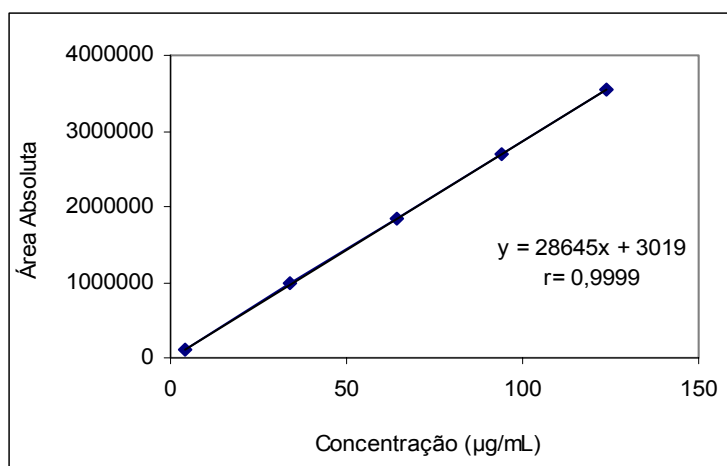
**Figura 5.22** — Especificidade: solução de ritonavir SQR, solução dos excipientes e meio de dissolução. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); diluente: meio de dissolução; fluxo de 1,5 ml/min; λ= 210 nm.

### 5.4.1.2 Linearidade

A linearidade é geralmente estabelecida preparando cinco soluções padrão do fármaco com concentrações variando de ± 20% abaixo da concentração mais baixa esperada até ± 20% acima da concentração mais alta

que pode ocorrer durante a liberação da dose (PHARM. FORUM, 2004; ICH, 1994).

Três curvas padrão da SQR foram construídas contendo cinco níveis de concentração (4, 34, 64, 94 e 124 µg/ml), realizadas em dias diferentes. Na Figura 5.23 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de correlação.



**Figura 5.23** — Representação gráfica da curva padrão média do ritonavir obtida por CLAE. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm); pré-coluna Phenomenex; fase móvel: acetonitrila, água e metanol (53:40:7); diluente: água + 0,7% de LSS; fluxo de 1,5 ml/min.; λ= 210 nm.

As Tabelas 1, 2 e 3 do anexo 3 apresentam as áreas médias absolutas e os DPR de cada concentração, obtida na elaboração das curvas padrão do ritonavir em três diferentes dias.

A linearidade da curva padrão foi avaliada através da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.13.

**Tabela 5.13** – Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do ritonavir.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre	4	22155310320667	5538827580167	39121*	3,48
Regressão linear	1	22155278752632	22155278752632	156483*	4,96
Desvio de linearidade	3	31568035	10522678	0,07	3,71
Resíduo	10	1415827633	141582763		
Total	14	22156726148300			

\*Significativo para  $p < 0,05$ 

A análise de variância dos resultados demonstra que a curva padrão média obtida para o ritonavir apresenta regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação de 0,9999, demonstram que o método é linear na faixa de concentração de 4 a 124  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 5.4.1.3 Exatidão

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

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na solução dos excipientes, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 4.5.1.3.

Os valores experimentais obtidos são apresentados na tabela 5.14. Os resultados apresentados demonstram que o método proposto é exato.

**Tabela 5.14** – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para o ritonavir.

Amostra	Recuperação (%)		
	8 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	102,5	99,8	98,1
2	101,8	102,0	98,4
3	100,8	102,9	98,3
4	102,9	99,2	98,7
5	100,1	100,7	98,6
6	101,8	101,3	99,2
Média	101,6	101,0	98,5
% DPR	1,03	1,36	0,39

#### 5.4.1.4 Precisão

A repetibilidade do método foi avaliada através de duas replicatas de soluções da SQR (8,0 µg/ml, 50,0 µg/ml e 102,0 µg/ml) e a precisão intermediária foi determinada em dois dias diferentes. Os resultados da precisão do método podem ser visualizados na Tabela 5.15.

**Tabela 5.15** – Valores experimentais obtidos no doseamento do ritonavir por CLAE, em dois dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.

	Concentração µg/ml	DPR (%) intradia	DPR (%) interdia
Dia 1	8,0	0,84	1,03
Dia 2	8,0	1,39	
Dia 1	50,0	1,57	1,36
Dia 2	50,0	1,08	
Dia 1	102,0	0,16	0,39
Dia 2	102,0	0,33	

n = 3 para cada concentração em cada dia.

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

#### 5.4.2 Espectrofotometria Ultravioleta Derivada (UV-D)

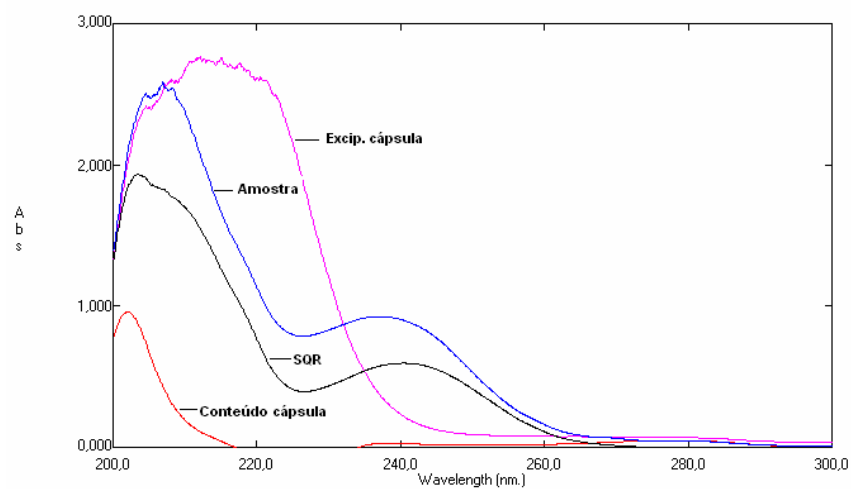
O emprego do método espectrofotométrico de derivadas no doseamento de fármacos, tanto para a análise simultânea de dois princípios ativos em uma forma farmacêutica, quanto para eliminação de interferência de excipientes e de produtos de degradação, vem aumentando, uma vez que este método tem demonstrado ser preciso, sensível, seletivo, reprodutivo, simples e de baixo custo (PASCHOAL *et al.*, 2003).

##### 5.4.2.1 Especificidade

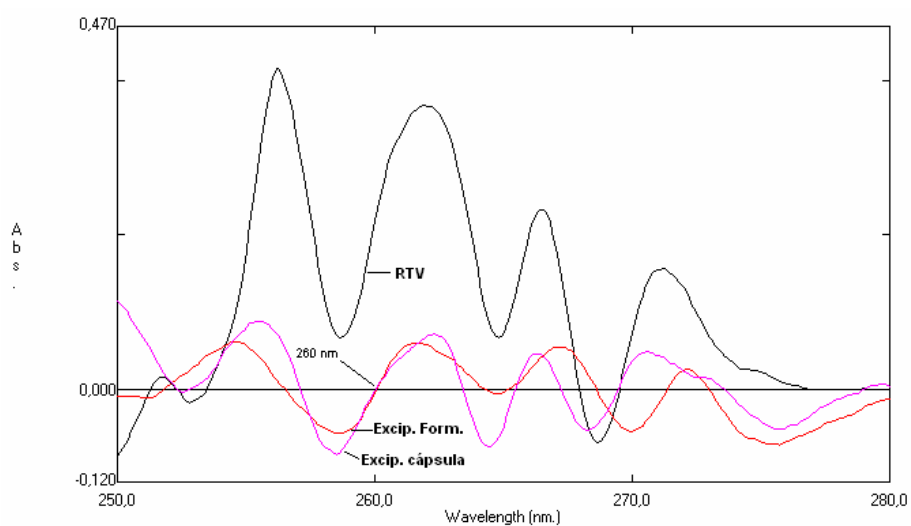
A especificidade do método foi avaliada fazendo-se uma varredura de 300 a 200 nm para as soluções amostra (50 µg/ml), SQR (50 µg/ml), excipientes do conteúdo da cápsula e excipientes da cápsula, uma vez que o ritonavir apresenta picos máximos de absorção em 210 e 240 nm. Conforme pode ser observado na Figura 5.24, os excipientes da formulação causam interferência na determinação do ritonavir por espectrofotometria de ordem zero.

Na tentativa de eliminar a interferência dos excipientes da formulação, derivou-se o espectro de ordem zero até a obtenção de um ponto onde os excipientes se anulam. Na Figura 5.25 pode ser observado um ponto de anulação dos excipientes enquanto há absorção do ritonavir (260 nm) obtido pela derivada de segunda ordem (UV-D<sup>2</sup>). Os valores de absorvâncias obtidos na leitura das soluções em 260 nm podem ser visualizados na Tabela 5.16.

Selecionou-se também o delta lambda ( $\Delta\lambda = 4$ ) com a melhor relação sinal/ruído e o fator de escala (100) em que se registrará a derivada.



**Figura 5.24** – Espectro de absorção de ordem zero das soluções amostra, SQR, excipientes do conteúdo da cápsula e excipientes da cápsula.



**Figura 5.25** – Espectro de absorção de derivada de segunda ordem do ritonavir.



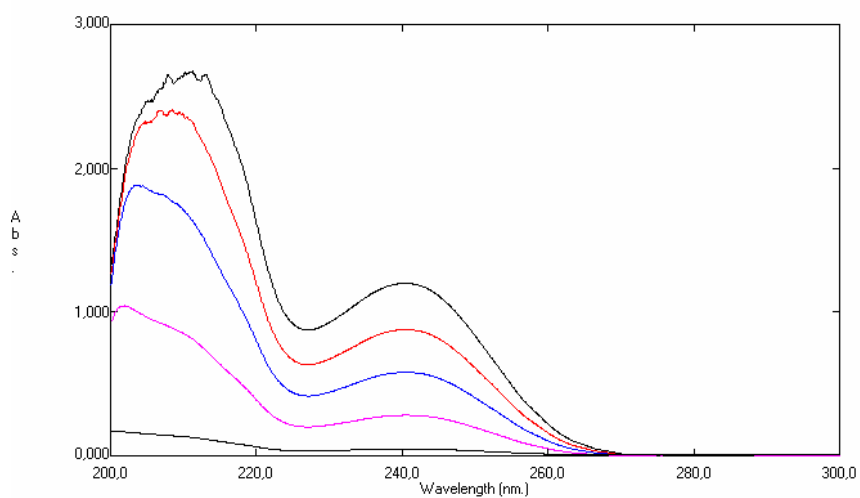
**Tabela 5.16** – Valores de absorvância obtidos por espectrofotometria de segunda derivada.

	ABSORVÂNCIA ( $\lambda= 260\text{nm}$ )
SQR (50 $\mu\text{g/ml}$ )	0,2173
Amostra (50 $\mu\text{g/ml}$ )	0,2093
Excipientes da cápsula	-0,0043
Excipientes do conteúdo da cápsula	-0,0013

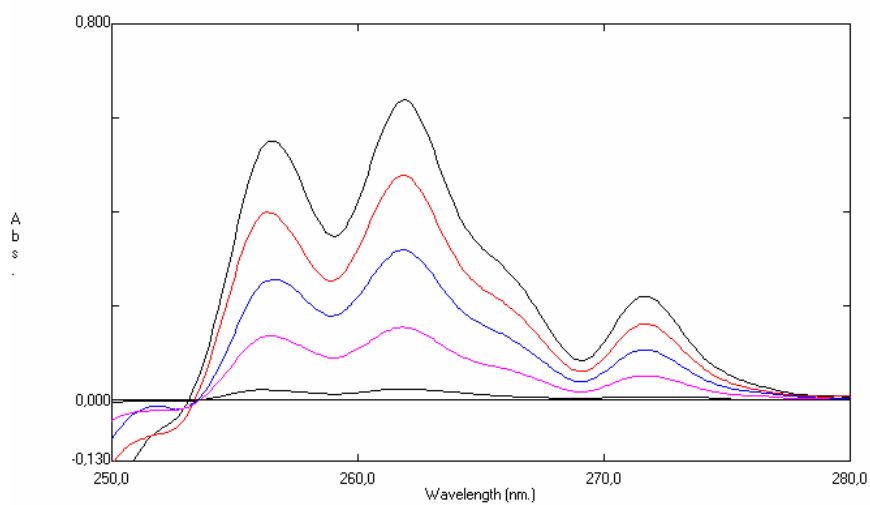
#### 5.4.2.2 Linearidade

A partir da técnica de anulação (zero crossing), isto é, lendo-se as amplitudes de absorção de um componente no comprimento de onda de anulação do outro, construiu-se três curvas padrão do ritonavir SQR contendo cinco níveis de concentração (5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Nas Figuras 5.26 e 5.27 estão apresentados os espectros de absorção de ordem zero e segunda ordem do ritonavir para soluções de 5, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g/ml}$  em  $\text{H}_2\text{O} + 0,7\%$  LSS, respectivamente.

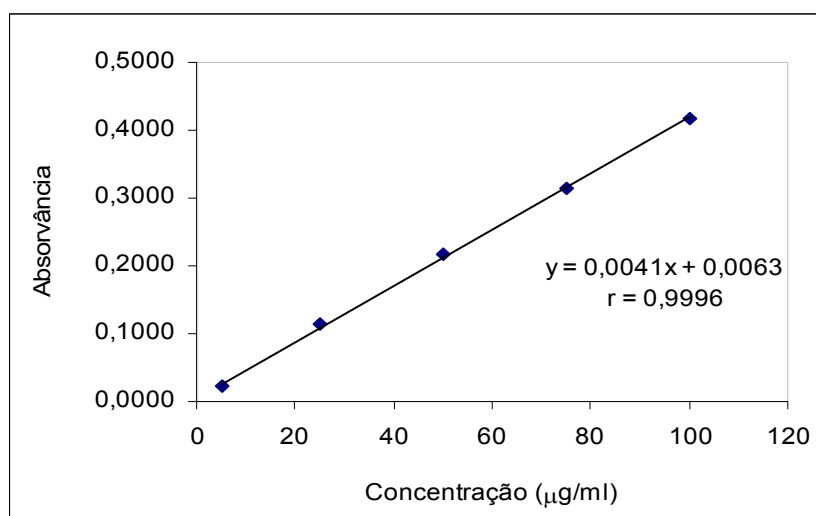
Na Figura 5.28 está apresentada a curva padrão média obtida, sua respectiva reta de regressão linear e coeficiente de correlação.



**Figura 5.26** — Espectro de absorção de ordem zero do ritonavir para soluções de 5, 25, 50, 75, 100 µg/ml em H<sub>2</sub>O + 0,7% LSS.



**Figura 5.27** — Espectro de absorção de segunda derivada do ritonavir para soluções de 5, 25, 50, 75, 100 µg/ml em H<sub>2</sub>O + 0,7% LSS.



**Figura 5.28** — Representação gráfica da curva padrão do ritonavir obtida por UV-D<sup>2</sup>. Condições espectrofotométricas:  $\lambda = 260$  nm,  $\Delta\lambda = 4$  nm e fator de escala 100.

A linearidade da curva padrão foi avaliada através a análise de variância (ANOVA) demonstrada na Tabela 5.17.

**Tabela 5.17** — Análise de variância (ANOVA) da curva padrão do ritonavir.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre	4	0,2946	0,0736	473,52*	3,48
Regressão linear	1	0,2944	0,2944	1892,76*	4,96
Desvio de linearidade	3	0,0002	0,0001	0,44	3,71
Resíduo	10	0,0016	0,00002		
Total	14	0,29407			

\*Significativo para  $p < 0,05$

Os resultados demonstram que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação de 0,9996, indicam que o método é linear na faixa de concentração de 5 a 100 µg/ml de ritonavir.

### 5.4.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas da SQR na solução dos excipientes, em três diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 4.5.1.3. A percentagem de recuperação deve estar compreendida entre 95% e 105% das quantidades adicionadas (PHARM. FORUM, 2004; SECOND SUPPLEMENT TO USP 29, 2006).

Os valores experimentais obtidos são apresentados na tabela 5.18. Os resultados apresentados demonstram que o método proposto é exato.

**Tabela 5.18** —Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método por UV-D<sup>2</sup> para o ritonavir.

Amostra	Recuperação (%)		
	8 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1	99,4	102,0	96,7
2	96,6	97,6	99,7
3	95,1	103,7	99,5
4	102,6	100,9	96,2
5	96,1	103,6	101,5
6	99,2	104,7	101,0
Média	98,2	102,1	99,1
% DPR	2,8	2,5	2,2

#### 5.4.2.4 Precisão

A repetibilidade do método foi avaliada através de duas replicatas de soluções da SQR (8,0 µg/ml, 50,0 µg/ml e 100,0 µg/ml) e a precisão intermediária foi determinada em dois dias diferentes. Os resultados da precisão do método podem ser visualizados na Tabela 5.19. Os resultados obtidos demonstram que o método por espectrofotometria de segunda derivada é preciso.

**Tabela 5.19** – Valores experimentais obtidos no doseamento do ritonavir por UV-D<sup>2</sup>, em dois dias diferentes, para a avaliação da precisão intra e interdia.

	Concentração µg/ml	DPR (%) intradia	DPR (%) interdia
Dia 1	8,0	2,29	2,8
Dia 2	8,0	3,29	
Dia 1	50,0	3,11	2,5
Dia 2	50,0	1,83	
Dia 1	100,0	1,71	2,2
Dia 2	100,0	2,92	

n = 3 para cada concentração em cada dia.

#### 5.4.3 Análise comparativa dos métodos

Os teores médios obtidos no doseamento do ritonavir através dos métodos propostos são apresentados na tabela 5.20.

**Tabela 5.20** – Resultados obtidos na determinação do ritonavir em cápsulas por UV-D<sup>2</sup> e CLAE.

	UV-D <sup>2</sup> (n= 18)	CLAE (n= 18)
Teor médio (%)	99,78	100,39
DPR	2,94	1,67

A avaliação estatística, através do Teste t de *Student*, das determinações do ritonavir cápsulas através dos métodos desenvolvidos para UV-D<sup>2</sup> e CLAE está demonstrada na Tabela 5.21.

**Tabela 5.21** – Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	Variável 1	Variável 2
Média	100,3944444	99,78333
Variância	2,800555556	8,583824
Observações	18	18
Variância agrupada	5,692189542	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	0,768425482	
P(T<=t) bi-caudal	0,447539237	
t crítico bi-caudal	2,032244498	

O resultado do Teste t de *Student* demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos desenvolvidos. Deste modo, os métodos UV-D<sup>2</sup> e CLAE podem ser considerados equivalentes na determinação quantitativa do ritonavir.

## 5.5 COMPARAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO

A comparação de perfis de dissolução é útil nos casos em que se deseja conhecer o comportamento de dois produtos antes de submetê-los a ensaios de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, selecionar formulações durante o desenvolvimento farmacotécnico, avaliar a estabilidade da formulação, evitar a

exigência de estudos de bioequivalência das formas farmacêuticas de liberação imediata nas formulações de menor dosagem e em casos de alterações pós-registro (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

A comparação de perfis de dissolução entre o produto teste e referência realizada antes da condução do estudo de bioequivalência atua como um indicativo do comportamento semelhante dos produtos, mas não garante que os produtos sejam bioequivalentes (BRASIL, 2004).

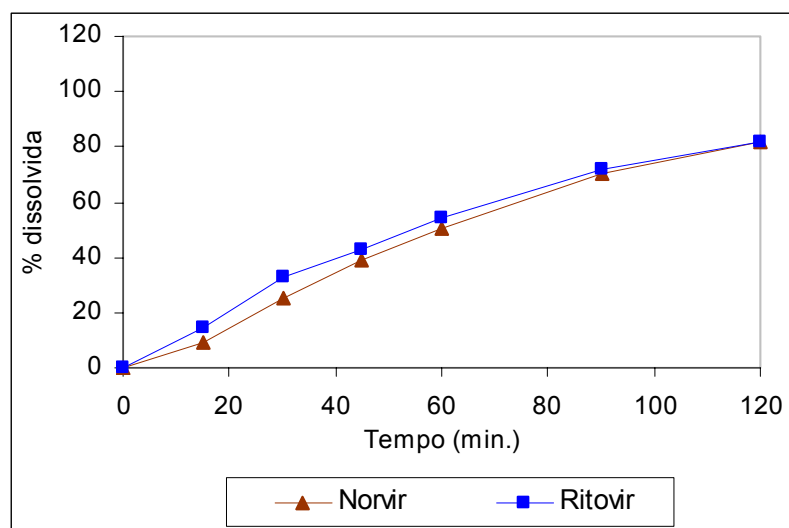
Para a avaliação dos perfis de dissolução é comumente utilizado o método modelo independente empregando fator de similaridade e fator de diferença.

#### **5.5.1 Método modelo independente empregando fator de diferença ( $f_1$ ) e fator de similaridade ( $f_2$ )**

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

O fator  $f_1$  calcula a porcentagem de diferença entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta e corresponde a uma medida do erro relativo entre os perfis. O fator  $f_2$  corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

Os perfis de dissolução obtidos a partir de 12 cápsulas do medicamento referência (Norvir<sup>®</sup>) e do medicamento similar (Ritovir<sup>®</sup>) são apresentados na Figura 5.29. O coeficiente de variação do primeiro ponto (15 minutos) não excedeu 20% e dos demais pontos foram menores que 10%, conforme preconizado pelo guia do FDA (1997a).



**Figura 5.29** — Comparação dos perfis de dissolução: Norvir<sup>®</sup> (n= 12) e Ritovir<sup>®</sup> (n= 12). Condições do ensaio de dissolução: meio de dissolução H<sub>2</sub>O + 0,7% LSS a 37 °C ± 0, 5, equipamento USP 2 a 50 rpm.

Para a comparação dos perfis de dissolução através do fator de diferença ( $f_1$ ) e do fator de semelhança ( $f_2$ ) utilizou-se as equações descritas em 4.6.1. Os valores encontrados foram:  $f_1= 7,82$  e  $f_2= 67,65$ .

Os resultados obtidos demonstram que os dois perfis de dissolução são considerados semelhantes. Entretanto, o fato de obter a semelhança entre os perfis de dissolução (*in vitro*) não garante que os produtos sejam bioequivalentes (BRASIL, 2004).



## **6. CONCLUSÕES**

---



## 6. CONCLUSÕES

- O método de doseamento do ritonavir por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou ser específico, linear, preciso, exato, robusto. Apresentou um tempo de análise relativamente curto e viável para a aplicação em rotina, na quantificação do ritonavir em amostras de ensaio de dissolução.
- Uma correlação nível A pôde ser estabelecida entre a percentagem absorvida *versus* percentagem dissolvida ( $r= 0,997$ ) para a formulação avaliada, empregando equipamento de pás a 25 rpm, água + 0,7% LSS (900 ml) a  $37\text{ °C} \pm 0,5$  e com o uso de âncoras.
- As condições selecionadas para o ensaio de dissolução para ritonavir cápsulas (Norvir<sup>®</sup>) baseada em uma CIVIV podem ser utilizadas como um método de controle de qualidade do desempenho do produto.
- O ritonavir demonstrou ser estável por 24 horas nas condições do ensaio de dissolução.
- A validação do ensaio de dissolução por CLAE mostrou-se adequado, pois cumpriu as exigências de especificidade, linearidade, precisão e exatidão.
- A validação do ensaio de dissolução por UV-D<sup>2</sup> demonstrou ser específico, linear, preciso e exato. A metodologia proposta por UV-D<sup>2</sup> configura-se em uma alternativa extremamente vantajosa e viável para a solução de problemas espectrais de sobreposição de mais de um componente.

- A análise comparativa dos métodos de doseamento por CLAE e UV-D<sup>2</sup> demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos desenvolvidos sendo, portanto, considerados equivalentes para a determinação quantitativa do ritonavir.
- A comparação dos perfis de dissolução entre o medicamento referência e o medicamento similar, empregando o fator de diferença ( $f_1$ ) e o fator de semelhança ( $f_2$ ), demonstrou haver semelhança entre os mesmos.

## **7. REFERÊNCIAS**

---



## 7. REFERÊNCIAS

ABBOTT. Norvir® (ritonavir) capsules and oral solution, 2003. Disponível em: <http://www.norvir.com/pdf/norpi2a.PDF>. Acessado em: 25/05/2004.

AMATO, V. N.; MEDEIROS, E. A. S.; KALLAS, E. G.; LEVI, G. C.; BALDY, J. L. S.; MEDEIROS, R. S. S. **AIDS na prática médica**. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 1-6.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p. 413-420, 1995.

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

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

BANAKAR, U.K. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. New York: Marcel Dekker Inc., 1992. p. 144-166.

BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W. Ritonavir: An extraordinary example of conformation polymorphism. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 859-866, 2001.

BRASIL Lei nº 9.279, de 14 maio, 1996. Regulamenta os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da União**, 15 maio, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482 - Guia para estudos de correlação in vitro-in vivo (CIVIV). **Diário oficial da união**, Brasília, 19 de março de 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 483 - Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). **Diário oficial da união**, Brasília, 19 de março de 2002b.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 310 - Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário oficial da união**, Brasília, 1º de setembro de 2004.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Workshop: "Equivalência Farmacêutica com Ênfase em Dissolução/ 17 a 18 de março de 2004. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/divulga/eventos/equiva\\_farma.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/eventos/equiva_farma.pdf). Acessado em: março de 2006.

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

BUDAVARI, S. **The Merck Index**. 13<sup>th</sup> ed. New York, 2001. p. 1479.

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

DIAS, C. L.; ROSSI, R.C.; DONATO, E. M.; BERGOLD, A. M.; FRÖEHLICH, P. E. LC Determination of Ritonavir, a HIV Protease Inhibitor, in Soft Gelatin Capsules. **Chromatography**, v.62, n.11/12, p.589-593, 2005.

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

FIRST SUPPLEMENT TO USP 29 — U.S. Pharmacopeia and National Formulary, Rockville: Unites States, 2006.

FDA Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.

FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville, 1997a.

FDA Guidance for industry. Extended release oral dosage forms: Development, evaluation and application of In vitro/In vivo correlations. Rockville, 1997b.



FRANÇA, F. F. A. C. **Andrejus Korolkovas: Dicionário Terapêutico Guanabara** 2003/2004. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 18.49-18.50.

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

FRAPPIER, S.; BREILH, D.; DIARTE, E.; DUCINT, D.; PELLEGRIN, J. L.; SAUX M. C. Simultaneous determination of ritonavir and saquinavir, two human immunodeficiency virus protease inhibitors, in human serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 714, p. 384-389, 1998.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10<sup>th</sup>. New York: McGraw-Hill interamericana, 2001. p. 1349-1380.

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

HACKMANN, E. R. M.; BENETON, S. A.; SANTORO, M. I. R. M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**. v. XLI, p. 7-13, 1991.

HOETELMANS, R. M. W.; ESSENBERG, M.; PROFIJT, M.; MULDER, J.W.; MEENHORST, P. L. High-performance chromatographic determination of ritonavir in human plasma, cerebrospinal fluid and saliva. **Journal of Chromatography B**, v. 705, p. 119-126, 1998.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Text on Validation of Analytical Procedures, Q2A. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1999.

JUSTESEN, U.S.; PEDERSEN, C.; KLITGAARD, N.A. Simultaneous quantitative determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and the nelfinavir active metabolite M8 in plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 491-500, 2003.

KAMBA, M.; SETA, Y.; TAKEDA, N.; HAMAURA, T.; KUSAI, A.; NAKANE, H.; NISHIMURA, K. Measurement of agitation force in dissolution test and mechanical destructive force in disintegration test. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 99-109, 2003.

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

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

LAW, D.; KRILL, S. L.; SCHIMITT, E. A.; FORT, J. J.; QIU, Y.; WANG, W.; PORTER, W. R. Physicochemical Considerations in the Preparation of Amorphous Ritonavir – Poly (ethylene glycol) 8000 Solid Dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 8, p.1015-1025, 2001.

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

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

MARSH, K. C.; EIDEN, E.; McDONALD, E. Determination of ritonavir, a new HIV protease inhibitor, in biological samples using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 307-313, 1997.

MORISSETTE, S. L.; SOUKASENE, S.; LEVINSON, D.; CIMA, M. J.; ALMARSSON, O. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2180-2184, 2003.

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

OMS: Organização Mundial de Saúde. *Informe sobre la salud en el mundo*, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/download/es> Acessado em: dezembro de 2005.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 105-113, 2003.

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

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

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

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

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

REZK, N. L.; TIDWELL, R. R.; KASHUBA, A. D. M. High-performance liquid chromatography assay for the quantification of HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 805, p. 241-247, 2004.

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

SECOND SUPPLEMENT TO USP 29.— U.S. Pharmacopeia and National Formulary, Rockville: Unites States, 2006.

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

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

SIMON, V. A.; THIAM, M. D.; LIPFORD, L. C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-suppressing drugs by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 447-453, 2001.

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

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, p. 366-372, 2003.

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

UNAIDS/WHO - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Epidemiological fact sheets* on HIV/AIDS and sexually transmitted infections: Brazil, 2004. Disponível em <http://www.who.org>. Acessado em 4 agosto, 2004.

UPPOOR, V.R.S. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p. 127-132, 2001.

USP 29: The United States Pharmacopoeia. 29 ed. Rockville: Unites States Phamacopeial Convention, 2006.

WASHINGTON, C. B.; FLEXNER, C.; SHEINER, L. B.; ROSENKRANZ, S. L.; SEGAL, Y. Effect of simultaneous versus staggered dosing on pharmacokinetic interactions of protease inhibitors. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 73, p. 406-416, 2003.

WILLIAMS, G. C.; SINKO, P. J. Oral Absorption of HIV inhibitors: a current update. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 39, p. 211-238, 1999.

WHO, Ritonavir — Final text for inclusion in The International Pharmacopoeia. Site: [www.who.int/medicines/areas/quality-safety/safety-efficacy/IntPh-Ritonavir.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality-safety/safety-efficacy/IntPh-Ritonavir.pdf). Acessado em fevereiro de 2005.

ZHAO, F.; VYACHESLAV, M.; VENKATRAMANA, R.; HUSSAIN, M. Effect of Sodium Lauryl Sulfate in Dissolution Media on Dissolution of Hard Gelatin Capsule Shells. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 144-148, 2004.









Tabela 1 – Áreas absolutas relativas à curva-padrão do ritonavir, obtidas durante a realização da linearidade do método de doseamento por CLAE (dia 1), no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm) e fase móvel composta de ACN, H<sub>2</sub>O e MeOH (53:40:7).

	Concentração de ritonavir (µg/mL)				
	4	34	64	94	124
Áreas absolutas	109700	980357	1819679	2658850	3521714
	109892	980117	1821502	2661611	3523101
	109810	980462	1822371	2660821	3522411
Média	109801	980312	1821184	2660427	3522409
DPR (%)	0,09	0,02	0,08	0,05	0,02

Tabela 2 – Áreas absolutas relativas à curva-padrão do ritonavir, obtidas durante a realização da linearidade do método de doseamento por CLAE (dia 2), no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm) e fase móvel composta de ACN, H<sub>2</sub>O e MeOH (53:40:7).

	Concentração de ritonavir (µg/mL)				
	4	34	64	94	124
Áreas absolutas	112263	983583	1824897	2674590	3528880
	111807	984015	1821907	2675025	3534490
	112051	983776	1825271	2673426	3535153
Média	112040	983791	1824025	2674347	3532841
DPR (%)	0,20	0,02	0,10	0,03	0,10

Tabela 3 – Áreas absolutas relativas à curva-padrão do ritonavir, obtidas durante a realização da linearidade do método de doseamento por CLAE (dia 3), no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm) e fase móvel composta de ACN, H<sub>2</sub>O e MeOH (53:40:7).

	Concentração de ritonavir (µg/mL)				
	4	34	64	94	124
Áreas absolutas	112688	970644	1823026	2657199	3500931
	112464	971502	1825691	2656146	3504086
	112609	971132	1826433	2662394	3507133
Média	112587	971093	1825050	2658580	3504050
DPR (%)	0,10	0,04	0,10	0,13	0,09

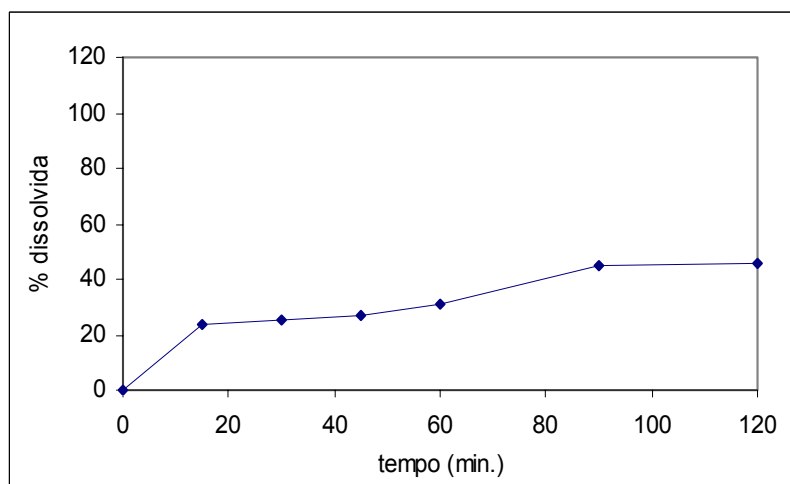


Figura 1 — Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir® (n= 4) no meio de dissolução HCl 0,01 M + 0,1% LSS, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.

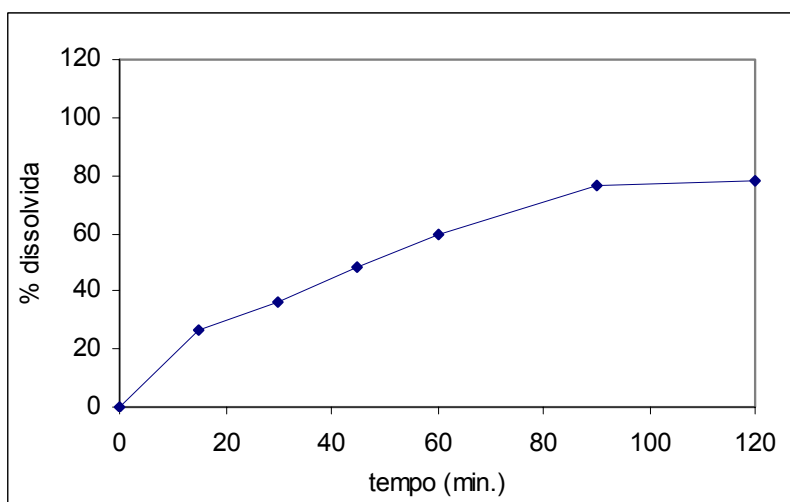


Figura 2 — Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir® (n= 4) no meio de dissolução HCl 0,01 M + 0,3% LSS, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.

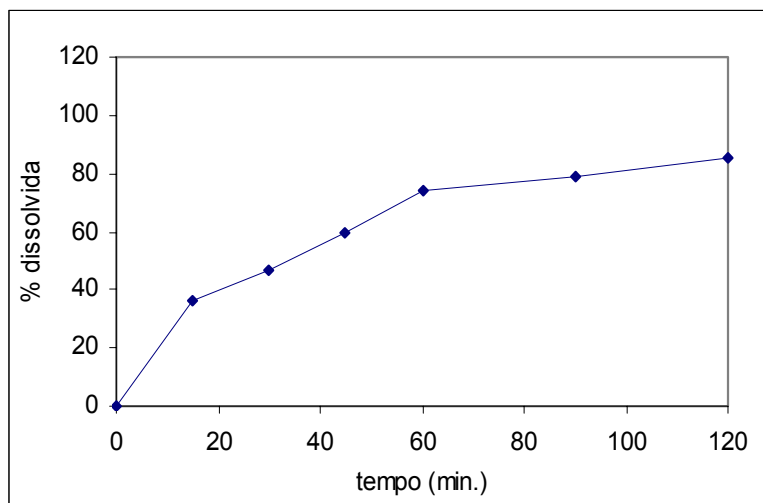


Figura 3 — Perfil de dissolução médio de cápsulas de Norvir® (n= 4) no meio de dissolução HCl 0,01 M + 0,5% LSS, utilizando equipamento USP 2 a 25 rpm.

Tabela 1 – Áreas absolutas relativas à curva-padrão do ritonavir, obtidas durante a realização da linearidade do método de dissolução por CLAE (dia 1), no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm), fase móvel composta de ACN, H<sub>2</sub>O e MeOH (53:40:7) e diluente H<sub>2</sub>O + 0,7% LSS.

	Concentração de ritonavir (µg/mL)				
	4	34	64	94	124
Áreas absolutas	116092	972017	1818083	2678371	3547882
	115385	972531	1821856	2678015	3537136
	115149	968102	1820895	2675750	3542113
Média	115542	970883	1820278	2677379	3542377
DPR (%)	0,42	0,25	0,11	0,05	0,15

Tabela 2 – Áreas absolutas relativas à curva-padrão do ritonavir, obtidas durante a realização da linearidade do método de dissolução por CLAE (dia 2), no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4.6 mm), fase móvel composta de ACN, H<sub>2</sub>O e MeOH (53:40:7) e diluente H<sub>2</sub>O + 0,7% de LSS.

	Concentração de ritonavir (µg/mL)				
	4	34	64	94	124
Áreas absolutas	118427	985095	1831764	2701532	3560532
	118788	981433	1830275	2704492	3560161
	118717	978870	1835904	2706181	3559780
Média	118644	981799	1832648	2704068	3560158
DPR (%)	0,16	0,32	0,16	0,09	0,01

Tabela 3 – Áreas absolutas relativas à curva-padrão do ritonavir, obtidas durante a realização da linearidade do método de dissolução por CLAE (dia 3), no comprimento de onda de 210 nm, utilizando coluna Phenomenex C<sub>18</sub> (5 µm, 150 X 4,6 mm), fase móvel composta de ACN, H<sub>2</sub>O e MeOH (53:40:7) e diluente H<sub>2</sub>O + 0,7% de LSS.

	Concentração de ritonavir (µg/mL)				
	4	34	64	94	124
Áreas absolutas	114812	981594	1850577	2709272	3552616
	114413	990191	1859680	2706639	3571303
	114180	985123	1846103	2707566	3559460
Média	114468	985636	1852120	2707826	3561126
DPR (%)	0,28	0,44	0,37	0,05	0,27