UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Desenvolvimento e validação de um método indicativo de
estabilidade para o antiviral aciclovir

Bruna Thaise Rodrigues Rhein

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2013

Bruna Thaise Rodrigues Rhein

Desenvolvimento e validação de um método indicativo de
estabilidade para o antiviral aciclovir

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“Depois de algum tempo, você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto... plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Romeu e Marli,
De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Mas, além
dela, vocês ainda me deram amor, carinho, conforto e cultivaram em
mim, ainda criança, todos os valores que me transformou em adulto
responsável e consciente. Também abriram as portas para o meu futuro,
muitas vezes sacrificando os seus sonhos em favor dos meus. Vocês não
são apenas pais, são amigos e companheiros. Mesmo nas horas em que
nossos ideais pareciam distantes e inatingíveis e em que o estudo
parecia estar além dos nossos limites, vocês estavam presentes, à
disposição para me ouvir, orientar, encorajar e me fazer acreditar que
somos vencedores em potencial. Tantas vezes meu cansaço e minha
preocupação foram sentidos e compartilhados por vocês, num colo, num
afago ou mesmo num silêncio. Por isso existe em mim uma imensa
vontade de alcançar o tão sonhado objetivo e ver o sorriso de satisfação
e orgulho estampado em seus rostos. Apesar de parecer uma pequena
vitória pessoal, saibam que foi imprescindível contar com o apoio
incondicional de vocês. Divido e dividirei sempre, o mérito de todas as
minhas conquistas, porque todas elas lhes pertencem. Dentre todas as
palavras que imaginei dizer-lhes nesse momento, a mais sensata foi:
obrigada!

Dedico também ao meu filho amado Gabriel

Com você meu mundo é colorido, com você aprendi o sentido real da vida, pelo o que realmente lutar, batalhar, ceder e simplesmente abdicar. Com você aprendi que posso ser milhões, fazer inúmeras atividades, dormir poucas horas, estar cansada sempre, mas ver o seu sorriso, ver você saudável, brincando e pulando não há satisfação maior. Tudo isso compensa e me faz a cada minuto lutar, seguir em frente e alcançar as estrelas. Se hoje estou aqui, no final do mestrado, é graças a você; por você que continuei, superei meu cansaço extremo e noites mal dormidas para um dia você possa entender que não foi fácil, mas você tornou este caminho mais alegre e suave.

*“Eu tenho tanto pra lhe falar
Mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por você
E não há nada pra comparar
Para poder lhe explicar
Como é grande o meu amor por você
Nem mesmo o céu, nem as estrelas
Nem mesmo o mar e o infinito
Não é maior que o meu amor, nem mais bonito
Nunca se esqueça nem um segundo
Que eu tenho o amor maior do mundo
Como é grande o meu amor por você”
Roberto Carlos*

Dedico ao meu marido Dennis

*Que estive ao meu lado durante esses anos, me fortalecendo,
me acalmando, para que eu pudesse chegar aqui. Obrigada pela
paciência, quando estive ausente, quando não fui companheira, amiga e
esposa. Obrigada por me auxiliar a encontrar respostas para minhas
dúvidas e também por sempre ter uma palavra de incentivo para que
eu não desanimasse.*

*“Nenhum obstáculo será tão grande se sua vitória de vencer
for maior.”*

Desconhecido

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador **Ernani Pinto** por me receber em seu laboratório para que eu pudesse aprender e crescer. Agradeço à confiança, apoio, amizade, oportunidades e principalmente pela paciência e compreensão com minhas dificuldades e limitações. Obrigada por tudo!!!!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À professora Hérica Salgado e a técnica Fátima Rodrigues, pela disponibilização de seu laboratório na FCF – UNESP, para a realização de alguns experimentos, e principalmente, pela nova amizade criada.

À professora Quézia Cass (DQ – UFSCAR) por permitir que eu usasse o HPLC do seu laboratório para finalização dos testes de degradação.

Aos secretários, Jorge, Sueli, Dora, Ana, Elaine, Samantha e Edna pela ajuda em todos os momentos de dúvida.

Aos colegas do Departamento de Toxicologia: aos professores e funcionários. Principalmente aos companheiros de laboratório: Felipe, Fabiane, Fabyana, Simone, Gustavo, Kazumi, Luana, Stella, Joseane, Ronaldo, Miriam, Bárbara, Jéssica, Giselle e as meninas Natália, Arianne e Mariah por todo o apoio durante a execução do projeto, por estarem sempre dispostas a me auxiliar e por todos os momentos que ouviram minhas aflições.

A toda a minha família (irmãos, avó, tia, primos) pelas orações, amizades e por simplesmente emitirem uma energia positiva. Por estarem sempre dispostos a me ajudar com meu filho e por entenderem a minha distância algumas vezes.

Sumário

<i>AGRADECIMENTOS</i>	VII
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	XIII
<i>LISTA DE TABELA</i>	XIII
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	XIII
<i>RESUMO</i>	XVIII
<i>ABSTRACT</i>	XX
1 - INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 - INTRODUÇÃO	XX2
1.2 JUSTIFICATIVA	4
1.3 – OBJETIVOS	6
1.3.1 - OBJETIVOS GERAIS:.....	6
1.3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO ACICLOVIR E GUANINA	7
2.1 – ACICLOVIR	8
2.1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E QUÍMICAS.....	8
2.1.2 - FARMACODINÂMICA DO ACICLOVIR	10
2.1.3- TOXICIDADE DO ACICLOVIR	11
2.1.4 - METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ACICLOVIR	12
2.2 - GUANINA	14
2.3 - HILIC - HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY	15
2.4 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	18
3 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DO ACICLOVIR E GUANINA	22
3.1 - VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	23
3.1.1 – ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE.....	25
3.1.2 - LINEARIDADE	26
3.1.3 - PRECISÃO.....	27
3.1.4 - LIMITE DE DETECÇÃO.....	28
3.1.5 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	28
3.1.6 - EXATIDÃO	28
3.1.7 - ROBUSTEZ.....	29
3.2 - EXPERIMENTAL	30
3.2.1 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ACICLOVIR EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	31
3.2.1.1 PREPARO DE AMOSTRA PARA A ANÁLISE DO ACICLOVIR.....	31
3.2.2 - OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ACICLOVIR.....	32
3.2.2.1 – ANÁLISE DO ACICLOVIR (SQR) UTILIZANDO COLUNA CIANO PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS.....	32
3.2.2.2 – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA UTILIZANDO COLUNA HILIC	33
3.2.3 – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DO ACICLOVIR.....	34

3.2.3.1 – SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE	34
5.2.3 - LINEARIDADE	34
3.2.3.3 - PRECISÃO.....	36
3.2.3.3.1- PRECISÃO INTRA-CORRIDA.....	36
3.2.3.2 - PRECISÃO INTER-CORRIDA.....	36
3.2.3.4 - EXATIDÃO	36
3.2.3.5 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	38
3.2.3.6 - ROBUSTEZ.....	38
3.2.4 – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE GUANINA	39
3.2.4.1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES E AMOSTRAS DE GUANINA.	39
3.2.4.2 – SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE	39
3.2.4.3 - LINEARIDADE	40
3.2.4.4 - PRECISÃO.....	40
3.2.4.4.1 - PRECISÃO INTRA-CORRIDA.....	40
3.2.4.4.2 - PRECISÃO INTER-CORRIDA.....	41
3.2.4.5 - EXATIDÃO	41
3.2.4.6 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	42
3.2.4.7 - ROBUSTEZ.....	42
3.2.4.8 – ANÁLISE DE TEOR DE GUANINA EM COMPRIMIDOS	42
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.3.1 – ANÁLISE DO ACICLOVIR EM COLUNA CIANO PARA DETECÇÃO DE IMPUREZAS.	43
3.3.2 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA UTILIZANDO A COLUNA HILIC.....	45
3.3.2.1 - ESCOLHA DA FASE MÓVEL.....	46
3.3.2.2 - PROPORÇÃO DA FASE ORGÂNICA.....	47
3.3.3.3 ESCOLHA DO PH	48
3.3.3 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ACICLOVIR EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	51
3.3.3.1 – SELETIVIDADE/ ESPECIFICIDADE	51
3.3.3.2 - LINEARIDADE	53
3.3.3.3 - PRECISÃO.....	55
3.3.3.4 - EXATIDÃO	56
3.3.3.5 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	57
3.3.3.6 - ROBUSTEZ.....	58
3.3.3.7 - RECUPERAÇÃO	59
3.3.4 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE GUANINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	60
3.3.4.1 – SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE	60
3.3.4.2 - LINEARIDADE	62
3.3.4.3 - PRECISÃO.....	64
3.3.4.4 - EXATIDÃO	64
3.3.4.5 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	65

3.3.4.6 - ROBUSTEZ.....	66
3.3.4.7 - RECUPERAÇÃO	68
3.3.4.8 - ANÁLISE DE TEOR DE GUANINA EM COMPRIMIDO	68
3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
4 - ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA O ANTÍ-VIRAL ACICLOVIR...	72
4.1 - INTRODUÇÃO	73
4.1.1 – PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	73
4.1.2 - ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA COMO FERRAMENTA PARA DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE.	73
4.1.3 - DEGRADAÇÃO FORÇADA EM AMBIENTES ÁCIDO/ BÁSICO	79
4.1.4 - DEGRADAÇÃO FORÇADA COM TEMPERATURA E TEMPERATURA/UMIDADE	80
4.1.5 - DEGRADAÇÃO FORÇADA OXIDATIVA	80
4.1.6 - DEGRADAÇÃO FORÇADA FOTOLÍTICA	81
4.1.7 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	82
4.2 EXPERIMENTAL.....	83
4.2.1 – DEGRADAÇÃO FORÇADA EM AMBIENTE ÁCIDO.....	84
4.2.2 – DEGRADAÇÃO FORÇADA EM AMBIENTE ALCALINO	85
4.2.3 – DEGRADAÇÃO FORÇADA EM AMBIENTE OXIDATIVO	85
4.2.4 – DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA.....	85
4.2.5 – DEGRADAÇÃO TÉRMICA	88
4.2.6 – DEGRADAÇÃO EM AMBIENTE ÚMIDO.....	89
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4.3.1 - MEIO ÁCIDO.....	89
4.3.1.1.DEGRAÇÃO ÁCIDA COM CONCENTRAÇÃO DE 0,5 MOL/L	90
4.3.1.2. DEGRADAÇÃO ÁCIDA COM CONCENTRAÇÃO DE 1,0 MOL/L.....	95
4.3.1.3 DEGRADAÇÃO EM AMBIENTES ALCALINOS.	99
4.3.1.4 DEGRADAÇÃO OXIDATIVA.....	100
4.3.1.5. DEGRADAÇÃO EM HIDRÓLISE NEUTRA	106
4.3.1.7 DEGRADAÇÃO TÉRMICA.....	114
4.3.1.8. DEGRADAÇÃO EM AMBIENTES ÚMIDOS	116
4.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
5 - CONCLUSÕES	

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila
ACV: aciclovir
ANOVA: análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAD: *Diode Array Detector*
DL50: dose letal para matar 50% da espécie
DNA: ácido desoxirribonucleico
DPR: desvio padrão relativo
FDA: *Food and Drug Administration*
GUA: guanina
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HCl: ácido clorídrico
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV: Papiloma Vírus Humano
HSV: *Herpes simplex virus*
ICH: *International Confederation Harmonization*
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
NaCl: cloreto de sódio
NaOH: hidróxido de sódio
PD: produto de degradação
pKa: dissociação ácido-base
SQR: substância química de referência
TR: tempo de retenção
UV: ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	24
Tabela 3.2. Características de Validação recomendadas dos vários tipos de testes.....	24
Tabela 3.3. Testes realizados em coluna HILIC com diferentes proporções de ACN e valor de pH.....	33
Tabela 3.4. Diferentes faixas lineares que deve ser abrangidas no estudo da validação de acordo com o ensaio escolhido.....	35
Tabela 3.5. Preparo das soluções diluídas de aciclovir para construção da curva analítica e estudo da linearidade do método analítico por HPLC.....	35
Tabela 3.6 - Relação dos excipientes e suas respectivas proporções, para preparo de formulação do pré-mix e avaliação da exatidão dos métodos cromatográfico.....	37
Tabela 3.7 - Soluções diluídas de guanina para construção da curva de calibração e estudo da linearidade do método analítico por HPLC.....	40
Tabela 3.8. Parâmetros cromatográficos da análise do aciclovir e guanina em coluna HILIC...50	50
Tabela 3.9. Concentrações da solução de aciclovir e respectivas áreas para obtenção das curvas analíticas do método por HPLC.....	54
Tabela 3.10. Valores obtidos da curva analítica para a análise do Aciclovir por HPLC.....	54
Tabela 3.11. Valores da concentração e % DPR do aciclovir na avaliação da precisão intra-dia.e inter-dia.....	56
Tabela 3.12. Exatidão do método de quantificação de ACV: porcentagens de recuperação em três níveis (75, 100 e 125% da concentração de trabalho) e desvio padrão relativo.....	56
Tabela 3.13. Valores de recuperação para ACV nas três concentrações avaliadas.....	60
Tabela 3.14. Concentrações da solução de guanina e respectivas áreas para obtenção das curvas analíticas do método por HPLC.....	62
Tabela 3.15. Resultados da curva de calibração obtidos para a análise de Guanina por HPLC.....	63
Tabela 3.16. Valores de concentração e DPR% obtidos na avaliação da precisão intra-corrida e inter-corrida.....	64
Tabela 3.17. Resultados da exatidão do método proposto para análise de GUA em comprimidos de ACV por HPLC.....	65
Tabela 3.18. Valores de recuperação para GUA nas três concentrações avaliadas.....	68
Tabela 3.19 Tabela com valores em área da quantidade de guanina presente na formulação farmacêutica.....	69
Tabela 4.1. Condições experimentais para a realização do estudo de degradação forçada.....	77
Tabela 4.2. Valores de limites (em %) obtido para que o produto de degradação seja notificado de acordo com a dose máxima diária do medicamento.....	77
Tabela 4.3. Valores de limites(em %) obtido para que o produto de degradação seja identificado de acordo com a dose máxima diária do medicamento.....	78
Tabela 4.4. Valores de limites (em %) obtido para que o produto de degradação seja qualificado de acordo com a dose máxima diária.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura química do aciclovir	8
Figura 2.2. Estrutura química da desoxiguanosina.....	8
Figura 2.3. Estrutura química da guanina.....	14
Figura 2.4. Esquema de formação do aciclovir a partir da guanina.....	15
Figura 3.1. (a) Cromatograma de análise do aciclovir em coluna Ciano, fase móvel tampão H_3PO_4 25mM / ACN (96 / 4) pH = 3,0. (b) Pureza do pico do ACV. (c) Espectro em ultravioleta do ACV. (d) Espectro em ultravioleta da GUA.....	44
Figura 3.2. Cromatograma de análise do aciclovir em coluna Ciano, fase móvel tampão H_3PO_4 25mM / ACN (96 / 4) pH = 1,8.....	45
Figura 3.3. Análise do aciclovir em coluna HILIC, fase móvel Formiato de Amônio 10mM / ACN (10 / 90) pH = 3,2; detecção de 245 nm.....	47
Figura 3.4. Espectro em UV do analito com tr = 5 minutos.....	47
Figura 3.5. Análise do aciclovir em coluna HILIC, fase móvel tampão Formiato de Amônio 10mM / ACN (7/93) pH = 3,2.....	48
Figura 3.6. Análise do aciclovir em coluna HILIC, fase móvel tampão Formiato de Amônio 10mM / ACN (7 / 93) pH = 5,6, detecção de 254 nm.....	49
Figura 3.7. (a) Análise do aciclovir (20 $\mu\text{g/mL}$) e guanina em coluna HILIC, fase móvel tampão Formiato de Amônio 100mM / ACN (7 / 93) pH = 7,4, detecção de 254 nm, (b) Espectro em UV do ACV. (c) Espectro do pico de pureza do ACV.....	50
Figura 3.8. Sobreposição dos cromatogramas ACV e pré-mix em água para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de Formiato de Amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL , 20 mg/mL.....	52
Figura 3.9. Sobreposição dos cromatogramas produto farmacêutico em água e pré-mix para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL	52
Figura 3.10. Espectro de UV do composto ACV na faixa de 180 – 800 nm.....	53
Figura 3.11. Espectro de UV do composto GUA na faixa de 180 – 500 nm.....	54
Figura 3.12. Curva analítica do composto aciclovir.....	54
Figura 3.13. Gráfico de resíduos da linearidade do ACV.....	55
Figura 3.14. Cromatograma para o estudo de Limite de Detecção para a molécula de ACV, Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL	57
Figura 3.15. Cromatograma para o estudo de Limite de Quantificação para a molécula de ACV, Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL	58
Figura 3.16. Sobreposição dos cromatogramas aciclovir padrão com o forno de colunas em temperatura 30°C e temperatura 35°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL	58
Figura 3.17. Sobreposição dos cromatogramas aciclovir padrão com o pH da solução igual a 7,36 e 6,35. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL	59
Figura 3.18. Sobreposição dos cromatogramas GUA e pré-mix em água para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de Formiato de Amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL , 20 mg/mL.....	61

Figura 3.19. Sobreposição dos cromatogramas produto farmacêutico em água e pré-mix para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....	61
Figura 3.20. Espectro de UV do composto GUA na faixa de 180 – 500 nm.....	62
Figura 3.21. Curva de calibração do composto guanina.....	63
Figura 3.22. Gráfico de Resíduos da análise de GUA.....	64
Figura 3.23. Cromatograma para o estudo de Limite de Quantificação para a molécula de GUA, Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....	66
Figura 3.24. Cromatograma para o estudo de Limite de Detecção para a molécula de GUA, fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....	66
Figura 3.25. Sobreposição dos cromatogramas guanina padrão com temperatura de 30 e 35°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), vazão de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....	67
Figura 3.26. Sobreposição dos cromatogramas guanina padrão com o pH da solução igual a 7,36 e 6,35. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....	67
Figura 3.27. Cromatograma da formulação farmacêutica contendo o pico do aciclovir (Tr = 5,3minutos) e guanina (Tr=7,6minutos). Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....	69
Figura 4.1. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 0,5 mol/L sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 12 dias.....	91
Figura 4.2. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 3,5 minutos com faixa entre 200-800 nm.....	91
Figura 4.3. Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em HCl 0,5 mol/L sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise: 12 dias (—) e zero hora (———)......	92
Figura 4.4. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (0,5 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em horas) durante 12 dias, em temperatura ambiente.....	93
Figura 4.5. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 0,5 mol/L sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 3 horas.....	94
Figura 4.6. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (0,5 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em horas) durante 3 dias, em temperatura de 70°C.....	94
Figura 4.7. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 1,0 mol/L sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 3 dias.....	95
Figura 4.8. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 5,4 minutos, em HCl 1,0 mol/L, com faixa entre 200-800 nm.....	96

- Figura 4.9.** Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em 1 mol/L de HCl sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise: zero hora (—) e 3 dias (—):96
- Figura 4.10.** Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (1,0 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em horas) durante 3 dias, em temperatura ambiente.....97
- Figura 4.11.** Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 1,0 mol/L sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 40 minutos.....97
- Figura 4.12.** Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em 1 mol/L de HCl sob agitação em temperatura de 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise: zero hora (—) e 40 minutos (—):97
- Figura 4.13.** Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (1,0 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em minutos) durante 40 minutos, em temperatura de 70°C.....98
- Figura 4.14.** Cromatograma da solução de ACV padrão em NaOH 1,0 mol/L sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 14 dias.....99
- Figura 4.15.** Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em 1 mol/L de NaOH sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise: 14 dias (—) e zero hora (—):100
- Figura 4.16.** Cromatograma da solução de ACV padrão em H₂O₂ sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 7 dias.....101
- Figura 4.17.** Cromatograma da solução de pré-mix em H₂O₂ sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 7 dias.....101
- Figura 4.18.** Ampliação do cromatograma da solução de ACV padrão em H₂O₂ 3% sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 7 dias.....102
- Figura 4.19.** Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 8,5 minutos, em solução de H₂O₂ 3%, com faixa entre 200-800 nm.....102
- Figura 4.20.** Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 11,5 minutos, em solução de H₂O₂ 3%, com faixa entre 200-800 nm.....103
- Figura 4.21.** Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em ambientes oxidativos (H₂O₂ 3%), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em minutos) durante 7 dias, em temperatura de 25°C.....103
- Figura 4.22.** Cromatograma da solução de ACV padrão em H₂O₂ sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 5 horas.....104

- Figura 4.23.** Ampliação do cromatograma da solução de ACV padrão em H₂O₂ 3% sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 5 horas.....105
- Figura 4.24.** Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 8,5 minutos, em solução de H₂O₂ 3%, com faixa entre 200-800 nm.....105
- Figura 4.25.** Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em ambientes oxidativos (H₂O₂ 3%), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em minutos) durante 5 horas, em temperatura de 70°C.....106
- Figura 4.26.** Cromatograma da solução de comprimido em água sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.....107
- Figura 4.27.** Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 6,3 minutos, em água por 14 dias em temperatura ambiente, com faixa entre 200-800 nm.....107
- Figura 4.28.** Sobreposição dos espectros em UV do produto de degradação com Tr= 6,3 minutos, em água por 14 dias em temperatura ambiente e do espectro de UV padrão de GUA, com faixa entre 200-800 nm.....108
- Figura 4.29.** Cromatograma da solução de ACV (SQR) em água sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.....108
- Figura 4.30.** Cromatograma da solução de pré-mix em água sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.....109
- Figura 4.31.** Cromatograma da solução de comprimido em água sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.....110
- Figura 4.32.** Cromatograma da solução de ACV (SQR) em água sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.....110
- Figura 4.33.** Cromatograma da solução de comprimido sólido macerado após exposição a luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....111
- Figura 4.33 a.** Cromatograma da solução de comprimido diluído em H₂O após exposição à luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....112
- Figura 4.34.** Cromatograma da solução de comprimido íntegro após exposição à luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....113
- Figura 4.35.** Cromatograma da solução de comprimido em blíster após exposição à luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.....113
- Figura 4.36.** Cromatograma da solução de comprimido macerado em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm),

Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 4 µL. Tempo de análise = 14 dias.....	114
Figura 4.37. Ampliação do cromatograma da solução de comprimido macerado em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 4 µL. Tempo de análise = 14 dias.....	115
Figura 4.38. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 9,2 minutos, em câmara climática com temperatura de 70°C, com faixa entre 200-800 nm.....	116
Figura 4.39. Foto do experimento de degradação úmida realizado com ACV (SQR), comprimido e pré-mix após 14 dias, com temperatura de 70°C e umidade de 75%.....	116
Figura 4.40. Ampliação do cromatograma da solução de comprimido macerado em temperatura= 70°C e umidade de 75%. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 4 µL. Tempo de análise = 14 dias.....	117
Figura 4.42. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 9,2 minutos, em câmara climática com temperatura de 70°C e UR 75%, com faixa entre 200-800 nm.....	117

RESUMO

Desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade para o antiviral aciclovir

O aciclovir é um anti-viral usado mundialmente para o tratamento de herpes (do tipo HSV-1 e HSV-2). Acredita-se que o vírus da herpes está presente em cerca de 90% das pessoas em estado de latência. O tratamento principal em casos onde a doença se manifesta, lesões nos lábios e mucosas, é o aciclovir.

No Brasil, para renovar ou fazer um novo registro de medicamento, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige testes que expõem o fármaco a ambientes extremos (ácido, base, luz, calor, umidade, oxidação) para gerar produtos de degradação que dependendo da concentração no produto acabado, devem ser submetidos a ensaios toxicológicos. O estudo de degradação forçada também permite elucidar a estabilidade intrínseca do fármaco, contribuindo para o entendimento do mecanismo de degradação da substância, o que, posteriormente, ajuda a compreender quais fatores físicos e químicos devem ser controlados para manutenção da estabilidade.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método de análise para quantificação do aciclovir e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de interação hidrofílica (*Hydrophilic interaction chromatography* - *HILIC*) com detecção por arranjo de diodos (DAD) como também degradar amostras de aciclovir padrão, comprimido e placebo em diferentes ambientes.

O desenvolvimento foi realizado em uma coluna HILIC Luna (Phenomenex) com fase móvel Formiato de Amônio 10 mmol/L (pH = 7,4) e acetonitrila (7:93), com temperatura de forno de 30° C, detecção de 254 nm e vazão de 0,3 mL/min. A metodologia foi seletiva, específica e linear para análise de aciclovir e guanina, obtendo valores menores que 5,0% para a precisão e 2,0% para o cálculo da exatidão. No estudo da robustez, os parâmetros alterados foram o valor do pH da fase móvel e também a temperatura do forno, na qual foi realizado o Teste de Tuckey que não foi verificada diferença significativa entre as áreas.

O estudo de degradação forçada foi realizado nos ambientes: ácido, básico, neutro, oxidativo, térmico, úmido e com luz. Em todos os ambientes, exceto básico e fotolítico não foi gerado produtos de degradação.

ABSTRACT

Acyclovir is an anti-viral used worldwide for herpes treatment (HSV-1 and HSV-2 types). It is estimated that herpes virus is present in almost 90% of people in his latent state. Acylcovir is the main treatment in cases where virus expresses itself.

In Brazil, to renew or to make a new registration of medicines, National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) demands tests to expose the medicine to extreme conditions (acid, basic, light, heat, humidity, oxidation) in order to generate degradation products that, depending on the concentration of the row product, will undergoes toxicological assays. The forced degradation study also allow to elucidate the intrinsic stability of medicine, contributing to understand the degradation mechanism of the substance leading to help the understanding of which physical and chemical factors must be controlled to keep stability.

The main objective of this work is to validate a method of analysis to quantify acyclovir and his degradation products using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) based on Diode Array detection as well as to degraded the sample in different conditions

INTRODUÇÃO GERAL

“Never follow the beaten track, it leads only where others have been before”

Alexander Graham Bell

1.1 – Introdução

O aciclovir é um antiviral análogo do nucleosídeo 2-desoxiguanosina, atuando contra todos os tipos de herpes. O ativo é seletivamente convertido em aciclo-guanosina monofosfato (aciclo-GMP) pela timidina quinase viral, que é muito mais eficiente (cerca de 3000 vezes) em fosforilação do que a timidina quinase humana. Na sequência, a aciclo-GMP é fosforilada e convertida a forma trifosfato, que é a forma ativa, aciclo-guanosina trifosfato (aciclo-GTP), por quinases celulares. A aciclo-GTP é um inibidor muito potente da enzima DNA polimerase viral, tendo uma afinidade 100 vezes maior pela DNA polimerase viral do que para a humana. Como substrato, a aciclo-GTP é incorporada ao DNA viral, resultando na terminação da cadeia viral. Embora o aciclovir seja muito semelhante ao nucleotídeo dGuo, não possuirá o 3' final correspondente. Por isso, após a incorporação na fita do DNA viral, nenhum nucleotídeo pode ser adicionado à fita. Foi também demonstrado que as enzimas virais não conseguem remover o aciclo-GTP da cadeia, o que resulta na inibição da atividade da DNA polimerase viral. O fármaco não elimina totalmente o vírus, no entanto, reduz significativamente as lesões causadas pela infecção. É um fármaco de natureza hidrofílica e anfótera, no entanto, permanece na forma molecular entre pH 3 e 9. A herpes genital pode ser causada pelo HSV-1 ou pelo HSV-2, mas na maioria dos casos são causadas pelo HSV-2. Esta infecção é comum em países industrializados como em países em desenvolvimento. Cerca de 99% da população têm o vírus que provoca a herpes e três em cada dez pessoas desenvolvem a lesão. Estudos epidemiológicos mostram uma interação

importante entre HSV, HIV-1 e HPV. A presença de HSV-2 aumenta o risco de aquisição, excreção e transmissão de HIV-1 e pode acelerar a progressão da doença pelo HIV-1.

A guanina é uma base nitrogenada orgânica, que se une a uma molécula de desoxirribose e com um ácido fosfórico, geralmente o fosfato, para formar um nucleotídeo, principal base para formar cadeias polinucleotídeas, que por sua vez, formam o DNA. O aciclovir foi desenvolvido com base no nucleosídeo guanina cíclico, uma base nitrogenada utilizada pelos vírus na construção do seu DNA. Por este motivo, a guanina é uma impureza de síntese do aciclovir.

Além de investigar sobre a substância e a estabilidade do produto, o estudo de degradação forçada também fornece informações sobre processos de degradação e a seletividade dos métodos aplicados na análise de ativos farmacêuticos.

As indústrias farmacêuticas realizam testes de estresse durante a pré-formulação do medicamento para auxiliar a seleção de compostos e excipientes para o desenvolvimento, com o objetivo de facilitar a seleção de sal ou de otimização de formulação, e produção de amostras para o desenvolvimento de uma metodologia analítica. O teste de degradação fornece informações sobre a degradação e mecanismos de formação de produtos de degradação. A metodologia analítica é confrontada com amostras nas quais há degradação de 30% do analito (neste caso, o ativo utilizado no medicamento).

Para melhor organização, esta dissertação foi dividida em três capítulos compreendendo o objetivo proposto e a importância do trabalho

realizado, além da discussão de um desenvolvimento de metodologia indicativa de estabilidade, como também a validação e estudo de degradação forçada.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão da literatura sobre a relevância do anti-viral aciclovir no contexto mundial e também da guanina que é uma impureza de síntese do aciclovir e qual sua importância para o ser humano. Também faz uma compilação de diferentes estudos encontrados na literatura para analisar o aciclovir e quais suas formas de detecção.

No Capítulo 2 descreve-se o desenvolvimento, otimização e validação de metodologia para análise do aciclovir e guanina usando coluna cromatográfica de interação hidrofílica (HILIC)

No Capítulo 3 apresenta-se a etapa do estudo de degradação forçada em ambientes: ácido, básico, neutro, quente, úmido, oxidativo e na presença de luz. Como também a discussão dos produtos de degradação formados de acordo com o espectro de ultravioleta.

1.2 – Justificativa

O aciclovir foi introduzido no mercado em 1983 e está presente em medicamentos para o tratamento do herpes labial, que não tem cura. Em alguns países, especialmente pobres, 90% das pessoas têm anticorpos contra o herpes, ainda que não tenham tido sintomas, isto é, há um número relevante de pessoas no mundo que são usuárias crônicas deste antiviral. Este ativo é relativamente tóxico para as células hospedeiras, além disso, descobriu-se o surgimento de cepas resistentes ao anti-viral (WHO, 2009).

Neste projeto foi utilizada a coluna HILIC por ser uma alternativa eficiente nas análises de compostos polares no controle de qualidade de medicamentos contendo ativos hidrofílicos. Por ser uma coluna fabricada com fase estacionária do tipo polar, ela tem sua versatilidade em propiciar seu uso juntamente com fase móvel aquosa composta por solventes miscíveis em água. As moléculas de água na fase móvel formam uma fina camada aquosa na superfície da fase estacionária, e com isso, acabam fazendo uma parte semi permanente da fase estacionária. Os analitos são retidos por essa camada aquosa e também pela fase estacionária sólida subjacente. Assim, a análise com este tipo de coluna, pode aumentar o tempo de retenção de analitos polares, melhorar a resolução das análises e permitir o acoplamento a espectrometria de massas. Estudos do aciclovir são encontrados na literatura em diferentes tipos de colunas e fases móveis; (HUIDOBRO, RUPEREZ e BARBAS, 2005) (LOREGIANA, GATTIB, *et al.*, 2001); (YADAV, UPADDHYAY, *et al.*, 2009), (HRISTOV e STANKOVA, 2011) (SALEM, ABDON e SALEH, 2012), que utilizam principalmente fase estacionária reversa, com alta vazão e maior concentração de água na fase móvel, dificultando o acoplamento com espectrômetro de massas. Nota-se nesses métodos citados que o aciclovir tem baixa retenção.

Em julho de 2008, a ANVISA, declarou que, registros de medicamentos deveriam possuir estudo de estabilidade para as impurezas e produtos de degradação (ANVISA, 2012). Porém, por ser uma normativa recente no Brasil, pouco foi realizado pela indústria nacional e não há estudos suficientes nas farmacopéias que incluem análise de produtos de degradação. Além disso, apenas alguns fabricantes nacionais conhecem e desenvolvem

metodologias para detecção e quantificação desses produtos. O desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade para o aciclovir, ausente nas literaturas, fornecerá informações importantes sobre a presença de impurezas e produtos de degradação na formulação.

1.3 – Objetivos

1.3.1 - Objetivos Gerais:

Desenvolver e validar uma metodologia indicativa de estabilidade para o aciclovir. Expor o anti-viral a condições de estresse para identificar os produtos de degradação.

1.3.2 – Objetivos Específicos

Entre os objetivos específicos deste trabalho estão:

- Desenvolver e validar uma metodologia indicativa de estabilidade para o aciclovir utilizando técnica de cromatografia a líquida de alta eficiência com coluna de interação hidrofílica (HILIC).
- Submeter o ativo e o medicamento a condições de degradação forçada como hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação, calor e umidade para identificar os ambientes que alteram sua composição.

Revisão Bibliográfica do Aciclovir e Guanina

“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta, mas gostar daquilo que se faz.”

Leonardo da Vinci

2.1 – Aciclovir

2.1.1 Características estruturais e químicas

O aciclovir (ACV), (9-[2-hidroximetil] guanina) (**Figura 2.1**), é um antiviral encontrado em medicamentos e pomadas, atuando contra todos os tipos de herpes (ELION, FURMAN, *et al.*, 1977) como os tipos HSV1 e HSV2 . O fármaco reduz as feridas causadas pela infecção. O antiviral é uma estrutura semelhante ao acíclico do nucleosídeo 2-desoxiguanosina (**Figura 2.2**), que inibe seletivamente a replicação do vírus da herpes (ELION, FURMAN, *et al.*, 1977); (SCHAEFFER, BEAUCHAMP, *et al.*, 1978) (HRISTOV e STANKOVA, 2011).

Figura 2.1. Estrutura química do aciclovir

Figura 2.2. Estrutura química da desoxiguanosina

O aciclovir é um fármaco de natureza hidrofílica e anfótera, isto é, a molécula contém dois grupos ionizáveis (ácido e básico). Um pKa básico (2,3) referente a desprotonação do anel imidazólico, e um pKa ácido (9,3) referente ao oxigênio ligado do anel pirimídico (HUIDOBRO, RUPEREZ e BARBAS, 2005).

O aciclovir possui solubilidade em água de 1,3 mg/mL, porém a solubilidade aumenta quando acrescenta-se etanol ou polietilenoglicol na solução (2,7 mg/mL) e é facilmente solúvel em dimetilsulfóxido (VOLPATO, SANTI e COLOMBO, 1995). O ponto de fusão do fármaco é 255 °C (VOLPATO, NICOLI, *et al.*, 1998).

A via preferencial para utilização do aciclovir é a oral do que a parenteral devido aos riscos de toxicidade local, porém quando administrado oralmente, a absorção pelo trato gastrointestinal é baixa; com uma biodisponibilidade variando entre 15 – 30% (FLETCHER e BEAN, 1985) (HRISTOV e STANKOVA, 2011). Este fármaco é predominantemente eliminado por via renal, portanto, o tempo médio de meia-vida do fármaco é de aproximadamente 3 horas, sendo necessário, então, frequentes administrações e em altas doses (JALÓN, BLANCO-PRÍETO, *et al.*, 2003) (SALEM, ABDU e SALEH, 2012). Em pacientes com insuficiência renal, o tempo de meia-vida aumenta, podendo atingir 20 horas. O aciclovir distribui-se largamente por todos os tecidos e fluidos corporais (NAESENS e CLERCQ, 2001), (COLLA, CLERCQ, *et al.*, 1983).

O ACV é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase para 8-hidroxi-9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina(8-hidroxiaciclovir), na qual é metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase 2 a 9-

carboximetoximetilguanina (aciclovir aldeído). O metabólito 9-carboximetoximetilguanina é responsável por 10-15% da dose excretada na urina (TUTLE, KRETNISKY e ELION, 1983). Há evidências de que o metabólito aciclovir aldeído pode desempenhar uma função importante na lesão tubular renal (nefrotoxicidade) (GUNNES, ALESKA, *et al.*, 2011).

2.1.2 - Farmacodinâmica do aciclovir

O anti-viral ideal deverá reconhecer e inibir a replicação do DNA viral sem afetar a replicação da célula hospedeira. A entrada e perda do capsídeo, a ligação do vírus, a síntese proteica, a replicação do DNA, a montagem e formação das vesículas são pontos importantes da replicação do DNA do HSV (LOREGIANA, GATTIB, *et al.*, 2001).

O aciclovir é particularmente ativo contra o vírus Herpes simplex tipos 1 e 2, e também ativo contra o vírus da varicela zoster, sendo inativo contra o citomegalovírus corporais (NAESENS e CLERCQ, 2001); (COLLA, CLERCQ, *et al.*, 1983). Essa seletividade deriva da fosforilação sequencial específica do aciclovir a aciclovir trifosfato em células infectadas (LOREGIANA, GATTIB, *et al.*, 2001).

O ACV tem sido eficiente na inibição do DNA viral, porém possui efeito discreto na síntese do DNA celular. O ACV é transformado em seu correspondente monofosfatado pela enzima viral timidina quinase. Em seguida, o monofosfatado é di e trifosforilado pela enzimas celulares. Estas substâncias agem competitivamente como substratos para a síntese do DNA do vírus HSV, atuando como terminadores da cadeia de DNA, quando incorporado a elas.

Como precisam ser ativadas por uma enzima viral específica, a quantidade de seus trifosfatos correspondentes presentes nas células infectadas é maior do que nas células não infectadas. A vantagem disso é que a toxicidade destes fármacos fica limitada às células infectadas (NAESENS e CLERCQ, 2001); (BESTMAN-SMITH, 2004); (CLERCQ, 2004).

2.1.3- Toxicidade do aciclovir

O aciclovir também pode ser incorporado ao DNA celular, por isso, seu uso deve ser evitado durante a gravidez. No entanto, não foi evidenciado qualquer efeito teratogênico ou carcinogênico. A toxicidade aguda (DL50) do aciclovir quando administrada por via oral é superior a 1 mg / kg, em razão de sua baixa biodisponibilidade oral. Foram relatados casos isolados, quando altas doses (80 mg/kg) foram acidentalmente administrada intravenosamente, porém não causaram maiores efeitos adversos (EPSTEIN e SCULLY, 1991); (FIELDS, KINPE e CHANOCK, 1990); (HAWKE, 1979); (SHAFER, 1985).

TUCKER *et al* (1983) realizou ensaios para se determinar a possível ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica do ACV em diferentes tecidos de ratos, camundongos e cães da raça *beagle*. O autor observou que as ratas tiveram um significativo aumento na duração de suas vidas quando o ACV foi administrado diariamente por *gavage* com doses de 150 e 450 mg/kg, em relação ao controle. Os cães que receberam doses orais diárias de 150 mg/kg tiveram vômitos, diarreias e perda de peso.

Beagles que receberam injeções intravenosa com doses de 100 mg / kg / dia morreram no oitavo dia do tratamento, e 5 dos 8 cães que

receberam 50 mg/kg/dia morreram entre o 21^o ao 31^o dia do tratamento. As injeções administradas causaram precipitações de cristais nos túbulos renais, resultando em nefropatia obstrutiva (TUCKER, KRASNY, *et al.*, 1983).

CLIVE *et al.*, 1983, realizaram testes *in vitro* na qual o ACV apresentou resultados negativos para o Teste de Ames (CLIVE, TURNER, *et al.*, 1983).

Não há relatos de testes toxicológicos dos produtos de degradação do ACV em literatura e também informações sobre a caracterização de suas estruturas moleculares.

2.1.4 - Metodologia para quantificação do aciclovir

Diversos métodos para a análise de aciclovir em formulações farmacêuticas têm sido publicados. Análise em fluxo com quimiluminescência (YANG, ZOU, *et al.*, 2004), espectroscopia FT-Raman (SHOULIKA e GEORGIU, 2003) e eletroforese capilar também tem sido utilizada para determinar ACV em urina (ZHANG, LIU, *et al.*, 1996) e plasma (VO, HENNING, *et al.*, 2002).

A técnica mais comum usada para esta análise é o HPLC com detecção UV (BATTERMANN, HEIZENROEDER e LUBDA, 1998); (PRAMAR, GUPTA e. ZERAI, 1990); (DUBHASHI e VAVIA, 2000) ou acoplado ao espectrômetro de massas (LEFOLL e CYR, 1995); (KAMEL, BROWN e MUNSON, 1999). Os autores reportam a separação dos picos de guanina e aciclovir, já que a guanina é uma impureza de formação do aciclovir, mas não há dados quantitativos sobre esta impureza (BAEYENS, VAN DER WEKEN, *et*

al., 2002); (NEUBERT, MRESTANI, *et al.*, 1998); (ZHANG, LIU, *et al.*, 1996). Geralmente, os métodos utilizados para separar esses analitos utilizam fase estacionária do tipo ciano ou C18, com alta concentração de água na fase aquosa para aumentar a retenção dos compostos, que estão em torno de 4 minutos (guanina) e 13 minutos (aciclovir).

Nos últimos dez anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas vem sendo largamente aplicada a análises tanto quantitativas quanto qualitativas de fármacos, e vem substituindo de forma ampla os outros tipos de detecção, como ultravioleta, eletroquímica e fluorescência (XIA, MILLER, *et al.*, 2003); (HOPFGARTNER e BOURGOGNE, 2003). As principais razões para este crescimento exponencial da espectrometria de massas são a elevada sensibilidade e seletividade da técnica, além da rapidez de análise (ZHOU, SONG, *et al.*, 2005). Além disso, um espectrômetro de massas pode facilitar o desenvolvimento de métodos por HPLC, pois pode facilitar a identificação de outros componentes diferentes do analito (neste caso, o ativo presente no medicamento), distinção entre compostos de interesse e interferentes em pequenas quantidades (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

O princípio da espectrometria de massas se baseia na produção de íons dos analitos em estudo, que são em seguida separados ou filtrados de acordo com sua relação massa/carga (m/z). O espectrômetro de massa pode dividir-se em uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector (ZHOU, SONG, *et al.*, 2005).

2.2 - Guanina

A guanina (GUA) é uma base nitrogenada (**Figura 2.3**), como adenina, citosina e timina, que se une a uma molécula de desoxirribose e com um ácido fosfórico, geralmente o fosfato, para formar um nucleotídeo, principal base para formar cadeias polinucleotídeas, que por sua vez, formam o DNA. As bases do DNA não são inertes e podem ser alvos de outras moléculas reativas para formar adutos de DNA, isto é, a guanina pode reagir para formar: hidroxiguanina, desoxiguanina, metilguanina, entre outros (MENEGATTI, ELIEZER e BARREIRO, 2001).

Figura 2.3 – Estrutura química da guanina

O aciclovir foi desenvolvido com base no nucleosídeo guanina cíclico, uma base nitrogenada utilizada pelos vírus na construção do seu DNA. O vírus não reconhece as diferenças estruturais entre o aciclovir (análogo a desoxiguanina) e as bases reais, e assim o utiliza para criar um “falso” DNA. Com o DNA construído de forma errada, o vírus não se replica (MENEGATTI, ELIEZER e BARREIRO, 2001).

O aciclovir é sintetizado a partir da guanina (1). Ela é acetilada com anidrido acético, formando um intermediário acetilado (2) que reage com a cadeia lateral na presença de ácido para-toluenossulfônico (4), produto da acilação da dioxolana (3) para formar o derivado glicosídico (5). Este reage

com amônia em metanol, à temperatura ambiente, para fornecer o produto desacetilado, aciclovir (6) (MENEGATTI, ELIEZER e BARREIRO, 2001).

Figura 2.4 – Esquema de formação do aciclovir a partir da guanina (Fonte: (MENEGATTI, ELIEZER e BARREIRO, 2001).

De acordo com a Farmacopéia Americana, a guanina deve estar presente na formulação do aciclovir em um limite de até 0,7% (USP, 2011).

2.3 - HILIC – Cromatografia líquida de interação hidrofílica

A determinação de compostos polares é importante em diversas etapas e muitas vezes faz-se necessário durante o desenvolvimento farmacêutico. Reagentes polares, matéria-prima, intermediários e produtos de

reação podem estar presentes como impureza em um fármaco. Assim métodos adequados para analisar compostos polares são necessários para identificá-los como também seus produtos de biotransformação em matrizes biológicas.

A cromatografia líquida em fase reversa é amplamente utilizada em análises farmacêuticas pela sua seletividade para uma vasta classe de compostos. Para compostos polares utiliza-se fase móvel com baixa concentração orgânica para alcançar retenção e separação. No entanto, ao se utilizar fase móvel aquosa em grande quantidade em relação a orgânica, as fases estacionárias com cadeias alquilas octil ou octadecil (usadas em fase reversa) podem entrar em colapso (REID, *et al.*, 1999). Além disso, a retenção dos analitos polares pode ser muito baixa, assim como a seletividade e reprodutibilidade. Tem-se estudado vastamente uma modificação na cadeia alquila, adicionando um grupamento polar (geralmente amida) para tentar resolver este problema (MAJORS, 1998) (MAJORS, 2000).

Alpert (1990) usou o termo *hydrophilic interaction chromatography* (HILIC) para descrever o uso de uma fase estacionária polar com fase móvel aquosa-orgânica. Ele desenvolveu a coluna poli(hidroxietil)aspartamida para a separação de proteínas, peptídeos e outros compostos polares. Outros artigos usando modo HILIC com diversas colunas polares têm aparecido em análises de carboidratos (ALPERT, SHUKLA, *et al.*, 1994); (CHURMS, 1996), peptídeos (YOSHIDA, 1997); (OYLER, ARMSTRONG, *et al.*, 1996), histonas (LINDNER, SARG, *et al.*, 1996) e produtos naturais (STREGE, 1998).

Alpert (1990) e depois Guo (2005) sugeriram que além de uma possível ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, o mecanismo de retenção HILIC envolve principalmente partição entre a fase móvel altamente

orgânica e uma camada de água, na qual é parcialmente imobilizada na superfície da fase estacionária (ALPERT, 1990) (GUO, 2005).

O principal mecanismo de interação que rege as separações em HILIC é o de partição. A alta polaridade da fase estacionária associada ao uso de uma fase móvel contendo água leva a formação de uma camada de água que fica imobilizada na superfície da fase estacionária e por causa disso, o composto em análise estabelece um equilíbrio com esta camada de água e a fase móvel que possui caráter apolar.

Geralmente as fases estacionárias usadas no modo HILIC são à base de sílica e pode ser neutra, diol, amida, zwitteriônica, ou seja, fases capazes de criar uma fase aquosa por solvatação (DEJAEGER, MANGELINGS e VANDER HEYDEN, 2008).

HILIC é uma estratégia a mais para se trabalhar em HPLC que é diferente do modo fase reversa e do modo normal. A fase estacionária HILIC é uma fase estacionária polar, como sílica, diol ou amino e a fase móvel é composta por solventes polares, tipicamente composta por acetonitrila e água, com alta porcentagem de acetonitrila. O eluente forte, nesse modo, é a água (CLIFFORD, BAO, *et al.*, 2009).

O modo HILIC possui vantagens bem definidas: boa retenção hidrofílica, seletividade, melhor separação, baixa pressão devido à baixa viscosidade das fases móveis, que são compostas com maior porcentagem de solvente orgânico, e maior dessolvatação destas fases em espectrometria de massas (OLSEN, 2001). Além disso, melhora no formato do pico e alta capacidade de carga para compostos básicos (MCCALLEY, 2007)

2.4 – Referência Bibliográfica

- ALPERT, A. J. Hydrophilic interaction chromatography for the separation for the peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, 499, 1990. 177- 196.
- ALPERT, A. J. et al. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, 676, 1994. 191.
- BAEYENS, W. R. G. et al. Fluorimetric determination of acyclovir in a pharmaceutical preparation applying HPLC with an acidic micellar mobile phase. **Luminescence**, 17, 2002. 210-213.
- BATTERMANN, C. G. K.; HEIZENROEDER, S.; LUBDA, D. **Labor Praxis**, 30, 1998. 32-34.
- BESTMAN-SMITH, J. 2. **Caractérisation des Mutations du Virus Herpès simplex impliquées dans la Résistance aux Antiviraux**. Universidade Laval. Quebec. 2004.
- CHURMS, S. A. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. **Journal of Chromatography A**, 720, 1996. 75.
- CLERQ, D. E. Antivirals and Antivirals strategies. **Nature Reviews Microbiology**, 2, 2004. 704-720.
- CLIFFORD, M. et al. Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes. **Journal of Chromatography B**, p. 4133-4139, 2009.
- CLIVE, D. et al. Preclinical Toxicology Studies with Acyclovir: Genetic Toxicity Tests. **FUNDAMENTAL AND APPLIED TOXICOLOGY**, 3, 1983. 587-602.
- COLLA, L. et al. Synthesis and Antiviral Activity of Water-Soluble Esters of Aciclovir [9-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]guanine]. **Journal of Medicine Chemistry**, 26, 1983. 602-604.
- DEJAEGHER, B.; MANGELINGS, D.; VANDER HEYDEN, Y. Method development for HILIC assays. **Journal of Separation Science**, 31, 2008. 1438.
- DUBHASHI, S. S.; VAVIA, P. R. **Indian Drugs**, 37, 2000. 464-468.
- ELION, G. B. et al. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74, 1977. 5716.
- EPSTEIN, J. B.; SCULLY, C. Herpes simplex virus in immunocompromised patients: Growing evidence of drug resistance. **Oral Surgery**, 72, 1991. 47-50.

- FIELDS, B. N.; KINPE, D. M.; CHANOCK, R. M. **Virology**. 2. ed. Nova Iorque: Raven Press, 1990.
- FLETCHER, C.; BEAN, B. Evaluation of oral acyclovir therapy. **Drug Intelligence and Clinic Pharmacy**, 19, 1985. 518-524.
- GUNNES, P. et al. Acyclovir-induced nephrotoxicity: the role of the acyclovir aldehyde metabolite. **Translational Research**, v. 158, n. 5, p. 290-301, 2011.
- GUO, Y. . G. S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1074, 2005. 71-80.
- HAWKE, R. A. **General principles underlying laboratories diagnosis of viral infection**. 5. ed. Washington: Lenette EH, 1979. 3-48 p.
- HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 22, p. 195-214, 2003. ISSN 3.
- HRISTOV, G.; STANKOVA, I. Chemical Stability of New Acyclovir Analogues with Peptidomimetics. **Scientia Pharmaceutica**, 2011. 259-265.
- JALÓN, E. G. et al. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical**, 56, 2003. 183-1877.
- KAMEL, A. M.; BROWN, P. R.; MUNSON, B. Effects of mobile-phase additives, solution pH, ionization constant, and analyte concentration on the sensitivities and electrospray ionization mass spectra of nucleoside antiviral agents. **Analytical Chemistry**, 71, 1999. 5481-5492.
- LEFOLL, E.; CYR, T. D. Determination of acyclovir (zovirax) and guanine by microbore high-performance liquid chromatography with confirmation by atmospheric-pressure-chemical-ionization mass spectrometry. **Journal of Applied Spectroscopy**, 40, 1995. 155-159.
- LINDNER, H. et al. Separation of acetylated core histones by hydrophilic-interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 743, 1996. 137.
- MAJORS, R. E. **LC/GC**, 16, 1998. 228.
- MAJORS, R. E. **LC/GC**, 18, 2000. 262.
- MCCALLEY, D. V. Direct purification of recombinant hepatitis B core antigen from two different pre-conditioned unclarified Escherichia coli feedstocks via expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1171, 2007. 46.
- MENEGATTI, R.; ELIEZER, C. R. M.; BARREIRO, J. A importância da síntese dos fármacos. **Química Nova na Escola**, v. 3, maio 2001.

NAESENS, L.; CLERCQ, E. Recent Developments in Herpes Virus Therapy. **Herpes Leuven**, 8, 2001. 1.

NEUBERT, R. H. H. et al. Application of micellar electrokinetic chromatography for analyzing antiviral drugs in pharmaceutical semisolid formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 16, 1998. 893–897.

NGUYEN, H. P.; SCHUG, K. A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. **Journal of Separation Science**, 31, 2008. 1465.

OLSEN, B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, 913, 2001. 113 – 122.

OYLER, A. R. et al. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. **Journal of Chromatography A**, 724, 1996. 378.

PRAMAR, Y.; GUPTA, V. D.; ZERAI, T. Quantitation of Acyclovir in Pharmaceutical Dosage forms using High-Performance Liquid Chromatography. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 16, 1990. 1687-1695.

SALEM, A. A.; ABDOU, I. M.; SALEH, H. Application of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Determination of Amantadine and Acyclovir in Plasma and Pharmaceutical Samples. **Journal of AOAC International**, 95, 2012. 1644-1652.

SCHAEFFER, H. J. et al. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. **Nature**, v. 272, p. 583, 1978.

SHAFFER, W. G. **Tratado de Patologia Bucal**. 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.

SHOULIKA, S. G.; GEORGIU, C. A. Generalized Approximation of Strong Interaction of Waves in the Theory of High-Power Radiation Frequency Doubling. **Journal of Applied Spectroscopy**, 57, 2003. 407-412.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley, 1997. 686-708 p.

STREGE, M. A. Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. **Analytical Chemistry**, 70, 1998. 2439.

TUCKER, W. J. et al. Preclinical Toxicology Studies with Acyclovir: Carcinogenicity Bioassays and Chronic Toxicity Test. **FUNDAMENTAL AND APPLIED TOXICOLOGY**, 3, 1983. 579-586.

TUTLE, J.; KRENITSKY, T. A.; ELION, G. EFFECTS OF ACYCLOVIR AND ITS METABOLITES ON HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE. **Biochemical Pharmacology**, p. 3011-3015, 1983.

USP, 32. **United States Pharmacopoeia**. Rockville, p. 233-237, 734-736. 2011.

VO, H. C. et al. Development and validation of a plasma assay for acyclovir using high-performance capillary electrophoresis with sample stacking. **Journal of Chromatography B**, 772, 2002. 291.

VOLPATO, N. M. et al. In vitro acyclovir distribution in human skin layers after transdermal iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, 50, 1998. 291-296.

VOLPATO, N. M.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Iontophoresis enhances the transport of acyclovir through nude mouse skin by electroosmosis. **Pharmaceutical Research**, 12, 1995. 1623-1627.

WHO. World Health Organization. **An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection.**, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int.bulletin/volumes/86/10/07-046128/en/>>. Acesso em: 14 agosto 2011.

XIA, Y. Q. et al. Use of a quadrupole linear ion trap mass spectrometer in metabolite identification and bioanalysis. **Rapid communications in mass spectrometry**, 17, 2003. 1137-1145.

YANG, M. et al. **Fenxi Huaxue**, 32, 2004. 1237-1239.

YOSHIDA, T. Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, 69, 1997. 3038.

ZHANG, S. S. et al. **Biomedical Chromatography**, 10, 1996. 256.

ZHOU, S. et al. Critical review of development, validation and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. **Current pharmaceutical analysis**, 1, 2005. 3-14.

*Desenvolvimento e Validação de
Metodologia do Aciclovir e
Guanina*

“An expert is a man who made all the mistakes wich can be made in a very narrow field.”

Niels Bohr

3.1 - Validação de métodos analíticos

Quando um método analítico é desenvolvido deve-se providenciar sua adequada validação para que ele possa ser aplicado na rotina de um laboratório. Recomendações gerais para a validação de métodos analíticos podem ser obtidas da *Food and Drug Administration* (FDA), *International Conference on Harmonization* (ICH), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), além da existência de diversas publicações científicas sobre o assunto. Segundo a ANVISA, “a validação deve garantir, através de estudos laboratoriais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. O objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que os resultados estão adequados com a sua finalidade (ICH, 1996).

No contexto do controle de qualidade de medicamentos, o termo validação foi amplamente divulgado no Brasil em 1999, quando a ANVISA publicou a resolução 391 de 9 de agosto de 1999, na qual visava normatizar e regulamentar critérios para medicamentos genéricos no Ministério da Saúde e atribuía a validação como um dos pré-requisitos para o registro desses medicamentos e controle de qualidade (ANVISA, 2003). Desde então, várias legislações foram emitidas e revogadas a fim de aprimorar a anterior. Finalmente, em 29 de maio de 2003, a resolução 899 estabeleceu os parâmetros para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, na qual deve apresentar linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, recuperação e limites de detecção e quantificação adequados para a análise. (ANVISA, 2003); (SHABIR, 2003); (KHAN, REDDY, *et al.*, 2012). Essas características da validação que são geralmente exigidas variam de acordo

com a finalidade do teste, que estão classificadas na Tabela 3.1. Neste trabalho foi utilizado testes da categoria II.

Tabela 3.1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).

Categoria	Finalidade do teste
I	Teste quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impureza e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
III	Testes de performance (dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

A tabela 3.2 mostra os ensaios exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária de acordo com as categorias classificadas acima.

Tabela 3.2. Características de Validação recomendadas dos vários tipos de testes. (Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	Não	**	Não
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária. Adaptado de AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003.

Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros órgãos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, é admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (SHABIR, 2003); (ANVISA, 2003); (BRETNALL e CLARKE, 2011); (SHAH, IQBAL, *et al.*, 2011); (KHAN, REDDY, *et al.*, 2012).

3.1.1 – Especificidade e Seletividade

Algumas vezes pode haver confusão sobre se usar o termo específico e seletivo em respeito a um método (VESSMAN, STEFAN, *et al.*, 2001). Por definição um método é específico se somente mede a quantidade do analito em questão sem receber a influência de nenhum tipo de interferente. Para ser seletivo, um método deve realizar uma análise sem ser influenciado pelos possíveis interferentes, tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes de matrizes. (ANVISA, 2003).

Uma das formas de analisar se uma metodologia é seletiva, consiste em analisar várias amostras e também uma amostra de um branco da matriz para observar a existência de picos próximos ou exatamente no tempo de retenção do analito. Outra forma seria identificando a pureza do pico com detectores como espectrômetro de massas ou arranjo de diodos (DAD), uma vez que permite a aquisição do espectro de massas ou no UV-VIS, respectivamente, seguida da comparação a um padrão analítico (HUBER, 2009).

3.1.2 - Linearidade

A linearidade de um método analítico consiste em obter resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. (ANVISA, 2003).

Na prática, a linearidade é determinada por estudos de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico (CASS e DEGANI, 2001). Os métodos estatísticos são usados para determinar o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo x , coeficiente angular e desvio padrão relativo (ANVISA, 2003).

Para determinação da linearidade, o ensaio é realizado utilizando-se no mínimo cinco concentrações conhecidas do padrão (em triplicata) e, essas concentrações devem abranger o intervalo especificado pelo método, contemplando o limite de variação esperado (80% da concentração mais baixa e 120% da concentração mais alta que se pretende analisar) (ANVISA, 2003).

O cálculo da regressão linear por mínimos quadrados é a forma mais comum de obtenção da função que relaciona a resposta medida e a concentração de interesse.

A linearidade é considerada, erroneamente, como apenas um ajuste adequado, fornecido pelo coeficiente de correlação, como ferramenta para avaliar a linearidade do intervalo de concentrações estudado. A revisão de Burke demonstra que apenas um alto valor de r não significa, necessariamente, que a distribuição dos resultados é linear (BURKE, 2001); (CROWTHER, 2001); (LISTER, 2005). Adicionalmente, um dos métodos mais aceitos para a

rápida avaliação da distribuição linear dos resultados é o cálculo e construção do gráfico de resíduos.

3.1.3 - Precisão

A precisão reflete o grau de dispersão de resultados quando o método é aplicado em várias amostras, sendo este, em um mesmo laboratório, com o mesmo modo de preparo da amostra e utilizando os mesmos equipamentos. A precisão é dividida em três categorias (ANVISA, 2003) (ICH, 1996): repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão inter-corrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) é a concordância dos resultados obtidos em laboratórios diferentes ou instrumentação diferente.

Uma das formas de se realizar essa determinação é pelo cálculo de desvio padrão relativo (DPR) de seis replicatas medidas em três níveis de concentrações diferentes e cobrindo o intervalo de linearidade. Para a precisão intermediária geralmente consideram-se medidas nas quais se avalia a influência de variações do equipamento utilizado, analista e/ou dia de análise. Reprodutibilidade é um parâmetro mais comumente associado com variações entre laboratórios (ICH, 1996).

A precisão é usualmente expressa segundo a fórmula: (ICH, 1996)

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

na qual, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. O valor máximo aceitável para o DPR deve ser 5% (ANVISA, 2003).

3.1.4 - Limite de Detecção

O limite de detecção de um analito é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato. É estabelecido por intermédio de análises de concentrações conhecidas e decrescentes até atingir o menor nível detectável. Pela regulamentação da ANVISA recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (ANVISA, 2003).

3.1.5 - Limite de Quantificação

É a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com segurança (ICH, 1996). O limite de quantificação é atribuído, em cromatografia, a picos com sinal/ruído maior que 10 (ANVISA, 2003).

3.1.6 - Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor encontrado em relação ao valor verdadeiro (ICH, 1996).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (ANVISA, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. (KARTAL, 2001); (ANVISA, 2003), (SHABIR, 2003).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003):

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.1.7 - Robustez

A robustez de um procedimento analítico é a capacidade dos resultados permanecerem inalterados em decorrência de pequenas variações introduzidas nos parâmetros da metodologia. Indica a susceptibilidade do método à variações analíticas.

Para cromatografia líquida, os principais parâmetros que estão preconizados na Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e que podem resultar em variação na resposta do método são os seguintes: variação do pH da fase móvel; variação da composição da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas; temperatura; vazão da fase móvel. (ANVISA, 2003).

3.2 - Experimental

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, composto por duas bombas LC-20AD, degaseificador A5, injetor automático de amostras SIL-20A, forno de colunas CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-20A, controladora dos componentes CBM-20A e software de aquisição de dados LC-Solution.

Equipamentos, soluções e solventes utilizados:

HPLC (Shimadzu, Japão)

Vórtex

Balança Analítica ($\pm 0,0001\text{g}$)

Agitador Magnético

Ultra-som

Termômetro

Formiato de Amônio (99,5% de pureza, Sigma-Aldrich)

Aciclovir (99,5% de pureza, INCQS, Rio de Janeiro)

Guanina (99,6% de pureza, Sigma-Aldrich)

Acetonitrila (Grau HPLC, JT Baker)

Água ultra-pura

Ácido Fórmico (99,9% de pureza, Sigma- Aldrich)

Hidróxido de Amônio P.A.(25% em água, Fluka)

Ácido Fosfórico (99,6% de pureza, Sigma-Aldrich)

A separação de aciclovir e guanina foram avaliadas em diferentes proporções dos solventes da fase móvel, e em cada condição, o fator de

retenção (k) dos picos de aciclovir e guanina e a resolução (R) entre eles foram avaliados.

3.2.1 - Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de aciclovir em formulações farmacêuticas

3.2.1.1 Preparo de amostra para a análise do aciclovir

Para o desenvolvimento da metodologia foram preparadas as soluções descritas a seguir. Essas soluções foram utilizadas tanto para o desenvolvimento como para a validação.

Solução padrão estoque de aciclovir: foram pesados 10 mg de aciclovir (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, Rio de Janeiro) em balança analítica, transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com água ultra-pura, a solução foi agitada em vortex por 2 minutos até a completa solubilização. A concentração final obtida da solução de ACV foi de 1 mg/mL

Solução trabalho da solução de aciclovir: foi retirada alíquota de 100 µL e transferida para um balão volumétrico de 5 mL e o mesmo foi completado com fase móvel constituída por ACN/Solução Formiato de Amônio 100 mM (93/7), tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL.

Solução estoque da formulação farmacêutica: cada comprimido tem um peso de aproximadamente 500 mg, o qual contem 200 mg de aciclovir (Neoquímica, Goiás). Então, pesaram-se 5 comprimidos, determinaram-se a média desse peso ($m = 493,83$ mg). Os comprimidos foram macerados juntos,

em um cadinho e pistilo, e o peso médio foi pesado em três réplicas e transferidos para um balão de 200 mL (1 mg/mL). Adicionou-se água e a solução foi submetida ao ultra-som por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente.

Solução trabalho da formulação farmacêutica: foi retirada alíquota de 100 µL e transferida para um balão volumétrico de 5 mL e completada com fase móvel constituída por ACN/Solução Formiato de Amônio 100 mM (93/7), tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. Essa solução foi filtrada em membrana de filtro de 0,45 µm de tamanho de poro.

3.2.2 - Otimização de metodologia analítica para determinação de aciclovir

Para o desenvolvimento de uma metodologia indicativa de estabilidade foram utilizadas duas colunas: Coluna Ciano, para determinação de possíveis impurezas presentes no aciclovir e para determinação dos produtos de degradação e validação da metodologia e Coluna HILIC.

3.2.2.1 – Análise do aciclovir utilizando coluna ciano para determinação de impurezas

Primeiramente a solução de aciclovir foi analisada de acordo com os parâmetros propostos por Huidobro et al., 2005, utilizando uma coluna Luna Ciano (150 mm x 3 mm, com 3 µm de diâmetro de partícula) da marca Phenomenex, com fase móvel 25 mM H₃PO₄ pH= 1,83 (Sigma) / ACN (96 / 4),

vazão de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 35°C e detectado num comprimento de onda igual a 254 nm, com o objetivo de se identificar possíveis impurezas na amostra de aciclovir (HUIDOBRO, RUPEREZ e BARBAS, 2005).

Em outra metodologia, seguindo Huidobro et al, a alteração foi no pH da solução tampão da fase móvel, mudando para um valor de 3,0 (HUIDOBRO, RUPEREZ e BARBAS, 2005).

3.2.2.2 – Desenvolvimento de metodologia utilizando coluna HILIC

Para o desenvolvimento de uma metodologia indicativa de estabilidade, os testes iniciais utilizaram uma coluna Luna Hilic (150 mm x 2 mm, 3 µm) Phenomenex, solução de Formiato de Amônio 10 mM (Sigma) / ACN como fase móvel, detector ajustado em 254 nm, vazão ajustada de 0,3mL/min e volume de injeção de 7 µL, no modo isocrático. Essa metodologia foi testada com diferentes pHs de solução da fase móvel e diferentes concentrações de acetonitrila.

Tabela 3.3. Testes realizados em coluna HILIC com diferentes proporções de ACN e valor de pH.

	pH	Proporção de ACN (%)	Temperatura do Forno (°C)
Teste 1	3,2	90	30
Teste 2	3,2	93	30
Teste 3	5,6	93	30
Teste 4	7,4	93	30
Teste 5	8,5	93	30

3.2.3 – Validação de metodologia para análise do aciclovir

O método foi validado segundo os procedimentos recomendados pela Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos (ICH, 1996).

3.2.3.1 – Seletividade/Especificidade

Para avaliar a seletividade/especificidade do método foram injetadas amostra padrão, produto farmacêutico, pré-mix e pré-mix fortificado com o objetivo de avaliar possíveis picos interferentes no cromatograma, com o mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo e também os parâmetros cromatográficos da metodologia de análise.

5.2.3 - Linearidade

Foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque com 1 mg/mL de aciclovir. A faixa linear compreendeu-se de 70% a 130% da concentração de trabalho de ACV (0,020 mg/mL) e GUA (0,001 mg/mL), devido ao limite proposto para uniformidade de conteúdo (Tabela 3.4). A curva foi construída realizando-se diluições de cada solução padrão estoque, obtendo-se seis concentrações diferentes que variaram de 0,011 mg/mL a 0,026 mg/mL de aciclovir (Tabela 3.5). Cada solução foi injetada duas vezes subsequentes no cromatógrafo líquido.

Tabela 3.4. Diferentes faixas lineares que deve ser abrangidas no estudo da validação de acordo com o ensaio escolhido (ANVISA, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

Tabela 3.5. Preparo das soluções diluídas de aciclovir para construção da curva analítica e estudo da linearidade do método analítico por HPLC.

Faixa Linear (%)	Vol. da solução estoque (μL)	Concentração de aciclovir (mg/mL)	Fase móvel (mL)
55	55	0,011	5
70	70	0,014	5
85	85	0,017	5
100	100	0,020	5
115	115	0,023	5
130	130	0,026	5

Com a obtenção dos resultados, as curvas analíticas foram plotadas para concentração versus área do pico do fármaco, e os dados submetidos à regressão linear e o coeficiente de correlação deve ser maior que 0,98.

3.2.3.3 - Precisão

3.2.3.3.1- Precisão intra-corrida

A precisão intra-corrida foi avaliada com três concentrações diferentes: baixa, média e alta (0,014; 0,020 e 0,026 mg/mL) e injetadas em triplicata. As soluções para a análise da precisão foram preparadas conforme procedimento descrito no item 3.2.1.1.

3.2.3.2 - Precisão inter-corrida

A precisão inter-corrida foi avaliada em três concentrações diferentes: baixa, média e alta (0,014; 0,020 e 0,026 mg/mL), injetadas em triplicata e preparadas em três dias consecutivos. Os teores de aciclovir e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados.

3.2.3.4 - Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela técnica do pré-mix fortificado, na qual uma quantidade conhecida do padrão aciclovir (INCQS, Rio

de Janeiro) foi adicionada a uma mistura dos excipientes do comprimido. Essa mistura foi preparada baseando-se nos excipientes citados na bula do medicamento. A quantidade de cada excipiente adicionado na formulação está descrito na Tabela 3.6 auxiliado pela literatura de referência (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006) e calculados para o peso médio de cinco comprimidos descritos no item 3.2.1.1.

Tabela 3.6 - Relação dos excipientes e suas respectivas proporções, para preparo de formulação do pré-mix e avaliação da exatidão dos métodos cromatográfico

Excipiente	Concentração na formulação (%)
Estearato de magnésio	5
Glicolato de amido sódico	5
Dióxido de silício	0,5
Pirrolidona	3
Celulose	46,5

As amostras foram preparadas em triplicata em balões de 1000 mL, através da pesagem de 14, 20 e 26 mg de aciclovir. O volume foi completado com água, obtendo-se soluções com concentração final de 0,014; 0,020 e 0,026 mg/mL. A quantidade de mistura de excipiente preparada para o estudo da exatidão foi de aproximadamente 125 mg. As soluções foram submetidas a agitação por vinte minutos, completou-se o volume e foram filtradas. O desvio padrão relativo (DPR) foi determinado.

3.2.3.5 - Limites de detecção e quantificação

Inicialmente foi verificado e avaliado no cromatograma da solução trabalho do ACV (20 mg/mL) o valor da relação sinal-ruído. A seguir, essa solução foi diluída sucessivamente utilizando-se fase móvel (solução de Formiato de Amônio 100 mM/ACN 7/93) como diluente até a obtenção das respectivas concentrações do limite de detecção e de quantificação segundo o critério da relação sinal/ruído.

As soluções correspondentes aos limites de quantificação e de detecção foram preparadas em triplicata e injetadas conforme as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.1 (Preparo de amostra para a análise do aciclovir)

3.2.3.6 - Robustez

Para avaliar a robustez da metodologia, os parâmetros temperatura da coluna e pH da solução tampão da fase móvel foram alterados para observar se o método resiste a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. As mudanças na metodologia analítica foram: temperatura de 30 para 35°C e pH de 7,4 para 6,4. As soluções foram injetadas em triplicatas nas concentrações: 0,014, 0,020 e 0,026 mg/mL. A concentração real foi determinada nessas injeções e os resultados foram submetidos a estudo estatístico.

3.2.4 – Validação de metodologia analítica para quantificação de guanina

Foi realizada, também, a validação da guanina, pois ela está presente na formulação padrão do ACV, sendo uma impureza de formação. Além disso, a guanina é também o produto de degradação majoritário do ACV (SINHA, 2007).

As condições cromatográficas utilizadas para a validação da guanina foram as mesmas descritas no item 3.2.2.2 para a validação do ACV.

3.2.4.1 - Preparo das soluções padrões e amostras de guanina.

Solução padrão de guanina: aproximadamente 25 mg de guanina foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL e solubilizados em uma solução de 0,1 mol/L de ácido clorídrico. O volume foi completado com a mesma solução de modo a obter uma concentração final de 1 mg/mL.

Solução trabalho da solução de guanina: foram retiradas alíquotas de 5 µL da solução estoque e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,001 mg/mL

3.2.4.2 – Seletividade e Especificidade

O estudo para a seletividade e especificidade foram realizados de acordo com item 3.2.3.1.

3.2.4.3 - Linearidade

Foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque contendo 1,0 mg/mL de guanina. A faixa linear compreendeu-se de 55% a 130% da concentração de trabalho de guanina a 100% (1 µg/mL). A curva foi construída realizando-se diluições de cada solução padrão estoque de trabalho, obtendo-se seis concentrações diferentes. Cada solução foi injetada duas vezes no sistema HPLC e as suas concentrações estão descritas conforme Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Soluções diluídas de guanina para construção da curva de calibração e estudo da linearidade do método analítico por HPLC

Faixa Linear (%)	Vol. da solução estoque (µL)	Concentração de guanina (mg/mL)	Fase móvel q.s.q (mL)
55	2,75	0,00055	5
70	3,50	0,00077	5
85	4,25	0,00085	5
100	5,00	0,00100	5
115	5,75	0,00115	5
130	6,50	0,00130	5

Com a obtenção dos resultados, as curvas analíticas foram obtidas para concentração versus área do pico do princípio ativo, e os dados submetidos à regressão linear.

3.2.4.4 - Precisão

3.2.4.4.1 - Precisão intra-corrida

A precisão intra-corrida foi avaliada com três concentrações diferentes: baixa, média e alta (0,00077; 0,00100 e 0,00130 mg/mL) e analisadas em triplicata. As soluções para a análise da precisão foram preparadas conforme procedimento descrito no item 3.2.4.1.

3.2.4.4.2 - Precisão inter-corrida

A precisão inter-corrida foi avaliada em três concentrações diferentes: baixa, média e alta (0,00077; 0,001 e 0,0013 mg/mL) injetadas em triplicata e em três dias consecutivos. Os teores de guanina e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados.

3.2.4.5 - Exatidão

A exatidão do método foi determinada utilizando-se o pré-mix fortificado, na qual uma quantidade conhecida de guanina padrão (Sigma - Aldrich) foi adicionada a uma mistura dos excipientes do comprimido. Essa mistura foi preparada baseando-se nos excipientes citados na bula do medicamento. A quantidade de cada excipiente adicionado na formulação está descrito na Tabela 3.6 auxiliado pela literatura de referência (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006) e calculados para o peso médio de cinco comprimidos descritos no 3.2.4.1.

As amostras foram preparadas em triplicata em balões de 1000 mL, e pesados uma massa de 0,7; 1 e 1,3 mg de guanina em solução de HCl 0,1mol/L, tendo uma concentração final de 0,7; 1 e 1,3 ($\mu\text{g/mL}$).

3.2.4.6 - Limites de detecção e quantificação

Inicialmente foi verificado e avaliado no cromatograma da solução trabalho da GUA (1 mg/mL) o valor da relação sinal-ruído. A seguir, essa solução foi diluída sucessivamente utilizando-se fase móvel (solução de Formiato de Amônio 100 mM/ACN 7/93) como diluente até a obtenção das respectivas concentrações do limite de detecção e de quantificação segundo o critério da relação sinal/ruído.

As soluções correspondentes aos limites de quantificação e de detecção foram preparadas em triplicata e injetadas conforme as condições cromatográficas descritas no 3.2.2.2.

3.2.4.7 - Robustez

A avaliação da robustez para a GUA foi determinada conforme item 3.2.3.6. As soluções foram injetadas em triplicatas nas concentrações: 0,7; 1 e 1,3 ($\mu\text{g/mL}$). A concentração nominal foi determinada nessas injeções e os resultados foram submetidos a estudo estatístico.

3.2.4.8 – Análise de teor de guanina em comprimidos

Foram retiradas alíquotas de 5 μL da solução que continha o comprimidos solubilizado e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 1 $\mu\text{g/mL}$. As soluções trabalho foram filtradas e injetadas no cromatógrafo.

3.3 - Resultados e Discussão

3.3.1 – Análise do aciclovir em coluna ciano para detecção de impurezas.

Primeiramente o aciclovir foi analisado para identificar impurezas presentes no aciclovir (SQR) e no produto farmacêutico. De acordo com as condições cromatográficas publicadas por Huidobro et al, em 2004, fase móvel 25 mM H_3PO_4 pH = 3,0 / ACN (96/4) em coluna ciano, 254 nm, o autor encontrou 6 impurezas presentes na formulação. A Figura 3.1 (a) mostra que foi detectado a guanina como impureza com tempo de retenção de 1,88 minutos e o aciclovir em 2,09 minutos, porém ao analisar-se a pureza do pico do aciclovir (Figura b) mostra que ele não está puro nessas condições cromatográficas, foi detectado uma impureza em 2,08.

Figura 3.1. (a) Cromatograma de análise do aciclovir em coluna Ciano, fase móvel tampão H_3PO_4 25mM / ACN (96 / 4) pH = 3,0, detecção de 254 nm, vazão de 0,5 mL/min. **(b)** Gráfico de pureza do pico do ACV. **(c)** Espectro em ultravioleta do ACV. **(d)** Espectro em ultravioleta da GUA.

Outra proposta de Huidobro (2004) para detecção de impurezas foi a alteração do pH da solução tampão para 1,8 (HUIDOBRO, RUPEREZ e BARBAS, 2005). Esse teste também foi realizado e as impurezas não foram encontradas na amostra do aciclovir, o tempo de retenção do ACV diminuiu e a GUA não foi detectada (Figura 3.2)

Figura 3.2. Cromatograma de análise do aciclovir em coluna Ciano, fase móvel tampão H_3PO_4 25mM / ACN (96 / 4) pH = 1,8 vazão de 0,5mL/min, temperatura do forno de 25°C, detecção de 254 nm.

3.3.2 - Desenvolvimento de metodologia utilizando a coluna HILIC

Como a molécula do aciclovir é polar, foram realizados testes com a coluna HILIC para aumentar o tempo de retenção da mesma e determinar quais as impurezas estariam presentes na formulação (LECOMTE, HUBERT, *et al.*, 2012) (CHAN, TARBIN, *et al.*, 2011). Esta etapa foi de modificações na metodologia que permitissem que o pico de aciclovir e guanina fossem resolvidos e simétricos. Neste desenvolvimento foi realizada a adequação da

metodologia através dos parâmetros como número de pratos teóricos, fator de cauda e resolução. Em um método em desenvolvimento deve-se fazer as alterações necessárias para que os parâmetros estejam dentro dos limites adequados para a qualidade da análise, assegurando a qualidade e a confiabilidade dos resultados (SHABIR, 2003); (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997); (USP, 2011)..

3.3.2.1 - Escolha da Fase Móvel

A escolha da fase móvel é de extrema importância na separação dos analitos em razão da interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a não interferir na detecção dos analitos de interesse, manter a solubilidade dos mesmos e produzir a separação desejada.

O primeiro teste realizado, como descrito no Item 3.2.2.2 teve uma composição de Fase Móvel de 10 mM de Tampão Formiato de Amônio (pH = 3,2) / ACN (10 / 90). Como observado na Figura 3.3, o pico do aciclovir ($T_r = 4,07$ minutos) e o pico com $T_r = 5,082$ não estão separados o suficiente para a realização da validação. Assim, com essa metodologia o pico do aciclovir não retorna a linha de base, podendo causar um erro na integração e quantificação deste pico. Pelo espectro de UV, sugere-se que o pico com tempo de retenção (t_r) em 5 minutos seja a GUA, já que o composto tem absorção máxima em 246 nm (**Figura 3.4**).

Figura 3.3. Análise do aciclovir em coluna HILIC, fase móvel Formiato de Amônio 10mM / ACN (10 /90) pH = 3,2; detecção de 254 nm, vazão de 0,3 mL/min e temperatura do forno de 30°C.

Figura 3.4. Espectro em UV do analito com $t_r = 5$ minutos.

3.3.2.2 - Proporção da fase orgânica

Em um segundo teste, a proporção de ACN na fase móvel foi alterada para 93% para separar os picos adjacentes. Observou-se melhor separação entre os picos de interesse, porém a eluição do aciclovir está com cauda (**Figura 3.5**).

Figura 3.5. Análise do aciclovir em coluna HILIC, fase móvel tampão Formiato de Amônio 10mM / ACN (7/93) pH = 3,2, detecção de 254 nm, vazão de 0,3 mL/min e temperatura do forno de 30°C.

3.3.3.3 Escolha do pH

O aciclovir é uma molécula anfótera, com duas constantes de ionização: 9,2 (básica) e 2,2 (ácida), assim, dependendo do pH da dispersão em que o ativo se encontra, ele pode agir como ácido ou base fraca. A acidez do composto é proveniente da protonação do oxigênio ligado ao N1 do anel pirimídico, enquanto suas propriedades básicas estão em função do N9 do anel imidazólico.

O pH da fase móvel foi alterado para 5,6. Como resultado, obteve-se um pico mais estreito, porém com fator caudal 1,7 que ainda não é adequado para a validação da metodologia (**Figura 3.6**).

Figura 3.6. Análise do aciclovir em coluna HILIC, fase móvel tampão Formiato de Amônio 10mM / ACN (7 /93) pH = 5,6, detecção de 254 nm, vazão de 0,3 mL/min e temperatura do forno de 30°C.

De acordo com informações físico-químicas calculadas obtidas site chemicalize.org a molécula do aciclovir está na sua forma não ionizada em pH que compreende a faixa de 6 à 8. Consequentemente, nesta faixa, o fator de cauda deveria diminuir e os analitos provavelmente seriam eluídos no mesmo Tr, e não ocorreria o caso de alguns analitos ficarem retidos na coluna e outros serem eluídos.

O pH da fase móvel foi alterado 7,4 e a concentração do sal Formiato de Amônio aumentou para 100 mM, pois usando 10 mM, na prática a quantidade que realmente está passando pela coluna é 0,7 mM devido a proporção de 7% de fase aquosa na composição da fase móvel . Com o aumento do pH o objetivo era manter todas as moléculas do ACV na sua forma neutra para diminuir a cauda do pico do ACV. A **Figura 3.7** mostra o cromatograma com estas condições, na qual observa-se a separação dos picos aciclovir e guanina, como também uma acentuada melhora na simetria do pico aciclovir. A **Tabela 3.8** contém os valores dos parâmetros cromatográficos analisados para desenvolvimento da metodologia.

Tabela 3.8. Parâmetros cromatográficos da análise do aciclovir e guanina em coluna HILIC

	Aciclovir	Guanina
Resolução		8,2
Fator de cauda	1,2	1,3
Fator de separação		1,6
Número de pratos	7359,71	11070,10
Fator de capacidade	2,4	3,9

Figura 3.7. (a) Análise do aciclovir (20 $\mu\text{g/mL}$) e guanina em coluna HILIC, fase móvel tampão Formiato de Amônio 100mM / ACN (7 / 93) pH = 7,4, detecção de 254 nm, vazão de 0,3 mL/min **(b)** Espectro em UV do ACV. **(c)** Espectro do pico de pureza do ACV.

3.3.3 - Validação de metodologia analítica para determinação de aciclovir em formulações farmacêuticas

A metodologia usada neste experimento teve como fase móvel 100 mM de tampão Formiato de Amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm) Phenomenex, Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm e volume de injeção = 7 µL.

3.3.3.1 – Seletividade/ Especificidade

Para que o método seja considerado seletivo ele deve ser capaz de produzir uma resposta característica para o aciclovir mesmo frente a outros compostos estruturalmente semelhantes, a substâncias relacionadas ou mesmo a constituintes da matriz analisada.

Foram injetadas soluções de água, pré-mix, aciclovir padrão, pré-mix contaminado e produto farmacêutico. Assim, pode-se avaliar a existência de interferentes no tempo de retenção do aciclovir.

As análises de pré-mix puderam confirmar a ausência de picos que pudessem interferir na seletividade do método, isto é, não foi observado a presença de picos eluídos no tempo de retenção do aciclovir e guanina.

A **figura 3.8** mostra o cromatograma do placebo do aciclovir sobreposto com o cromatograma da solução padrão de aciclovir.

Figura 3.8. Sobreposição dos cromatogramas ACV e pré-mix em água para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de Formiato de Amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L, 20 mg/mL.

Figura 3.9. Sobreposição dos cromatogramas produto farmacêutico em água e pré-mix para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

O espectro de ultravioleta do aciclovir é representado na **Figura**

3.10, na qual tem absorção máxima em 253 nm

Figura 3.10. Espectro de UV do composto ACV na faixa de 180 – 800 nm.

Figura 3.11. Espectro de UV do composto GUA na faixa de 180 – 500 nm.

3.3.3.2 - Linearidade

As curvas analíticas obtidas indicaram correlação linear adequada entre a concentração do aciclovir e as áreas dos picos, numa faixa compreendida entre 0,011 mg/mL e 0,026 mg/mL.

Tabela 3.9. Concentrações da solução de aciclovir e respectivas áreas para obtenção das curvas analíticas do método por HPLC.

Solução	Média da concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média da Área
1	11,07	864233
2	13,89	1094855
3	17,06	1353153
4	19,93	1587098
5	23,01	1837667
6	26,03	2084851

A curva de calibração e os dados obtidos a partir dela estão mostrados, respectivamente na **Figura 3.12** e **Tabela 3.10**.

Tabela 3.10. Valores obtidos da curva analítica para a análise do Aciclovir por HPLC

Parâmetros da curva de calibração	Aciclovir
Coefficiente de correlação (r)	0,9995
Equação da reta ($y = ax + b$)	$y = 81552,3x - 38272,1$
Desvio padrão da regressão	0,063
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	11 – 26
Número de pontos	6

Figura 3.12. Curva analítica do composto aciclovir

O coeficiente de correlação dá informação sobre a qualidade da curva obtida, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos parâmetros da regressão linear, quanto mais próximo o valor for de 1,0. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado um ajuste ideal dos dados na regressão linear.

Todo o intervalo estudado entre 11 e 26 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se linear sob a investigação de um gráfico de resíduos (**Figura 3.13**). O teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear realizado pelo programa InStat 3.0 ®. A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, bem como não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F críticos no nível de 95% de confiança. Portanto, o método analítico desenvolvido possui faixa de linearidade entre as concentrações de ACV de 11 e 26 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 3.13. Gráfico de resíduos da linearidade do ACV

3.3.3.3 - Precisão

Os valores obtidos tanto para a precisão intra-dia como para inter-dias foram expressos em termos de desvio padrão relativo (%DPR). Em ambos

os caso a % DRP obtida foi menor que 5% em todas as concentrações avaliadas (14, 20 e 26 µg/mL), como apresentados na **Tabela 3.11**.

Tabela 3.11. Valores da concentração e DPR do aciclovir na avaliação da precisão intra-dia.e inter-dia.

Concentração (µg/mL)	Precisão Intra-dia DPR	Precisão Inter-dia DPR
14	0,37	0,797
20	0,034	0,543
26	0,057	0,457

3.3.3.4 - Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação. Os valores de padrão recuperado estão demonstrados na **Tabela 3.12**.

Tabela 3.12. Exatidão do método de quantificação de ACV: porcentagens de recuperação em três níveis (75, 100 e 125% da concentração de trabalho) e desvio padrão relativo.

Concentração (µg/mL)	Exatidão (%)
14	99,4
20	99,9
26	100,3
Média	99,9
DPR	0,45

Os valores da porcentagem recuperada estão entre 99 e 100%, e o desvio padrão relativo está abaixo de 2%, estando dentro das determinações

previstas por compêndios oficiais. Isso indica que o método proposto apresentou exatidão para a análise de aciclovir.

3.3.3.5 - Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) para o ACV foi estabelecido como sendo a concentração onde o pico dos fármacos foi três vezes superior ao ruído da linha de base, sendo de 50 ng/mL. O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido em um nível de 180 ng/mL, onde o DPR foi inferior a 2%.

Figura 3.14. Cromatograma para o estudo de limite de detecção para a molécula de ACV, fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), temperatura do forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

Figura 3.15. Cromatograma para o estudo de Limite de Quantificação para a molécula de ACV, Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

3.3.3.6 - Robustez

A mudança de temperatura de 30°C para 35°C alterou o tempo de retenção do pico do ACV (**Figura 3.16**). O pH não foi um parâmetro que exerceu uma influência significativa em área, resolução e tempo de retenção (**Figura 3.17**).

Figura 3.16. Sobreposição dos cromatogramas aciclovir padrão com o forno de colunas em temperatura 30°C e temperatura 35°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

Figura 3.17. Sobreposição dos cromatogramas aciclovir padrão com o pH da solução igual a 7,36 e 6,35. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

De acordo com a análise estatística realizada (Teste de Tuckey para uma classificação $p \leq 0,05$), não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as áreas de aciclovir obtidas a partir do método validado e os parâmetros cromatográficos deliberadamente modificados ($p > 0,05$). Os testes foram realizados no programa InStat 3.0.

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o método é robusto, em relação a pequenas e deliberadas alterações de temperatura da coluna e valor de pH.

3.3.3.7 - Recuperação

Este parâmetro foi calculado com o objetivo de se avaliar o preparo da amostra, que neste caso, foi a solubilização do comprimido em

água. A amostra, após ser solubilizada e filtrada, foi injetada em triplicata e a **tabela 3.13** mostra as áreas obtidas, como também o valor da recuperação. Os valores obtidos deram próximos a 100%, sendo assim, o analito presente na composição farmacêutica foi solubilizado pelo diluente.

Tabela 3.13. Valores de recuperação para ACV nas três concentrações avaliadas descritas.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
14	100,4
20	100,5
26	100,4

3.3.4 - Validação da metodologia analítica para determinação de guanina em formulações farmacêuticas

3.3.4.1 – Seletividade/Especificidade

O método se mostrou específico, pois nenhum pico eluiu no mesmo tempo de retenção da GUA.

A **Figura 3.18** mostra o cromatograma do placebo do aciclovir sobreposto com o cromatograma da solução padrão de aciclovir.

Figura 3.18. Sobreposição dos cromatogramas GUA e pré-mix em água para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de Formiato de Amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L, 20 mg/mL.

Figura 3.19. Sobreposição dos cromatogramas produto farmacêutico em água e pré-mix para identificar interferentes no mesmo Tr. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

Figura 3.20. Espectro de UV do composto GUA na faixa de 180 – 500 nm.

3.3.4.2 - Linearidade

A faixa de trabalho foi avaliada de 0,55 e 1,3 $\mu\text{g/mL}$. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,999, demonstrando haver uma correlação entre concentração e resposta obtida. Os resultados do estudo de linearidade estão representados na **Tabela 3.14**.

Tabela 3.14. Concentrações da solução de guanina e respectivas áreas para obtenção das curvas analíticas do método por HPLC.

Solução	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média da Área
1	0,541	42872
2	0,753	59139
3	0,840	65871
4	1,061	82815
5	1,131	88203
6	1,276	99379

A curva de calibração e os dados obtidos a partir dela estão mostrados, respectivamente na **Figura 3.21** e **Tabela 3.15**.

Figura 3.21. Curva de calibração do composto guanina.

Tabela 3.15. Resultados da curva de calibração obtidos para a análise de Guanina por HPLC.

Parâmetros da curva de calibração	Guanina
Coeficiente de correlação (r)	0,999
Equação da reta ($y = ax + b$)	$y = 76872,76x + 1272,83$
Desvio padrão relativo	0,27
Faixa de concentração (10^{-3} mg/mL)	0,55 – 1,3
Número de pontos	6

Todo o intervalo estudado entre 11 e 26 µg/mL mostrou-se linear sob a investigação de um gráfico de resíduos (**Figura 3.22**). O teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear. A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, bem como não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F críticos no nível de 95% de confiança. Portanto, o método analítico desenvolvido possui faixa de linearidade entre as concentrações de GUA de 0,55 e 1,3 µg/mL

Figura 3.22. Gráfico de Resíduos da análise de GUA.

3.3.4.3 - Precisão

O DPR obtido na avaliação da precisão intra-corrida e inter-corrida foram menores que 2% em todas as concentrações avaliadas. Estes resultados demonstram que o método desenvolvido possui uma precisão adequada.

Tabela 3.16. Valores de concentração e DPR% obtidos na avaliação da precisão intra-corrida e inter-corrida.

Concentração (µg/mL)	Precisão intra-corrida	Precisão inter-corrida
	DPR	DPR
0,7	0,169	0,740
1	0,162	0,608
1,3	0,092	0,548

3.3.4.4 - Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação. Os valores de padrão recuperado estão demonstrados na **Tabela 3.17**.

Tabela 3.17. Resultados da exatidão do método proposto para análise de GUA em comprimidos de ACV por HPLC.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
0,7	103,2
1	103,8
1,3	100,7
Média	103,6
DPR	1,36

Os valores da porcentagem recuperada estão entre 100 e 104%, e o desvio padrão relativo está abaixo de 2%, estando dentro das determinações previstas por compêndios oficiais. Isso indica que o método proposto apresentou exatidão para a análise de guanina.

3.3.4.5 - Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) para a GUA foi estabelecido como sendo a concentração onde o pico dos fármacos foi três vezes superior ao ruído da linha de base, sendo de 0,01 $\mu\text{g/mL}$. O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido em um nível de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, onde o DPR era menor que 2%.

Figura 3.23. Cromatograma para o estudo de Limite de Detecção para a molécula de GUA, Fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.

Figura 3.24. Cromatograma para o estudo de Limite de Quantificação para a molécula de GUA, fase móvel 100 mM de formiato de amônio (pH = 7,4) / ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.

3.3.4.6 - Robustez

O parâmetro temperatura alterou o tempo de retenção do pico da GUA (**Figura 3.25**). A mudança de pH exerceu pouca influência no método (**Figura 3.26**).

Figura 3.25. Sobreposição dos cromatogramas guanina padrão com temperatura de 30 e 35°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), vazão de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.

Figura 3.26. Sobreposição dos cromatogramas guanina padrão com o pH da solução igual a 7,36 e 6,35. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.

De acordo com a análise estatística realizada (Teste de Tuckey para uma classificação $p \leq 0,05$), não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as áreas de timina obtidas a partir do método validado e os parâmetros cromatográficos deliberadamente modificados ($p > 0,05$)

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o método é robusto, em relação a pequenas e deliberadas alterações de temperatura da coluna e valor de pH.

3.3.4.7 - Recuperação

Este parâmetro foi calculado com o objetivo de se avaliar o preparo da amostra, que neste caso, foi a solubilização do comprimido em água. A amostra, após ser solubilizada e filtrada, foi injetada em triplicata e a **Tabela 3.18** mostra as áreas obtidas, como também o valor da recuperação. Os valores obtidos deram próximos a 100%, sendo assim, o analito presente na forma farmacêutica foi solubilizado pelo diluente.

Tabela 3.18. Valores de recuperação para GUA nas três concentrações avaliadas.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
0,7	100,4
1	100,5
1,3	100,4

3.3.4.8 - Análise de Teor de Guanina em comprimido

Conforme descrito anteriormente, a Guanina é uma impureza de formação do aciclovir, então ela é encontrada mesmo na formulação padrão. De acordo com a Farmacopéia Americana, a quantidade de impureza presente em uma formulação farmacêutica deverá ser menor que 0,7% da massa de ativo na composição (USP, 2011).

A **Tabela 3.19** contém os valores de teores de guanina presentes nos comprimidos de aciclovir.

Tabela 3.19 Tabela com valores em área da quantidade de guanina presente na formulação farmacêutica.

	Área	Teor (%)
1	6037	0,38
2	5689	0,36
3	5451	0,34
Média	5725	0,36
DPR	5,1	5,5

A presença da Guanina na formulação do aciclovir pode ser observada na análise do cromatograma na **Figura 3.27**.

Figura 3.27. Cromatograma da formulação farmacêutica contendo o pico do aciclovir ($T_r = 5,3$ minutos) e guanina ($T_r = 7,6$ minutos). Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

3.4 Referências Bibliográficas

- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 29 maio 2003. 1-17.
- BRETNALL, A. E.; CLARKE, G. S. Validation of Analytical Test Methods. **Separation Science and Technology**, 10, 2011. 429-457.
- BURKE, S. Regression and Calibration. **LC GC Europe Online Supplement**, 2001. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/502001/4500/article.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2012.
- CASS, Q.. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.
- CHAN, D. et al. Screening method for the analysis of antiviral drugs in poultry tissues using zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 700, 2011. 194-200.
- CROWTHER, J. B. Validation of pharmaceutical test methods. **Separation Science and Technology**, 3, 2001. 415-443.
- HUBER, L. Applications of diode-array detection in HPLC. **Agilent Technologies**, v. 12, 2009.
- HUIDOBRO, A. L.; RUPEREZ, F. J.; BARBAS, C. LC methods for acyclovir and related impurities determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, 2005. 687 – 694.
- ICH. Validation of Analytical Procedures: text and methodology. **International Conference of Harmonization**, 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 07 setembro 2010.
- KARTAL, M. LC method for the analysis of 2paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 26, 2001. 857-864.
- KHAN, M. et al. Development and validation of a stability indicating HPLC method for simultaneous determination of four novel fluoroquinolone dimers as potential antibacterial agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 59, 2012. 162-166.
- LECOMTE, F. et al. Comparison of the quantitative performances and measurement uncertainty estimates obtained during method validation versus routine applications of a novel hydrophilic interaction chromatography method for the determination of

cidofovir in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 57, 2012. 153-165.

LISTER, A. S. Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. **Separation Science and Technology**, 6, 2005. 191-217.

RAO, R. N. et al. RP-HPLC separation and ESI-MS, ¹H, and ¹³C NMR characterization of forced degradants including process related impurities of carisbamate: Method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, In Press 2013.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Londres: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2006. p. 945.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the USP and the ICH. **Journal of Chromatography A**, 987, 2003. 57-66.

SHAH, Y. et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. **Journal of Chromatography B**, 879, 2011. 557-563.

SINHA, V. R. T. A. K. M. S. S. B. J. R. Stress Studies Acyclovir. **Journal of Chromatographic Science**, 45, 2007. 319-324.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley, 1997. 686-708 p.

USP, 3. **United States Pharmacopoeia**. Rockville, p. 233-237, 734-736. 2011.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 73, 2001. 1381-1386.

Estudo de Degradação
Forçada para o anti-víral
Aciclovir

“Really great people make you feel that you, too, can become great.”

Mark Twain

4.1 - Introdução

4.1.1– Produtos de degradação

A indústria farmacêutica deve garantir, por meios de testes de qualidade, que o medicamento seja seguro, eficaz e seja puro, como também deve controlar o processo de fabricação do mesmo, desde dos excipientes e ativos até o produto final formulado (RAMAN, 2009).

De acordo com as diretrizes do ICH (2003) um produto de degradação é definido como uma alteração química da molécula do(s) ativo(s) provocada por alterações ao longo do tempo e/ou por ação da: luz, temperatura, água, pH, ou por reagir com excipientes. Impureza é classificada como compostos que se formam durante reação de síntese, extração e purificação, como também solventes residuais, água, compostos inorgânicos e orgânicos presentes na composição do ativo (ICH, 2003).

Medicamentos degradados podem resultar em situações indesejáveis para o usuário, tais como: perda ou diminuição da eficácia, gerar efeitos tóxicos ou colaterais (TONNESEN, 2001); (TONNESEN, 1991).

4.1.2 - Estudo de Degradação Forçada como ferramenta para desenvolvimento de um Método Indicativo de Estabilidade.

O teste de degradação forçada é definido como o teste de estabilidade da substância e do medicamento em condições superiores àqueles usados para testes acelerados. Isto é, é um estudo designado a aumentar a degradação química ou física de uma substância ou produto

usando condições de estocagem exageradas (temperatura, umidade, luz, pH e oxidação) (ICH, 2003).

O estudo de degradação forçada mostra uma tendência de ser utilizado, pelas indústrias farmacêuticas, durante o planejamento e desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois o estudo da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens da formulação e também se há a necessidade de adição de protetores específicos e de acondicionamentos que, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto (SINHA, 2007).

Um dos principais objetivos do estudo de degradação forçada é que o método seja seletivo e específico para o princípio ativo, diferenciando-o de suas impurezas e de seus produtos de degradação. Este teste também fornece informações sobre os mecanismos de degradação e dos produtos formados que poderiam ser produzidos durante o tempo de estocagem (ICH, 2003) (RAMAN, 2009).

Tendo em vista a necessidade de garantir a confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos, é imprescindível a validação dos métodos. O processo de validação assegura a credibilidade do método no uso rotineiro, fornecendo evidências documentadas de que o método realiza o que é esperado, através da avaliação sistemática do procedimento analítico (RIBANI, 2004).

Embora os documentos de autoridades reguladoras definam o conceito de teste de estresse, eles não fornecem informações detalhadas sobre uma estratégia de como proceder com os ensaios. As condições experimentais para a realização do teste são descritas de um modo geral e os

detalhes (tempo de exposição, valor de pH, temperatura) de como se realizar o procedimento são insuficientes. Para cada ativo estudado normalmente é realizado um protocolo específico, pois esses testes dependem da natureza química da substância e do tipo de medicamento envolvido, isto é, da formulação, embalagem, entre outros (ICH, 2003) (FDA, 1998).

Fármacos degradados podem resultar em situações indesejáveis para o usuário, tais como: perda ou diminuição da potência, aumento da atividade e formação de efeitos tóxicos ou colaterais.

As reações mais comuns observadas são as reações de hidrólise e oxidação, devido à presença de umidade e oxigênio da atmosfera. No entanto, há outras reações de degradação como fotoquímicas, incompatibilidade com outros componentes da fórmula ou embalagem, entre outras. As reações de degradação podem ocorrer consecutivamente, como também ao mesmo tempo (BAERTSCHI, 2001).

As indústrias farmacêuticas realizam testes de estresse durante a pré-formulação do medicamento para auxiliar a seleção de compostos e excipientes para o desenvolvimento, com o objetivo de facilitar a seleção de sal ou de otimização de formulação, e produção de amostras para o desenvolvimento de uma metodologia analítica. O teste de degradação fornece informações sobre mecanismos e produtos de degradação majoritários. Esta informação pode ser utilizada, em seguida, para desenvolver processo de fabricação ou para selecionar a embalagem adequada (ALSANTE, MARTIN e BAERTSCHI, 2003).

O teste de degradação forçada é um componente crítico do desenvolvimento do fármaco, por gerar amostras chave, predizer informações

sobre a degradação que podem ser obtidas inicialmente no processo e pode ter um valor significativo para a companhia em termos de tempo e custos. Além disso, auxilia na seleção de medicamentos mais estáveis (ALSANTE, MARTIN e BAERTSCHI, 2003).

Geralmente, as condições de estresse são determinadas com base na experiência do cientista sênior ou baseiam-se em estudos de produtos anteriores. Por exemplo, o ICH informa o valor de temperatura, umidade, entre outros, porém não detalha por quanto tempo a amostra permanecerá reagindo para obter os produtos de degradação (KLICK, MUIJSELAAR, *et al.*, 2005).

Em janeiro de 2012, a ANVISA divulgou uma consulta pública, na qual trata de uma nova Resolução da Diretoria Colegiada (DRC) a ser criada para estabelecer parâmetros (temperatura, umidade, pH, oxidação e luz), elaborar o perfil da degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos formados em medicamentos com princípios ativos classificados como novos, genéricos e similares (ANVISA, 2012).

Os testes devem promover uma degradação razoável, isto é, uma degradação de 10 – 30% do ativo (ALSANTE, FRIEDMANN, *et al.*, 2001) (ALSANTE, MARTIN e BAERTSCHI, 2003). Na ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco é considerado estável. Se a degradação for menor que 10% deve -se aumentar as condições de estresse (BAERTSCHI, 2001). A ANVISA sugere que novos medicamentos como também medicamentos para registro façam os seguintes testes (ANVISA, 2012)

Tabela 4.1. Condições experimentais para a realização do estudo de degradação forçada

Aquecimento	60°C
Umidade	75% UR ou mais
Solução Ácida	pH = 2,0
Solução Básica	pH = 10 – 12
Fotólise	UV-B fluorescente
Solução Oxidativa	3% H ₂ O ₂
Íons metálicos	0,05M Fe ⁺² ou Cu ⁺²

A necessidade de identificação, notificação e qualificação dos produtos de degradação no decorrer do estudo deve ser avaliada de acordo com as tabelas a seguir:

Tabela 4.2. Valores de limites (em %) obtido para que o produto de degradação seja notificado de acordo com a dose máxima diária do medicamento.

Dose máxima diária ⁽¹⁾	Limites ^(2,3)
≤ 1g	0,1%
> 1g	0,05%

Caso o valor (em %) do produto de degradação ultrapasse o limite aceitável pelos órgãos reguladores, este deverá ser reportado (ANVISA, 2012).

Tabela 4.3. Valores de limites(em %) obtido para que o produto de degradação seja identificado de acordo com a dose máxima diária do medicamento.

Dose máxima diária ⁽¹⁾	Limites ^(2,3)
< 1mg	1,0% ou 5µg TDI, o que for menor
1mg – 10mg	0,5% ou 20µg TDI, o que for menor
> 10mg – 2g	0,2% ou 2mg TDI, o que for menor
> 2g	0,1%

Caso o valor (em %) do produto de degradação ultrapasse o limite aceitável pelos órgãos reguladores, este deverá ser identificado (ANVISA, 2012).

Tabela 4.4. Valores de limites (em %) obtido para que o produto de degradação seja qualificado de acordo com a dose máxima diária

Dose máxima diária ⁽¹⁾	Limites ^(2,3)
< 10mg	1,0% ou 50µg TDI, o que for menor
10mg – 100mg	0,5% ou 200µg TDI, o que for menor
> 100mg –	0,2% ou 3mg TDI, o que for menor
> 2g	0,15%

1- Quantidade do fármaco administrado por dia.

2- Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do fármaco ou como a ingestão total diária (TDI) de um produto de degradação. Baixos limites podem ser considerados apropriados caso o produto de degradação não seja tóxico.

3- Limites elevados devem ser cientificamente justificados.

A qualificação de um medicamento é um processo que irá estabelecer a segurança biológica de um produto de degradação individual ou de um perfil de degradação de um produto no limite especificado (ANVISA, 2012).

4.1.3 - Degradação forçada em ambientes ácido/ básico

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação (WATERMAN, ADAMI, *et al.*, 2002), estando presente em muitos fármacos, como por exemplo, os hidratos, e em muitos excipientes (BAERTSCHI, 2001). Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons H^+ e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ANSEL, POPOVICH e ALLEN-JR, 2007).

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição (SILVA, ALVES, *et al.*, 2009). As reações de ácido/base devem ser iniciadas com temperatura ambiente e na ausência de luz. O calor deve ser evitado sempre que possível, porque isto introduz uma segunda variável. Porém, caso nenhuma degradação seja observada em temperatura ambiente, então, esta pode ser aumentada (BAERTSCHI, 2001)

Os grupos funcionais susceptíveis para reagir nestes ambientes são: amidas (lactâmicos), ésteres (lactonas), carbamatos, imidas, iminas, álcoois e aminas arila (ALSANTE, FRIEDMANN, *et al.*, 2001).

4.1.4 - Degradação forçada com temperatura e temperatura/umidade

A degradação térmica é geralmente definida como uma degradação causada pela exposição a altas temperaturas sem induzir a pirólise (BAERTSCHI, 2001).

De acordo com as condições de estresse térmico/umidade, as amostras são colocadas em estufas apropriadas. Essas estufas atingem 70°C/75% UR.

Dois testes são realizados, um teste é para avaliar somente o efeito da temperatura sobre o ativo, na qual o composto é exposto a temperaturas maiores que 60 °C. O outro ensaio é realizado para avaliar o efeito da umidade no ativo, colocando-se soluções saturadas de sal (NaCl) que pode ser usado como controle de precisão de umidade, para obter uma umidade relativa de 75% (BAERTSCHI, 2001).

4.1.5 - Degradação forçada oxidativa

As reações de degradação oxidativa são uma das reações de degradação mais comuns em mecanismos de degradação. A principal fonte de produtos de degradação oxidativa de fórmulas farmacêuticas é a reação da substância e/ou medicamento com oxigênio molecular (CARSTENSEN, 1995).

A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia que procedem lentamente sob a influência

do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação (SILVA, ALVES, *et al.*, 2009).

Grupos funcionais que são suscetíveis a sofrer oxidação são: heteroátomos (nitrogênio: N-óxidos e enxofre: sulfóxidos e sulfonas), compostos benzílicos, aldeídos e cetonas (ALSANTE, FRIEDMANN, *et al.*, 2001).

4.1.6 - Degradação forçada fotolítica

A exposição a luz pode induzir degradação química em moléculas suscetíveis (ICH, 1997) (TONNESEN, 2001). O objetivo do estudo é forçar a degradação da substância via exposição a luz por um tempo suficiente para determinar produtos de degradação primários. As faixas do UV e visível (normalmente de 300 a 800 nm) são as que oferecem mais energia eletromagnética para que ativo e outros produtos sejam expostos (BAERTSCHI, 2001).

Os grupos funcionais suscetíveis para sofrer reação fotolítica são: nitroaromáticos, carbonilas, N-óxido, alcenos, cloreto de arila, ligação fraca C – H e O – H, sulfetos e polienos (ALSANTE, FRIEDMANN, *et al.*, 2001) (ALSANTE, MARTIN e BAERTSCHI, 2003).

Os testes sob ação da luz são conduzidos diretamente no ativo e/ou com este em solução/suspensão e têm por base as condições de exposição sugeridas pelo guia ICH Q1B para a realização de testes de fotoestabilidade (exposição total de pelo menos 1,2 milhões lux.hr de luz visível e 200watt.hr/m² de luz ultra-violeta próximo) (ICH, 1997).

4.1.7 – Equipamentos utilizados na análise de produtos de degradação

Ao desenvolver um método indicativo de estabilidade deve-se considerar três aspectos: a amostra, a técnica de separação e o detector. A amostra deve estar entre o pior caso de degradação e o mais próximo da realidade, contendo o maior número de impurezas e produtos de degradação (DOLAN, 2002).

O método indicativo de estabilidade deve ser capaz de separar os produtos de degradação, detectar compostos em baixas concentrações e se possível identificá-los estruturalmente. Porém, uma só técnica não é suficiente para atender as exigências (detectar e identificar), sendo necessário a utilização de mais de uma ferramenta. As técnicas de cromatografia líquida acoplada ao detector DAD (arranjo de fotodiodos), cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear constituem importantes ferramentas para a elucidação estrutural dos produtos de degradação (REYNOLDS, FACCHINE, *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida acoplada a diferentes detectores é a mais utilizada, pois é capaz de detectar impurezas e/ou produtos de degradação em baixas concentrações. A cromatografia gasosa com diferentes detectores também pode ser utilizada, no entanto, é mais limitada a compostos voláteis e restrita a ativos e produtos de degradação e/ou impurezas com essas características. Particularmente, com relação à cromatografia líquida de alta eficiência com detector DAD, esta técnica analítica é amplamente utilizada para avaliação da pureza dos fármacos em análise quantitativa e qualitativa. Permite

a separação de possíveis impurezas, como produtos de degradação e intermediários de síntese, auxiliando na sua identificação ((REYNOLDS, FACCHINE, *et al.*, 2002). Outros detectores (fluorescência, espalhamento de luz e espectrômetro de massas) são utilizados para complementar a análise auxiliando na identificação de impurezas e produtos de degradação e possível elucidação estrutural.

A técnica de LC-MS se destaca por suas características de especificidade, rapidez, precisão e exatidão da análise, além da sensibilidade para detecção de traços de produtos de degradação formados, característica esta que não é observada quando se utiliza o método por HPLC acoplado ao detector tipo DAD. Pode ser aplicada para determinar a estabilidade de um produto farmacêutico, estabelecendo seu perfil de degradação com informações mais estruturais mais detalhadas que o detector DAD (DARRINGTON e JIAO, 2004). Na área farmacêutica, a importância da técnica de LC-MS é justificada por suas inúmeras aplicações, dentre elas a identificação de novos compostos, a detecção de impurezas em produtos sintéticos e formulações (NIESSEN, 1998).

4.2 Experimental

Os testes foram realizados em solução de aciclovir, amostra de comprimido, pré-mix e branco (solução em que padrão e comprimido foram solubilizados: água, NaOH, HCl, H₂O₂). Em cada modo de degradação, as amostras foram também expostas ao calor (70 °C) e à temperatura ambiente

(25°C), todos mantidos em agitação por um período até o ACV degradar de 20 – 30% (SINHA, 2007).

4.2.1 – Degradação forçada em ambiente ácido

Para a degradação em meio ácido, inicialmente foram realizados testes em soluções de 0,5 mol/L de HCl, posteriormente em soluções de 1 mol/L de HCl.

Solução padrão estoque de aciclovir: aproximadamente 10 mg de aciclovir foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizados em uma solução de HCl (0,5 e 1 mol/L). O volume foi completado com a mesma solução de modo a obter uma concentração final de 1 mg/mL. Essas soluções foram mantidas em temperatura ambiente e 70°C, sob agitação para a seguir serem aliqüotadas.

Solução trabalho de aciclovir: foram retiradas alíqüotas de 100 µL da solução estoque e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se NaOH para ajuste de pH e completou-se o volume do balão com fase móvel, tendo uma concentração final de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e injetada no HPLC.

Formulação farmacêutica: pesou-se 5 comprimidos, tirou-se a média desse peso ($m = 502,54$ mg). Os comprimidos foram macerados, em um cadinho e pistilo, e o peso médio foi pesado em duas réplicas e transferidos para um balão de 200 mL. Adicionou-se solução de HCl (0,5 e 1 mol/L) e a solução foi submetida a ultra-som de banho por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma concentração final de 1

mg/mL. Essas soluções foram mantidas em temperatura ambiente e 70 °C, sob agitação para a seguir serem aliqüotadas.

Solução trabalho da formulação farmacêutica: foram retiradas aliqüotas de 100 µL e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e analisada por HPLC.

4.2.2 – Degradação forçada em ambiente alcalino

O procedimento experimental (preparo das amostras e temperatura de reação) foi o mesmo descrito no item 4.2.1, porém, os sólidos foram solubilizados em uma solução de NaOH 1 mol/L e o pH foi ajustado com uma solução de HCl 1 mol/L.

4.2.3 – Degradação forçada em ambiente oxidativo

O procedimento experimental (preparo das amostras e temperatura de reação) foi o mesmo descrito no item 4.2.1, porém, os sólidos foram solubilizados em uma solução de H₂O₂ 3%

4.2.4 – Degradação fotolítica

O estudo foi realizado em colaboração com o Dr. Giordano Trazzi (da indústria farmacêutica Eurofarma®) que realizou o experimento na câmara de fotoestabilidade 424/CF (Ehik Technology). As amostras ficaram expostas

por 50 horas, totalizando uma exposição superior a 1,2Mlux.h registrada no luxímetro e 0,5ABS no teste actinométrico de quinino. Estando dentro dos parâmetros exigidos pelo ICH (ICH, 1997)

O procedimento experimental utilizado nesse teste tem por objetivo avaliar se a luz UV pode degradar o ACV em diferentes estados: sólido, em solução, no formato do comprimido e envolto no blíster.

Sólidos:

- Pesou-se 10 mg do ACV em balão de 10 mL envolto em papel alumínio (controle escuro).
- Pesou-se 10 mg do ACV em balão de 10 mL (amostra exposta)
- Pesou-se 25 mg do comprimido macerado (peso equivalente a 10 mg de ACV) em balão de 10mL envolto em papel alumínio (controle escuro)
- Pesou-se 25 mg do comprimido macerado (peso equivalente a 10 mg de ACV) em balão de 10mL (amostra exposta).
- Pesou-se 25 mg do pré-mix em balão de 10 mL envolto em papel alumínio (controle escuro).
- Pesou-se 25 mg do pré-mix em balão de 10 mL (amostra exposta).

O sólido foi solubilizado em água até completar o volume de 10 mL (concentração 1 mg/mL), foram retiradas alíquotas de 100 µL e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e injetada no HPLC.

Em solução:

- Pesou-se 10 mg do ACV diluído em 5 mL de água em balão de 10 ml envolto em papel alumínio (controle escuro).

- Pesou-se 10 mg do ACV diluído em 5 mL de água em balão de 10 mL envolto em papel alumínio (controle escuro)..
- Pesou-se 25,2 mg do comprimido macerado (peso equivalente a 10 mg de ACV) diluído em 5 mL água em balão de 10mL envolto em papel alumínio (controle escuro).
- Pesou-se 25,2 mg do comprimido macerado (peso equivalente a 10 mg de ACV) diluído em 5 mL de água em balão de 10mL (amostra exposta).
- Pesou-se 25,2 mg do pré-mix em balão de 10mL diluído em 5 mL de água envolto em papel alumínio (controle escuro).
- Pesou-se 25,2 mg do pré-mix diluído em 5 mL de água em balão de 10mL (amostra exposta).

O volume do balão foi completado com água (concentração da solução igual a 1 mg/mL) , foram retiradas alíquotas de 100 μ L e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e injetada no HPLC.

Comprimido:

- Cinco comprimidos íntegros foram envoltos em papel alumínio (controle escuro).
- Cinco comprimidos íntegros (amostra exposta).

Os comprimidos foram pesados, em grupos separados: controle escuro e amostra exposta. Foram macerados, pesou-se o peso médio deles ($m = 492,71$ mg), e eles foram transferidos para um balão de 200 mL e adicionou-se água (concentração da solução igual a 1 mg/mL). Foram retiradas alíquotas de 100 μ L e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas

com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e injetada no HPLC.

Blister:

- Os comprimidos ainda no blister foram envoltos em papel alumínio (controle escuro).
- Os comprimidos ainda no blister foram expostos a luz.

Os comprimidos foram pesados, em grupos separados: controle escuro e amostra exposta. Foram macerados, pesou-se o peso médio deles ($m = 487,93$ mg), e eles foram transferidos para um balão de 200 mL e adicionou-se água (concentração da solução igual a 1 mg/mL). Foram retiradas alíquotas de 100 μ L e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e injetada no HPLC

4.2.5 – Degradação Térmica

Este estudo foi realizado em parceria com o laboratório de Controle de Qualidade da UNESP sob responsabilidade da Professora Dra. Hérica Salgado, na qual foi utilizada a estufa de incubação e refrigeração WTB Binder Labortechnik GmbH Postfach 102-78502.

Pesou-se uma massa de 100 mg de ACV em uma placa de Petri, na qual foi colocada na estufa por 14 dias, e durante este período, amostras diárias de 10 mg de ACV foram pesados, transferidos para um balão de 10 mL e diluídos em água (concentração da solução = 1 mg/mL). Foram retiradas alíquotas de 100 μ L e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e

completadas com fase móvel, tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e analisada por HPLC.

Foram pesados 3 comprimidos íntegros, retirou-se o peso médio deles ($m=503,49$ mg), os comprimidos foram macerados e colocados na placa de Petri. Durante este período, amostras diárias de aproximadamente 25 mg de comprimido (peso equivalente a 10 mg de ACV) foram pesados, transferidos para um balão de 10 mL e completado o volume com água. Foram retiradas alíquotas de 100 μ L e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e completadas com fase móvel (solução de formiato de amônio 10 mmol/L, pH = 7,4 e ACN), tendo uma concentração final de trabalho de 0,020 mg/mL. A solução foi filtrada e analisada por HPLC

O teste com o pré-mix foi realizado de acordo com o procedimento acima descrito para o produto farmacêutico.

4.2.6 – Degradação em ambiente úmido

O preparo das amostras foi realizado de acordo com o item 4.2.5 e utilizada a mesma estufa, no entanto foi preparado uma solução saturada de NaCl para garantir a umidade de 75%, na qual foi medida por um higrômetro.

4.3 – Resultados e Discussão

4.3.1 - Meio Ácido

Não existe um padrão para a realização desses estudos. Na ausência de procedimentos, dificuldades são enfrentadas pelos profissionais, ao decidir sobre as condições de estresse a serem utilizadas para um novo fármaco. Alguns estudos, como o realizado por Singh (2000) propõem um sistema para a classificação de fármacos, tomando como base o comportamento da estabilidade de fármaco diante de variações nas condições submetidas (AULTON, 2005).

O primeiro teste de degradação realizado foi em meio ácido; aciclovir (SQR), fórmula farmacêutica e pré-mix foram solubilizados em soluções de 0,5 e 1,0 mol/L de HCl. As soluções foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) e temperatura de 70°C com agitação (SINHA, 2007) e aliquoteados em tempos.

4.3.1.1.Degradação ácida com concentração de 0,5 mol/L

De acordo com Sinha (2007), o aciclovir degrada facilmente em ambientes ácidos e por isso o teste inicial foi realizado com uma concentração de 0,5 mol/L de HCl.

As amostras (ACV, comprimido e pré-mix) foram injetadas no tempo zero hora para saber o perfil cromatográfico da mesma (presença de impurezas referentes ao HCl ou NaOH a fim de que não fossem confundidos com picos de produtos de degradação) e cálculo da área do pico de interesse.

O estudo de estresse do fármaco em meio ácido (solução de 0,5 mol/L de HCl) em temperatura ambiente, após um período de 12 dias foi possível observar o decaimento de 30% do teor de ACV presente no

medicamento como também na SQR (**Figura 4.1**). No $T_r = 3,5$ minutos há a formação de um produto de degradação proveniente da degradação ácida, com espectro em UV mostrado na **Figura 4.2**, com absorção máxima de 260 nm.

O produto de degradação em $T_r = 3,5$ minutos possui uma polaridade menor que o ACV, já que na coluna HILIC os compostos que são eluídos primeiramente são mais apolares que os demais.

Figura 4.1. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 0,5 mol/L sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise = 12 dias

Figura 4.2. Espectro em UV do produto de degradação com $T_r = 3,5$ minutos com faixa entre 200-800 nm.

A **Figura 4.3** contém a sobreposição dos cromatogramas obtidos no tempo zero e após 12 dias de reação. Observa-se que houve um aumento significativo da área da GUA (considerado como produto de degradação majoritário para a degradação em ambientes ácidos), diminuição da área do ACV e surgimento de outro produto de degradação (em $T_r = 3,5$ minutos).

Figura 4.3. Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em HCl 0,5 mol/L sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio pH = 7,4/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise: 12 dias () e zero hora ().

A **Figura 4.4** mostra o gráfico com os valores de área do ACV e da GUA em relação ao tempo, na qual observa-se que conforme o ACV foi sendo degradado, houve a formação da GUA.

Figura 4.4. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (0,5 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em horas) durante 12 dias, em temperatura ambiente.

A temperatura pode ser usada concomitantemente com outros fatores, dada a sua capacidade de acelerar as reações de degradação (NUDELMAN, 1975). Quando a solução do ACV e comprimidos foram mantidos em temperatura de 70 °C, a degradação do ACV foi mais rápida, na qual em 3 horas o ativo degradou 30% do seu valor inicial. Apesar de utilizar a temperatura para acelerar o processo de degradação, não foi identificado a formação do produto de degradação no $T_r = 3,5$ minutos como foi observado na **Figura 4.5**.

Figura 4.5. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 0,5 mol/L sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 3 horas.

O gráfico da **Figura 4.6** mostra que a temperatura acelera a degradação do ACV em ambientes ácidos, sendo uma degradação mais intensa do que a degradação realizada em temperatura ambiente.

Figura 4.6. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (0,5 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em horas) durante 3 dias, em temperatura de 70°C.

4.3.1.2. Degradação ácida com concentração de 1,0 mol/L

O ACV (SQR), comprimido e pré-mix foram solubilizados em solução de 1,0 mol/L de HCl para verificar como o aumento da força do ácido influencia na degradação do ACV, qual o tempo necessário para que o ativo degrade 30% e se surge produtos de degradação diferentes do já identificado anteriormente (com concentração de 0,5 mol/L de HCl).

As soluções mantidas em temperatura ambiente tiveram 30% de degradação do ACV após 3 dias e a formação do produto de degradação em $T_r = 3,5$ minutos (**Figura 4.7**) e um novo produto de degradação com $T_r = 5,4$ minutos, com espectro de absorção em UV na **Figura 4.8**. O pH das amostras foram mantido em 7,0 em todas as aliquotagens.

Figura 4.7. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 1,0 mol/L sob agitação em temperatura = 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 3 dias.

Figura 4.8. Espectro em UV do produto de degradação com $T_r = 5,4$ minutos, em HCl 1,0 mol/L, com faixa entre 200-800 nm

Figura 4.9. Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em 1mol/L de HCl sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise: zero hora (—) e 3 dias (—).

A **Figura 4.10** mostra o perfil da degradação em relação ao tempo (em horas), na qual foram necessários 3 dias para que o ACV fosse degradado em temperatura ambiente.

Figura 4.10. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (1,0 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em horas) durante 3 dias, em temperatura ambiente.

As soluções que foram mantidas em temperatura de 70 °C tiveram uma intensa degradação, na qual foram precisos apenas 40 minutos de reação para que o ACV degradasse 30% do seu teor (**Figura 4.11**).

Figura 4.11. Cromatograma da solução de ACV padrão em HCl 1,0 mol/L sob agitação em temperatura = 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 40 minutos.

Figura 4.12. Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em 1 mol/L de HCl sob agitação em temperatura de 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise: zero hora (—) e 40 minutos (—).

Neste teste não foi detectada a formação do produto de degradação com $T_r = 3,5$ minutos e o tempo para que 30% do ACV fosse degradado foi menor que no teste realizado com temperatura ambiente.

Figura 4.13. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em condições ácidas (1,0 mol/L), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em minutos) durante 40 minutos, em temperatura de 70°C.

4.3.1.3 Degradação em ambientes alcalinos.

O estudo de estresse do fármaco em meio alcalino, em temperatura ambiente e temperatura de 70°C, após 14 dias de reação não foi observado diminuição do teor do ACV para ambas as amostras: SQR e comprimido, além disso não foi observado nem formação de precipitado durante o período analisado (**Figura 4.14**). Assim, o ACV mostrou-se estável quando exposto em ambientes com pH básico.

Figura 4.14. Cromatograma da solução de ACV padrão em NaOH 1,0 mol/L sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93) pH= 7,4, coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.

Figura 4.15. Sobreposição dos cromatogramas de análise de solução de ACV padrão em 1mol/L de NaOH sob agitação em temperatura ambiente. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93) pH = 7,4, coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L. Tempo de análise: 14 dias (—) e zero hora (—).

4.3.1.4 Degradação Oxidativa

A estabilização do fármaco frente a condições oxidativas envolve a prevenção do mesmo durante a manufatura e estocagem. No entanto, o oxigênio presente em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono e a temperatura reduzida para não acelerar a reação.

As amostras de ACV (SQR), medicamento e pré-mix foram solubilizadas em soluções de H₂O₂ 3% e mantidas em temperatura de 25°C e 70 °C.

Após 7 dias de reação, em agitação e temperatura ambiente, foi observado dois picos de produtos de degradação (em Tr iguais a 8,5 e 11,5 minutos) e foi o tempo necessário para que o teor do ACV diminuísse 28%

(Figura 4.16). O pico com Tr referente a 2,0 minutos é da solução de H_2O_2 e está presente também no branco (Figura 4.17).

Figura 4.16. Cromatograma da solução de ACV padrão em H_2O_2 sob agitação em temperatura = 25°C . Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93) pH = 7,4, coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, $3\mu\text{m}$), Temperatura do Forno = 30°C , fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL . Tempo de análise = 7 dias.

Figura 4.17. Cromatograma da solução de pré-mix em H_2O_2 sob agitação em temperatura = 25°C . Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93) pH = 7,4, coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, $3\mu\text{m}$), Temperatura do Forno = 30°C , fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL . Tempo de análise = 7 dias

Figura 4.18. Ampliação do cromatograma da solução de ACV padrão em H_2O_2 3% sob agitação em temperatura = 25°C . Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93) pH = 7,4, coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, $3\mu\text{m}$), Temperatura do Forno = 30°C , fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL . Tempo de análise = 7 dias.

A **Figura 4.19 e 4.20** está demonstrado os espectros em UV dos produtos de degradação referentes ao Tr respectivamente.

Figura 4.19. Espectro em UV do produto de degradação com Tr = 8,5 minutos, em solução de H_2O_2 3%, com faixa entre 200-800 nm

Figura 4.20. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 11,5 minutos, em solução de H₂O₂ 3%, com faixa entre 200-800 nm.

A **Figura 4.21** mostra o gráfico de decaimento do ACV em relação ao tempo, na qual após 12 horas de reação o ACV degradou 6% e após 7 dias 72%. Um ponto importante observado nesta degradação foi que a GUA não é o produto de degradação majoritário, isto é, o valor da GUA manteve-se o mesmo durante o período de reação; enquanto que na degradação ácida, a GUA era gerada enquanto ocorria a reação do ACV com o HCl.

Figura 4.21. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em ambientes oxidativos (H₂O₂ 3%), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em minutos) durante 7 dias, em temperatura de 25°C.

O teste realizado colocando as amostras solubilizadas de ACV (SQR), comprimido e pré-mix em H_2O_2 em temperatura de 70°C , mostrou que foi preciso apenas de 5 horas para que o ACV fosse degradado a 71%. Houve a formação apenas de um produto de degradação com Tr igual a 8 minutos (**Figura 4.22**) e espectro de UV com absorção máxima na **Figura 4.24**. Nesse caso, a área da GUA também permaneceu inalterada durante o tempo de reação em que foram aliqotados.

Figura 4.22. Cromatograma da solução de ACV padrão em H_2O_2 sob agitação em temperatura= 70°C . Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, $3\mu\text{m}$), Temperatura do Forno = 30°C , fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL . Tempo de análise = 5 horas.

Figura 4.23. Ampliação do cromatograma da solução de ACV padrão em H_2O_2 3% sob agitação em temperatura = 70°C . Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, $3\mu\text{m}$), Temperatura do Forno = 30°C , fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μL . Tempo de análise = 5 horas.

Figura 4.24. Espectro em UV do produto de degradação com $T_r = 8,5$ minutos, em solução de H_2O_2 3%, com faixa entre 200-800 nm..

Figura 4.25. Gráfico obtido com a degradação forçada do ACV (SQR) em ambientes oxidativos (H_2O_2 3%), relação das áreas do ACV e GUA pelo tempo (em minutos) durante 5 horas, em temperatura de 70°C .

4.3.1.5. Degradação em hidrólise neutra

Amostras de ACV (SQR), comprimido e pré-mix foram solubilizados em água Milli-Q e mantidos sob agitação, em temperatura ambiente e temperatura de 70°C por 14 dias.

O comprimido mantido sob agitação, em temperatura ambiente, gerou um produto de degradação com $\text{Tr} = 6,3$ minutos (**Figura 4.26**) e com espectro de UV com máxima absorção em 247 nm (**Figura 4.27**) após 14 dias de análise.

Figura 4.26. Cromatograma da solução de comprimido em água sob agitação em temperatura= 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.

Figura 4.27. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 6,3 minutos, em água por 14 dias em temperatura ambiente, com faixa entre 200-800 nm

Apesar da GUA possuir também absorção máxima, na região do UV, em 246nm; ao sobrepor o espectro do produto de degradação 1 (referente a degradação neutra) com o espectro da GUA padrão, observa-se que o perfil espectral de ambos são diferentes. (**Figura 4.28**)

Figura 4.28. Sobreposição dos espectros em UV do produto de degradação com $T_r = 6,3$ minutos, em água por 14 dias em temperatura ambiente e do espectro de UV padrão de GUA, com faixa entre 200-800 nm

O estudo de degradação neutra realizado em ACV (SQR) não gerou o produto de degradação encontrado no teste em comprimidos. A **Figura 4.29** mostra somente o pico do ACV detectado em 5,5 minutos.

Figura 4.29. Cromatograma da solução de ACV (SQR) em água sob agitação em temperatura = 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias

Adicionalmente, o produto de degradação encontrado no comprimido não foi detectado na amostra de pré-mix que foi mantida sob as mesmas condições do medicamento e do ACV (**Figura 4.30**)

Figura 4.30. Cromatograma da solução de pré-mix em água sob agitação em temperatura = 25°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias

O estudo de degradação em água também foi realizado em temperatura de 70 °C, na qual o pico do produto de degradação detectado em 6,3 minutos também foi encontrado na solução do comprimido (**Figura 4.31**), porém não foi detectado na solução de ACV (SQR) (**Figura 4.32**)

Figura 4.31. Cromatograma da solução de comprimido em água sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.

Figura 4.32. Cromatograma da solução de ACV (SQR) em água sob agitação em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL. Tempo de análise = 14 dias.

4.3.1.6.Degradação Fotolítica

O estudo de degradação forçada expondo ACV (SQR), comprimido e pré-mix em uma câmara de luz apropriada para este teste, não gerou produtos de degradação detectados pelo DAD.

Após a exposição do comprimido, em estado sólido e macerado, a **Figura 4.33** mostra o cromatograma da análise, na qual não foi observada alteração no cromatograma e nem observado pico que pudesse ser um produto de degradação. Houve uma mudança na cor do comprimido após a exposição, antes a sua cor era azulada e após tornou-se esbranquiçada.

Figura 4.33. Cromatograma da solução de comprimido sólido macerado após exposição a luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

Outro teste realizado foi diluir amostras de comprimido, ACV (SQR) e pré-mix em água e coloca-los dentro da câmara para exposição à luz. Novamente não foi observado nenhum pico interferente (**Figura 4.33**)

Figura 4.33 a. Cromatograma da solução de comprimido diluído em H₂O após exposição à luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 µL.

As análises realizadas no HPLC não detectaram picos de produtos de degradação e nem queda do teor do ACV durante o estudo de degradação quando o comprimido foi exposto de forma íntegra, isto é, sem macerar (**Figura 4.34**). Nesse estudo a coloração do comprimido não sofreu alteração.

Figura 4.34. Cromatograma da solução de comprimido íntegro após exposição à luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

O último teste realizado para degradação fotolítica foi expondo o comprimido envolto pelo blister na luz UV, porém este teste também não gerou produto de degradação. (**Figura 4.35**)

Figura 4.35. Cromatograma da solução de comprimido em blister após exposição à luz UV em câmara fotolítica. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 7 μ L.

4.3.1.7 Degradação Térmica

A exposição do comprimido, ACV (SQR) e pré-mix em uma câmara climática com temperatura de 70°C por um período de 14 dias gerou um produto de degradação com $T_r = 9,2$ minutos. (**Figuras 4.36 e 4.37**). Este pico foi detectado apenas no tempo de 14 dias.

Figura 4.36. Cromatograma da solução de comprimido macerado em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3 μ m), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 4 μ L. Tempo de análise = 14 dias.

Figura 4.37. Ampliação do cromatograma da solução de comprimido macerado em temperatura= 70°C. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 4 µL. Tempo de análise = 14 dias

Pelo espectro de UV pode-se observar que apesar dos Tr serem próximos, o produto de degradação detectado na Figura é diferente do produto de degradação obtido com a degradação neutra. Neste caso, ele tem absorção máxima em 317 nm e no estudo da hidrólise tem 247 nm (**Figura 4.38**).

Figura 4.38. Espectro em UV do produto de degradação com Tr= 9,2 minutos, em câmara climática com temperatura de 70°C, com faixa entre 200-800 nm

4.3.1.8. Degradação em ambientes Úmidos

O estudo de degradação com umidade causou mudança na cor do comprimido, antes tinha uma coloração azul e após 14 dias de experimento a sua coloração tornou-se esbranquiçada (**Figura 4.39**).

Figura 4.39. Foto do experimento de degradação úmida realizado com ACV (SQR), comprimido e pré-mix após 14 dias, com temperatura de 70°C e umidade de 75%.

O produto de degradação encontrado neste teste forçado possui $T_r = 9,2$ minutos (**Figura 4.40**) e sugere-se ser o mesmo que o obtido com a degradação térmica (**Figura 4.37**) devido aos T_r iguais e comprimento de onda com máxima absorção em 320 nm (**Figura 4.41**).

Figura 4.40. Ampliação do cromatograma da solução de comprimido macerado em temperatura= 70°C e umidade de 75%. Fase móvel 100 mM de formiato de amônio/ ACN (7/93), coluna HILIC Luna (150 x 2 mm, 3µm), Temperatura do Forno = 30°C, fluxo de 0,3 mL/min, detecção em 254 nm, e volume de injeção = 4 µL. Tempo de análise = 14 dias

Figura 4.41. Espectro em UV do produto de degradação com $T_r = 9,2$ minutos, em câmara climática com temperatura de 70°C e UR 75%, com faixa entre 200-800 nm.

A tabela contém um resumo das condições em que foram obtidos os produtos de degradação.

Condições	Degradou	Produtos de Degradação formados
Ácido	Sim	GUA, PD1 e PD2
Peróxido de Hidrogênio	Sim	PD3 e PD4
Neutra	Sim	PD5
Temperatura	Sim	PD6
Umidade	Sim	PD6
Fotolítica	Não	_____
Neutra	não	_____

4.4 - Referências Bibliográficas

- ALSANTE, K. et al. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. **Handbook of Modern Pharmaceutical**, 2001. 85.
- ALSANTE, K.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical technology**, 2003.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JR. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 775 p.
- ANVISA. **Consulta Pública n 11**. Brasília: [s.n.]. 23 janeiro 2012.
- AULTON, M. E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.
- BAERTSCHI, S. W. **Pharmaceutical Stress testing: Predicting Drug Degradation**. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2001. 469 p.
- CARSTENSEN, J. T. . 2. E. **Drug Stability Principles and Practices**. Nova Iorque: Marcel Dekker, v. 68, 1995.

- DARRINGTON, R. T.; JIAO, J. Rapid and accurate prediction of degradant formation rates in pharmaceutical formulation using LC/MS. **Journal of Pharmaceutical Science**, 93, n. 4, 2004. 838-846.
- DOLAN, J. W. Stability Indicating-Assays. **LC-Troubleshooting**, p. 274-275, 2002.
- FDA, F. D. A. **Guidance for Industry (Draft): Stability Testing of Drug Substances and Drug products**. MD. 1998.
- ICH, I. C. O. H. Guidelines for the photostability testing of new drug substances and products. **Federal Register**, p. 27115–27122, 1997.
- ICH, I. C. O. H. **ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products**. [S.l.]. 2003.
- KLICK, S. et al. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, 2005.
- NIESSEN, W. M. A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 812, 1998. 53-75.
- NUDELMAN, N. S. Estabilidad de medicamentos. Buenos Aires: Ateneu, 1975. p. 187.
- RAMAN, N. V. V. S. S. H. K. A. P. A. V. R. R. K. Development and validation of stability-indicating RP-LC method for famciclovir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 50, 2009. 797-802.
- RANGANATHAN, H. P.; GOVINDRAJULU, G.; PALANYAPPAN, V. FORCED DEGRADATION STUDY OF LETROZOLE-A VALIDATED STABILITY INDICATING HPLC ASSAY FOR BULK AND TABLET DOSAGE FORM. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 582-586, 2012.
- REYNOLDS, D. W. et al. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**, 26, 2002. 48-56.
- RIBANI, M. B. C. B. G. C. C. H. J. I. C. S. F. M. L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 2004. 771-780.
- SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.
- SINHA, V. R. T. A. K. M. S. S. B. J. R. Stress Studies Acyclovir. **Journal of Chromatographic Science**, 45, 2007. 319-324.
- TONNESEN, H. H. Photochemical degradation of components in drug formulations. Part 1: Approach to the standardization of degradation studies. **Pharmazie**, 46, 1991. 263-265.
- TONNESEN, H. H. Formulation and stability of photolabile drugs. **International Drugs of Pharmaceutics**, 225, 2001. 1-14.

WATERMAN, K. C. et al. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. **Pharmaceutical Development Technology**, p. 1113-1146, 2002.

ZAN, M. M. D. C. M. S. R. J. C. K. S. V. Development and validation of a simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations. **Talanta**, 79, 2009. 762-767.

Conclusões Gerais

“Great spirits have often encountered violent opposition from weak minds”

Albert Einstein

Conclusões Gerais:

- O método proposto por HUIDOBRO não foi satisfatório para a separação de ACV e GUA, como também não foram encontradas impurezas além da guanina.
- A metodologia utilizando a coluna HILIC (100 mM de Tampão Formiato de Amônio pH = 7,4 / ACN (7/93) e comprimento de onda = 254 nm, temperatura do forno 30°C, fluxo de 0,3 mL/min e volume de injeção de 7µL) para a análise de aciclovir e guanina em formulações farmacêuticas foi satisfatória, pois houve uma redução no tempo de análise, como também diminuição da vazão e principalmente, redução do volume de resíduos contendo solvente orgânico.
- O método por HPLC com detecção UV (254 nm) desenvolvido se mostrou simples e adequado para quantificação simultânea de aciclovir e guanina em formulação farmacêutica. O método demonstrou ser

seletivo, linear na faixa de 0,011 a 0,026 mg/ml para aciclovir e 0,0055 a 0,013 mg/ml para guanina, preciso (DPR < 2,0%), exato (taxas de recuperação próximas a 100%) e robusto, podendo ser empregado para quantificação dos fármacos e análise da qualidade dos comprimidos.

- A quantificação de aciclovir e guanina em formulações farmacêuticas estão dentro do valor exigido pela Farmacopéia Americana.

- A degradação forçada em meio ácido gerou a guanina como produto de degradação como também, ao utilizar condições extremas (temperatura e período prolongado), outros picos surgiram.

- O ACV mostrou-se estável em ambientes alcalinos, umidade, temperatura e com luz.

- Os estudos de degradação forçados em ambientes oxidativos e neutros provocaram a formação de produtos de degradação diferentes da guanina.