



Universidade Estadual da Paraíba
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Farmácia
Curso de Farmácia

KARLA MONIK ALVES DA SILVA

**Desenvolvimento de Método Indicativo para Estudo de Estabilidade da Zidovudina,
utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**

**Campina Grande,
Fevereiro de 2014**

KARLA MONIK ALVES DA SILVA

Desenvolvimento de Método Indicativo para Estudo de Estabilidade da Zidovudina,
utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Coorientador: Aíla Karla Mota Santana

Campina Grande,
Fevereiro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

S586d

Silva, Karla Monik Alves da.

Desenvolvimento de método indicativo para estudo de estabilidade da Zidovudina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência [manuscrito] / Karla Monik Alves da Silva. – 2014.

29 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

“Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia.”

1. Testes de estresse. 2. Estabilidade farmacêutica. 3. Indústria farmacêutica. I. Título.


21. ed. CDD 615.1

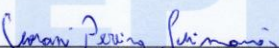
KARLA MONIK ALVES DA SILVA

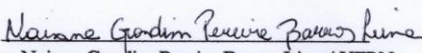
Desenvolvimento de Método Indicativo para Estudo de Estabilidade da Zidovudina,
utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 10/02/2014.


Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros / UEPB
Orientadora


Prof. Msc. Geovani Pereira Guimarães / UEPB
Examinador


Msc. Naiana Gondim Pereira Barros Lima / UFRN
Examinadora

Desenvolvimento de Método Indicativo para Estudo de Estabilidade (MIEE) da Zidovudina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-DAD

SILVA, Karla Monik Alves

RESUMO

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a segurança, eficácia e qualidade exigidas para o registro sanitário de produtos farmacêuticos. Vários países publicam diretrizes para estabilidade farmacêutica. No Brasil, os estudos de estabilidade devem ser conduzidos segundo o Guia sobre a realização de estudos de estabilidade, publicada na resolução –RE n.01 de 29 de julho de 2005. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método indicativo de estabilidade, usando a metodologia da *The United States Pharmacopeia* (USP 36) para substâncias relacionadas de comprimidos de Zidovudina e Lamivudina associadas, por meio de testes de estresse em meio básico, ácido, oxidativo e térmico. Os resultados foram analisados segundo dados gerados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de díodos (DAD). A zidovudina mostrou-se estável nas condições ácida e básica menos concentradas, bem como na térmica. Porém, mostrou instabilidade na condição mais severa da hidrólise ácida, apresentando uma percentagem de degradação de 44,27%, no 15º dia de estudo. Foram observados produtos de degradação nas condições oxidativas, porém o decaimento do teor do fármaco foi maior quando submetido à condição mais concentrada. Através dos resultados obtidos, verificou-se que o método utilizado conseguiu detectar possíveis produtos de degradação que, venham a surgir durante os estudos de estabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Método indicativo de estabilidade. Testes de estresse. Produtos de degradação. Zidovudina.

ABSTRACT

Stability is an important parameter to evaluate the safety, efficacy and quality required for drug registration of pharmaceutical products. Several countries publish guidelines for pharmaceutical stability. In Brazil, the stability studies must be conducted according to the

guide on execution stability studies , published in the RE - resolution n.01 , 29 July 2005. The aim of this study was to develop a stability indicating method , using the methodology of *United States Pharmacopeia* – (36 USP) tablets of related substances for Zidovudine and Lamivudine associated with stress testing under basic conditions , acidic, oxidative and thermal. The results were analyzed according to data generated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). Zidovudine was stable in less concentrated acidic, basic and else thermal conditions. However, the drug showed instability in the severe conditions of acid hidrolide, with a percentage degradation of 44.27%, on the 15th day of the study. The oxidative conditions showed degradation products. However, the decay of the drug was higher when subjected to the more concentrated conditions. Through the results, it appears that the method can detect possible degradation products, which arise during the stability studies.

KEYWORDS: Method indicative of stability. Stress tests. Degradation products. Zidovudine.

1. Introdução

Para a avaliação das condições de preservação de um medicamento faz-se necessário um estudo de estabilidade, que tem por objetivo acompanhar um produto durante todo o seu prazo de validade, analisando as mudanças ocorridas por exposição aos fatores intrínsecos e extrínsecos, como luminosidade, umidade, gases atmosféricos, composição e dosagem, incompatibilidade farmacotécnica, possível interação com material de embalagem, como também analisar se as condições de armazenamento estão adequadas (BRASIL, 2005).

O estudo se aplica para prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade de quaisquer produtos farmacêuticos que contenham fármacos bem conhecidos (BRASIL, 2005). Todos os produtos farmacêuticos devem passar por testes de estabilidade para poderem ser registrados nos órgãos competentes que no caso do Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Estabilidade refere-se ao tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época da sua fabricação (SILVA et al 2009).

A monitorização da estabilidade dos medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto

durante a validade. A segurança e a eficácia também podem ser avaliadas, através do monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica ou toxicidade (NÓBREGA et al., 2006; ITO, 2012).

A RE nº1/05 da ANVISA determina que o estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos deve contemplar a quantificação de produtos de degradação, assim como o método analítico correspondente. Produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem no processo de fabricação do fármaco ou medicamento, durante o seu armazenamento, devido aos efeitos da luz, temperatura, pH, umidade, das reações com os excipientes ou devido ao contato com a embalagem primária.

Dessa forma, os estudos de estabilidade são preconizados, a fim de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo (LUCAS et al., 2004; ANSEL et al., 2007).

Assim, o objetivo principal desse trabalho foi desenvolver um método indicativo para estudo de estabilidade para Zidovudina (AZT) matéria-prima, baseada na metodologia da *The United States Pharmacopeia* (USP 36) para substâncias relacionadas de comprimidos de Zidovudina e Lamivudina associadas.

2. Referencial Teórico

2.1 Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)

A síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS) é uma doença infecto contagiosa causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Caracterizada pela imunossupressão profunda associada a infecções oportunistas. O HIV infecta vários tipos de células do sistema imunológico, incluindo as células T auxiliares CD4⁺, macrófagos e células dendríticas (ABBAS, 2008).

O HIV corresponde a um retrovírus transmitido através de contato sexual, sangue e uso de utensílios contaminados. A transmissão através da transfusão sanguínea e hemoderivados perderam significativa importância, devido à realização previa de exames sorológicos para seleção dos doadores de sangue (BRITO et al 2006).

Os HIV's são pertencentes à família *Retroviridae* (retrovírus) do gênero *Lentivirus*. A replicação do vírus é constante após a infecção, embora algumas células possam abrigar vírus que não estão nesta fase. São conhecidos dois tipos de agentes etiológicos muito próximos,

chamados de HIV-1 e HIV-2, apresentando similaridade de sequências genômicas de 40%. O HIV-2 parece prevalecer apenas na África Ocidental, no entanto causa uma síndrome clínica semelhante à AIDS (BROOKS et al., 2000; ABBAS, 2008). Ambos apresentam sensibilidade *in vitro* à maioria dos agentes antirretrovirais, porém os inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos (INNTR) sejam específicos para o HIV-1 (ABBAS, 2008; GOODMAN, 2010).

De acordo com o último Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2012), durante o período de 1980 a junho de 2011 foram notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) 608.230 casos de AIDS. Sendo que, a taxa de prevalência de infecção pelo HIV na população jovem (15 a 24 anos) apresenta tendência de aumento, com taxa de incidência em 2010 de 9,5/100.000 habitantes. Assim, o impacto global da infecção pelo HIV nos recursos do sistema de saúde e na economia é enorme e continua a crescer (BRASIL, 2012a).

A infecção pelo HIV continua sendo de grande importância para a saúde pública no Brasil. Baseado nos dados registrados no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) e no Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLON). No país, em 2012, cerca de 46 mil pessoas vivendo com HIV foram atendidas pela primeira vez na rede pública de Serviços de Assistência Especializada (SAE) e cerca de 313 mil receberam medicamentos antirretrovirais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012a).

2.2 Terapia antirretroviral (TARV)

O Ministério da Saúde adotou uma política de controle da disseminação da AIDS no país bem como assistência aos indivíduos infectados pelo HIV. Incluindo, entre várias outras iniciativas, um programa de acesso gratuito aos medicamentos antirretrovirais na rede pública de saúde (SOUZA, 2004).

Atualmente, as terapias recomendadas consistem em associações de fármacos antirretrovirais capazes de reduzir a carga viral, resultando em melhoria e aumento da expectativa de vida dos pacientes (QIAN, 2009).

A terapia consiste na utilização de três ou mais medicamentos antirretrovirais concomitantemente. Essa estratégia, conhecida como “coquetel”, baseia-se em estudos realizados na década de 90 que evidenciaram que o HIV se replica rapidamente e possui uma meia vida plasmática de 48h. Dessa forma, o uso de coquetéis aumenta a eficácia e lentifica o

surgimento de resistência pelo vírus, ao retardarem a replicação do RNA e diminuição da concentração plasmática viral (GREENE, 2008; DHAMI, 2009).

Existem 21 medicamentos antirretrovirais divididos em cinco classes distintas: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos, inibidores da protease, inibidores de fusão e inibidores da integrase (BRASIL, 2012a).

Segundo recomendações do Ministério da Saúde para adultos e adolescentes infectados pelo HIV, a TARV inicial deve sempre incluir combinações de três medicamentos: dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), associados a um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN), ou a um inibidor da protease reforçado com ritonavir (IP/r). Além disso, devem ser considerados fatores relevantes para o sucesso do esquema terapêutico inicial, o regime prescrito, a presença de comorbidades, o uso concomitante com outros medicamentos, a adequação do esquema à rotina de vida do paciente, dentre outros (BRASIL, 2008a).

A azidotimidina ou zidovudina (AZT ou ZDV) foi o primeiro fármaco com atividade antirretroviral aprovado para comercialização pelo FDA (Food and Drug Administration), em 1987. Sendo, então, utilizada para o tratamento de portadores de HIV (STYRT et al., 1996). Além de inibir os vírus HIV-1 e HIV-2, ele inibe o vírus-1 da leucemia T/linfoma em humanos e outros retrovírus de mamíferos (AOKI, 1999).

Em 1995, a lamivudina (3TC) teve seu uso aprovado pela FDA (STYRT et al., 1996). Ela atua inibindo a replicação do HIV e, possivelmente, apresenta atividade contra o vírus da hepatite B, conforme relatos de alguns trabalhos (ZHOU, SOMMADOSSI, 1997).

Tanto a AZT quanto a 3TC pertencem à classe de inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, e são utilizadas atualmente na TARV combinada, a fim de aumentar a supressão viral, prevenir a resistência aos fármacos e simplificar a posologia (HAVLIR, LANGE, 1998, BONOLO et al 2007).

2.3 Produção de Antirretrovirais no Brasil

A distribuição de medicamentos para infecções oportunistas em pacientes com AIDS teve início no Brasil em 1988. Já a TARV começou a ser oferecida no Brasil em 1991, com a distribuição de cápsulas de AZT pelo Ministério da Saúde. Mas somente a partir de 1996,

após a XI Conferência Internacional de AIDS, a terapia tripla, foi apresentada e tomou grandes proporções (BRASIL, 1999).

No Brasil, a Lei nº 9.313, de 13 de novembro de 1996 tornou obrigatória à distribuição de medicamentos antirretrovirais (BRASIL, 1999). Dessa forma, o Brasil tornou-se o primeiro país emergente a dispensar gratuitamente a TARV. Segundo dados de 2012 do Ministério da Saúde, cerca de 200 mil pessoas recebem regularmente os medicamentos para tratar a doença.

O Ministério da Saúde tem conseguido obter antirretrovirais a um custo mais baixo do que o praticado pela indústria farmacêutica em outros países. Este fato deve-se ao programa de aquisição em larga escala e produção em laboratórios estatais, tais como Farmanguinhos/Fiocruz, LAFEPE, IQUECO, Fundação para o Remédio Popular (FURP/SP), que fornecem medicamentos a um custo inferior (CHEQUER et al., 2001).

Atualmente o Ministério da Saúde disponibiliza gratuitamente vinte medicamentos antirretrovirais, representando um investimento de R\$ 850 milhões por ano na aquisição. Desses vinte, oito são objetos de Parcerias de Desenvolvimento Produtivo com laboratórios estatais e empresas privadas (FARMANGUINHOS, 2013).

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), desde a década de 90, vem desenvolvendo esforços na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antirretrovirais. Como exemplo, o LAFEPE foi o primeiro laboratório oficial brasileiro a produzir, em 1994, a zidovudina. Atualmente, dispõe de área dedicada para a produção desses medicamentos, totalizando o estudo de seis fármacos (zidovudina, lamivudina, estavudina, didanosina, indinavir e ritonavir), apresentados em diferentes formas farmacêuticas (comprimido, cápsula, comprimido revestido, xarope, pó para solução). Além de produtos que se encontram em desenvolvimento, tais como o efavirenz, o nelfinavir e as associações de dose fixa combinada. Seus antirretrovirais são vendidos exclusivamente para o Ministério da Saúde (LAFEPE, 2013).

2.4 Estudo de Estabilidade

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual o medicamento ou mesmo a matéria-prima, mantém dentro dos limites especificados, as mesmas condições e características que possuíam quando da época de sua estocagem (MARIN et al 2012).

Os fabricantes são os responsáveis por garantir que os medicamentos permaneçam inalterados e que os mesmos sejam seguros e eficazes. Para isso, realizam-se os testes de estabilidade. Pois estes são uma maneira de conhecer o comportamento do fármaco ou

medicamento durante seu tempo de utilização (EMEA, 2004), determinar o prazo de validade dos mesmos, e ainda determinar as condições ideais de armazenamento (EMEA, 2004; KOPP, 2006, STENGER, 2011).

A preocupação com a estabilidade de fármacos e medicamentos é crescente, e os órgãos regulatórios vêm ampliando suas exigências na concessão do registro de medicamentos para comercialização nos diferentes países (ICH,1996a; ICH 2006; BRASIL, 2008b).

O estabelecimento de normas regulatórias quanto às impurezas em novos fármacos tem sido constantemente discutido e atualizado por meio de guias internacionais, o ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements) (EMEA 2004; ICH 2006). No Brasil, a ANVISA publicou um Regulamento Técnico (BRASIL, 2008b) exigindo a notificação, identificação e quantificação dos produtos de degradação para o registro e renovação de registros de todos os tipos de medicamentos (referência, genérico e similar), mesmo os já tradicionais. Estes documentos sugerem as condições de teste de estresse aos quais os produtos devem ser submetidos, bem como determina os limites de identificação, quantificação e qualificação das impurezas para cada faixa de dose diária ingerida de fármaco.

Atualmente a ANVISA mantém em vigência o “Guia para realização de Estudos de Estabilidade” contido na RE 01 de 2005. Este guia traz a realização de três estudos: O estudo de estabilidade acelerado, que consiste em um estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou física de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento; o estudo de longa duração que, corresponde a um estudo desenvolvido para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente após o prazo de validade e o estudo de estabilidade de acompanhamento que é projetado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características, conforme os resultados obtidos nos estudos de longa duração.

O estudo de estabilidade requer o emprego de metodologias analíticas validadas que sejam indicadoras de estabilidade (Métodos Indicadores de Estabilidade - MIE) do analito em estudo. Testes de degradação forçada do analito podem auxiliar no estabelecimento das vias de degradação, na identificação dos produtos de degradação e na avaliação da estabilidade intrínseca da molécula. Além de validar a capacidade do método analítico de ser indicativo da estabilidade da amostra em estudo. A natureza dos testes de degradação forçada ou de estresse irá depender das características individuais do fármaco e do tipo de forma farmacêutica envolvida (ICH, 2006).

2.5 Degradação forçada

Um dos principais objetivos a serem atingidos através dos testes de estresse ou testes de degradação forçada é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação. Estes também fornecem informações sobre as rotas de degradação e dos produtos formados, que poderiam ser formados durante o período de armazenamento (SILVA et al., 2009; STENGER, 2011).

Para o medicamento, o planejamento dos estudos deve ser baseado nas propriedades do fármaco e dos excipientes que serão utilizados na formulação, assim como nas condições de armazenamento. Neste caso, são utilizadas condições mais severas do que as condições do estudo de estabilidade acelerado, como estratégia para a fase de desenvolvimento da forma farmacêutica. No entanto, tais exames podem não ser necessários, se for demonstrado que os produtos de degradação não são formados sob condições de estudo de estabilidade acelerado ou de longa duração (ICH, 2003; SILVA et al., 2009).

Além dos produtos de degradação, o fármaco pode apresentar outras impurezas, como as misturas racêmicas que podem ser geradas durante a sua síntese. Neste aspecto, são de suma importância a identificação e qualificação destas, pois podem causar efeitos tóxicos, podendo colocar em risco a vida humana. O estabelecimento de normas regulatórias quanto a impurezas em novos fármacos tem sido constantemente discutido e atualizado por meio de guias internacionais (ICH, 2006; STENGER, 2011; SINGH et al 2012).

A ICH traz especificações acerca dos limites dos produtos de degradação que podem surgir durante o armazenamento do produto. Os limites permitidos são baseados na ingestão diária total do fármaco e são separados em limites de notificação, identificação e qualificação. O limite de notificação é definido como o nível que deve ser reportado às agências reguladoras a fim de alertar a presença de produtos de degradação; enquanto que, o limite de identificação define-se como o nível que requer a identificação química da substância. Finalmente, o limite de qualificação é o nível que deve ser testado em estudos toxicológicos para garantir a segurança do composto. A Tabela 1 apresenta os níveis específicos de produtos de degradação permitidos para o analito em estudo (WATERMAN; ADAMI, 2005; ICH, 2006).

Tabela 1 – Limites de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação, no decorrer do estudo de estabilidade (ICH, 2006; BRASIL, 2012b)

Tipo de limites	Dose máxima diária¹	Limites²
Limites de notificação	≤ 1 g	0,1%
	> 1 g	0,05%
Limites de identificação	< 1 mg	1,0% ou 5µg TDI, o que for menor
	1 mg – 10 mg	0,5% ou 20µg TDI, o que for menor
	10 mg – 2 g	0,2% ou 2mg TDI, o que for menor
	> 2 g	0,10%
Limites de qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50µg TDI, o que for menor
	10 mg – 100 mg	0,5% ou 200µg TDI, o que for menor
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3mg TDI, o que for menor
	> 2 g	0,15%

1- Quantidade máxima 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.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material

Foram utilizados metanol (J.T. Baker[®]), acetonitrila (Merck[®]), acetato de amônio (Fmaia[®]), ácido acético glacial (Hexis[®]), hidróxido de sódio (Synth[®]), ácido clorídrico (Synth[®]) e peróxido de hidrogênio (Química Moderna[®]) e a Zidovudina (AZT), lote 17279 (LAFEPE[®]).

3.2. Método

3.2.1. Instrumentação

Cromatógrafo a líquido Hitachi Elite Lachrom - Merck[®] equipado com bomba quaternária L-2130, auto-injetor L-2200, detector L-2400 e arranjo de diodo (DAD) L-2455 e forno para coluna L-2300; lavadora ultra-sônica Unique[®], modelo USC-1880 (Brasil); balança Shimadzu[®], modelo AW220; pHmetro Tec-3MP; bomba a vácuo Tecnal[®], modelo TE-058; estufa de secagem Fanem[®]. Todos os equipamentos citados estavam devidamente calibrados e certificados.

3.2.2. Condições cromatográficas

Os experimentos foram realizados de acordo com o método farmacopéico descrito na USP36 para substâncias relacionadas de comprimidos da associação de Zidovudina e Lamivudina.

Foi utilizado um gradiente de eluição composto por acetonitrila, metanol e tampão de fosfato 25mM (pH 4, ajustado com ácido acético glacial), com taxa de fluxo de 0,5mL/min. A coluna Polaris C18-A (250 x 3,0mm 3µm) foi mantida na temperatura de 45°C com volume de injeção de 10µL. Antes da injeção das amostras a coluna foi acomodada com a passagem da fase móvel, durante 20-30 minutos. A leitura foi feita a 270nm empregando CLAE-DAD.

3.2.3. Solução diluente

Esta foi obtida a partir da solução de tampão fosfato 25mM e metanol, na proporção 19:1, respectivamente.

3.2.4. Preparação do padrão

Foram preparadas triplicatas do padrão de AZT. Estas foram obtidas pesando-se 750mg de AZT, transferidas para balões volumétricos de 250 mL, solubilizando-as com 125 mL de água ultrapura, seguidas de sonicação durante 10 minutos. Obtendo-se soluções-mãe na concentração de 3mg/mL. Ao término destas, foram coletadas alíquotas de 10 mL e transferidas para balões de 100 mL (completando-os com a solução diluente) a fim de se obter concentração final de 0,3mg/mL. As amostras foram analisadas em CLAE-DAD. As soluções-mãe foram acondicionadas em recipientes de vidro âmbar durante o tempo de estudo.

3.2.5. Preparação das soluções de degradação

Foram preparadas soluções de hidróxido de sódio 0,1, 1 e 5M; soluções de ácido clorídrico 0,1, 1 e 5M e soluções de peróxido de hidrogênio 3 e 30%.

As soluções de degradação foram preparadas conforme Farmacopeia Brasileira, volume I, 2010.

3.2.6. Degradação forçada de Zidovudina

Foram realizadas triplicadas das amostras para cada meio de solução (meio ácido, básico e oxidativo). As quais foram obtidas pesando-se 750mg de AZT. As amostras foram solubilizadas com as respectivas soluções de degradação, sendo transferidas para balões volumétricos de 250 mL, seguidas de sonicação durante 10 minutos. Obtendo-se soluções-mãe para cada condição de degradação. Estas foram armazenadas em recipientes de vidro âmbar, durante todo o estudo.

Nos tempos predefinidos do estudo, foram coletadas alíquotas de 10 mL e transferidas para balões de 100 mL (completado-os com a solução diluente), a fim de se obter concentração final de 0,3mg/mL. As amostras foram analisadas nos seguintes tempos de estudo: 0h, 24h, 48h, 72h, 7 dias, 15 dias e 30 dias.

3.2.7. Degradação térmica

Foram pesados 6g de AZT e colocados em uma estufa de secagem a 60°, sendo armazenado nesta condição durante todo o estudo. Amostras foram coletadas em triplicata, transferidas para balão de 250 mL, diluídas em água ultrapura, e sonicadas por 10 minutos. Em seguida, foram coletadas 10 mL de cada triplicata, transferidas para balões de 100mL (completado-os com a solução diluente), a fim de se obter concentração final de 0,3mg/mL. Estes procedimentos foram realizados em cada tempo de análise (24h, 48h, 72h, 7 dias e 10 dias).

Todas as segundas diluições foram filtradas e transferidas para vials para posterior corrida cromatográfica.

4. Resultados e discussão

Foi realizada degradação forçada do AZT sobre diferentes condições hidrolíticas e térmica, a fim de se obter um método seletivo aos possíveis produtos de degradação que venham a surgir durante os estudos de estabilidade preconizados na RE 01 de 2005. Assim, o fármaco foi submetido à degradação em meio alcalino e ácido, bem como em meio oxidativo, como mostra a tabela 2.

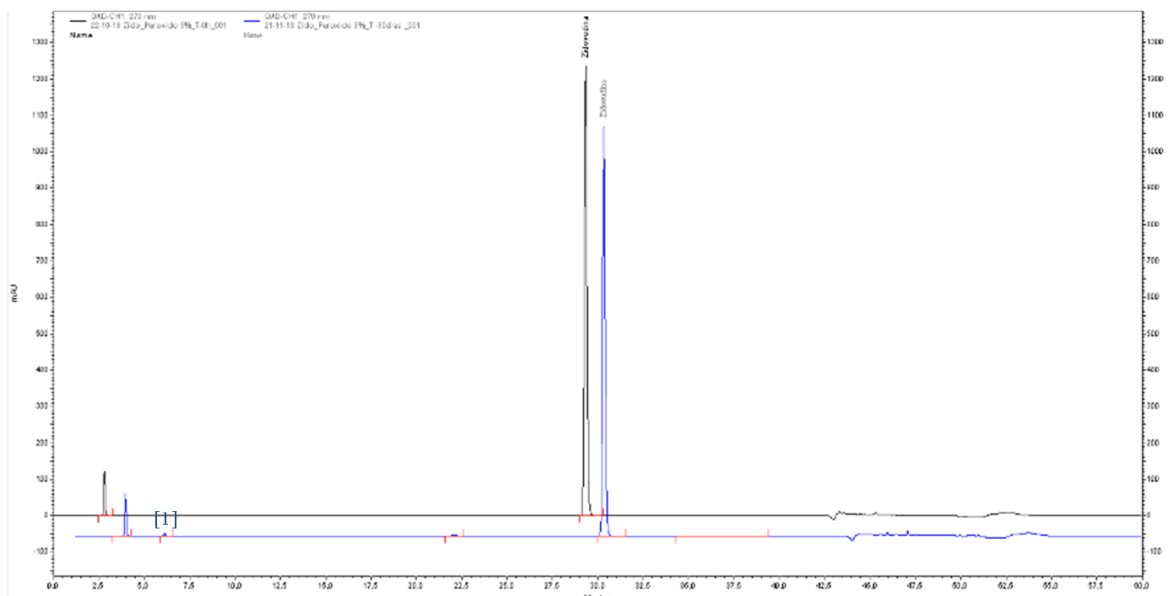
Tabela 2: Degradação forçada do AZT com variação de pH e oxidativa.

Tempo (h)	NaOH				HCl				Peróxido 3%	
	0,1 M		1M		0,1M		1M		Teor	Deg.
0	Teor	Deg.	Teor	Deg.	Teor	Deg.	Teor	Deg.	Teor	Deg.
0	101,1242	-	100,7568	-	100,8017	-	101,5467	-	100,6323	-
24	100,7963	-	100,2100	-	101,5467	-	101,4243	-	99,61555	-
48	101,0204	-	99,7474	-	101,0940	-	102,6502	-	99,63259	-
72	101,1800	-	100,8810	-	101,1324	-	100,4233	-	99,65954	-
168	100,5015	-	100,6104	-	100,3932	-	100,2439	-	99,65954	-
360	100,4666	-	100,7584	-	99,67477	-	100,2190	-	99,63721	-
720	100,2073	-	99,6044	-	99,38223	-	99,71646	-	98,67954	1,32

De acordo com a Tabela 2, verificou-se que não houve diminuição do teor de AZT nas condições testada, durante o tempo de estudo. Exceto para a degradação oxidativa, que apresentou um leve decaimento de 1,32% após 720 horas de estudo. Esse decaimento está

relacionado com a presença do pico [1] observado no 30º dia de estudo, como mostra a figura 1, descartando a possibilidade de erros analíticos e sistemáticos associados a essa diminuição do teor do AZT, nas condições testadas.

Figura 1: *Overlay* dos cromatogramas na condição oxidativa 3% nos tempos 0 horas (preto) e 30 dias (azul).



Tempo de retenção (TR) do AZT: 29, 371; Tempo de Retenção Relativo (TRR) do pico [1]: 0,097.

O estudo de degradação forçada é importante no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, como preconizado pelo ICH (2003).

De acordo com o item 2.9 da Resolução RE nº 1, de 29/07/2005, devem ser realizados ensaios de identificação e quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente no estudo de estabilidade, para todos os produtos a serem registrados na ANVISA. Porém, não existe uma regulamentação brasileira, que esclareça os requisitos do item citado. Dessa forma, esse estudo baseou-se em protocolos internos, usando como referencias o ICH (2003), o Informe Técnico publicado pela ANVISA em 2008 e a Consulta Publica em 2012.

Segundo a Consulta Pública (2012), o estresse da amostra deverá gerar produto(s) de degradação em quantidade suficiente para se desenvolver e validar a metodologia analítica utilizada para a quantificação do teor do fármaco e do(s) produto(s) de degradação.

Dessa forma, o fármaco foi submetido a condições mais severas (NaOH 5M, NaOH 5M e H₂O₂ 30%), a fim de promover sua degradação. Porém, o ideal é que seja uma

degradação de pequena extensão. Em torno de 10-30% (dez a trinta por cento), com intuito de evitar a degradação dos produtos, como preconizado no informe técnico (2008).

Com esta nova condição, a hidrólise ácida foi a que mais gerou produtos de degradação. Podendo estar relacionado à estrutura química do AZT que se hidroliza facilmente em pH ácido, por se tratar de uma base fraca, apresentando um pka de 9,8 (Souza, 2004).

A Tabela 3 mostra a correlação do decaimento da área do AZT, com o aumento da área dos picos de degradação com o decorrer do estudo.

Tabela 3: Decaimento da área do AZT com aumento das áreas dos picos de degradação ácida de acordo com o tempo de estudo.

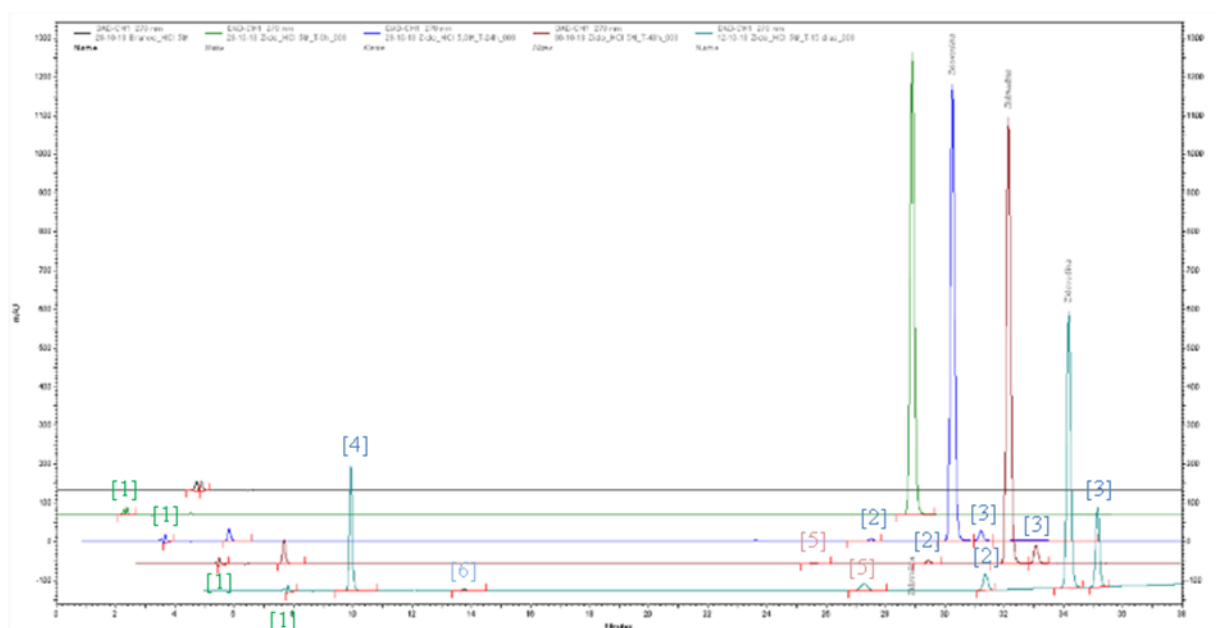
Tempo (h)	TRR	Área dos picos	Área do AZT	Teor dos picos (%)	Teor do AZT (%)
0					99,6252
24	[2] 0,907	198771		0,4202	96,3378
	[3] 1,033	965932	47308891	2,0571	
	[4] 0,169	932793		1,9676	
48	[2] 0,908	373585		0,8076	
	[3] 1,032	1819786		3,9518	
	[4] 0,169	1633988	46170001	3,6188	91,7584
	[5] 0,778	212613		0,4572	
72	[2] 0,907	502394		1,2323	
	[3] 1,032	2427373		5,9773	
	[4] 0,170	2270396	40892631	5,4961	83,9474
	[5] 0,775	291837		0,7154	
168	[2] 0,902	949707		2,5359	
	[3] 1,034	4439270		11,8797	
	[4] 0,169	4510375	37538493	11,8694	77,2226
	[5] 0,775	576768		1,5454	

360	[2] 0,904	1858710		6,6849	
	[3] 1,033	7691373		27,6782	
	[4] 0,170	9051332	458336	33,0033	55,7338
	[5] 0,764	1311310		4,7288	
	[6] 0,301	170880		0,6199	

Na tabela 3, verifica-se o decaimento da área do AZT de 47308891 para 458336, bem como o aumento da área dos picos de degradação. O pico que obteve um maior crescimento foi o pico [4], de 932793 para 9051332, representando um aumento de 33,00%.

Ao analisar a figura 2, já é possível verificar a presença de produto de degradação no t0h, o pico [1]. Com 24h surgem outros três picos, o pico [2], [3] e o [4]. Com 48h apareceu o pico [5] e no 10º dia de estudo surgiu o pico [6].

Figura 2: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 5,0 M, nos tempos zero (verde), 24h horas (azul), 48 horas (rosa) e 10 dias (azul claro).

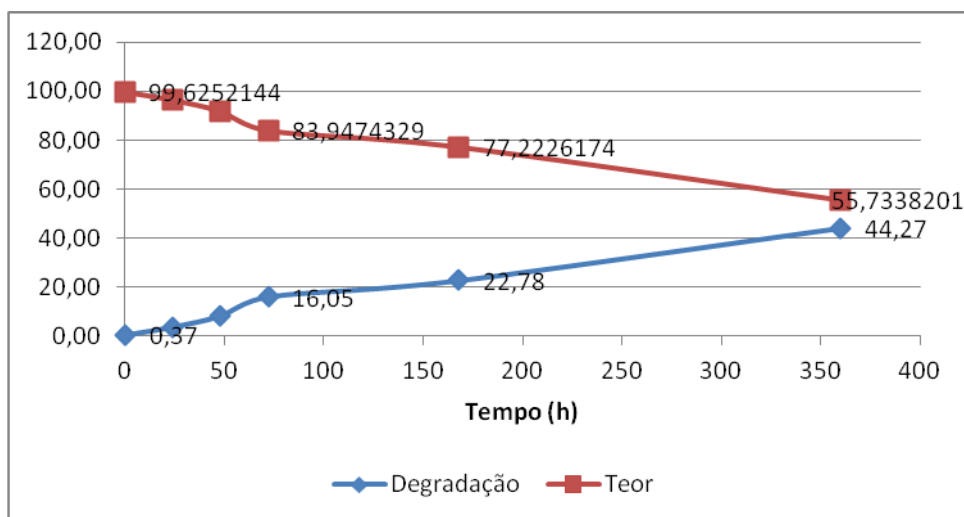


TR do AZT: 29,347

Segundo a Figura 2, não houve crescimento do pico [1]. Este, podendo não ser um pico de degradação e sim resultado das condições analíticas, como por exemplo, ruídos na linha de base.

A Figura 3 correlaciona a redução do teor do fármaco, com o aumento da degradação com o passar do tempo de exposição à solução de degradação ácida.

Figura 3 – Percentual do teor e da degradação da zidovudina por tempo de estudo nas amostras de hidrólise ácida 5,0 M



De acordo com o gráfico acima, verificou-se a redução do teor do AZT de 99,62% para 55,73% durante o tempo de estudo (15 dias), com aumento do percentual de degradação, atingindo um valor de 44,27% no último dia de análise.

Devido o fármaco apresentar uma degradação correspondente à faixa exigida, contemplada no Informe Técnico. As análises tiveram uma duração de apenas 15 dias, a fim de manter a integridade dos picos de degradação. Dessa forma, não pode-se afirmar se o pico [6] trata-se de um pico de degradação ou de ruídos da linha de base, pois, não se pôde observar crescimento da área até o último dia de análise.

Referente à degradação alcalina, a Figura 4, mostra um decaimento de 4,32%, no 15º dia. Porém, essa redução do teor pode não estar relacionada à presença de picos de degradação, como mostra a figura 5. Podendo estar relacionados a erros aleatórios ou até mesmo produtos de degradação não detectados nas condições da metodologia adotada.

Figura 4 – Percentual do teor e da degradação da zidovudina por tempo de estudo nas amostras de hidrólise básica 5,0 M.

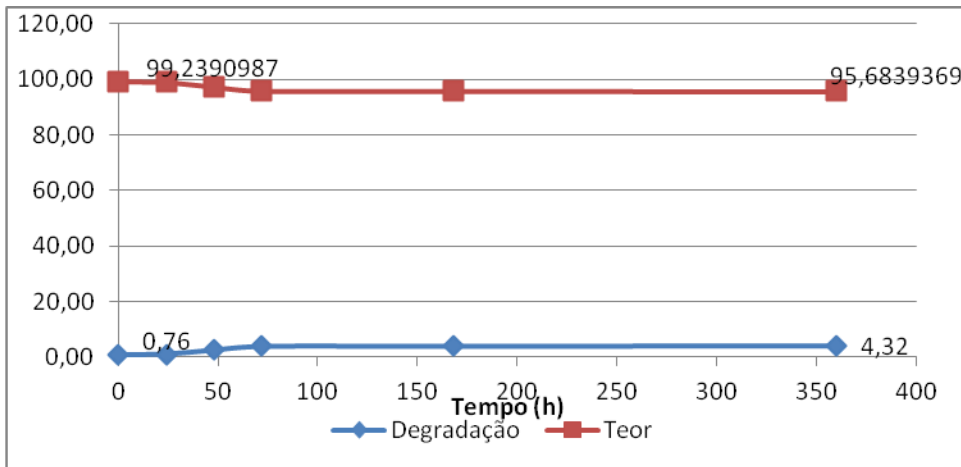
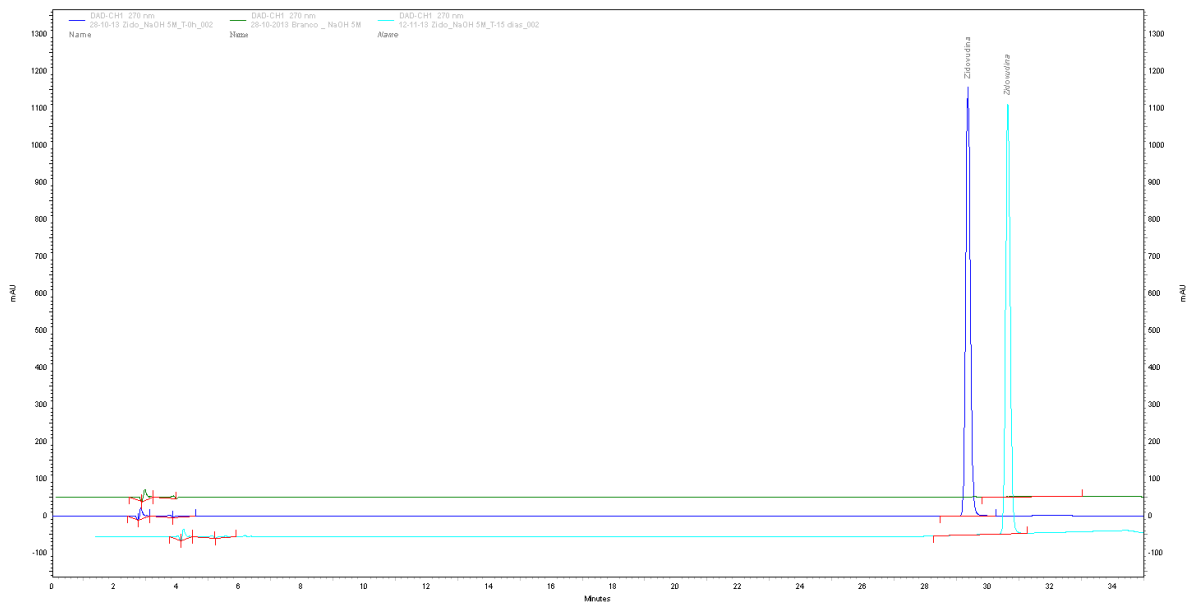


Figura 5: *Overlay* dos cromatogramas na condição de hidrólise básica 5,0 M nos tempos zero (azul escuro) e 10 dias (azul claro).



TR: AZT: 29,370

O resultado obtido quando a amostra foi submetida a degradação oxidativa está descrito na Tabela 4, onde mostra o decaimento de área do AZT de 47005397 para 45767385, representando 7,42 % de degradação, como mostra a Figura 7. Essa redução está associada ao crescimento do pico.

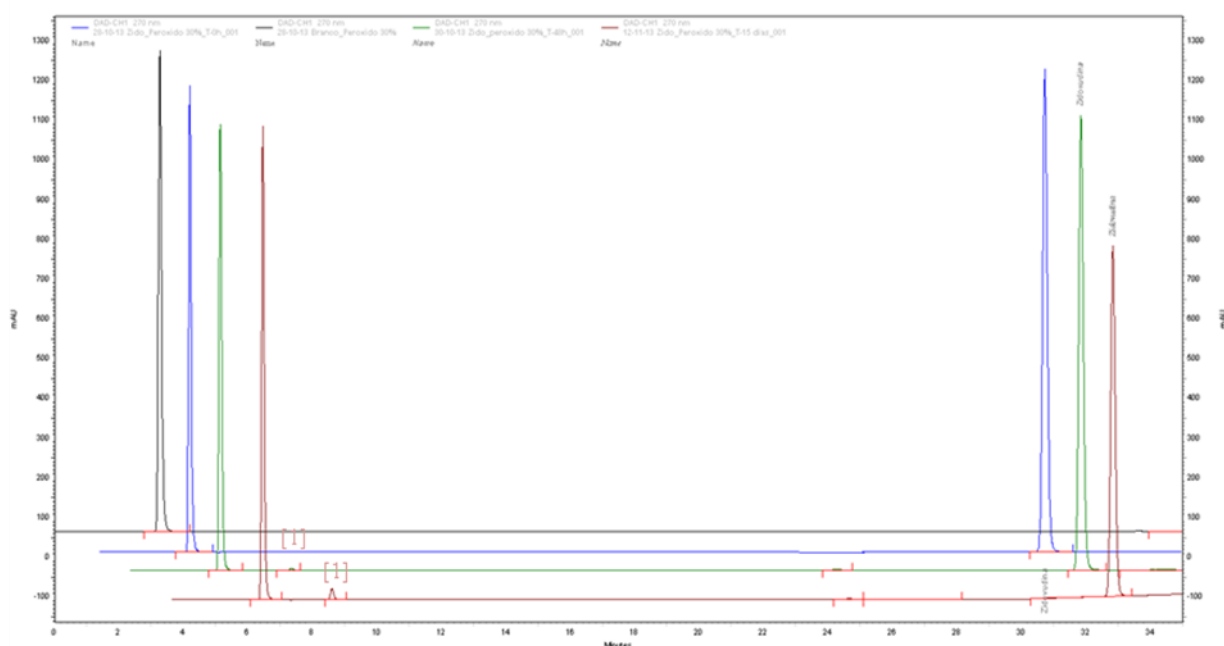
Tabela 4: Decaimento da área do AZT com aumento das áreas dos picos de degradação oxidativa a 30% de acordo com o tempo de estudo.

Tempo (h)	TRR	Área dos picos	Área do AZT	Teor dos picos (%)	Teor do AZT (%)
0					98,1804229
24					97,8780259
48	[1] 0,170	153443	47005397	0,10877258	95,558706
72h	[1] 0,170	176485	46930190	0,40976118	95,2003452
168	[1] 0,170	420228	46463674	0,88312852	94,9956789
360	[1] 0,170	770626	45767385	1,63762947	92,5789576

Verifica-se na tabela 4, um aumento da área do pico de 153443 a 770626. Em 72h o teor do pico duplicou e no 10º dia houve um aumento de 16 vezes.

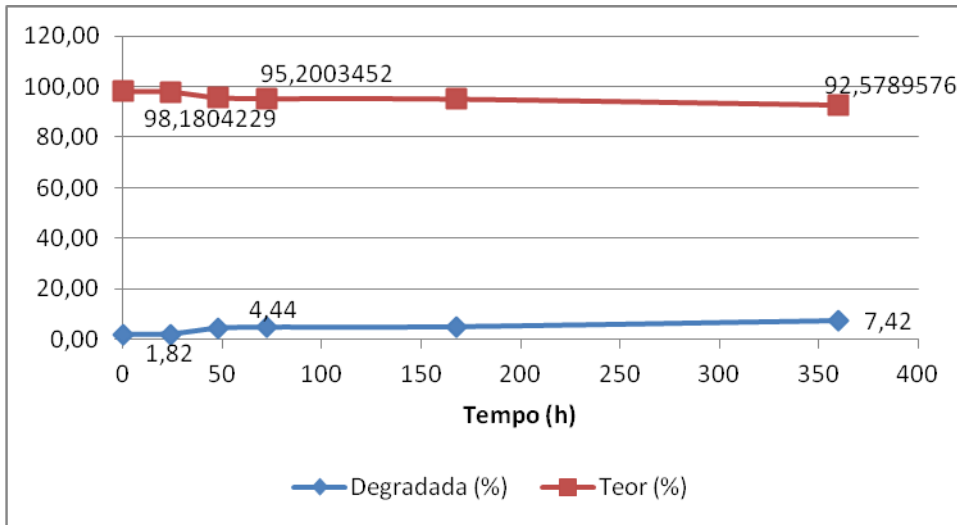
De acordo com a figura 6, verifica-se com 48h a presença do pico [1].

Figura 6: Overlay dos cromatogramas na condição oxidativa 30% nos tempos zero (azul), 48h (verde) e 10 dias (rosa).



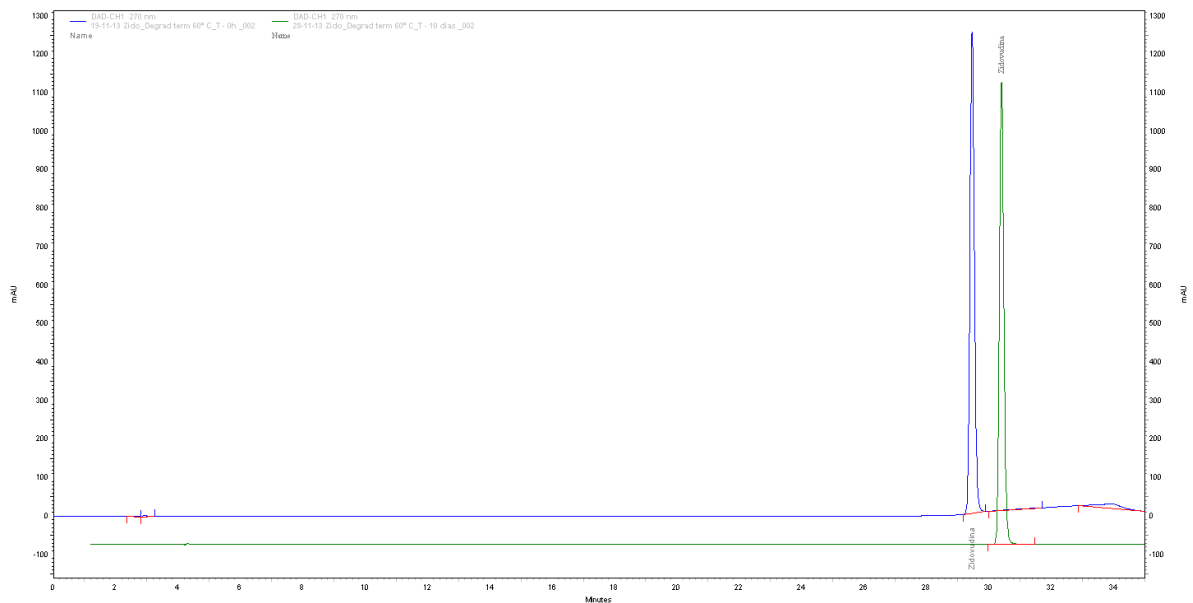
TR: AZT: 29,337.

Figura 7 – Percentual do teor e da degradação da zidovudina por tempo de estudo nas amostras de degradação oxidativa a 30%.



O AZT mostrou-se resistente a degradação térmica. Não apresentando produtos de degradação durante o tempo de estudo, como consta na figura 8. Segundo o informe técnico (2008), o fármaco é considerado estável, na ausência de produtos de degradação após 10 dias, submetido a condições de estresse.

Figura 8: *Overlay* dos cromatogramas na condição térmica nos tempos zero (azul) e 10 dias (verde).



TR: AZT: 29,337.

De acordo com a Consulta Pública (2012), a análise crítica do perfil de degradação, deve contemplar além da avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento, a análise da perda de teor do fármaco em relação à formação de possíveis produtos de degradação nas diferentes condições testadas. Deve contemplar ainda, a verificação da pureza cromatográfica do pico do fármaco no medicamento.

O detector DAD possui alta resolução espectral e em adição a informações qualitativas, a qualidade da análise é aumentada, permitindo checar a identidade do composto e a pureza do pico. Assim, dados espectrais para cada pico cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que os compostos eluem da coluna, fornecendo informações adicionais para confirmar a identidade do pico (LANÇAS, 2003). A pureza do pico cromatográfico é examinada comparando os espectros em diversos pontos do pico. Se eles se sobrepõem, o pico é puro. Isto fornece um dado extra para o analista que assim saberá se há ou não interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção que o analito (CALDAS ET AL 2011).

Foram realizadas a análise da pureza do pico no início e no término do estudo, como preconizado na Consulta Publicada (2012), a fim de comprovar de que não há interferência dos produtos de degradação no pico cromatográfico do fármaco, detalhado na Tabela 5.

Tabela 5: Pureza dos picos e similaridade do AZT durante o início e término do estudo, nas condições de estresse.

Condição de estresse	Tempo (h)	TR (min)	Pureza do Pico	Similaridade
Alcalina				
0,1M	0	29,367	1,000	1,000
	720	29,213	1,000	1,000
1,0M	0	29,347	1,000	1,000
	720	29,183	1,000	1,000
5,0M	0	29,363	1,000	1,000
	360	29,170	1,000	1,000
Ácida				
0,1M	0	29,310	1,000	1,000
	720	29,133	1,000	1,000
1,0M	0	29,300	1,000	1,000
	720	29,163	1,000	1,000
5,0M	0	29,347	1,000	1,000

	360	29,430	1,000	1,000
Oxidativa				
3%	0	29,313	1,000	1,000
	720	29,170	1,000	1,000
30%	0	29,333	1,000	1,000
	360	29,310	1,000	1,000
Térmica	0	29,313	1,000	1,000
	170	29,443	1,000	1,000

A Tabela 5 mostra que todos os picos de AZT em todas as condições testadas, mostraram-se puros, não sofrendo nenhum tipo de interferência. Observa-se ainda que em todas as condições testadas, durante os tempos de análises, o fármaco analisado realmente se tratava de zidovudina. Fato este, confirmado através da similaridade dos espectros entre o fármaco em questão e seu padrão primário.

5. Conclusão

Através dos resultados obtidos nos testes de estresses, verifica-se que a metodologia utilizada, USP 36 para o ensaio de substâncias relacionadas para comprimidos de Zidovudina e Lamivudina associadas, consegue detectar possíveis produtos de degradação que venham a surgir durante os estudos de estabilidade. Além de demonstrar especificidade e seletividade a partir da análise de pureza e similaridade de pico.

A zidovudina mostrou-se estável nas condições ácida (0,1 e 1M), básica (0,1, 1 e 5M) e térmica, não apresentando pico de degradação nos tempos de estudos. A maior degradação foi observada na condição ácida a 5M.

É necessário que sejam feitos alguns estudos complementares de estresse como, submeter o fármaco a umidade, a íons metálicos, bem como estresse fotolítico. A fim de verificar a presença de quaisquer produtos de degradação que venham a surgir nos estudos de estabilidades, sob influência de qualquer um desses fatores.

6. Agradecimentos

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Miguel Arraes (LAFEPE) pela oportunidade, incentivo e apoio prestado a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), especialmente a professora Ana Cláudia Dantas de Medeiros por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada, pela amizade construída, pela confiança e, sobretudo, pelo carinho.

7. Referências bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHLMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília, DF, 5ª ed., v. 1, p. 523-524, 2010.

AOKI, F. Y. Infecções virais. In: PAGE, C. P.; CURTIS, M. J.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. B. **Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manole, 1999, p. 445-460.

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

BrasiL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>. Acesso em: 20 de out. 2013.

BRASIL, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública** nº 59, de 18 de junho de 2010. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. D.O.U de 21 de Junho de 2010b.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico AIDS e DST**. Brasília, DF, ano 8, n. 1, p. 10, 2012a.

BRASIL, **Ministério da Saúde**. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Terapia Anti-Retroviral e Saúde Pública: Um Balanço da Experiência Brasileira. Brasília, DF, 1999.

BRASIL, **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Documento preliminar. Brasília, DF, p. 65-84, 2008a.

BRASIL. Lei nº 9.313, de 13 de novembro de 1996. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de AIDS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 dez. 1996. Disponível em: <<http://www.senado.gov.br/publicacoes/diarios/pdf/sf/2002/08/20082002/16200.pdf>>. Acesso em: 11 jan.. 2014.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>>. Acesso em 20 de outubro de 2013

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008b.

BRITO, A. M. et al. Tendência da transmissão vertical de AIDS após terapia anti-retroviral no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v.40, p. 18-22, 2006.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Jawetz, Melnick & Adelberg. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CHEQUER, P.; SUDO, E.; VITÓRIA, M. A. A.; CUNHA, C.; VELOSO, V. G. Impacto da terapia anti-retroviral. Disponível em:< <http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 3 de dezembro de 2013

DHAMI, H. The chemokine system and CCR5 antagonists: potential in HIV treatment and other novel therapies. **J Clin Pharm Ther**, v. 3, n.2, p.147-60, 2009.

EMA. THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. CPMP. **Guideline on stability testing for active substances and medicinal products manufactured in climatic zones III and IV to be marketed in the EU**. Londres, 25 fevereiro 2004. Disponível em:<<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/614203en.pdf>> Acessado em: 02 janeiro 2014.

FARMANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Fármacos. Disponível em: <www.far.fiocruz.br/>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2010.

GREENE, W. C et al. Novel targets for HIV therapy. **Antiviral Res.**, v.8, n.3, p.251-65, 2008.

HAVLIR, D. V.; LANGE, J. M. A. New antiviral and new combinations. **AIDS**, v.12, Sup. A, p. S165-S174, 1998.

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Guidance for industry Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guideline stability testing: photostability testing of new drug Substances and products. nov., 1996.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Guideline stability testing: photostability testing of new drug Substances and products, 2006.

ITO, K. N. Avaliação e desenvolvimento de formulações para o complexo Benznidazol- β -ciclodextrina. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

KOPP, S. Stability testing of pharmaceutical products in a global environment. **RAJ Pharma**, p. 291-294, 2006.

LAFEPE. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes. Disponível em: <<http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2013.

LANÇAS, F. M.; **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n.183, 2003.

LUCAS, T. I.; BISHARA, R. H.; SEEVERS, R. H. A Stability program for the distribution of drug products. **Pharm Technol.** v. 2, p. 68-73, 2004.

MARIN, E. K. et al. Degradação forçada e análise fatorial para caracterização da estabilidade de formulações líquidas de carbocisteína. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n. 4, p. 537-544.

NÓBREGA, I. M. F et al. Estudo de estabilidade de comprimidos de Captopril 25 mg acondicionados em blister frente a diferentes tipos de filmes moldáveis. **Ver Bras Farm.** v.87, n.4, p.128-31, 2006.

QIAN, K.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE.; K. H. HIV entry inhibitors and their potencial in HIV therapy. **Med Res Rev.** v.29,n.2, p. 369-93, 2009.

SILVA, K. E. R et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Industria Farmacêutica. **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v.30, n.2, p.1-8, 2009.

SINGH, S., et al. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Pharmaceutical and Biomedical analysis**, p.148-173, 2012.

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

STENGER, F. C. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade do Cloridrato de Metformina em comprimidos e estudo de citotoxicidade dos produtos de degradação. [Dissertação Mestrado], Área de concentração em produtos naturais e substâncias sintéticas bioativas. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.

STYRT, B. A.; PIAZZA-HEPP, T. D.; CHIKAMI, G. K. Clinical toxicity of antiretroviral nucleoside analogs. **Antiv. Res.**, v.31, p. 121-135, 1996.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP 36-NF31, Reissue, R-922-923, 2013.

WATERMAN, K. C.; ADAMI, R. C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Internacional journal of pharmaceutics**, p.101-125, 2005.

ZHOU, X. L.; SOMMADOSSI, J. P. Rapid quantitation of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine in human serum by highperformance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B.**, v. 691, p. 417-424, 1997.