

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Degradação Forçada dos Fármacos Nitazoxanida e Sofosbuvir e
Degradação Térmica de Dispersões Sólidas Amorfas Contendo
Ritonavir**

Benedito Roberto de Alvarenga Junior*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

***bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2022

Benedito Roberto de, Alvarenga Junior

Degradação forçada dos fármacos nitazoxanida e sofosbuvir e degradação térmica de dispersões sólidas amorfas contendo ritonavir / Alvarenga Junior Benedito Roberto de -- 2022.
218f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Renato Lajarim Carneiro

Banca Examinadora: Regina Vincenzi Oliveira, Willian
Batista Braga, Marco Flôres Ferrão, Marcia Cristina
Breitkreitz

Bibliografia

1. Degradação forçada. 2. Planejamento de experimentos
. 3. Estabilidade térmica.. I. Benedito Roberto de,
Alvarenga Junior. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Benedito Roberto de Alvarenga Junior, realizada em 28/04/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira (UFSCar)

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga (UnB)

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão (UFRGS)

Profa. Dra. Marcia Cristina Breikreitz (UNICAMP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Dedico esta tese aos meus pais Ana e Roberto
as minhas irmãs Maysa, Hérica e Thaís
pelos esforços imensuráveis durante minha trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, mesmo que toda forma de agradecimento não seja suficiente perante sua bondade, deixo meu singelo registro de obrigado ao Senhor Deus por toda iluminação, clareza nos momentos difíceis e peço perdão durante minhas fraquezas e erros.

Agradeço aos meus pais Ana e Roberto, por todo apoio e força, não somente nesse momento, mas em todas minhas iniciativas. As minhas irmãs pela presença e prestatividade sempre que necessário. Agradeço a minha companheira Camila pelo carinho, apoio e por estar sempre junto em tudo.

Ao Prof. Dr. Renato pela orientação durante o trabalho e contribuição na minha formação acadêmica e profissional. Somos espelhos de quem nos orienta e não posso deixar de agradecê-lo por todo crescimento pessoal. Aos meus companheiros que conheci no grupo GQA, Wallace, Cecília, Jorge e Frederico pela ótima convivência, prestatividade e discussões científicas.

Agradeço as pessoas do grupo Produtos Naturais (PN), principalmente ao Luis Cuadrado por sua amizade e prestatividade desde meu período de mestrado. Ao Prof. Moacir Rossi Forim por disponibilizar toda a infraestrutura do laboratório PN para realização dos experimentos. As pessoas do laboratório do grupo LaBiE, as quais estiveram presentes em boa parte do meu doutorado. Ao departamento de Química da UFSCar e todos os funcionários envolvidos na realização deste doutorado.

A Prof^a. Dr. Lynne S. Taylor pela orientação, discussões científicas e por todo o suporte durante meu doutorado sanduíche em Purdue University. Aos colegas do Taylor lab em especial Dana Mosesson, a qual me auxiliou na realização do trabalho e Chengzhe Gao por toda ajuda e companheirismo. Não menos importante, agradeço aos demais membros do grupo Qingqing, Tze Ning, Alex, Thuy, Pradnya e Marry Ellen que me ajudaram direta ou indiretamente na minha estadia nos EUA.

À CAPES, CNPq e FAPESP (2017/13095-0) pelo aporte financeiro deste trabalho.

*“e no deserto, onde vistes como o Senhor teu Deus vos levou,
como um homem leva seu filho, por todo caminho em que
fostes, até que chegastes a este lugar.”*

(Bíblia, Deuteronômio, 1, 31)

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Dispersão sólida amorfa (do inglês <i>amorphous solid dispersion</i>)
CCD	Planejamento composto central (do inglês <i>central composite design</i>)
D(n)	Produto de degradação “n” da nitazoxanida
D.i.	Diâmetro interno
DoE	Planejamento experimental (do inglês <i>design of experiments</i>)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês <i>differential scanning calorimetry</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Infravermelho por transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transform infrared</i>)
HCV	Vírus da hepatite C (do inglês <i>hepatitis C virus</i>)
HME	Extrusão por fusão a quente (do inglês <i>hot-melt extrusion</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPMC	Hidroxipropil metilcelulose
HPMCAS LF	Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose LF
HPMCAS MF	Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose MF
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
LD	Limite de detecção

Ln	Logaritmo neperiano
LQ	Limite de quantificação
NTZ	Nitazoxanida
P(n)	Produto de degradação “n” do sofosbuvir
PVP	Polivinilpirolidona
PVP/VA	Copovidona
R(n)	Produto de degradação “n” do ritonavir
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RTV-ASD	Dispersão sólida amorfa contendo ritonavir
RTV-HPMC	Dipensão sólida amorfa contendo ritonavir e hidroxipropil metilcelulose
RTV-HPMCAS LF	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose LF
RTV-HPMCAS ML	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose MF
RTV-PVP K-12	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e polivinilpirolidona K-12
RTV-PVP K-17	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e polivinilpirolidona K-17
RTV-PVP K-30	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir polivinil e pirolidona K-30
RTV-PVP K-90	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e polivinilpirolidona K-90
RTV-PVP/VA 37	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e copovidona 37
RTV-PVP/VA 64	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e copovidona 64
RTV-PVP/VA 73	Dipensão sólida amorfa contendo Ritonavir e copovidona 73

SOF	Sofosbuvir
T _{amb}	Temperatura ambiente
T _g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Termogravimetria
TIC	Cromatograma total de íons (do inglês <i>total ion chromatogram</i>)
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta performance (do inglês <i>ultra-high-performance liquid chromatography</i>)
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Critérios de avaliação dos produtos de degradação de acordo com suas respectivas quantidades em relação a dose máxima diária administrada do ativo no produto.....	10
TABELA 2 – Variáveis de degradação e níveis utilizados no planejamento composto central para os fármacos SOF e NTZ.	27
TABELA 3 – Planejamento composto central sem luz UV.	28
TABELA 4 – Planejamento composto central com luz UV	28
TABELA 5 – Volumes dos degradantes e solução de SOF utilizados em cada experimento.....	31
TABELA 6 – Volumes dos degradantes e da solução de NTZ utilizados em cada experimento.....	33
TABELA 7 – Porcentagens de degradação do SOF para os experimentos realizados sem luz UV.....	38
TABELA 8 – Porcentagens de degradação do SOF para os experimentos realizados com luz UV.	38
TABELA 9 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação do SOF sem a presença de luz UV (experimentos 1 a 17).	40
TABELA 10 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 1-17 para o SOF.	41
TABELA 11 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação do SOF com a presença de luz UV (experimentos 18 a 27).	43
TABELA 12 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 1-17 para o SOF.	43
TABELA 13 – Massa molecular observada e teórica do sofosbuvir e seus produtos de degradação.	47

TABELA 14 – Porcentagens de degradação da NTZ para os experimentos realizados sem luz UV.....	77
TABELA 15 – Porcentagens de degradação da NTZ para os experimentos realizados com luz UV.	77
TABELA 16 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação da NTZ sem a presença de luz UV (experimentos 1 a 17).	79
TABELA 17 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 1-17 para a NTZ.	80
TABELA 18 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação da NTZ com a presença de luz UV (experimentos 18 a 27).	82
TABELA 19 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 18-27 para a NTZ.	82
TABELA 20 – Massa molecular observada e teórica da NTZ e seus produtos de degradação.	84
TABELA 21 – RTV em dispersão sólidas amorfas preparadas por HME.	108
TABELA 22 – Relação entre a massa molecular e o valor K para o polímero PVP. ¹²¹	110
TABELA 23 – Temperatura de transição vítrea (T_g) dos componentes e do RTV-ASD.	127
TABELA 24 – Temperatura de transição vítrea (T_g) das dispersões sólidas RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 em diferentes concentrações	127
TABELA 25 – ANOVA fator único para RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 em diferentes concentrações.	140
TABELA 26 – ANOVA fator único RTV com diferentes classes de PVP e para as amostras RTV-PVP/VA 64 e 73.	143
TABELA 27 – Massas experimentais encontradas para o RTV e seus produtos de degradação.	153

TABELA 28 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental do SOF realizado sem a presença de luz UV.	187
TABELA 29 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental do SOF realizado na presença de luz UV.....	188
TABELA 30 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental da NTZ realizado sem a presença de luz UV.	189
TABELA 31 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental da NTZ realizado na presença de luz UV.....	190

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema das possíveis etapas realizadas em um DoE.....	14
FIGURA 2 – Fórmula estrutural do sofosbuvir (A) e seu o metabólito ativo, GS-461203 (B).....	17
FIGURA 3 – Fórmula estrutural da nitazoxanida (A) e do seu metabólito ativo, tizoxanida (B).....	19
FIGURA 4 – Esquema do procedimento experimental para a realização dos experimentos do planejamento experimental. Etapa 1-3: adição de alíquota da solução estoque do IFA, alíquota de H ₂ O ₂ 30% e solução de pH requeridas nas condições experimentais de cada experimento. Etapa 4: revestimento dos frascos com papel alumínio (experimentos com agente oxidante) para posteriormente eva-los a estufa. Etapa 5: resfriamento da solução e correção do volume com diluente. Etapa 6: diluição da solução degradada com diluente. Etapa 7: análise cromatográfica.....	31
FIGURA 5 – Estudo de lineraridade para o sofosbuvir. A) Cromatogramas sobrepostos do padrão sofosbuvir nas concentrações a, b, c, d, e, e f iguais a 5, 20, 60, 100, 140 e 180 µg·mL ⁻¹ , respectivamente. B) Curva analítica para o sofosbuvir.	35
FIGURA 6 – Representação espacial com valores codificados do planejamento composto central. A) Experimentos 1 a 17 realizados sem luz UV. B) Experimentos 18 a 27 realizados com luz UV.	36
FIGURA 7 – Representação dos resultados da degradação do SOF sem a presença de luz UV. (A) pH×H ₂ O ₂ , (B) pH×Temperatura e (C) H ₂ O ₂ ×Temperatura.	39
FIGURA 8 – Representação dos resultados da degradação do SOF na presença de luz UV.	42
FIGURA 9 – Diferentes perfis cromatográficos obtidos nas condições de degradação estudadas para o SOF.....	46

FIGURA 10 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do SOF, m/z 530 [M+H] ⁺	48
FIGURA 11 – Proposta da rota de fragmentação do fármaco sofosbuvir, m/z 530 [M+H] ⁺	49
FIGURA 12 – Cromatograma de íons totais obtido a partir da degradação do sofosbuvir em meio ácido. (–) Branco. (–) Sofosbuvir degradado em meio ácido.	50
FIGURA 13 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P1, m/z 341 [M+H] ⁺	51
FIGURA 14 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P1 (C ₁₀ H ₁₅ FN ₂ O ₈ P ⁺), m/z 341 [M+H] ⁺	51
FIGURA 15 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P2, m/z 261 [M+H] ⁺	52
FIGURA 16 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P2, m/z 261 [M+H] ⁺	53
FIGURA 17 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P3 (C ₁₆ H ₁₉ FN ₂ O ₈ P ⁺) m/z 417 [M+H] ⁺	54
FIGURA 18 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P3, m/z 417 [M+H] ⁺	54
FIGURA 19 – Cromatograma de íons totais obtido a partir da degradação do sofosbuvir em meio básico. (–) Branco. (–) Sofosbuvir degradado em meio básico.	55
FIGURA 20 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P4 (C ₁₃ H ₂₀ FN ₃ O ₉ P ⁺), m/z 412 [M+H] ⁺	57
FIGURA 21 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P4, m/z 412 [M+H] ⁺	57
FIGURA 22 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P5 (C ₁₆ H ₂₆ FN ₃ O ₉ P ⁺), m/z 454 [M+H] ⁺	59

FIGURA 23 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P5, m/z 454 [M+H] ⁺	60
FIGURA 24 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P6 (C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₉ P ⁺), m/z 488 [M+H] ⁺	61
FIGURA 25 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P6, m/z 488 [M+H] ⁺	62
FIGURA 26 – Cromatograma de íons totais obtido a partir da degradação do sofobuvir nas condições pH 5,5, temperatura 80°C e 7,5% de H ₂ O ₂ . (–) Branco. (–) Sofobuvir degradado nas condições do experimento 14.	63
FIGURA 27 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P7 (C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₉ P ⁺), m/z 402 [M+H] ⁺	64
FIGURA 28 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P7, m/z 402 [M+H] ⁺	64
FIGURA 29– Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P7 (C ₁₉ H ₃₀ FN ₃ O ₉ P ⁺), m/z 494 [M+H] ⁺	66
FIGURA 30 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P8, m/z 494 [M+H] ⁺	66
FIGURA 31 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular protonado do P9 (C ₂₂ H ₃₀ FN ₃ O ₁₀ P ⁺), m/z 546 [M+H] ⁺	68
FIGURA 32 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P9, m/z 546 [M+H] ⁺	69
FIGURA 33 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P10, m/z 478 [M+H] ⁺	70
FIGURA 34 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P10, m/z 478 [M+H] ⁺	71
FIGURA 35 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação P1-P3 do SOF.....	72
FIGURA 36 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação P4-P6 do SOF.....	73

FIGURA 37 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação P7-P10 do SOF.....	74
FIGURA 38 – Estudo de linearidade para nitazoxanida. A) Cromatogramas sobrepostos do padrão nitazoxanida nas concentrações a, b, c, d, e, e f iguais a 1, 5, 10, 20, 30 e 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. B) Curva analítica para a nitazoxanida.....	75
FIGURA 39 - Representação dos resultados da degradação da NTZ sem a presença de luz UV. (A) $\text{pH}\times\text{H}_2\text{O}_2$, (B) $\text{pH}\times\text{Temperatura}$ e (C) $\text{H}_2\text{O}_2\times\text{Temperatura}$	78
FIGURA 40 – Representação dos resultados da degradação da NTZ na presença de luz UV.....	81
FIGURA 41 – Diferentes perfis cromatográficos obtidos nas condições de degradação estudadas para a NTZ.....	84
FIGURA 42 – Espectro de massas coletado na análises MS^2 do íon molecular desprotonado da NTZ ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5\text{S}^-$) $[\text{M}-\text{H}]^-$	85
FIGURA 43 – Proposta de uma rota de fragmentação da NTZ, m/z 360 $[\text{M}-\text{H}]^-$	86
FIGURA 44 – Cromatograma de íons totais (modo negativo) obtido a partir da degradação da NTZ em meio básico durante 90 minutos. (–) Branco. (–) NTZ degradada em meio básico.	87
FIGURA 45 – Cromatograma de íons totais (modo positivo) obtido a partir da degradação da NTZ em meio básico durante 20 minutos. (–) Branco. (–) NTZ degradada em meio básico.	87
FIGURA 46 – Espectro de massas coletado na análises MS^2 do íon molecular desprotonado D1 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3^-$), m/z 137 $[\text{M}-\text{H}]^-$	88
FIGURA 47 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D1, m/z 137 $[\text{M}-\text{H}]^-$	88
FIGURA 48 – Espectro de massas coletado na análises MS^2 do íon molecular protonado D2 ($\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2^+$), m/z 163 $[\text{M}+\text{H}]^+$	89

FIGURA 49 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D2, m/z 163 [M+H] ⁺	90
FIGURA 50 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular desprotonado D3 (C ₇ H ₆ NO ₂ ⁻), m/z 136 [M-H] ⁻	91
FIGURA 51 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D3 (C ₇ H ₆ NO ₂ ⁻), m/z 136 [M-H] ⁻	91
FIGURA 52 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular desprotonado D4 (C ₈ H ₇ N ₂ O ₃ ⁻), m/z 179 [M-H] ⁻	92
FIGURA 53 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D4, m/z 179 [M-H] ⁺	92
FIGURA 54 – Cromatograma de íons totais (modo negativo) obtido a partir da degradação da nitazoxanida. (–) Branco. (–) Nitazoxanida degradada na condição do experimento 7.	93
FIGURA 55 – Espectro de massas coletado na análises MS ² do íon molecular desprotonado D5 (C ₁₀ H ₆ N ₃ O ₄ S ⁻), m/z 264 [M-H] ⁻	94
FIGURA 56 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D5 (C ₁₀ H ₆ N ₃ O ₄ S ⁻), m/z 264 [M-H] ⁻	94
FIGURA 57 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação D1-D3 da nitazoxanida.	95
FIGURA 58 – Esquema de uma típica extrusora com as principais variáveis de entrada e saída (adaptado de Patil <i>et al.</i> ⁸⁵).	105
FIGURA 59 – Estrutura química do ritonavir.	108
FIGURA 60 – Estrutura química do polímero polivinilpirrolidona (PVP).	109
FIGURA 61 – Estrutura química do polímero copovidona (PVP/VA 64).	111
FIGURA 62 – Estrutura química do polímero hidroxipropil metilcelulose (HPMC).	112
FIGURA 63 – Estrutura química do polímero Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS).	113

FIGURA 64 – Curvas calorimétricas com indicação da T_g . A) RTV, polímeros e RTV-polímero. B) RTV-PVP e RTV-PVP/VA com polímeros de diferentes graus.	125
FIGURA 65 – Curvas calorimétricas com indicação da T_g . A) RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 em diferentes concentrações de RTV. B) Curva calorimétrica indicando o ponto de fusão do RTV.	126
FIGURA 66 – Difrátogramas de RTV-ADS preparados por evaporação de solvente. A) RTV, polímeros, e RTV-ASDs preparados com 20% <i>m/m</i> . B) Polímeros e RTV-ASD preparados diferentes graus de PVP e PVPVA (20% <i>m/m</i>). C) RTV-ASD preparados com PVP K-30 e PVP/VA 64 em diferentes concentrações.	128
FIGURA 67 – Difrátogramas do RTV-ASD preparados por HME com 20% <i>m/m</i> e temperaturas de 130 a 160 °C. A) RTV, PVP/VA 64 e RTV-PVP/VA 64. B) RTV, HPMCAS MF e RTV-HPMCAS MF. C) RTV, HPMC e RTV-HPMC.	129
FIGURA 68 – A) Curvas não isotérmicas para perdas de massas do RTV puro. B) Temperaturas <i>onset</i> (T_{onset}) determinadas pelo aquecimento não isotérmico (1-10 °C/min) através de métodos de porcentagem de perda massa e interseção da tangente.....	130
FIGURA 69 – Curvas isotérmicas de perda de massa do RTV e RTV-ASDs (20% <i>m/m</i>) em 120 (A), 130 (B), 140 (C), 150 (D), 160 (E), 170 (F) e 180 °C (G). .	132
FIGURA 70 – Curvas isotérmicas de perda de massa do RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 (10-50% <i>m/m</i>) em 120 (A), 130 (B), 140 (C), 150 (D), 160 (E), 170 (F) e 180 °C (G).....	133
FIGURA 71 – Curvas isotérmicas de perda de massa polímeros puros em 120 (A), 130 (B), 140 (C), 150 (D), 160 (E), 170 (F) e 180 °C (G).	134
FIGURA 72 – Cromatogramas sobrepostos referentes as diferentes concentrações de RTV: a) 5, b) 50, c) 100, d) 150, e) 200, f) 250, g) 300 e h) 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Curva de calibração para o RTV.....	135

FIGURA 73 – Cromatogramas das amostras de referência (sem degradação) e RTV-ASDs (20% <i>m/m</i>) degradados de 120 a 180 °C. A) RTV-PVP K-30, B) RTV-PVP/VA 64, C) RTV puro, D) RTV-HPMCAS MF, E) RTV-HPMCAS LF e F) RTV-HPMC.	137
FIGURA 74 – Teor de RTV nas dispersões sólidas amorfas a 20% (<i>m/m</i>) e RTV puro. As barras de erro representam o desvio padrão para n = 2.	138
FIGURA 75 – Teor de RTV em ASDs (10-50% <i>m/m</i>) após exposição isotérmica de 120-180 °C utilizando TGA durante 5 minutos. A) RTV-PVP K-30 e B) RTV-PVP/VA 64. As barras de erro representam o desvio padrão para n = 2.	139
FIGURA 76 – Teor de RTV em ASDs com diferentes classes de polímeros PVP (A) e PVP/VA 64 (B) na concentração de 20% (<i>m/m</i>) após exposição isotérmica de 120-180 °C utilizando TGA durante 5 minutos. As barras de erro representam o desvio padrão para n = 2.	142
FIGURA 77 – Relação entre o teor de RTV para uma dada temperatura e T _g (razão em Kelvin). RTV-ASDs foram preparadas com diferentes polímeros a 20% (<i>m/m</i>) (A), diferentes classes de PVP a 20% (<i>m/m</i>) (B), diferentes classes de PVP/VA a 20% (<i>m/m</i>) (C) e diferentes concentrações com os polímeros PVP K-30 e PVP/VA 64 (D).	144
FIGURA 78 – Esquema do barril de aquecimento utilizado na extrusora Xplore.	145
FIGURA 79 – Amostras extrusadas após processamento em diferentes temperaturas.	146
FIGURA 80 – Cromatogramas das amostras extrusadas em diferentes temperaturas.	147
FIGURA 81 – Perfil de degradação das amostras processadas por HME representadas pelo teor de RTV (%) e pela soma das áreas cromatográficas dos	147

FIGURA 82 – Comparação dos teores de RTV para RTV puro, RTV-PVP/VA 64 e RTV-HPMC degradados por TGA e estufa convencional a 160 °C durante 30 minutos.	149
FIGURA 83 – Logaritmo (ln) do teor de RTV vs tempo. Degradação das amostras usando (A) estufa convecional e (B) TGA	149
FIGURA 84 – Espectro de infravermelho do RTV, HPMC, RTV-HPMC, HPMCAS LF, RTV-HPMCAS LF, HPMCAS MF, and RTV-HPMCAS MF. As dispersões sólidas amorfas estão na concentração de 20% (m/m).	151
FIGURA 85 – Espectros de infravermelho. A) RTV, PVP K-30, e RTV-PVP K-30 nas concentrações de 10 to 50% (m/m). B) RTV, PVP K-12, PVP K-17, PVP K-30, PVP K-90 e seus ASDs (20% m/m). C) RTV, PVP/VA 64 e RTV-PVP/VA 64 nas concentrações de 10 a 50% (m/m). D) RTV, PVP/VA 37, PVP/VA 64, PVP/VA 73 e seus ASD (20% m/m).	152
FIGURA 86 – Espectros de massas do RTV e seus produtos de degradação. A) espectro MS ² do RTV (m/z 721), B) espectro <i>full scan</i> com a presença de R1 (m/z 171), C) espectro MS ² de R2 (m/z 271), D) espectro MS ² de R3 (m/z 213). ...	156
FIGURA 87 – Espectros MS ² dos produtos de degradação. A) R4 (m/z 703), B) R5 (m/z 551), C) R6 (m/z 436), e D) R7 (m/z 606).	157
FIGURA 88 – Rotas de fragmentação propostas para o RTV e seus produtos de degradação (R1-R7).	158
FIGURA 89 – Mecanismos de reação propostos para os produtos de degradação do RTV.	159
FIGURA 90 – Perfis cromatográficos na diferentes condições de degradação do planejamento experimental para o SOF. A) Experimentos 1-17. B) Experimentos 18-27.	191
FIGURA 91 – Perfis cromatográficos na diferentes condições de degradação do planejamento experimental para a NTZ. A) Experimentos 1-17. B) Experimentos 18-27.	192

RESUMO

DEGRADAÇÃO FORÇADA DOS FÁRMACOS NITAZOXANIDA E SOFOSBUVIR E DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE DISPERSÕES SÓLIDAS AMORFAS CONTENDO RITONAVIR

O primeiro capítulo deste trabalho teve como objetivo utilizar o planejamento experimental no estudo de degradação forçada sofosbuvir (SOF) e nitazoxanida (NTZ). As variáveis pH, temperatura e a interação desta com o H₂O₂ nos experimentos sem luz UV contribuíram para a degradação do SOF. Nos experimentos com luz UV, SOF apresentou menor estabilidade em pH 1. As variáveis pH, temperatura, H₂O₂ e a interação do pH e temperatura influenciaram a degradação da NTZ nos experimentos sem luz UV. Nos experimentos com luz UV não foi constatado a influência das variáveis pH e temperatura na degradação da NTZ, mas foi observado um efeito sinérgico destas variáveis. Foram elucidados por LC-MS/MS 10 produtos de degradação do SOF (P1-P10) e 5 da NTZ (D1-D5). No segundo capítulo avaliou-se a estabilidade térmica do Ritonavir (RTV) em dispersões sólidas amorfas. As amostras foram termodegradadas por termogravimetria, estufa e *hot-melt extrusion*. A estabilidade térmica do RTV foi relacionada com os grupos substituintes dos polímeros. Polímeros próticos (acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS) e hidroxipropil metilcelulose (HPMC)) catalisaram as reações de degradação do RTV quando comparadas aos apróticos (polivinilpirrolidona (PVP) e copovidona (PVP/VA)). Poucas evidências mostraram que a estabilidade térmica está associada a mobilidade molecular ou interações intermoleculares. Os produtos de degradação do RTV (R1-R7) foram oriundas de hidrólises, exceto R4 que se formou a partir da desidratação do RTV. Ambos trabalhos foram fundamentais para compreender os processos de de degradação e a estabilidade dos fármacos em diferentes ambientes químicos.

Palavras chaves: Degradação forçada; planejamento de experimentos; dispersões sólidas amorfas; estabilidade térmica.

ABSTRACT

FORCED DEGRADATION OF NITAZOXANIDE AND SOFOSBUVIR AND THERMAL DEGRADATION OF AMORPHOUS SOLID DISPERSIONS CONTAINING RITONAVIR

The first chapter of this work aimed to use design of experiments in the forced degradation of sofosbuvir (SOF) and nitazoxanide (NTZ). The variables pH, temperature and interaction between temperature and H₂O₂ contributed to degrade SOF in the experiments with no UV light. SOF presented lower stability at pH 1 in the experiments with UV light. The variables pH, temperature, H₂O₂, and the interaction between pH and temperature contributed to degrade NTZ in the experiments with no UV light. In the experiments with UV light it was not noticed influence of pH and temperature on NTZ degradation, but a synergism effect of these variables was observed. It was elucidated 10 degradation products of SOF (P1-P10) and 5 (D1-D5) for NTZ by LC-MS/MS. The second chapter was destined to evaluate the thermal stability of RTV in amorphous solid dispersions. The samples were thermally degraded by thermogravimetry, conventional oven, and hot-melt extrusion. Thermal stability of RTV was related to substituent groups of polymers, which protic ones (hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate (HPMCAS), and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)) catalyzed degradation reactions of RTV when compared with aprotic polymers (poly(vinylpyrrolidone) (PVP), copovidone (PVP/VA)). Few evidences showed that thermal stability of RTV is related to molecular mobility or molecular interactions in RTV formulations. The RTV degradation products (R1-R7) were generated from hydrolysis reactions, except R4 which raised of RTV dehydration. Both works were fundamental to understand the process of degradation and the drugs stabilities in different chemical environments.

Key words: Forced degradation; design of experiments; amorphous solid dispersions; thermal stability.

SUMÁRIO

Introdução geral	1
CAPÍTULO 1.....	3
Planejamento Experimental Aplicado a Estudos de Degradação Forçada dos Fármacos Nitazoxanida e Sofosbuvir	3
1.1 - Introdução.....	5
1.1.1 - Estudos de degradação forçada no Brasil	6
1.1.2 - Perfil e avaliação dos produtos degradação.....	8
1.1.3 - Estratégia para selecionar as condições de degradação.....	10
1.1.4 - Planejamento experimental.....	11
1.1.5 - Estudos de degradação forçada via planejamento experimental	14
1.1.6 - Aspectos gerais dos analitos	16
1.1.6.1 - Sofosbuvir	16
1.1.6.2 - Nitazoxanida	18
1.2 - Objetivos	21
1.3 - Parte experimental.....	23
1.3.1 - Equipamentos.....	23
1.3.2 - Reagentes	23
1.3.3 - Método HPLC para o sofosbuvir	23
1.3.4 - Método LC-MS/MS para o sofosbuvir	24
1.3.5 - Método HPLC para a nitazoxanida.....	25
1.3.6 - Método LC-MS/MS para a nitazoxanida.....	26
1.3.7 - Degradação do sofosbuvir e nitazoxanida via planejamento experimental	26
1.3.8 - Curva de calibração para o sofosbuvir.....	29

1.3.9 - Degradação forçada do sofosbuvir	29
1.3.10 - Curva de calibração para a nitazoxanida	32
1.3.11 - Degradação forçada da nitazoxanida	32
1.4 - Resultados e discussão	35
1.4.1 - Estudo de linearidade para quantificação do sofosbuvir	35
1.4.2 - Degradação forçada do sofosbuvir	36
1.4.3 - Elucidação dos produtos de degradação do sofosbuvir	45
1.4.3.1 - Sofosbuvir (m/z 530, [M+H] ⁺)	47
1.4.4 - Degradação forçada do sofosbuvir em meio ácido.....	50
1.4.4.1 - P1 (m/z 341, [M+H] ⁺).....	50
1.4.4.2 - P2 (m/z 261, [M+H] ⁺).....	52
1.4.4.3 - P3 (m/z 417, [M+H] ⁺).....	53
1.4.5 - Degradação forçada do sofosbuvir em meio básico	55
1.4.5.1 - P4 (m/z 412, [M+H] ⁺).....	55
1.4.5.2 - P5 (m/z 454, [M+H] ⁺).....	58
1.4.5.3 - P6 (m/z 488, [M+H] ⁺).....	60
1.4.6 - Degradação forçada do sofosbuvir – Experimento 14.....	62
1.4.6.1 - P7 (m/z 402, [M+H] ⁺).....	63
1.4.6.2 - P8 (m/z 494, [M+H] ⁺).....	65
1.1.1.1 - P9 (m/z 546, [M+H] ⁺).....	67
1.1.1.2 - P10 (m/z 478, [M+H] ⁺).....	70
1.1.2 - Estudo de linearidade para quantificação da nitazoxanida	75
1.1.3 - Degradação forçada da nitazoxanida	76
1.1.4 - Elucidação dos produtos de degradação da nitazoxanida.....	82
1.1.4.1 - Nitazoxanida (m/z 306, [M-H] ⁻)	85
1.1.5 - Degradação forçada da nitazoxanida em meio básico.....	86
1.1.5.1 - D1 (m/z 137, [M-H] ⁻).....	88
1.1.5.2 - D2 (m/z 163, [M+H] ⁺)	89
1.1.5.3 - D3 (m/z 136, [M-H] ⁻).....	90

1.1.5.4 - D4 (m/z 179, [M-H] ⁻).....	91
1.1.6 - Degradação forçada da nitazoxanida - Experimento 7	92
1.1.6.1 - D5 (m/z 264, [M-H] ⁻)	93
1.2 - Conclusões.....	97
CAPÍTULO 2.....	98
Impacto do polímero na estabilidade térmica de dispersões sólidas amorfas contendo Ritonavir	98
2.1 - Introdução.....	100
2.1.1 - Dispersão sólida	102
2.1.2 - <i>Hot-melt extrusion</i>	103
2.1.3 - Aspectos gerais do fármaco e dos polímeros.....	107
2.1.3.1 - Ritonavir.....	107
2.1.3.2 - Polivinilpirrolidona (PVP).....	109
2.1.3.3 - Polivinilpirrolidona/acetato de vinila – Copovidona (PVP/VA 64)...	110
2.1.3.4 - Hidroxipropil metilcelulose (HPMC)	111
2.1.3.5 - Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose.....	112
2.2 - Objetivos	115
2.3 - Parte experimental.....	117
2.3.1 - Reagentes	117
2.3.2 - Métodos e equipamentos.....	117
2.3.2.1 - Dispersões sólidas amorfas por rota-evaporação.....	117
2.3.2.2 - Dispersões sólidas amorfas por extrusão	118
2.3.2.3 - Análises de infravermelho	118
2.3.2.4 - Caracterização das amostras em estado sólido por DSC e difração de raio-X.....	119
2.3.2.5 - Estudos de estabilidade térmica.....	120
2.3.2.6 - Quantificação de RTV por HPLC.....	121

2.3.2.7 - Análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	121
2.3.2.8 - Análise estatística.....	122
2.4 - Resultados e discussão	124
2.4.1 - Propriedades físico-químicas	124
2.4.2 - Degradação térmica considerando a perda de massa.....	130
2.4.3 - Curva de calibração para o RTV.....	135
2.4.4 - Degradação térmica considerando o tipo de polímero.	136
2.4.5 - Degradação térmica considerando massa molecular do PVP e a química do PVP/VA.....	138
2.4.6 - Relação entre a degradação térmica e T_g	140
2.4.7 - Estabilidade térmica das amostras preparadas por HME	145
2.4.8 - Cinética de degradação	148
2.4.9 - Análises de infravermelho	150
2.4.10 - Elucidação estrutural dos produtos de degradação.....	152
2.4.11 - Mecanismos da degradação térmica	160
2.4.12 - Cinética da degradação térmica e processamento por HME.	161
2.5 - Conclusões.....	164
2.6 - Conclusões gerais	166
2.7 - Referências.....	168
Apêndice 1	187
Apêndice 2	188
Apêndice 3	189
Apêndice 4	190
Apêndice 5	191
Apêndice 6	192

Introdução geral

A segurança e eficácia de um fármaco são determinadas pelo perfil tóxico-farmacológico e pelos efeitos adversos causados pelas impurezas contidas no produto acabado.^{1, 2} Diante disso, o estudo de degradação forçada constitui uma etapa extremamente importante para o desenvolvimento de medicamentos. Durante estes estudos o insumo farmacêutico ativo (IFA) e o produto acabado são submetidos a condições extremas que acelerem a geração dos produtos de degradação. O estudo de degradação forçada possibilita prever os possíveis produtos de degradação gerados no estudo de estabilidade de longa duração ou acelerada. Além disso, estes estudos permitem assegurar que o método analítico é indicativo de estabilidade, ou seja, capaz de identificar e quantificar os produtos de degradação, assim como o ativo.

Os produtos de degradação podem ser gerados pela exposição do medicamento à luz, altas temperaturas, condições ácidas e/ou básicas, umidade, ambiente oxidativo, reações entre insumo farmacêutico ativo (IFA) e excipientes (incompatibilidade) e até mesmo devido ao contato com a embalagem.³ Uma das formas de se avaliar a degradação do fármaco é através do planejamento experimental. Nesta abordagem as variáveis de degradação são alteradas simultaneamente, permitindo simular uma degradação mais próxima da realidade, e os resultados são analisados estatisticamente para obtenção de modelos matemáticos.

A degradação do ativo pode ocorrer em prateleira ou durante o processo de manufatura dos medicamentos. A extrusão por fusão a quente (HME, do inglês *hot-melt extrusion*) é um exemplo de técnica em que podem surgir produtos de degradação durante o processo. HME é empregado para preparar dispersões sólidas amorfas (ASD, do inglês *amorphous solid dispersion*) com a finalidade de aumentar a solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos de baixa solubilidade em água. Durante o processo de HME o fármaco é disperso

molecularmente e homogeneizado em um carregador/polímero em condições de estresse térmico e mecânico. Estas condições podem promover o surgimento de produtos de degradação provenientes do polímero e/ou fármacos sensíveis à temperatura.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, no qual o primeiro destinou-se aos estudos de degradação forçada dos fármacos sofosbuvir (SOF) e nitazoxanida (NTZ) empregando planejamento experimental. Além disso, os produtos de degradação gerados nas diferentes condições do planejamento foram analisados por espectrometria de massas de alta resolução.

Já o segundo capítulo foi destinado a avaliação da estabilidade térmica do fármaco ritonavir (RTV) em ASD com diferentes polímeros. As amostras foram preparadas por HME e por rota-*evaporação* de solvente. Com intuito de entender a estabilidade térmica do RTV, foram realizados ensaios de teor por cromatografia líquida e caracterização das amostras por termogravimetria (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e difração de raio-X (DRX). Além disso, os produtos de degradação foram elucidados para compreender os processos de degradação ocorridos durante o estresse térmico.

CAPÍTULO 1

Planejamento Experimental Aplicado a Estudos de Degradação Forçada dos Fármacos Nitazoxanida e Sofosbuvir

1.1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Introdução

O termo impureza geralmente é adotado como sinônimo de produtos de degradação. Porém, cabe frisar que o conceito de impureza consiste em quaisquer fontes inorgânicas (catalizadores, metais pesados, sais inorgânicos, etc.), orgânicas (solventes, material de partida, subprodutos, intermediários, etc.) ou solventes (orgânicos ou inorgânicos) utilizados na manufatura do medicamento.⁴⁻⁶ Portanto, produtos de degradação pertencem a um subgrupo das impurezas. Os produtos de degradação podem ser gerados dependendo da estabilidade de um determinado princípio ativo, sendo que esse processo pode ser acelerado pela exposição do medicamento à luz, altas temperaturas, condições ácidas e/ou básicas, umidade, ambiente oxidativo, reações entre insumo farmacêutico ativo (IFA) e excipientes (incompatibilidade) e até mesmo devido ao contato com a embalagem.³

Os estudos de degradação forçada, conhecidos também como testes de estresse, são praticados na indústria farmacêutica há muitos anos,⁷ mas somente em 1993 a Conferência Internacional para Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonization*) lançou o requerimento formal Q1A com a introdução do guia “*Stability Testing of New Drug Substances and Products*”.⁸ A degradação forçada é um processo que envolve a degradação do medicamento sob condições extremas que aceleram a geração dos produtos de degradação. As informações obtidas são utilizadas para determinar a estabilidade da molécula, conhecer os caminhos de degradação e identificar os produtos de degradação, estabelecer condições de armazenagem, validade, escolha de excipientes para formulação e permite ainda o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos para tais produtos.⁷⁻⁹

1.1.1 - Estudos de degradação forçada no Brasil

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu com a resolução RE nº 889/2003 os parâmetros para validação analítica e a necessidade dos medicamentos serem submetidos a condições de estresse para que haja degradação do princípio ativo, quando as impurezas não forem conhecidas.¹⁰ Cabe frisar que esta resolução foi revogada e atualmente está em vigor a Resolução da Diretiva Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017. Nesta resolução estão os parâmetros que regem a validação analítica.¹¹

Em consonância com a resolução nº 889/2003, em 2005 foi emitida a resolução RE nº 1, de 29 de julho, para guiar a realização dos estudos de estabilidade dos produtos farmacêuticos, com a finalidade de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade. Neste guia, foi introduzido indiretamente alguns conceitos e variáveis (como pH, irradiação de luz UV e aquecimento) relacionados ao estudo de degradação.¹² Em 2008 foi lançado o Informe Técnico nº 1/2008 com a finalidade de esclarecer, dentre outros itens, os procedimentos para a realização dos 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.¹³

No dia 23 de janeiro de 2012 foi aberta a Consulta Pública nº 11/2012 com a finalidade de que os centros de pesquisa, indústrias e instituições relacionadas com a produção e comercialização de produtos farmacêuticos contribuíssem com a elaboração da proposta de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) final aplicável para todo o território nacional. Nesta eram recebidas críticas e sugestões relativas à proposta da RDC, estabelecendo parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.¹⁴

Em 2015 entra em vigor a RDC nº 53, a qual estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em

medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, além de outras providências. A resolução ainda recomenda as condições de estresse em que o fármaco deve ser submetido, tais como aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição à radiação UV e a íons metálicos.¹⁵ Embora a RDC nº 53 não mencione, vale salientar que a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês “*World Health Organization*”) propõe a submissão do princípio ativo ao fator de estresse solução de íon metálicos ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe^{2+} ou Cu^{2+}).¹⁶ A RDC nº 53 não se aplica:

- Produtos biológicos/ biotecnológicos
- Excipientes;
- Peptídeos;
- Oligonucleotídeos;
- Radiofármacos;
- Produtos de fermentação e derivados;
- Produtos fitoterápicos;
- Produtos brutos de origem animal;
- Medicamentos específicos (medicamentos que não se enquadram nas categorias de medicamento novo, genérico, similar biológico, fitoterápico ou notificado. Portanto, o IFA não é passível de ensaio de bioequivalência frente a um produto comparador. São exemplos de medicamentos específicos os produtos para a prevenção da desidratação, soluções para diálise, medicamentos a base de rutina, etc...);¹⁷
- Poliaminoácidos, os de notificação simplificada;
- Produtos usados nas etapas de desenvolvimento de estudos clínicos.

1.1.2 - Perfil e avaliação dos produtos de degradação

O perfil de degradação consiste, em termos gerais, no conjunto de produtos de degradação, o qual pode remeter a uma determinada condição específica ou ao estudo de estabilidade. Uma vez que o fármaco é exposto a condições extremas no estudo de degradação forçada, este se torna mais crítico e fornece, por via de regra, uma maior quantidade de produtos de degradação em relação ao estudo de estabilidade. No estudo de degradação forçada são gerados os potenciais produtos de degradação e o estudo de estabilidade fornece o perfil de degradação “real”. Este último pode apresentar impurezas encontradas no perfil de degradação potencial.¹⁸

De acordo com o ICH Q2A e ICH Q2B, a aplicação de um registro de um fármaco deve apresentar um método analítico de forma que seja adequado para detecção e quantificação dos produtos de degradação. O método analítico é validado através do preparo do IFA juntamente com as impurezas. Além disso, caso os padrões das impurezas não estejam disponíveis ou sejam desconhecidas, realiza-se os estudos de degradação forçada.^{6, 19} Os estudos de degradação forçada são essenciais durante o desenvolvimento do método analítico e tem como finalidade:

- Estabelecer as vias de degradação de um IFA, tais como hidrólise, oxidação, termólise e fotólise;
- Elucidar a estrutura química dos produtos de degradação;
- Estabelecer a estabilidade intrínseca de um IFA;
- Produzir formulações mais estáveis através da seleção de excipientes, embalagens, condições de transporte e armazenagem adequada que minimizem a degradação do princípio ativo.¹⁸

Após a obtenção do perfil de degradação deve-se realizar uma análise crítica, a qual deve contemplar a verificação da pureza do pico cromatográfico do IFA, e também uma avaliação dos fatores que podem interferir na estabilidade do medicamento.

Os produtos de degradação devem seguir um critério de avaliação de acordo com a sua quantidade encontrada em relação ao IFA. A avaliação leva em consideração a quantidade máxima de IFA administrado por dia e o limite dos produtos de degradação expressos em porcentagem (ou massa) em relação ao IFA. De acordo com a quantidade de cada produto de degradação é feito uma notificação, identificação ou qualificação do mesmo. Cabe salientar que a quantidade do produto de degradação se refere a maior concentração encontrada no estudo de estabilidade do fármaco. A TABELA 1 mostra os critérios adotados pelo ICH, U.S. FDA (*United States Food and Drug Administration*) e ANVISA da quantidade de impureza encontrada em relação a quantidade de IFA administrado diariamente do produto acabado.^{15, 19} Os critérios levados em consideração possuem os seguintes significados:

- Limite de notificação: se refere ao limite acima do qual uma impureza deve ser reportada.
- Limite de identificação: limite acima do qual uma impureza deve ser identificada estruturalmente.
- Limite de qualificação: quantidade acima do qual uma impureza necessita ser qualificada. Entende-se “qualificada” como sendo o processo de aquisição e avaliação de dados que estabelecem a segurança biológica (perfil tóxico-farmacológico) de uma impureza ou um dado perfil de degradação.

TABELA 1 – Critérios de avaliação dos produtos de degradação de acordo com suas respectivas quantidades em relação a dose máxima diária administrada do ativo no produto.

	Dose máxima diária	Limites*
Limites de notificação	≤ 1g	0,1%
	> 1g	0,05%
Limite de identificação	< 1mg	1,0% ou 5µg IDT, o que for menor
	1mg-10mg	0,5% ou 20µg IDT, o que for menor
	> 10mg-2g	0,2% ou 2mg IDT, o que for menor
	> 2g	0,10%
Limite de qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50µg IDT, o que for menor
	10 mg - 100mg	0,5% ou 200µg IDT, o que for menor
	> 100 mg - 2g	0,2% ou 3mg IDT, o que for menor
	> 2g	0,15%

*Limites do produto de degradação expressos em porcentagens do IFA.

IDT: ingestão diária total

1.1.3 - Estratégia para selecionar as condições de degradação

O estudo de degradação forçada é realizado de forma que haja exposição direta do fármaco em condições extremas para ocorrência dos produtos de degradação. As variáveis a serem estudadas são dependentes da legislação vigente e da natureza da molécula em estudo. Os estudos de degradação devem ser realizados em batelada com soluções em diferentes pHs, na presença de oxigênio, luz, elevadas temperaturas e níveis de umidade.²⁰

A degradação variando o pH é realizada geralmente utilizando soluções 0,1 mol·L⁻¹ de HCl e NaOH²⁰. A degradação por efeito da radiação é realizada por exposição do fármaco a qualquer fonte de luz que produza uma emissão padrão D65/ID65 (lâmpadas que simulam luz natural do dia com temperatura 6500K). A iluminação e a potência da fonte de radiação devem ser

respectivamente de no mínimo 1,2 milhões de lux/hora e 200 Wh m⁻². Recomenda-se também que a lâmpada não emita radiação significativa abaixo de 320 nm.²¹ Com relação à exposição a condições oxidantes o reagente geralmente utilizado é o H₂O₂, em concentrações que variam desde 0,1% até 3,0%, neutro e em temperatura ambiente (25°C). As temperaturas utilizadas no estudo de degradação forçada são comumente variadas de 40 a 80°C, tanto para IFA sólido quanto para líquidos. Outros estudos adicionais levando em consideração as variáveis umidade e estabilidade microbiológica também fazem parte do estudo global de estabilidade de um IFA ou do produto final.²²⁻²⁴

Para cada condição de degradação, de acordo com a RDC n° 53/2015, recomenda-se que ocorra no mínimo 10% de degradação do princípio ativo, e que essa degradação seja inferior a uma degradação completa da amostra (100% de degradação). Quando não for possível obter valores superiores a 10% de degradação deve se apresentar uma justificativa técnica baseada na estabilidade da amostra.¹⁵ Já WHO no 39° relatório denominado “*Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*” determina que o IFA não deve ser degradado completamente, mas que a degradação ocorra em uma extensão entre 10 a 30% por ensaio quando comparado ao IFA não degradado. A faixa escolhida permite que alguma degradação ocorra e também evita a geração de produtos de degradação secundários. Logo, deve-se variar as condições e o tempo de reação levando em consideração a susceptibilidade de degradação do IFA em cada fator de estresse. Caso não haja formação de produtos de degradação durante 10 dias, o fármaco é considerado estável na específica condição de estresse.¹⁶

1.1.4 - Planejamento experimental

Em qualquer sistema, seja ele de produção ou analítico, o conhecimento da influência das variáveis de entrada sobre as respostas é fundamental. Dentro deste cenário, o planejamento de experimentos surge como

uma ferramenta multivariada útil para ser utilizada na condução de pesquisas e tem como finalidade extrair o máximo de informação dos dados experimentais para determinar a influência de cada variável e o sinergismo entre elas, o que possibilita otimizar um processo.^{25, 26} O método multivariado apresenta as seguintes vantagens:

- Conhecer previamente quantos experimentos deverão ser realizados para alcançar determinado objetivo;
- Observar interações sinérgicas ou antagônicas entre as variáveis;
- Criar modelos matemáticos (superfícies de resposta) capazes de descrever o comportamento das variáveis e prever a resposta do sistema dentro do domínio experimental estudado;
- Diminuição de tempo, custo e geração de resíduos químicos, o que contribui para os princípios da química verde²⁶.

A análise das variáveis se inicia estabelecendo quais variáveis do sistema são conhecidas e desconhecidas. Para isso, lança-se mão do conhecimento prévio adquirido pela própria experiência do analista ou através da literatura. Em seguida são selecionadas as possíveis variáveis a serem analisadas e o domínio experimental estudado. Este último remete à área a ser investigada que será definida pela variação das variáveis experimentais²⁷. Nesta etapa, chamada de triagem, é comumente utilizado o planejamento fatorial completo de dois níveis, caso o número de variáveis seja menor ou igual a quatro, e o planejamento fatorial fracionário para sistemas com mais de 4 variáveis. Estes planejamentos são capazes de fornecer modelos de regressão e superfícies de respostas lineares. Os planejamentos experimentais fatoriais de dois níveis investigam valores extremos das variáveis, e a adição de pontos centrais é uma alternativa para obter maior conhecimento do comportamento do sistema em valores intermediários. Logo, a abordagem dos planejamentos fatoriais de dois níveis são normalmente

empregados para analisar quais efeitos possuem ou não significância na resposta de interesse.²⁸ A etapa de triagem é de extrema importância, pois uma vez obtido maior conhecimento do sistema, evita-se trabalhar com grande número de variáveis que não influenciam significativamente a resposta de interesse, o que faz economizar tempo e gastos desnecessários.

Após quantificados os efeitos de cada variável e suas interações, realiza-se a otimização do sistema. Em termos gerais, de acordo com a regra de Pareto, aproximadamente 20% das variáveis são responsáveis por 80% da resposta do sistema.²⁹ As variáveis de maior influencia na resposta de interesse são tomadas para a realização de um novo planejamento experimental que é escolhido de acordo com o julgamento do analista ser o mais viável e necessário para o sistema em estudo. Neste caso, as variáveis são estudadas em um maior número de níveis para se ter um maior conhecimento do comportamento da resposta do sistema. A FIGURA 1 mostra o esquema das possíveis etapas a serem realizadas durante um planejamento experimental. As etapas a serem realizadas dependerá dos objetivos do trabalho e dos resultados obtidos.

Vários são os planejamentos utilizados para otimização (Fatorial completo de 3 níveis, Composto central, Doehlert, Box-Behnken, etc.) e cada um possui suas especificidades. Neste trabalho trabalho foi utilizado o planejamento composto central (CCD, do inglês *central composite design*) com cinco níveis constituído por pontos nos vértices, advindos de um planejamento fatorial de dois níveis acrescido de pontos axiais e ponto central. O número de experimentos a serem realizados em um CCD pode ser determinado por $N = 2^k + 2k + C_0$, onde N , k e C_0 são respectivamente, o número total de experimentos, quantidade de fatores analisados e número de réplicas no ponto central.³⁰ A distância do ponto central em relação aos pontos axiais é geralmente determinada por $\pm \alpha$ (rotabilidade), o qual varia de 1 a \sqrt{k} . O CCD constituiu uma interessante opção de planejamento pois necessita de poucos experimentos e é uma ampliação do

natural do planejamento fatorial com ponto central, o qual pode ser realizado em uma primeira etapa.^{26, 31}

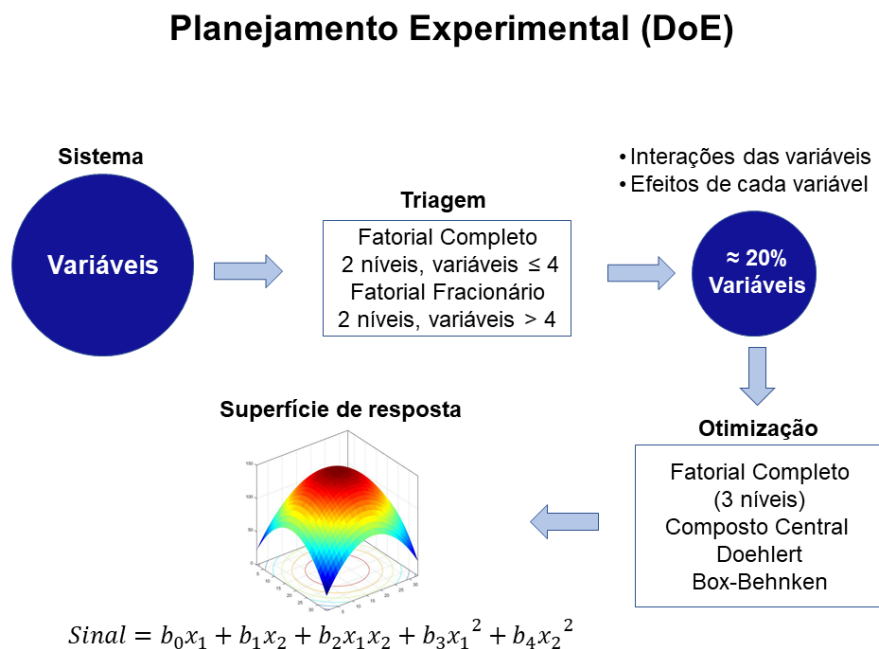


FIGURA 1 – Esquema das possíveis etapas realizadas em um DoE.

1.1.5 - Estudos de degradação forçada via planejamento experimental

Poucas monografias em farmacopeias trazem métodos multivariados para análise de produtos de degradação³² e os guias existentes referentes à condução de estudos de degradação forçada são generalistas e não fornecem informações suficientes sobre a abordagem prática do estudo de degradação forçada. O método mais utilizado para este estudo é método univariado²⁰ em que as variáveis de degradação são estudadas de forma independente em cada experimento. Nesta abordagem os experimentos são realizados mantendo-se todas as variáveis constantes em determinados valores e, então, varia-se apenas o nível de uma determinada variável. Porém, o método univariado não considera a

interação entre as variáveis, como por exemplo, a exposição a ambiente oxidativo e à radiação UV, simultaneamente.^{26, 33}

A exposição do fármaco a somente uma variável de estresse pode não apresentar degradação, mas a combinação de duas variáveis pode criar condições de sinergismo onde ocorra a degradação.³⁴ Por exemplo, em condições reais, um fármaco pode ser submetido simultaneamente à incidência de radiação UV, temperatura alta, condições ácidas e oxidativas, devido um excipiente ser ácido e ao medicamento não oferecer resistência a mecanismos oxidativos. A utilização dos conceitos de planejamento experimental possibilita avaliar simultaneamente as diferentes variáveis e verificar as que possuem maior influência no sistema utilizado para degradação forçada, assim como o efeito da interação entre elas.³⁵ Os experimentos são realizados com as variáveis sendo modificadas em níveis e as variáveis são analisadas estatisticamente para criar modelos de regressão capazes de avaliar a intensidade da degradação em função das condições do sistema.³⁶

As condições às quais o medicamento é submetido no estudo de degradação forçada fornecidas pelo planejamento experimental proporcionam dados que simulam melhor as situações reais. Isto traz conhecimento suficiente para a escolha final das condições de armazenamento e de formulação. Além disso, o sinergismo existente entre as variáveis pode promover o surgimento de produtos de degradação ainda não reportados na literatura.³³

Atualmente não existe nenhuma legislação acerca do estudo de degradação utilizando a metodologia multivariada, tampouco com relação à avaliação do possível sinergismo entre as variáveis para geração dos produtos de degradação de um fármaco.²⁰ Na literatura os trabalhos relacionados à aplicação de análise multivariada no estudo de degradação forçada são escassos e pouco estudados. Em 2012, Sonawane e Guidem utilizaram o planejamento fatorial completo 3² com a finalidade de submeter o lulicinazol a diversas condições de estresse. Neste trabalho, o pH teve maior efeito na formação de produtos de

degradação e a interação entre pH e temperatura também influenciou na porcentagem de lulicinazol degradado.³³ Já o trabalho de Kurmi *et al.*, o qual teve como um dos objetivos a otimização das condições de degradação forçada para furosemida por meio do planejamento experimental, foram encontradas condições experimentais em que somente foram gerados produtos de degradação específicos, de maneira seletiva.³⁴

Ardila *et al.* determinaram as variáveis que mais influenciam na degradação do albendazol por meio do estudo multivariado dos parâmetros de degradação forçada. Esse estudo gerou resultados interessantes, incluindo uma molécula inédita gerada pela reação de Pummerer em que houve a introdução de um átomo de cloro na molécula de sulfóxido de albendazol. A reação promovida pela presença de temperatura alta, agente oxidante e HCl mostra a importância da combinação das variáveis durante o estudo de degradação forçada.³⁷

1.1.6 - Aspectos gerais dos analitos

1.1.6.1 - Sofosbuvir

Sofosbuvir (SOF) é um medicamento de uso oral aprovado pelo U.S. FDA em 2013³⁸ que é geralmente combinado com outros medicamentos, como ribavirin e ledipasvir, para o tratamento de pacientes com infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C (HCV – *hepatitis C virus*).³⁹ Devido a sua eficácia e relevância no tratamento contra HCV⁴⁰, SOF está incluído na lista de medicamentos essenciais da WHO (*WHO Model list of Essential Medicines*), o qual contém os medicamentos necessários para compor um sistema básico de saúde.⁴¹

Sofosbuvir, ou propan-2-il (2S)-2-[[[(2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-fluor-3-hidroxi-4-metiloxolan-2-il]metoxi-fenoxifosforil] amino] propanoato (FIGURA 2A), possui fórmula e massa molecular iguais a

$C_{22}H_{29}FN_3O_9P$ e $529,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente.³⁸ SOF possui ação antiviral atuando diretamente na replicação do vírus HCV através da inibição do RNA NS5B polimerase.⁴²⁻⁴⁴ No organismo o fármaco é metabolizado no fígado para a forma ativa análoga da uridina trifosfato, chamado de GS-461203 (FIGURA 2B). Este é incorporado dentro do RNA do HCV inibindo a atividade do NS5B polimerase durante replicação viral. A eliminação do fármaco pelo organismo se dá na sua forma ativa a qual é excretada predominantemente pela urina.⁴⁵ Informações sobre o mecanismo de transformação do sofosbuvir para GS-461203, assim como sua eliminação do organismo, podem ser encontrados detalhadamente no trabalho de Summers *et al.*⁴³

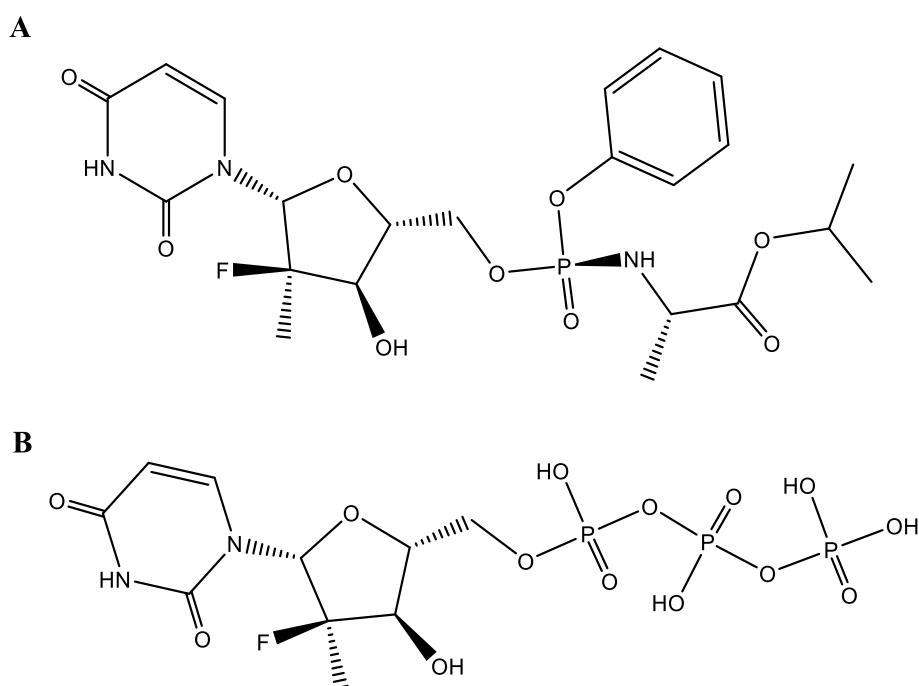


FIGURA 2 – Fórmula estrutural do sofosbuvir (A) e seu o metabólito ativo, GS-461203 (B).

1.1.6.2 - Nitazoxanida

Os parasitas intestinais estão entre os maiores contribuintes para a carga de doenças a nível mundial. Porém, durante três décadas desde a introdução dos nitroimidazóis e benzimidazóis em 1970 não houve inovações relevantes com relação ao tratamento de infecções parasitárias. Mas em 2002, o FDA aprovou a comercialização do fármaco nitazoxanida (NTZ), o qual se apresentou como notável no tratamento dessas doenças. No Brasil o fármaco passou a ser comercializado em 2006 pelo laboratório Farmoquímica S/A sob o nome comercial de Annita[®].⁴⁶

Nitazoxanida, etanoato de 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenila, apresentado na FIGURA 3A, possui fórmula e massa molecular iguais a $C_{12}H_9N_3O_5S$ e $307,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Este fármaco atua como antiparasitário que possui um amplo espectro de atividade contra protozoários, helmintos,⁴⁷ bactérias e vírus.^{48, 49} NTZ tem sido utilizado usualmente contra os parasitas *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* e *Ascaris lumbricoides* e todas as espécies *Cryptosporidium*.⁵⁰ Atua também contra *Blastocystis hominis*, protozoário encontrado com frequência em pacientes que possuem sistema imunológico comprometido, incluindo aqueles com infecções ocasionados pela AIDS/ HIV.^{51, 52}

Após a administração oral, a atividade do NTZ ocorre no trato gastrointestinal que é rapidamente hidrolisado para o seu metabólito ativo, a tizoxanida (2-hidróxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida) (FIGURA 3B)⁵³. O mecanismo completo de ação ainda é desconhecido para helmintos,^{48, 54} mas para protozoários e bactérias estudos indicam que a NTZ atua inibindo a enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) que participa de reações de transferências de elétrons essenciais no metabolismo para produção de energia

destes organismos.^{48, 50, 55} O fármaco também consegue suprimir a replicação do vírus, inibindo a síntese de proteínas estruturais.⁵⁶

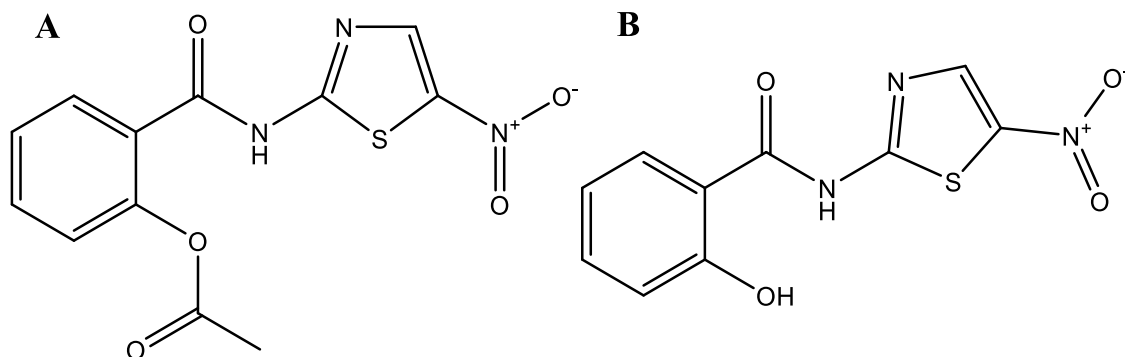


FIGURA 3 – Fórmula estrutural da nitazoxanida (A) e do seu metabólito ativo, tizoxanida (B).

1.2 - OBJETIVOS

1.2 - Objetivos

Diante da inexistência de uma regulamentação e guias para se conduzir os estudos de degradação forçada de maneira multivariada, a relevância social dos fármacos escolhidos, NTZ e SOF, e a possibilidade de obtenção de produtos de degradação inéditos, este trabalho tem como objetivos:

- Avaliar o efeito individual e as interações entre as condições de degradação para NTZ e SOF através de planejamento multivariado de experimentos;
- Compreender as vias de degradação dos IFA, mediante o controle simultâneo das variáveis de degradação, correlacionando tais variáveis aos produtos formados;
- Desenvolver e/ou adaptar os métodos cromatográficos para a caracterização e quantificação dos produtos de degradação NTZ e SOF por HPLC-UV e HPLC-MS;
- Elucidar os produtos de degradação formados pela combinação de variáveis em condições de degradação;

1.3 - PARTE EXPERIMENTAL

1.3 - Parte experimental

1.3.1 - Equipamentos

O pH foi ajustado utilizando pH-metro Orion, modelo EA 940 e as pesagens foram feitas em uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D com precisão $\pm 0,01$ mg. As reações com controle de temperatura foram realizadas em uma estufa Nova Etica com controle digital de temperatura, na qual foi adaptada uma lâmpada UV para os experimentos realizados em presença de radiação UV simultaneamente à temperatura. A lâmpada UV-C utilizada foi da marca OSRAM Puritec HNS S 9W com comprimento de onda dominante em 254 nm.

1.3.2 - Reagentes

Foram utilizados ácido clorídrico (HCl, Sigma-aldrich, 37%), hidróxido de sódio (NaOH, Synth, 97,0%), água deionizada com um sistema Milli-Q (resistividade 18.2 M Ω .cm), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Synth, 29%), sofosbuvir (C₂₂H₂₉FN₃O₉P, Shanghai Huirui Chemical Technology, $\geq 98\%$) e nitazoxanida (C₁₂H₉N₃O₅S, obtido por indústria farmacêutica, $\geq 98\%$). Para os métodos cromatográficos foram utilizados acetonitrila (CH₃CN, J.T.Baker, 99,9%), acetato de amônio (CH₃CO₂NH₄, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) e ácido fórmico (CH₂O₂, Sigma-aldrich, $\geq 98\%$).

1.3.3 - Método HPLC para o sofosbuvir

Utilizou-se um cromatógrafo Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), equipado com um desgaseificador G1322A,

bomba quaternária G1311A, injetor automático G1329A, compartimento de coluna com termostato G1316A e um detector UV-VIS G1314B. A análise cromatográfica do sofobuvir foi realizada utilizando fase móvel solução tampão acetato de amônio 10 mM com pH 5 ajustado com ácido fórmico concentrado (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Utilizou-se água ultrapura:acetonitrila (1:1 v/v) e solvente A:solvente B (90:10 v/v) como, respectivamente, diluente A e diluente B.

As análises foram realizadas no seguinte gradiente: 0 a 2,0 min, 10% do solvente B; 2,0 a 10,0 min, 10 a 80% do solvente B; 10,0 a 12,0 min, 80% do solvente B; 12,0 a 14,0 min, 80 a 10%; 14,0 a 15,0 min, 10% do solvente B. O fluxo da fase móvel, volume de injeção, comprimento de onda e temperatura da coluna foram respectivamente iguais a 1 mL·min⁻¹, 10 µL, 260 nm e 25 °C. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna C18 Xtimate™ (4,6 x 150 mm x 5 µm, Waters, USA).

1.3.4 - Método LC-MS/MS para o sofobuvir

Os espectros de massas foram obtidos com o espectrômetro de massas Agilent 6545B Q-TOF-MS (Agilent Technology, Santa Clara, CA, EUA), equipado com fonte de íons Dual AJS ESI. Os dados foram processados pelo software MassHunter Workstation Software Version B.08.0. Acoplado ao espectrômetro de massas, foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC, *ultra-high-performance liquid chromatography*) Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado com uma bomba quaternária G7104A, amostrador automático G7167B, compartimento de coluna com termostato G7116B e um detector de arranja de diodo (DAD) G7117A.

As análises foram realizadas utilizando os solventes, diluentes e o gradiente de eluição da seção 1.3.3. O fluxo da fase móvel, volume de injeção e

temperatura da coluna foram respectivamente $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{L}$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna C18 Zorbax Eclipse Plus (50 mm x 2,1 mm d.i., $1,8 \text{ }\mu\text{m}$, , Agilent, USA).

As análises espectrométricas foram realizadas em um espectrômetro de massas Q-TOF (Agilent) no modo positivo. As condições espectrométricas foram: nebulizador 60 psig, voltagem do capilar 4000 V, fragmentor 101 V, energia de colisão 3,2 V, skimmer 46 V, temperatura do gás $320 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo do gás $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do *sheath gas* $350 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo do *sheath gas* $11 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de aquisição de 1 espectro $\cdot\text{s}^{-1}$, *nozzle voltage* 1000 V, frequência do octapolo 750 V e faixa *m/z* de 20 a 700.

1.3.5 - Método HPLC para a nitazoxanida

Utilizou-se o mesmo equipamento da seção 1.3.3 para as análises cromatográficas da NTZ. As análises foram realizadas utilizando os solventes tampão acetato de amônio 50 mM com pH 5 ajustado com ácido fórmico concentrado (solvente D) e acetonitrila (solvente B). Utilizou-se acetonitrila e solvente D:solvente B (85:15 v/v) como, respectivamente, diluente C e diluente D.

As análises seguiram o gradiente: 0,0 a 12,0 min, 15 a 70% de B; 12,1 a 14,0 min, 70% de B; 14,0 a 18,0 min, 70 a 15% de B; 18,0 a 25,0 min, 15% de B. Foi utilizado fluxo da fase móvel, volume de injeção, comprimento de onda e temperatura da coluna iguais a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, $20 \text{ }\mu\text{L}$, 240 nm e $40 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Luna[®] fenil-hexil (250 x 4,6 mm, $10 \text{ }\mu\text{m}$, Phenomenex, USA).

1.3.6 - Método LC-MS/MS para a nitazoxanida

As análises espectrométricas da NTZ foram conduzidas no mesmo equipamento utilizado na seção 1.3.4. Utilizou-se como fases móveis tampão acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 5 ajustado com ácido fórmico concentrado (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com o seguinte gradiente: 0,0 a 10,0 min, 15 a 70% de B; 10,0 a 11,0 min, 70% de B; 11,1 a 12,0 min, 70 a 15% de B; 12,1 a 15 min, 15% de B. O fluxo da fase móvel, volume de injeção e temperatura foram respectivamente 0,4 mL·min⁻¹, 1 µL e 40 °C. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Zorbax Eclipse Plus Fenil-hexil (100 mm × 2,1 mm, 1,8 µm, Plus, Agilent, USA).

As análises espectrométricas foram realizadas em um espectrômetro de massas Q-TOF (Agilent) no modo positivo e negativo. As condições espectrométricas foram: nebulizador 60 psig, voltagem do capilar 4000 V, fragmentor 119 V, energia de colisão 3,2 V, skimmer 47 V, temperatura do gás 320 °C, fluxo do gás 10 L·min⁻¹, temperatura do *sheath gas* 350 °C, fluxo do *sheath gas* 11 L·min⁻¹, taxa de aquisição de 3 espectro·s⁻¹, *nozzle voltage* 1000 V, frequência do octapolo 750 V e faixa m/z de 50 a 1000.

1.3.7 - Degradação do sofosbuvir e nitazoxanida via planejamento experimental

Neste trabalho foi utilizado o planejamento experimental composto central para avaliar simultaneamente a influência das variáveis temperatura, pH e concentração de agente oxidante (H₂O₂) na degradação do SOF e NTZ. Para avaliar a presença de luz UV (254,7 nm), foi realizado um segundo planejamento com as variáveis pH e temperatura. A radiação UV foi tomada como variável qualitativa, avaliando-se sua presença e ausência nas reações. As TABELA 2, 3 e 4 apresentam a codificação das variáveis, condições de degradação dos

experimentos realizados sem luz UV e com luz UV para os fármacos SOF e NTZ. Durante as degradações os experimentos com peróxido de hidrogênio não foram expostos à radiação UV, pois a combinação destas variáveis pode gerar oxidações não seletivas devido à formação não controlada de radicais hidroxilas. Os experimentos de 1 a 17 foram realizados em frascos de vidro recobertos com papel alumínio para proteção da radiação ambiente. Já os experimentos 18 a 27 foram realizados na presença de luz UV. Como os experimentos foram divididos em dois planejamentos, os dados foram tratados separadamente, mas ambos seguindo o mesmo procedimento estatístico.

TABELA 2 – Variáveis de degradação e níveis utilizados no planejamento composto central para os fármacos SOF e NTZ.

Nível	SOF				NTZ			
	pH	H ₂ O ₂ (%)	Temp.(°C)	UV	pH	H ₂ O ₂ (%)	Temp. (°C)	UV
-1,63	1,0	0,0	20	-	1,0	0,0	20	-
-1	2,7	2,9	32	Sem	2,7	1,0	28	Sem
0	5,5	7,5	50	-	5,5	2,5	40	-
1	8,3	12,1	68	Com	8,3	4,0	52	Com
1,63	10,0	15,0	80	-	10,0	5,0	60	-

TABELA 3 – Planejamento composto central sem luz UV.

Experimento	pH	H₂O₂	Temperatura	Luz UV
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1,63	0	0	-1
10	1,63	0	0	-1
11	0	-1,63	0	-1
12	0	1,63	0	-1
13	0	0	-1,63	-1
14	0	0	1,63	-1
15	0	0	0	-1
16	0	0	0	-1
17	0	0	0	-1

TABELA 4 – Planejamento composto central com luz UV

Experimento	pH	H₂O₂	Temperatura	Luz UV
18	-1	-1,63	-1	1
19	1	-1,63	-1	1
20	-1	-1,63	1	1
21	1	-1,63	1	1
22	-1,63	-1,63	0	1
23	1,63	-1,63	0	1
24	0	-1,63	-1,63	1
25	0	-1,63	1,63	1
26	0	-1,63	0	1
27	0	-1,63	0	1

1.3.8 - Curva de calibração para o sofosbuvir

Para a construção da curva analítica, preparou-se uma solução estoque de SOF de concentração igual a $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pesou-se 25 mg do IFA SOF em um balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 15 mL do diluente A foi adicionada no balão volumétrico e a solução permaneceu em banho ultrassônico por aproximadamente 10 minutos. Após a solução atingir temperatura ambiente, o balão volumétrico foi completado com diluente A. A curva analítica foi preparada a partir de diluições da solução estoque do SOF. Preparou-se soluções de SOF nas concentrações de 5, 20, 60, 100, 140 e 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando o diluente B.

1.3.9 - Degradação forçada do sofosbuvir

Para as degradações foram preparadas soluções degradantes nos pH's: 1,0; 2,7; 5,5; 8,3 e 10,0. Excetuando o pH 1, o pH das soluções degradantes foi ajustado utilizando soluções de HCl e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As degradações do SOF foram realizadas a partir de uma solução estoque de SOF $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pesou-se 40 mg do IFA SOF em um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 5 mL do diluente A e a solução foi deixada em banho ultrassônico até a completa solubilização. Após a solução atingir temperatura ambiente, o volume do balão volumétrico foi completado com o diluente A.

Uma alíquota de 500 μL da solução estoque de SOF foi adicionada em um tubo de vidro. Em seguida, um volume de peróxido de hidrogênio 30% foi adicionado de forma a obter a concentração requerida em cada experimento do planejamento experimental. O volume final foi ajustado para 5 mL com solução de pH determinado em cada experimento. A TABELA 5 mostra os volumes da

solução de SOF (V_{SOF}), solução de H_2O_2 ($V_{\text{H}_2\text{O}_2}$) e solução degradante com pH ajustado (V_{pH}) utilizados em cada experimento.

As soluções foram levadas para degradação em uma estufa com uma lâmpada de luz UV adaptada em seu interior. Após as degradações, as soluções foram esfriadas em banho de gelo e, posteriormente, deixou-se atingir a temperatura ambiente. Para corrigir possíveis perdas de solventes durante as degradações, o volume foi corrigido para 10 mL com diluente B. Por último, diluiu-se 2 mL da solução degradada em um balão volumétrico de 5 mL, o qual foi completado com diluente B (concentração teórica de SOF igual a $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$). O tempo de degradação foi de 180 minutos e os tubos de vidro foram revestidos com papel alumínio para os experimentos realizados sem a presença de luz UV. A FIGURA 4 mostra um esquema do procedimento experimental para a realização dos experimentos do planejamento experimental.

TABELA 5 – Volumes dos degradantes e solução de SOF utilizados em cada experimento.

Exp.	V _{SOF} /mL	V _{H₂O₂} /mL	V _{pH} /mL
1	0,500	0,483	4,017
2	0,500	0,483	4,017
3	0,500	2,017	2,483
4	0,500	2,017	2,483
5	0,500	0,483	4,017
6	0,500	0,483	4,017
7	0,500	2,017	2,483
8	0,500	2,017	2,483
9	0,500	1,250	3,250
10	0,500	1,250	3,250
11	0,500	0,000	4,500
12	0,500	2,500	2,000
13	0,500	1,250	3,250
14	0,500	1,250	3,250
15	0,500	1,250	3,250
16	0,500	1,250	3,250
17	0,500	1,250	3,250

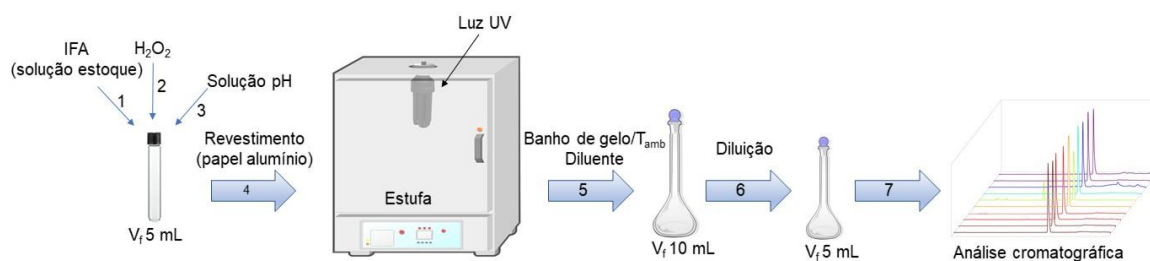


FIGURA 4 – Esquema do procedimento experimental para a realização dos experimentos do planejamento experimental. Etapa 1-3: adição de alíquota da solução estoque do IFA, alíquota de H₂O₂ 30% e solução de pH requeridas nas condições experimentais de cada experimento. Etapa 4: revestimento dos frascos com papel alumínio (experimentos com agente oxidante) para posteriormente levá-los a estufa. Etapa 5: resfriamento da solução e correção do volume com diluente. Etapa 6: diluição da solução degradada com diluente. Etapa 7: análise cromatográfica

1.3.10 - Curva de calibração para a nitazoxanida

Para a construção da curva analítica, preparou-se uma solução estoque de NTZ de concentração igual a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pesou-se 25 mg do IFA NTZ em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 15 mL de diluente C e, em seguida, a solução foi deixada no ultrassom por 10 minutos. Após a solução atingir a temperatura ambiente, o balão volumétrico foi completado com diluente C. A curva de calibração foi preparada a partir de diluições da solução estoque de NTZ. Preparou-se soluções de NTZ nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30 e $35 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ com diluente D.

1.3.11 - Degradação forçada da nitazoxanida

As soluções degradantes foram preparadas conforme a seção 1.3.9.

Para as degradações da NTZ foi preparado uma solução estoque de NTZ $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pesando 40 mg do IFA NTZ em um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL do diluente C e, em seguida, o balão volumétrico foi deixado no ultrassom até a completa solubilização. Após a solução atingir a temperatura ambiente, completou-se o volume para 10 mL com diluente C.

As soluções de degradação foram preparadas adicionando $625 \mu\text{L}$ da solução estoque de NTZ $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em um tubo de vidro. Em seguida, adicionou-se um volume de peróxido de hidrogênio 30% considerando a concentração de cada experimento. O frasco de vidro foi completado para um volume de 5 mL com a solução degradante de pH ajustado. A TABELA 6 mostra os volumes da solução de NTZ (V_{NTZ}), solução de H_2O_2 ($V_{\text{H}_2\text{O}_2}$) e solução degradante com pH ajustado (V_{pH}) utilizados em cada experimento.

Após a degradação, as soluções foram esfriadas em banho de gelo e, posteriormente, deixou-se atingir a temperatura ambiente. O volume foi corrigido para 10 mL e $500 \mu\text{L}$ desta solução foram diluídos com tampão acetato de amônio

pH 5 de concentração 50 mmol L^{-1} e acetonitrila (85:15) em um balão volumétrico de 5 mL (concentração teórica de NTZ igual a $25 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{mL}$). Assim como na degradação forçada do SOF, utilizou-se papel alumínio nos experimentos sem a presença de luz UV (FIGURA 4). As degradações foram realizadas durante 80 minutos.

TABELA 6 – Volumes dos degradantes e da solução de NTZ utilizados em cada experimento.

Exp.	V_{NTZ}/mL	V_{H₂O₂}/mL	V_{pH}/mL
1	0,625	0,483	3,892
2	0,625	0,483	3,892
3	0,625	2,017	2,358
4	0,625	2,017	2,358
5	0,625	0,483	3,892
6	0,625	0,483	3,892
7	0,625	2,017	2,358
8	0,625	2,017	2,358
9	0,625	1,250	3,125
10	0,625	1,250	3,125
11	0,625	0,000	4,375
12	0,625	2,500	1,875
13	0,625	1,250	3,125
14	0,625	1,250	3,125
15	0,625	1,250	3,125
16	0,625	1,250	3,125
17	0,625	1,250	3,125

1.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4 - Resultados e discussão

1.4.1 - Estudo de linearidade para quantificação do sofobuvir

Realizou-se o estudo de linearidade para quantificação do SOF por HPLC e foi obtido uma região de linearidade entre 5 e 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Obteve-se uma equação linear igual a $\text{Area}(\text{SOF}) = 7,68 + 10,39[\text{SOF}]$ e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9992, onde $\text{Area}(\text{SOF})$ e $[\text{SOF}]$ correspondem respectivamente ao sinal analítico e a concentração do SOF. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram iguais a respectivamente 1,51 e 1,45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A FIGURA 5 mostra os cromatogramas sobrepostos e a curva analítica obtida com as áreas dos picos do padrão SOF. LD e LQ foram determinados usando $3\times(\text{desvio padrão do branco/coeficiente angular})$ e $10\times(\text{desvio padrão do branco/coeficiente angular})$, sendo $n=10$.

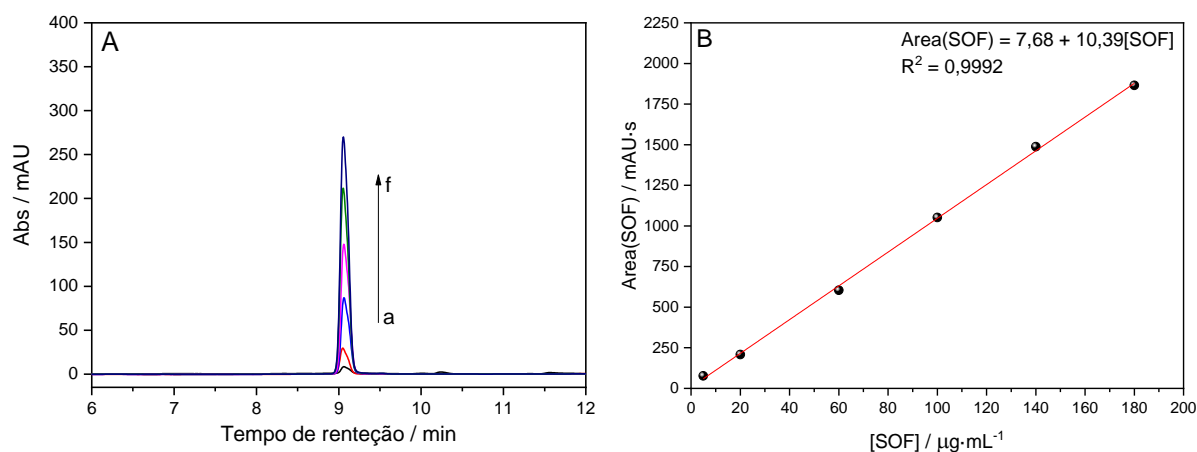


FIGURA 5 – Estudo de linearidade para o sofobuvir. A) Cromatogramas sobrepostos do padrão sofobuvir nas concentrações a, b, c, d, e, e f iguais a 5, 20, 60, 100, 140 e 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. B) Curva analítica para o sofobuvir.

1.4.2 - Degradação forçada do sofosbuvir

A FIGURA 6 mostra a representação espacial dos valores codificados do planejamento composto central modificado para os dois conjuntos de experimentos. Os experimentos foram realizados randomicamente.

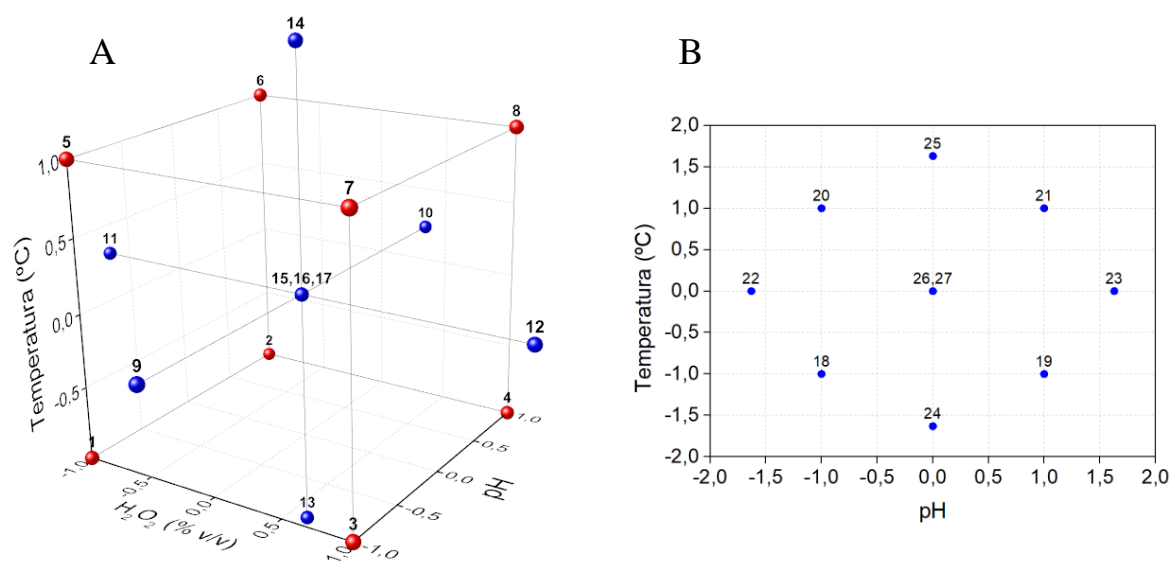


FIGURA 6 – Representação espacial com valores codificados do planejamento composto central. A) Experimentos 1 a 17 realizados sem luz UV. B) Experimentos 18 a 27 realizados com luz UV.

As TABELA 7 e 8 mostram os valores de degradação (em porcentagem) encontrados em cada uma das condições do planejamento experimental durante 180 minutos. O tempo de degradação dos fármacos e os níveis utilizados no planejamento experimental foram definidos a partir de ensaios preliminares. A degradação do SOF foi obtida através da diferença dos sinais da amostra referência (sem degradação) e degradada dividido pelo sinal da amostra referência na concentração de $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A comparação entre as áreas pode ser feita pois os valores analisados estavam dentro da região linearidade do SOF.

As degradações do fármaco ocorreram entre 0 a 27%. Observa-se que em pH 1, com e sem radiação UV, ocorreram as maiores degradações do fármaco,

cerca de 21% e 27% para, respectivamente os experimentos 9 e 22. Já as demais condições intermediárias as degradações ocorreram entre 0% e 8%. As áreas dos picos dos padrões das soluções degradadas que tiveram áreas superiores a área do pico da solução padrão não degradada, foram consideradas como degradação igual a 0,00%. Essa variação pode ser devido a variações instrumentais decorrentes a condições laboratoriais, como temperatura e fonte de energia elétrica mal estabilizada.

De acordo com a TABELA 7, os experimentos sem luz UV em nível alto de temperatura forneceram as maiores degradações para o SOF. Excetuando o experimento 5, os experimentos realizados a 68 °C tenderam a degradar mais o SOF do que os experimentos a 32 °C. Além disso, o experimento 14, em que possui temperatura igual a 80 °C, apresentou a maior degradação do SOF, considerando os experimentos sem luz UV. Observou-se pouca influência do pH entre 2,74 e 8,26 na degradação do SOF. Entretanto, percebe-se que o experimento 9 a degradação do SOF foi de 21,61%, demonstrando que o fármaco possui uma maior susceptibilidade em sofrer degradação em pH igual a 1.

Não foi observada uma degradação significativa do SOF com o aumento da concentração do agente oxidante. Porém, o efeito sinérgico entre as variáveis temperatura e agente oxidante pode ser observado nos experimentos 7 e 8 (nível +1 para ambas variáveis), os quais apresentaram maior degradação que os experimentos os quais apenas uma destas variáveis está em nível +1. A FIGURA 7 mostra a variação da degradação do SOF sem a presença de luz UV em relação as variáveis pH×H₂O₂ (A), pH×Temperatura (B) e H₂O₂×Temperatura (C). Os pontos no gráfico representam cada experimento no planejamento experimental.

TABELA 7 – Porcentagens de degradação do SOF para os experimentos realizados sem luz UV.

Exp.	pH	H₂O₂ (v/v)	Temperatura (°C)	Luz UV	Degradação (%)
1	2,7	2,9	32	Sem	2,37
2	8,3	2,9	32	Sem	3,83
3	2,7	12,1	32	Sem	1,20
4	8,3	12,1	32	Sem	2,40
5	2,7	2,9	68	Sem	3,12
6	8,3	2,9	68	Sem	5,42
7	2,7	12,1	68	Sem	6,48
8	8,3	12,1	68	Sem	7,85
9	1,0	7,5	50	Sem	21,61
10	10,0	7,5	50	Sem	1,19
11	5,5	0,0	50	Sem	2,06
12	5,5	15,0	50	Sem	4,83
13	5,5	7,5	20	Sem	0,52
14	5,5	7,5	80	Sem	27,28
15	5,5	7,5	50	Sem	4,07
16	5,5	7,5	50	Sem	6,22
17	5,5	7,5	50	Sem	5,75

TABELA 8 – Porcentagens de degradação do SOF para os experimentos realizados com luz UV.

Exp.	pH	H₂O₂ (v/v)	Temperatura (°C)	Luz UV	Degradação (%)
18	2,7	0,0	32	Com	1,57
19	8,3	0,0	32	Com	0,00
20	2,7	0,0	68	Com	3,35
21	8,3	0,0	68	Com	0,00
22	1,0	0,0	50	Com	27,36
23	10,0	0,0	50	Com	0,00
24	5,5	0,0	20	Com	0,00
25	5,5	0,0	80	Com	0,00
26	5,5	0,0	50	Com	0,00
27	5,5	0,0	50	Com	0,00

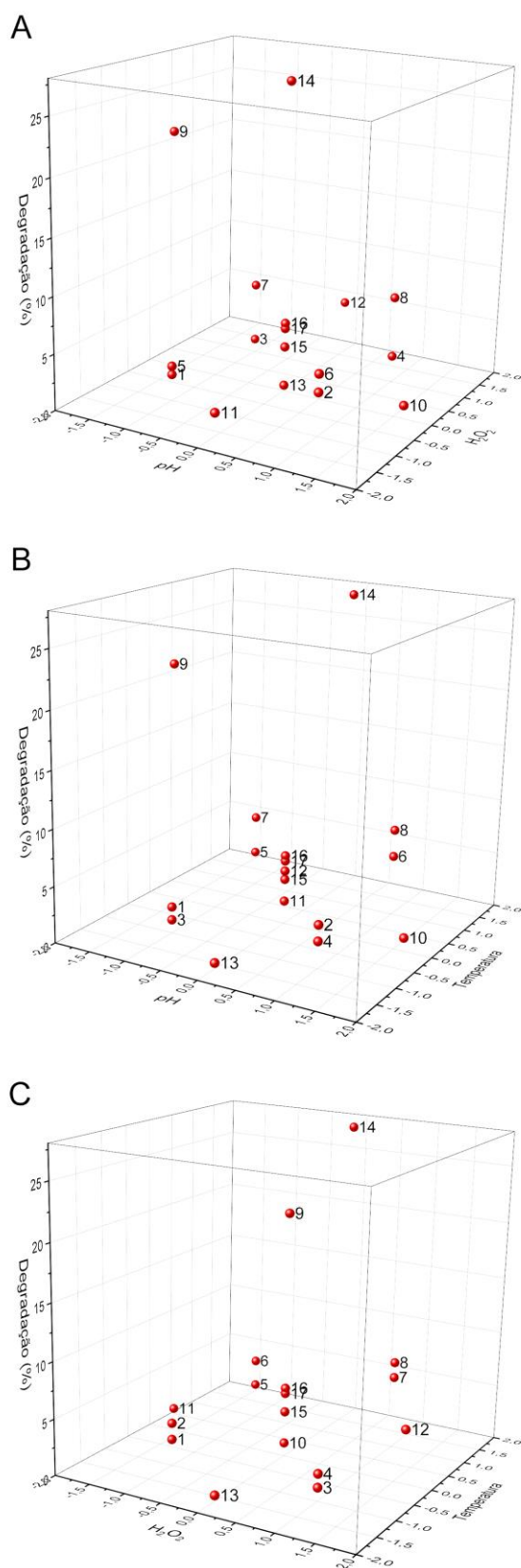


FIGURA 7 – Representação dos resultados da degradação do SOF sem a presença de luz UV. (A) pH×H₂O₂, (B) pH×Temperatura e (C) H₂O₂×Temperatura.

A partir dos resultados do planejamento experimental, realizou-se a análise de variância dos dados (TABELA 9). O teste F calculado para regressão, inferior ao $F_{\text{crítico}(10,6)}$, mostra que a média quadrática da regressão e dos resíduos são estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança. Além disso, o teste F para a falta de ajuste foi superior ao $F_{\text{crítico}(4,2)}$, em aproximadamente 4 vezes. Portanto, o modelo calculado possui falta de ajuste muito pronunciada e este não se confunde estatisticamente com o erro puro ao nível de confiança de 95%.

TABELA 9 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação do SOF sem a presença de luz UV (experimentos 1 a 17).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$4,29 \times 10^2$	10	42,89
Resíduo	$4,07 \times 10^2$	6	67,78
Total	$8,36 \times 10^2$	16	52,22
Erro Puro	2,57	2	1,28
Falta de Ajuste	$4,04 \times 10^2$	4	101,02
Var. explicada (R^2)	0,5123	Var. máxima explicável (R^2 máximo)	0,9969
Teste F Regressão	0,63	$F_{\text{crítico}(10,6)}$	4,06
Teste F Falta de Ajuste	78,52	$F_{\text{crítico}(4,2)}$	19,25

*Teste F com intervalo de 95% de confiança.

O modelo quadrático gerado conseguiu somente explicar cerca de 51% de toda informação obtida e nenhum coeficiente foi significativo no intervalo de 95% de confiança. A resposta y_{SOF} representa a porcentagem de degradação do princípio ativo e b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_{11} , b_{22} , b_{33} , b_{12} , b_{23} , b_{13} e b_{123} respectivamente os coeficientes associados ao intercepto e as variáveis x_1 (pH), x_2 (H_2O_2), x_3 (temperatura), termos quadráticos (x_1^2 , x_2^2 e x_3^2) e as interações (x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 e $x_1x_2x_3$). A TABELA 10 mostra os valores dos coeficientes e seus respectivos erros.

TABELA 10 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 1-17 para o SOF.

Coef.	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{11}	b_{22}	b_{33}	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}
Valor	6,1	-2,0	0,6	4,3	0,7	-2,3	1,7	-0,2	0,1	-1,1	-0,1
Erro	$\pm 18,3$	$\pm 8,7$	$\pm 8,7$	$\pm 8,7$	$\pm 9,9$	$\pm 9,9$	$\pm 9,9$	$\pm 11,3$	$\pm 11,3$	$\pm 11,3$	$\pm 11,3$

A FIGURA 8 mostra a variação da degradação em relação as variáveis pH e temperatura. Os pontos no gráfico representam cada experimento no planejamento experimental. Assim como nos experimentos realizados sem a presença de luz UV, podemos observar na FIGURA 8 que o experimento 22 realizado em pH 1 e temperatura de 50 °C ocorreu a maior degradação do sofobuvir. Já as demais condições degradaram o SOF entre 0,00 a 3,35%.

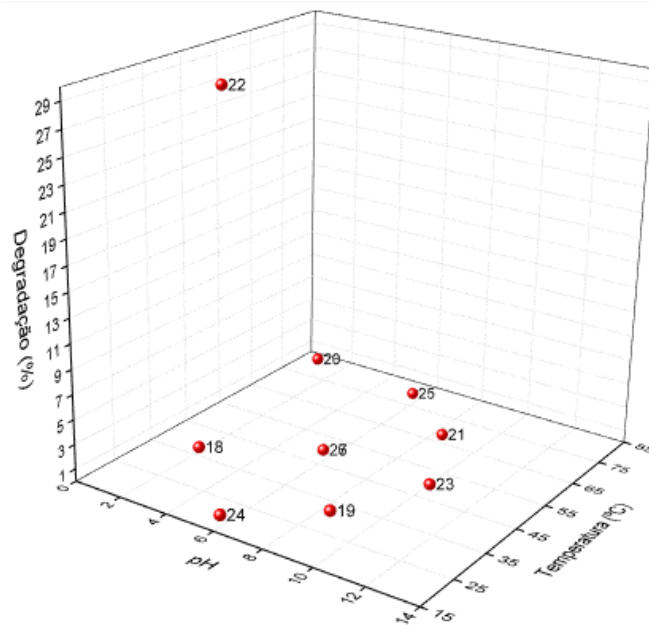


FIGURA 8 – Representação dos resultados da degradação do SOF na presença de luz UV.

A TABELA 11 mostra a análise de variância obtida com os experimentos 18 a 27 para o SOF. O modelo quadrático gerado foi capaz de explicar aproximadamente 77% de toda a informação do sistema. O modelo matemático apresentou falta de ajuste de acordo com o teste F para a regressão ($F_{\text{regressão}}$ inferior ao $F_{\text{crítico}}$) e os erros para cada coeficiente foram estatisticamente superiores aos próprios coeficientes ao nível de confiança de 95% (TABELA 12). Não foi realizado o teste F para a falta de ajuste uma vez que não foi observado degradação nas réplicas da condição do ponto central (experimentos 26 e 27).

TABELA 11 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação do SOF com a presença de luz UV (experimentos 18 a 27).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$5,04 \times 10^2$	5	100,72
Resíduo	$1,54 \times 10^2$	4	38,51
Total	$6,58 \times 10^2$	9	73,07
Erro Puro	0,00	1	0,00
Falta de Ajuste	$1,54 \times 10^2$	3	51,34
		Var. máxima	
Var. explicada (R^2)	0,7658	explicável (R^2 máximo)	0,9999
Teste F Regressão	2,61	$F_{\text{crítico}}(5,4)$	6,26
Teste F Falta de Ajuste	-	$F_{\text{crítico}}(3,1)$	215,71

*Teste F com intervalo de 95% de confiança.

TABELA 12 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 1-17 para o SOF.

Coef.	b_0	b_1	b_3	b_{11}	b_{33}	b_{13}
Valor	-1,1	-5,3	0,2	4,9	-0,2	-0,4
Erro	$\pm 21,0$	$\pm 10,1$	$\pm 10,1$	$\pm 11,5$	$\pm 11,5$	$\pm 15,4$

Partindo dos resultados do planejamento experimental, foram elaborados modelos quadráticos entre os parâmetros de degradação forçada (variáveis independentes) e a degradação do ativo (variável dependente). Como se trata de um modelo de segunda ordem, a equação obtida terá termos quadráticos, gerando perfis de resposta parabólicos para as variáveis que possuírem o termo quadrático. A complexidade das reações envolvidas nas

degradações (como hidrólises, termólises, oxidações e fotólises) podem promover, em determinadas condições, altas degradações em relação as outras. Como as degradações foram conduzidas em condições em que as variáveis foram estudadas em seus níveis extremos, se torna difícil controlar fatores cinéticos inerentes às reações comumente reportadas em sistemas submetidos a estudos de degradação. A construção de modelos matemáticos capazes de predizer de forma exata o comportamento das variáveis dificilmente é obtido com êxito, pois tais modelos somente são obtidos em condições restritas do domínio experimental. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das variáveis de degradação assim como a interação entre elas, e não necessariamente obter um modelo matemático para otimização da degradação. Portanto, esforços não foram despendidos na criação de modelos matemáticos de ordem superior a quadrática.

Mesmo não obtendo um modelo matemático que seja capaz de fazer previsões, podemos tirar certas conclusões dos dados empíricos. Dentro do domínio experimental estudado, em meio ácido a degradação do SOF é mais pronunciada (fato observado pelos experimentos 9 e 22 em que o pH é 1). Nos experimentos realizados em pH com valores intermediários, a degradação ocorreu em escala muito baixa. A variável temperatura e a sua interação com peróxido de hidrogênio (experimentos sem a presença de luz UV) foram os parâmetros que também tiveram influência na degradação do SOF. A variável H_2O_2 , assim como as demais interações entre as variáveis, aparentemente não contribuíram para a degradação do SOF. Além disso, foi observado uma maior degradação do SOF em pH 1 nos experimentos realizados na presença de luz UV.

1.4.3 - Elucidação dos produtos de degradação do sofosbuvir

Os estudos realizados até o momento preconizavam as intensidades das áreas cromatográficas em cada uma das condições de degradação analisadas. Esta seção visa a elucidação dos produtos de degradação gerados durante as diferentes condições de degradação. Portanto, os experimentos não demandaram a rigorosidade em determinados parâmetros como tempo de degradação e concentração do princípio ativo, os quais foram precisamente padronizados anteriormente.

Além das 27 condições do planejamento experimental, foram analisados os perfis cromatográficos do SOF degradado nas condições básica ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ácida ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e em meio oxidativo (15% de H_2O_2). Este último foi analisado sem a presença de luz UV, já as demais condições foram analisadas na presença e ausência de luz UV. Todos estes experimentos foram realizados a 80°C durante 90 min, exceto a condição básica a qual foi degradada durante 30 minutos.

Para as análises de LC-MS/MS foram selecionadas amostras em condições de degradação que forneceram perfis cromatográficos diferentes e com maior concentração dos produtos de degradação (FIGURA 9). Observou-se que as condições básica ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ácida ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e o experimento 14 (pH 5,5, temperatura 80°C e 7,5% de H_2O_2) forneceram os perfis cromatográficos mais distintos e, portanto, foram selecionadas para análises de LC-MS/MS.

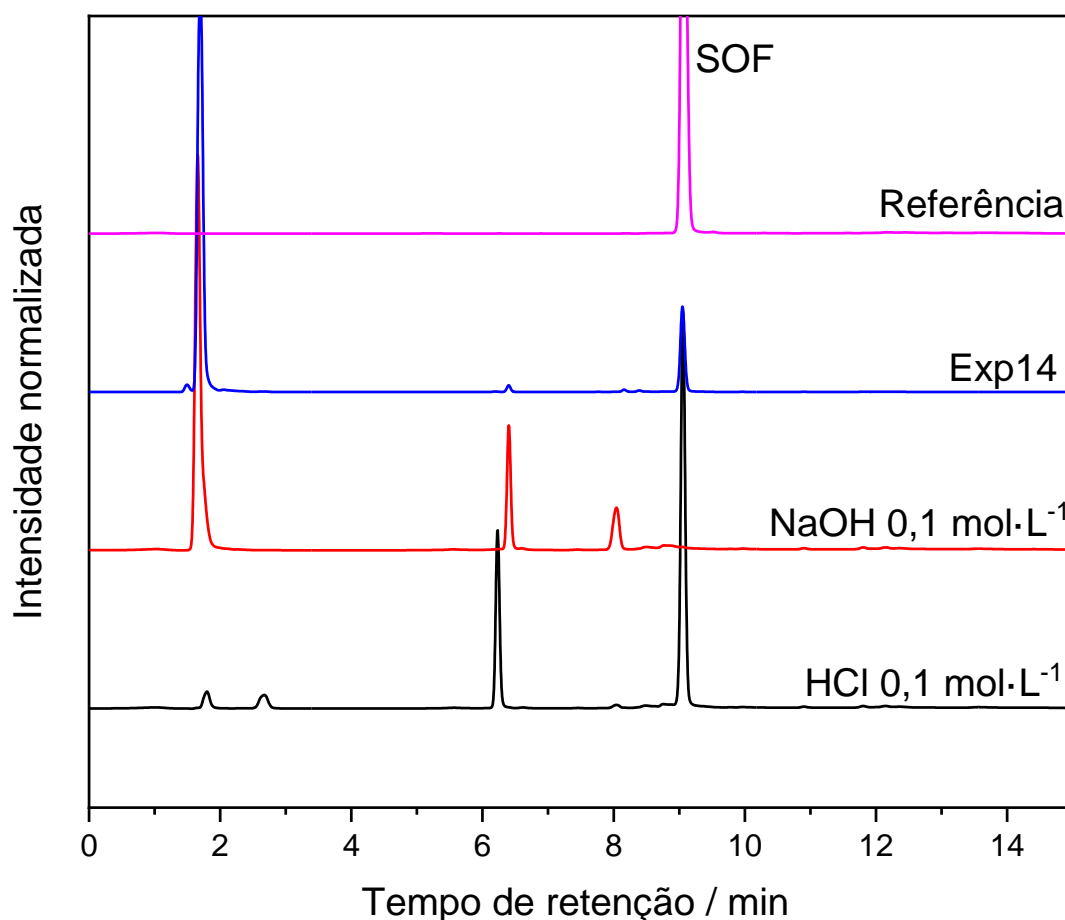


FIGURA 9 – Diferentes perfis cromatográficos obtidos nas condições de degradação estudadas para o SOF.

A elucidação dos produtos de degradação foi realizada através dos dados obtidos na literatura, comparação entre os perfis espectrais do princípio ativo e dos produtos de degradação e também considerando a massa exata para a predição da fórmula molecular. Além disso, os cromatogramas foram comparados com os cromatogramas de íons totais (TIC, do inglês *total ion chromatography*) para verificar a ordem de eluição dos produtos de degradação. A TABELA 13 mostra os produtos de degradação (P1-P10) e os fragmentos característicos. Observa-se que os erros das massas exatas dos produtos de degradação foram inferiores a 5 ppm, indicando que as fórmulas moleculares propostas possuem alta acurácia.

TABELA 13 – Massa molecular observada e teórica do sofosbuvir e seus produtos de degradação.

Composto	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M+H] ⁺	Ions fragmentos
SOF	530,1693	530,1698	-0,94	C ₂₂ H ₃₀ FN ₃ O ₉ P ⁺	488, 399, 288, 243, 200, 167, 113
P1	341,0559	341,0545	4,10	C ₁₀ H ₁₅ FN ₂ O ₈ P ⁺	243, 229, 111
P2	261,0878	261,0881	-1,15	C ₁₀ H ₁₄ FN ₂ O ₅ ⁺	149, 113, 83
P3	417,0849	417,0858	-2,16	C ₁₆ H ₁₉ FN ₂ O ₈ P ⁺	305, 243, 175, 111
P4	412,0934	412,0916	4,37	C ₁₃ H ₂₀ FN ₃ O ₉ P ⁺	323, 300, 254, 243, 124, 113
P5	454,1376	454,1385	-1,98	C ₁₆ H ₂₆ FN ₃ O ₉ P ⁺	412, 323, 300, 243, 167, 113
P6	488,1217	488,1229	-2,46	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O ₉ P ⁺	399, 376, 300, 243, 200, 167
P7	402,1424	402,1436	-2,98	C ₁₃ H ₂₆ FN ₃ O ₈ P ⁺	385, 342, 359, 300, 228, 132
P8	494,1684	494,1698	-2,83	C ₁₉ H ₃₀ FN ₃ O ₉ P ⁺	478, 461, 418, 376, 304, 288, 254, 200, 132
P9	546,1631	546,1647	-2,93	C ₂₂ H ₃₀ FN ₃ O ₁₀ P ⁺	415, 392, 346, 243, 167, 113
P10	478,1739	478,1749	-2,09	C ₁₉ H ₃₀ FN ₃ O ₈ P ⁺	461, 418, 376, 304, 288, 254, 200, 132

1.4.3.1 - Sofosbuvir (m/z 530, [M+H]⁺)

Sofosbuvir foi identificado com m/z 530 (C₂₂H₃₀FN₃O₉P⁺) [M+H]⁺ no tempo de retenção de 6,70 minutos. O espectro de massas MS² do SOF é mostrado na FIGURA 10. Observou-se íons produtos característicos em m/z 488 (C₁₉H₂₄FN₃O₉P⁺) (perda do grupo isopropil [M+H-C₃H₆]⁺), 399 (C₁₆H₁₇FN₂O₇P⁺)

(perda da porção isopropil 2-aminopropanoato $[M+H-C_6H_{13}NO_2]^+$), 288 ($C_{12}H_{19}NO_5P^+$) (perda dos anéis de cinco membros e pirimidínico $[M+H-C_{10}H_{11}FN_2O_4P]^+$), 243 ($C_{10}H_{12}FN_2O_4^+$) (perda da porção fenil fosforoamidato $[M+H-C_{12}H_{18}NO_5P]^+$), 200 ($C_8H_{11}NO_3P^+$) (perda da porção éster, e dos anéis de cinco membros e pirimidínico $[M+H-C_{14}H_{19}FN_2O_6]^+$) e 113 ($C_4H_5N_2O_2^+$) (perda do anel de cinco membros com suas ramificações $[M+H-C_{18}H_{25}FNO_7P]^+$). Além desses fragmentos, foi observado ion em m/z 167 ($C_7H_7N_2O_3^+$) referente a perda de C_3H_5FO do íon produto m/z 243. A proposta da possível rota de fragmentação para o sofosbuvir é apresentada na FIGURA 11.

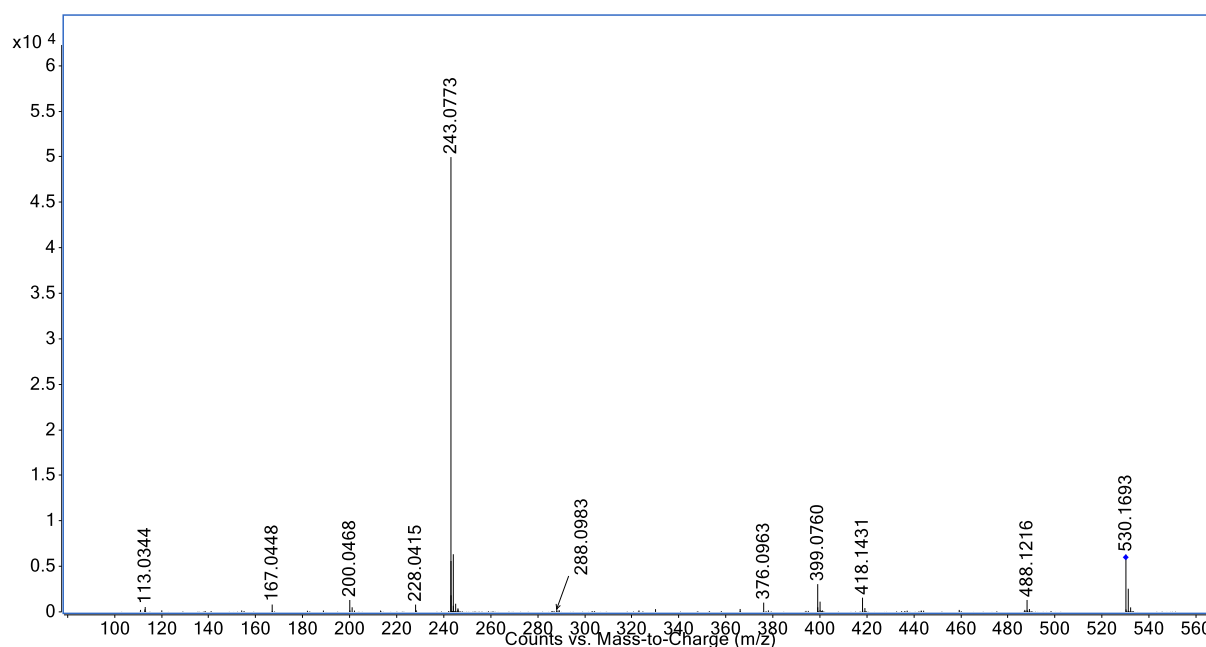


FIGURA 10 – Espectro de massas coletado na análises MS^2 do íon molecular protonado do SOF, m/z 530 $[M+H]^+$.

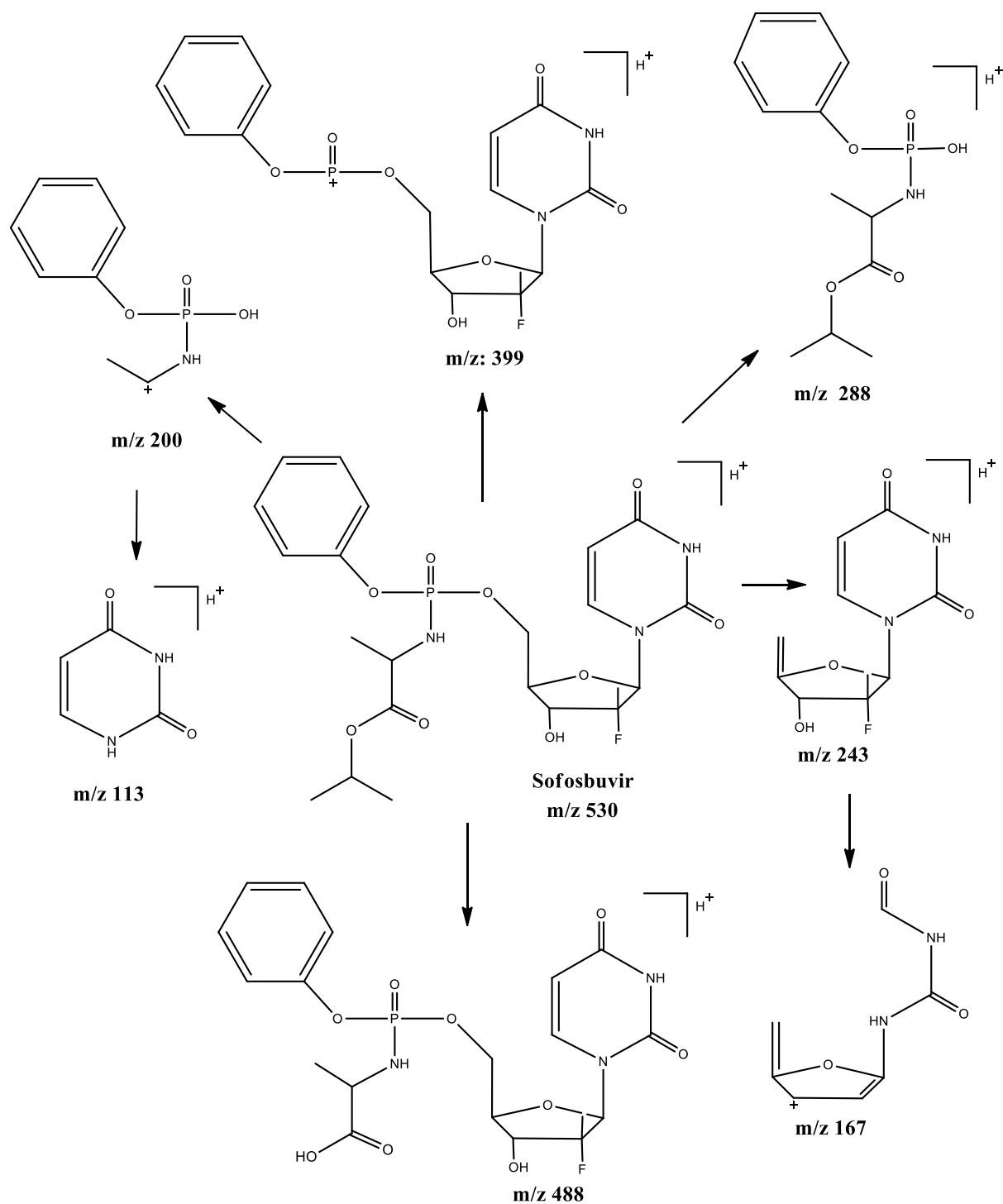


FIGURA 11 – Proposta da rota de fragmentação do fármaco sofosbuvir, m/z 530 $[M+H]^+$.

1.4.4 - Degradação forçada do sofosbuvir em meio ácido

O cromatograma de íons totais da amostra degradada em meio ácido (HCl 0,1 mol·L⁻¹) e seu respectivo branco podem ser vistos na FIGURA 12. Observou-se a presença de 3 produtos de degradação eluídos em 0,36, 0,47 e 2,46 minutos, os quais foram denominados como P1, P2 e P3, respectivamente.

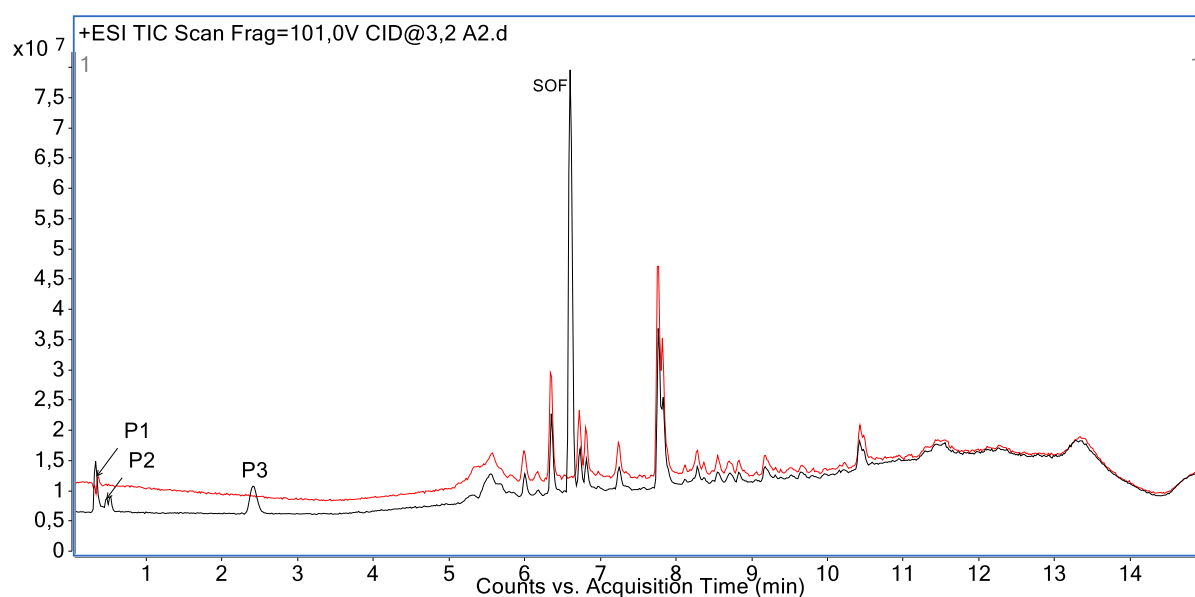


FIGURA 12 – Cromatograma de íons totais obtido a partir da degradação do sofosbuvir em meio ácido. (–) Branco. (–) Sofosbuvir degradado em meio ácido.

1.4.4.1 - P1 (m/z 341, [M+H]⁺)

Ao analisar o espectro de massas MS² de P1, foi observado o íon de m/z 341 (C₁₀H₁₅FN₂O₈P⁺) [M+H]⁺ no tempo de retenção igual a 0,36 minutos que foi formado a partir da hidrólise ácida do sofosbuvir. O espectro de massas MS² (FIGURA 13) apresentou dois fragmentos característicos referentes as perdas do íon precursor em m/z iguais a 243 (C₁₀H₁₂FN₂O₄⁺), devido à perda do grupo fosfato ([M+H-H₂O₄P]⁺), e 299 (C₆H₁₁FO₆P⁺), referente à perda do anel de seis membros ([M+H-C₄H₃N₂O₂]⁺). O íon m/z 243 sugere que a cadeia principal do

SOF foi mantida na estrutura de P1. Além disso, foi notificado no espectro MS² um fragmento com m/z 111 (C₆H₇O₂⁺) oriundo da perda de H₄FO₄P do íon fragmento m/z 229, confirmando a presença do grupo fosfato na estrutura de P1. A FIGURA 14 mostra uma possível rota de fragmentação do produto de degradação P1.

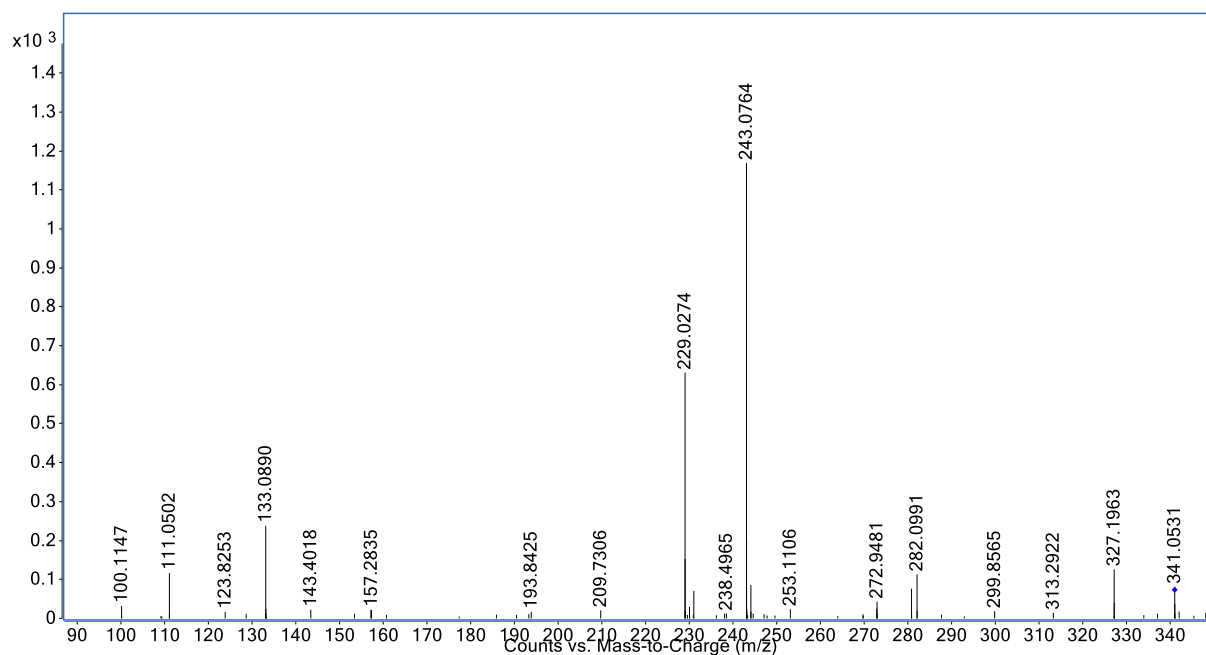


FIGURA 13 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P1, m/z 341 [M+H]⁺.

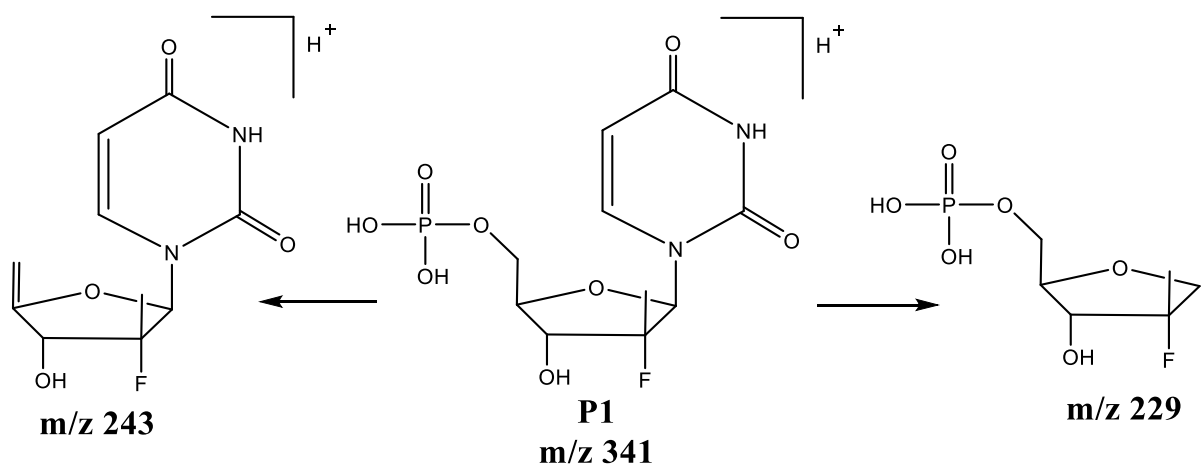


FIGURA 14 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P1 (C₁₀H₁₅FN₂O₈P⁺), m/z 341 [M+H]⁺.

1.4.4.2 - P2 (m/z 261, [M+H]⁺)

O produto de degradação P2 foi identificado no tempo de retenção igual a 0,47 minutos com m/z 261 (C₁₀H₁₄FN₂O₅⁺) [M+H]⁺ (FIGURA 15). A estrutura molecular de P2 sugere que este degradante foi formado a partir de hidrólise ácida do SOF. A diferença de m/z entre P2 e o fragmento m/z 243 do SOF sugere a adição de um átomo de oxigênio e dois hidrogênios (18 unidades). O pico base em m/z 133 (C₄H₅N₂O₂⁺) e o íon produto em m/z 149 (C₆H₁₀FO₃⁺) são referentes, respectivamente, aos anéis pirimidínico e de cinco membros de P2. O íon fragmento de m/z 83 (C₅H₇O⁺) é originado a partir da perda de CH₃FO₂ do fragmento m/z 149. Portanto, a adição de 18 unidades em m/z 243 deve ter ocorrido na porção do anel de cinco membros. A rota de fragmentação proposta para P2 está mostrada na FIGURA 16.

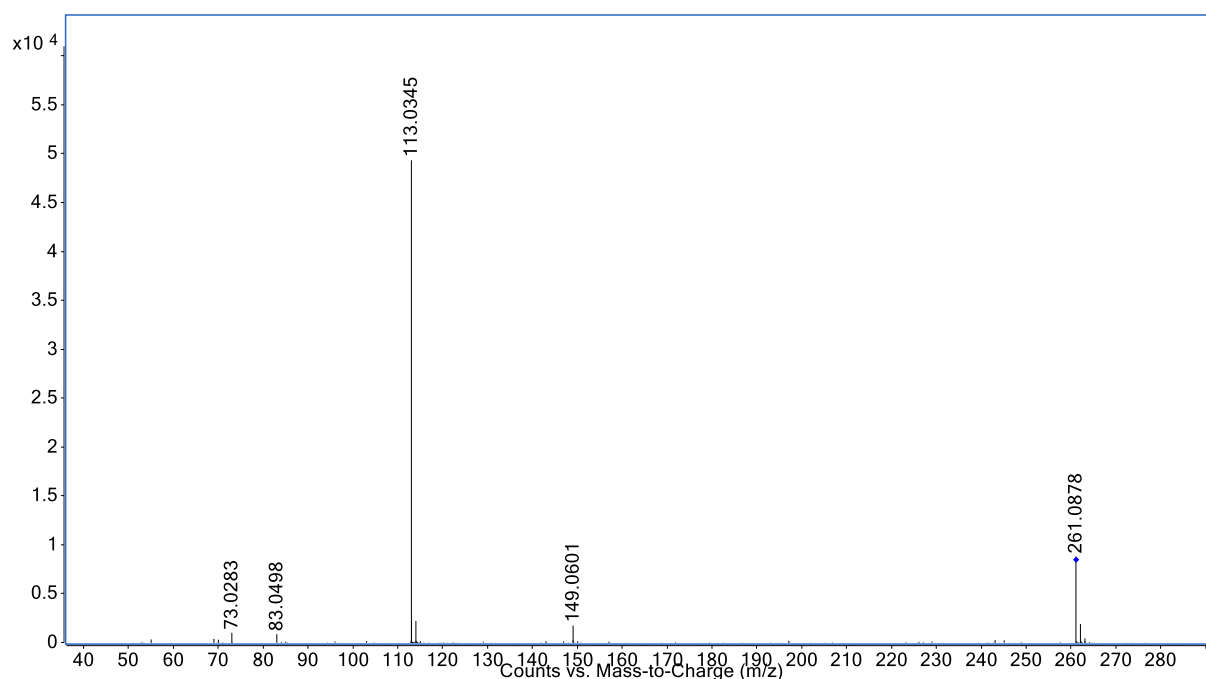


FIGURA 15 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P2, m/z 261 [M+H]⁺.

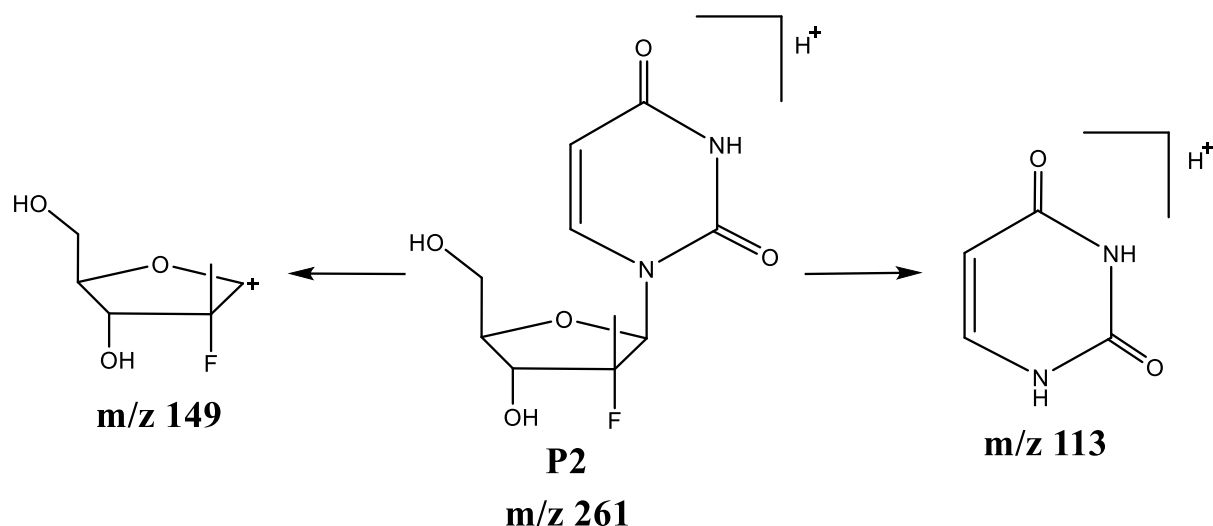


FIGURA 16 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P2, m/z 261 $[M+H]^+$.

1.4.4.3 - P3 (m/z 417, $[M+H]^+$)

O produto de degradação P3 foi identificado com pico do íon molecular em m/z 417 ($C_{16}H_{19}FN_2O_8P^+$) $[M+H]^+$ com tempo de retenção igual 2,46 minutos. A FIGURA 17 mostra o espectro MS^2 de P3, onde percebe-se que os íons fragmentos de maior intensidade em m/z iguais a 243 ($C_{10}H_{12}FN_2O_4^+$) e 305 ($C_{12}H_{15}FO_6P^+$) são referentes, respectivamente, às perdas da porção fenil fosfato ($[M+H-C_6H_7PO_4]^+$) e anel pirimídínico ($[M+H-C_4H_4N_2O_2]^+$). Além disso, foi observado a ocorrência de íons produtos em m/z 175, devido a perda de $C_6H_7FO_2$ do íon produto m/z 305, e m/z 111, perda de HO_2P do fragmento m/z 175. A condição de degradação ácida foi capaz de promover hidrólise da porção fenil fosforamidato em fosfato de fenil como pode ser verificado na FIGURA 18.

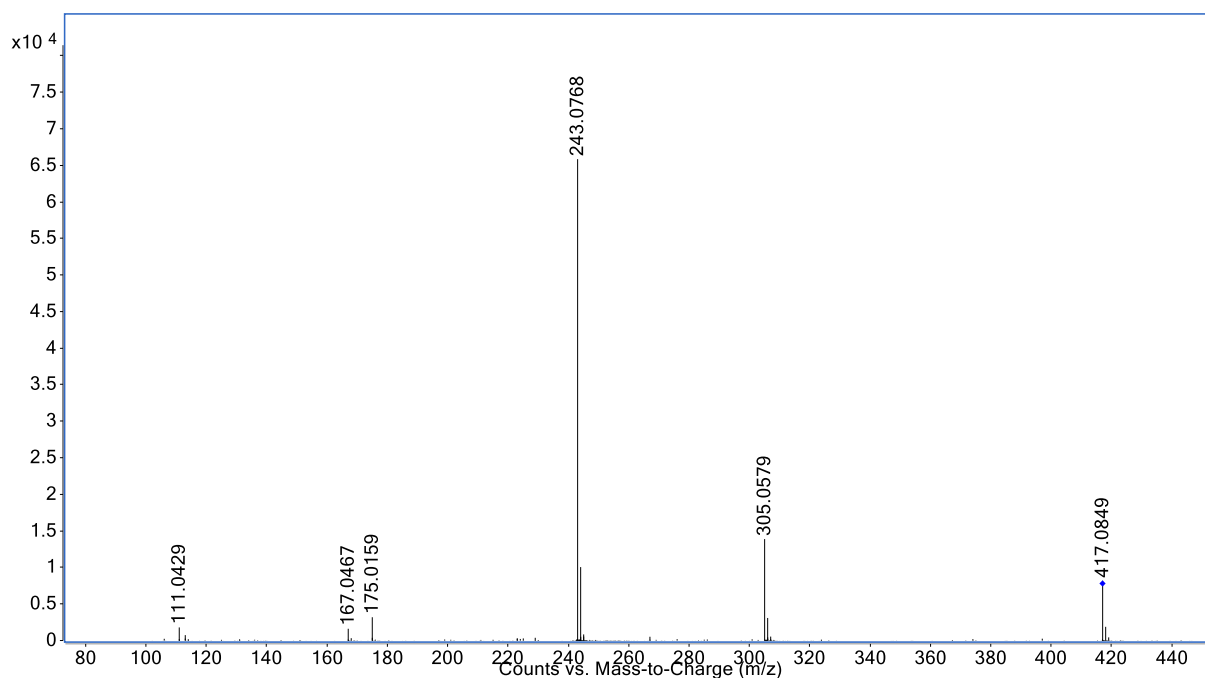


FIGURA 17 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P3 (C₁₆H₁₉FN₂O₈P⁺) m/z 417 [M+H]⁺.

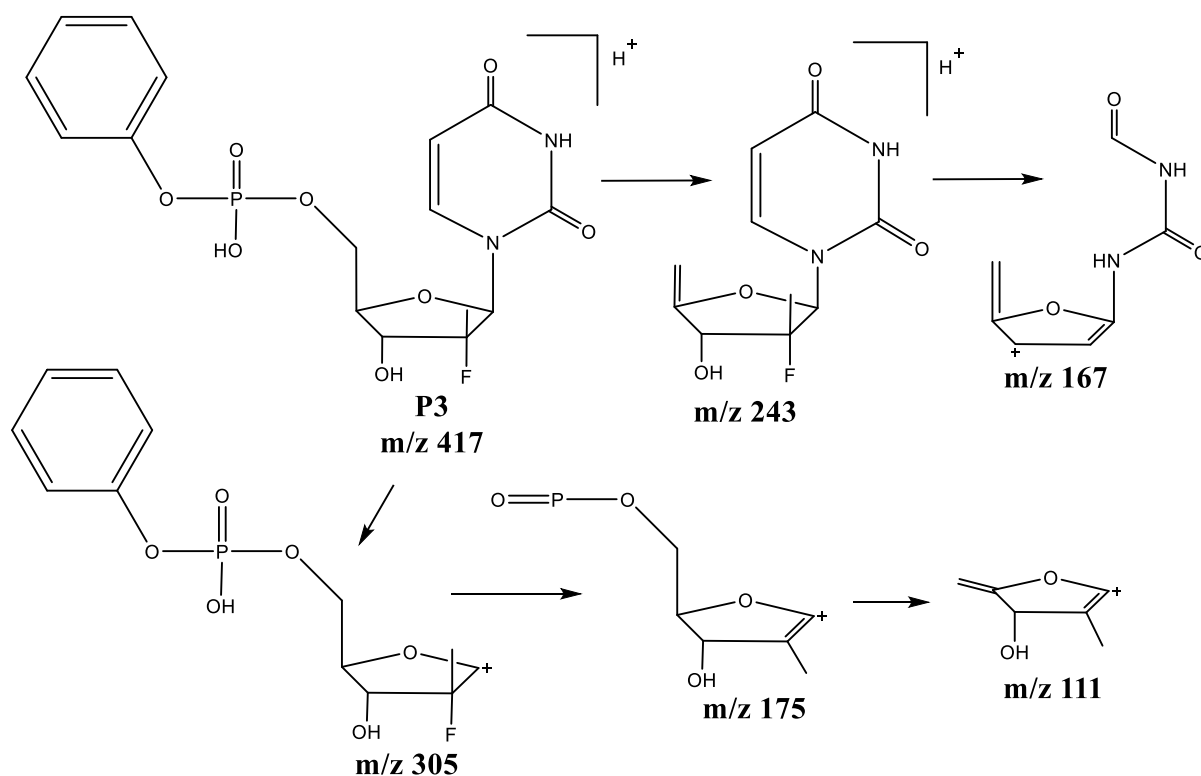


FIGURA 18 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P3, m/z 417 [M+H]⁺.

1.4.5 - Degradação forçada do sofobuvir em meio básico

A FIGURA 19 mostra o cromatograma de íons totais para a amostra submetida em condição básica (NaOH 0,1 mol·L⁻¹), o qual apresentou 3 produtos de degradação nos tempos de retenção iguais a 0,36 (P4), 3,90 (P5) e 4,40 minutos (P6).

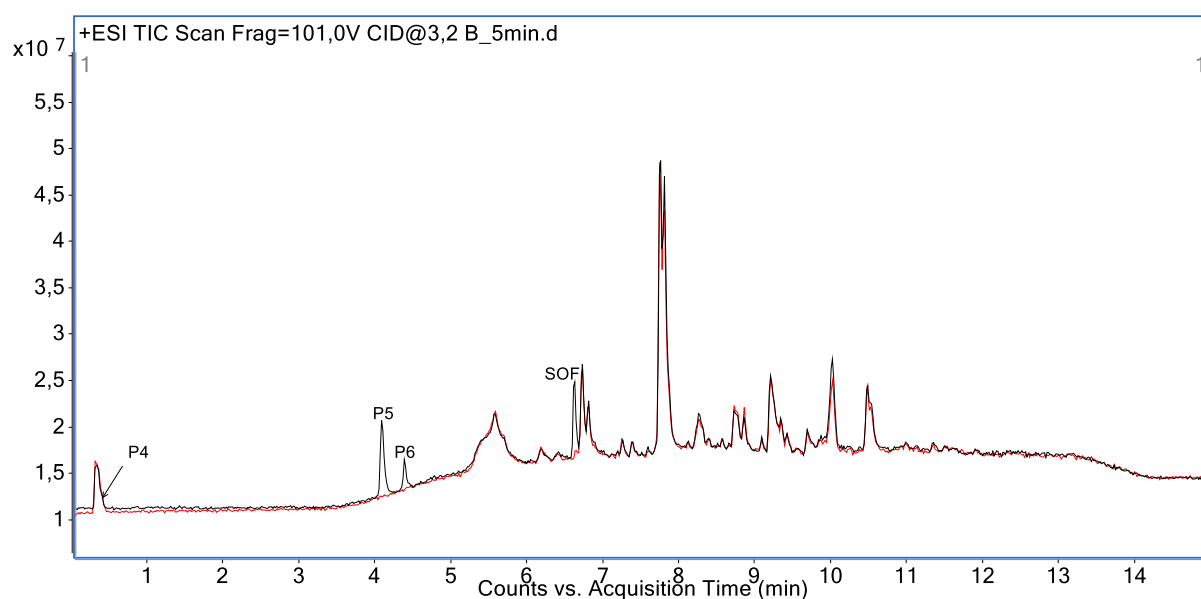


FIGURA 19 – Cromatograma de íons totais obtido a partir da degradação do sofobuvir em meio básico. (–) Branco. (–) Sofobuvir degradado em meio básico.

1.4.5.1 - P4 (m/z 412, [M+H]⁺)

No tempo de retenção igual a 0,41 minutos foi identificado P4 com m/z 412 (C₁₃H₂₀FN₃O₉P⁺) [M+H]⁺ (FIGURA 20). Embora o cromatograma de íons totais referente ao branco também contenha um sinal no mesmo tempo de retenção que P4 na amostra degradada, o perfil espectral de ambas amostras foram diferentes. O espectro de massas do branco em 0,41 minutos não apresentou íons fragmentos característicos correlacionados com a estrutura do SOF e, portanto, o m/z 412 foi denominado como impureza da amostra degradada.

Observou-se no espectro MS² de P4 íons produtos em m/z iguais a 323 (C₁₀H₁₃FN₂O₇P⁺) (perda da porção aminoácida, alanina [M+H-C₃H₇NO₂]⁺), 300 (C₁₀H₁₁N₃O₆P⁺) (perda da estrutura contendo grupo ácido carboxílico e hetero-átomos do anel de cinco membros [M+H-C₃H₉FO₃]⁺), 254 (C₈H₁₄FNO₅P⁺) (perda da estrutura contendo ácido carboxílico e anel pirimidico [M+H-C₅H₆N₂O₄]⁺), 243 (C₁₀H₁₂FN₂O₄⁺). (perda do fosforamidato ([M+H-C₃H₈NO₅P]⁺) e 113 (C₄H₅N₂O₂⁺) (perda da estrutura do anel de cinco membros [M+H-C₉H₁₅FNO₇P]⁺). Além desses, foi identificado um íon produto em m/z 124 (C₂H₇NO₃P⁺) oriundo do fragmento m/z 254.

A presença do íon m/z 243 sugere que a estrutura principal do SOF foi mantida e a ausência do íon m/z 288 mostra que possivelmente as mudanças ocorreram nesta cadeia. De acordo com os íons fragmentos identificados, observou-se também a ausência do grupo fenil na estrutura do produto de degradação P4. Diante disso, o produto de degradação P4 foi formado a partir da hidrólise básica do grupo éster, levando a perda do grupo isopropil. A mostra a FIGURA 21 proposta para a rota de fragmentação do produto P4.

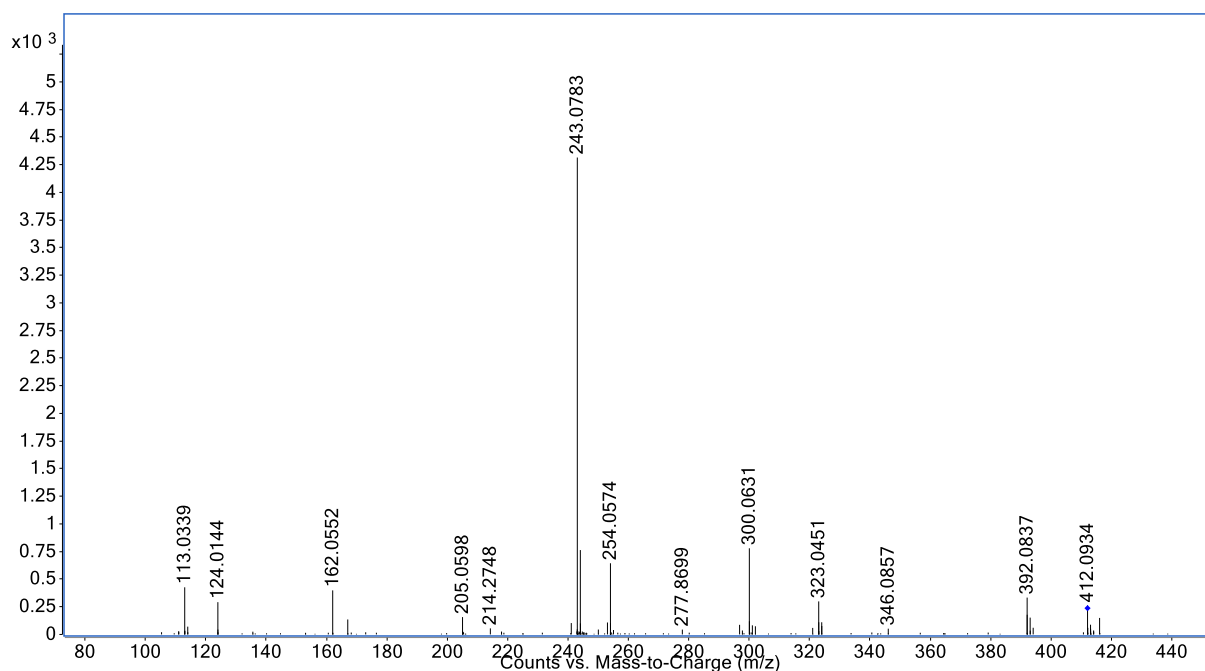


FIGURA 20 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P4 (C₁₃H₂₀FN₃O₉P⁺), m/z 412 [M+H]⁺.

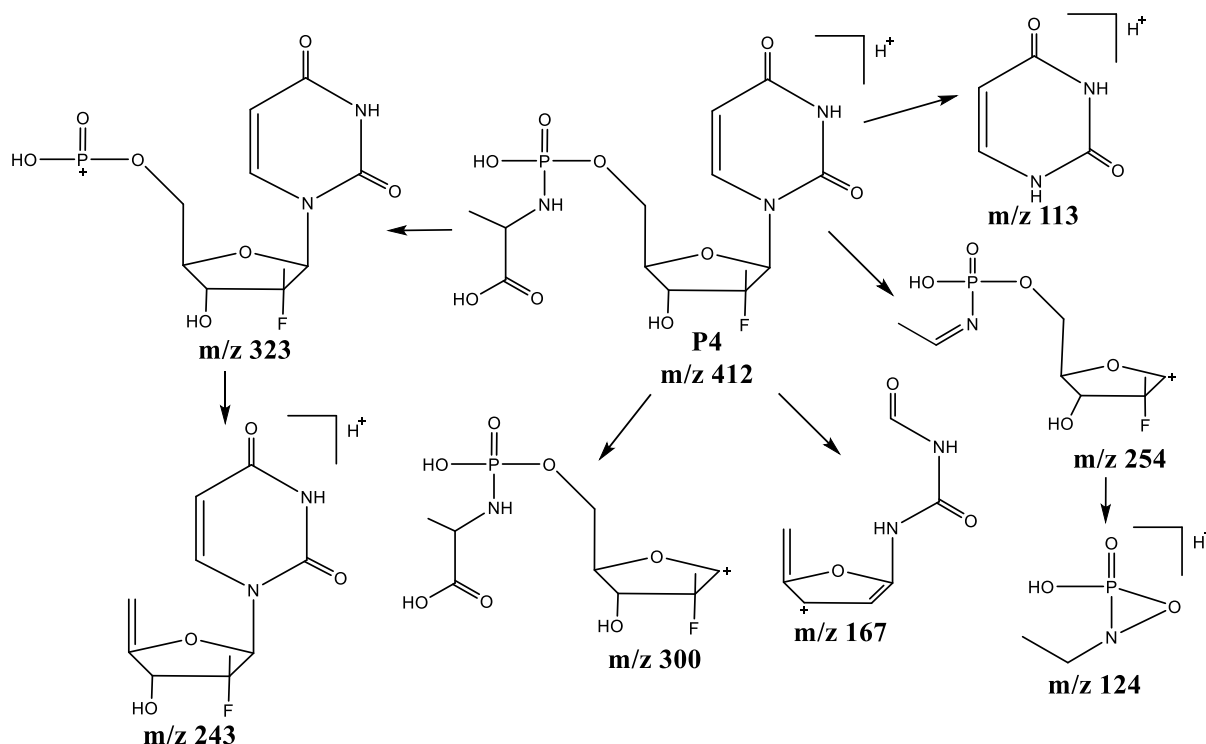


FIGURA 21 – Proposta da rota de fragmentação do produto de degradação P4, m/z 412 [M+H]⁺.

1.4.5.2 - P5 (m/z 454, [M+H]⁺)

No tempo de retenção igual a 4,15 minutos foi observado produto denominado P5 com m/z igual a 454 ($C_{16}H_{26}FN_3O_9P^+$) [M+H]⁺ oriundo de hidrólise básica. A FIGURA 22 mostra o espectro MS² do íon produto P5. Observa-se a formação de fragmentos em m/z iguais a 323 ($C_{10}H_{14}FN_3O_7P^+$) (perda da cadeia isopropil propanoato [M+H-C₆H₁₂O₂]⁺), 300 ($C_{10}H_{11}N_3O_6P^+$) (perda da cadeia isopropil propanoato e hetero-átomos do anel de cinco membros [M+H-C₆H₁₅FO₃]⁺), 243 ($C_{10}H_{12}FN_2O_4^+$) (perda da estrutura fosforamido [M-H-C₆H₁₄NO₅P]⁺), e 113 ($C_4H_5N_2O_2^+$) (perda do anel de cinco membros com suas ramificações [M+H-C₁₂H₂₁FNO₇P]⁺). Ademais, foi observado íon fragmento em m/z 167 devido a perda de C₃H₅FO do íon produto m/z 243. Os íons m/z 113 e 243 mostram que o anel de cinco membros contendo os grupos hidroxila e flúor, assim como o anel pirimidínico estão intactos na cadeia. A ausência do íon fragmento m/z 288, observado no espectro MS² do sofosbuvir, sugere que a modificação estrutural deve ter ocorrido na cadeia isopropil 2-((hidroxi(phenoxi) fosforil) amido) propanoato. De acordo com o perfil espectral, P5 foi formado a partir da perda do anel benzênico da estrutura do SOF devido às reações hidrolíticas. A rota de fragmentação de P5 pode ser observada na FIGURA 23.

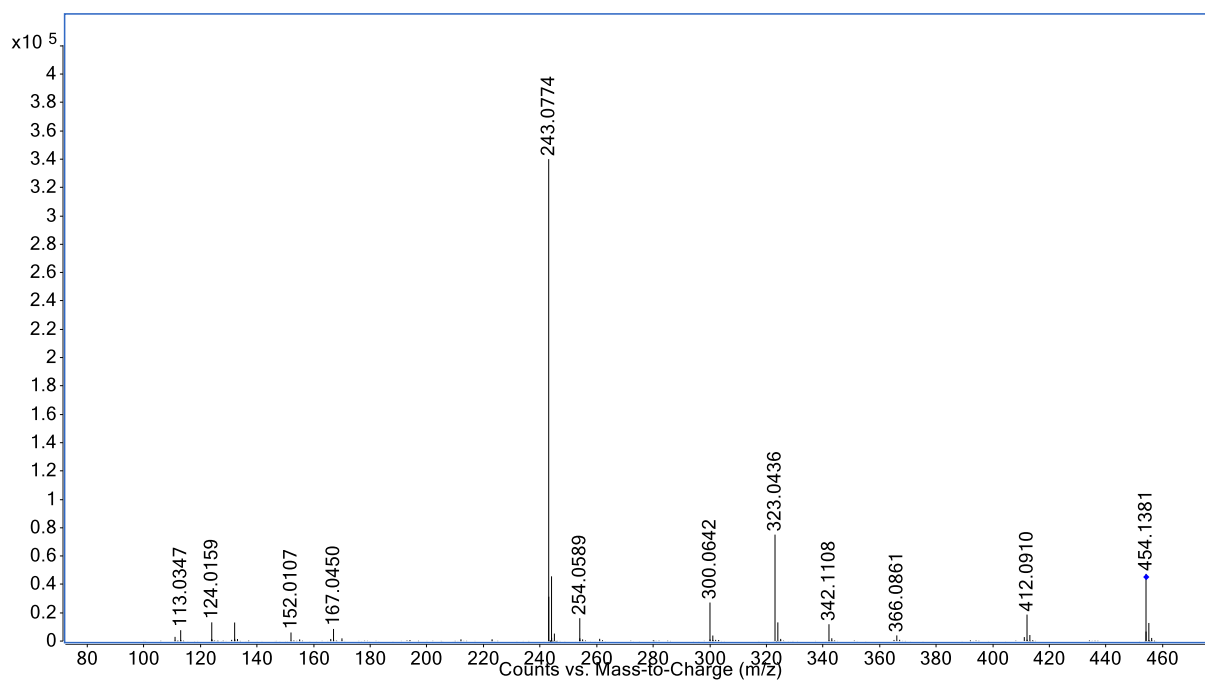


FIGURA 22 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P5 (C₁₆H₂₆FN₃O₉P⁺), m/z 454 [M+H]⁺.

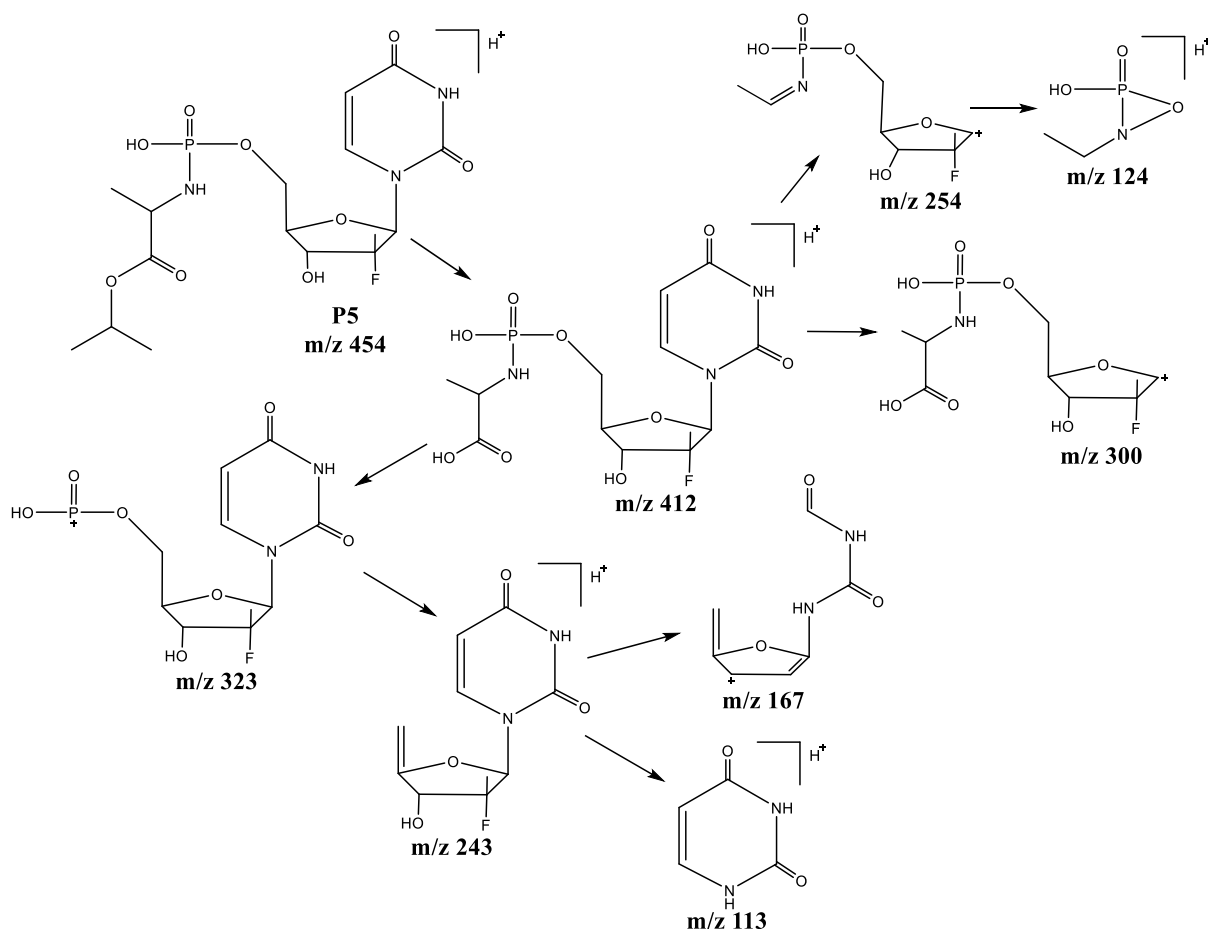


FIGURA 23 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P5, m/z 454 $[M+H]^+$.

1.4.5.3 - P6 (m/z 488, $[M+H]^+$)

O produto de degradação P6 foi eluído em 4,44 minutos e apresentou m/z igual a 488 ($C_{19}H_{24}FN_3O_9P^+$) $[M+H]^+$. A FIGURA 24 mostra o espectro MS^2 do íon produto P6. Observa-se a formação de fragmentos em m/z iguais a 399 ($C_{16}H_{17}FN_2O_7P^+$) (perda da cadeia de aminoácido $[M+H-C_3H_7NO_2]^+$), 376 ($C_{13}H_{19}N_3O_8P^+$) (perda de uma hidroxila e o átomo de flúor $[M+H-C_6H_5FO]^+$), 330 ($C_{14}H_{18}FNO_5P^+$) (perda estrutura aminoácida e quebra do anel pirimidínico $[M-H-C_5H_6N_2O_4]^+$), 243 ($C_{10}H_{12}FN_2O_4^+$) (perda da porção fosfato com suas ramificações $[M+H-C_9H_{12}NO_5P]^+$) e 200 ($C_8H_{11}NO_3P^+$) (perda do anel de cinco membros, estrutura de pirimidina e ácido fórmico $[M+H-C_{11}H_{13}FN_2O_6]^+$). Além

disso, foi observado fragmento em m/z 167 ($C_7H_7N_2O_3$) devido à perda de C_3H_5FO do íon produto m/z 24. O perfil de fragmentação de P6 e do SOF foram semelhantes, demonstrando que a parte da estrutura do princípio ativo permaneceu inalterada. A perda de 42 unidades remete à perda da porção isopropil devido à reação de hidrólise básica. A FIGURA 25 mostra a proposta para a rota de fragmentação para P6.

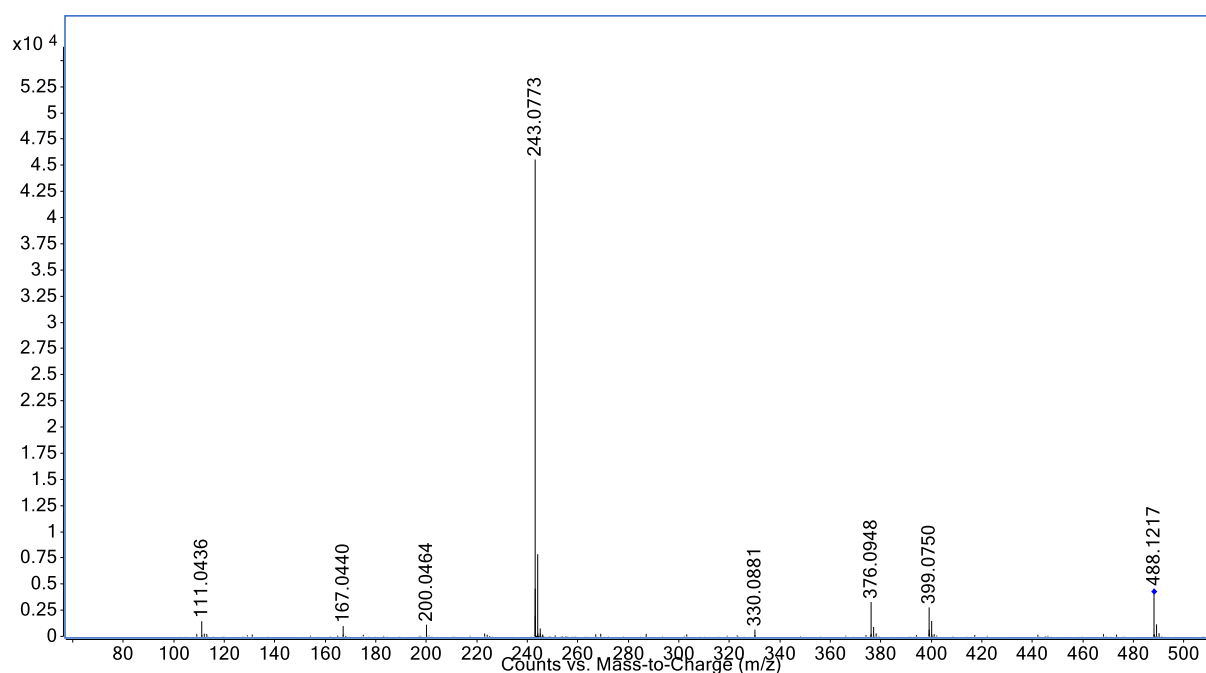


FIGURA 24 – Espectro de massas coletado na análises MS^2 do íon molecular protonado do P6 ($C_{19}H_{24}FN_3O_9P^+$), m/z 488 $[M+H]^+$.

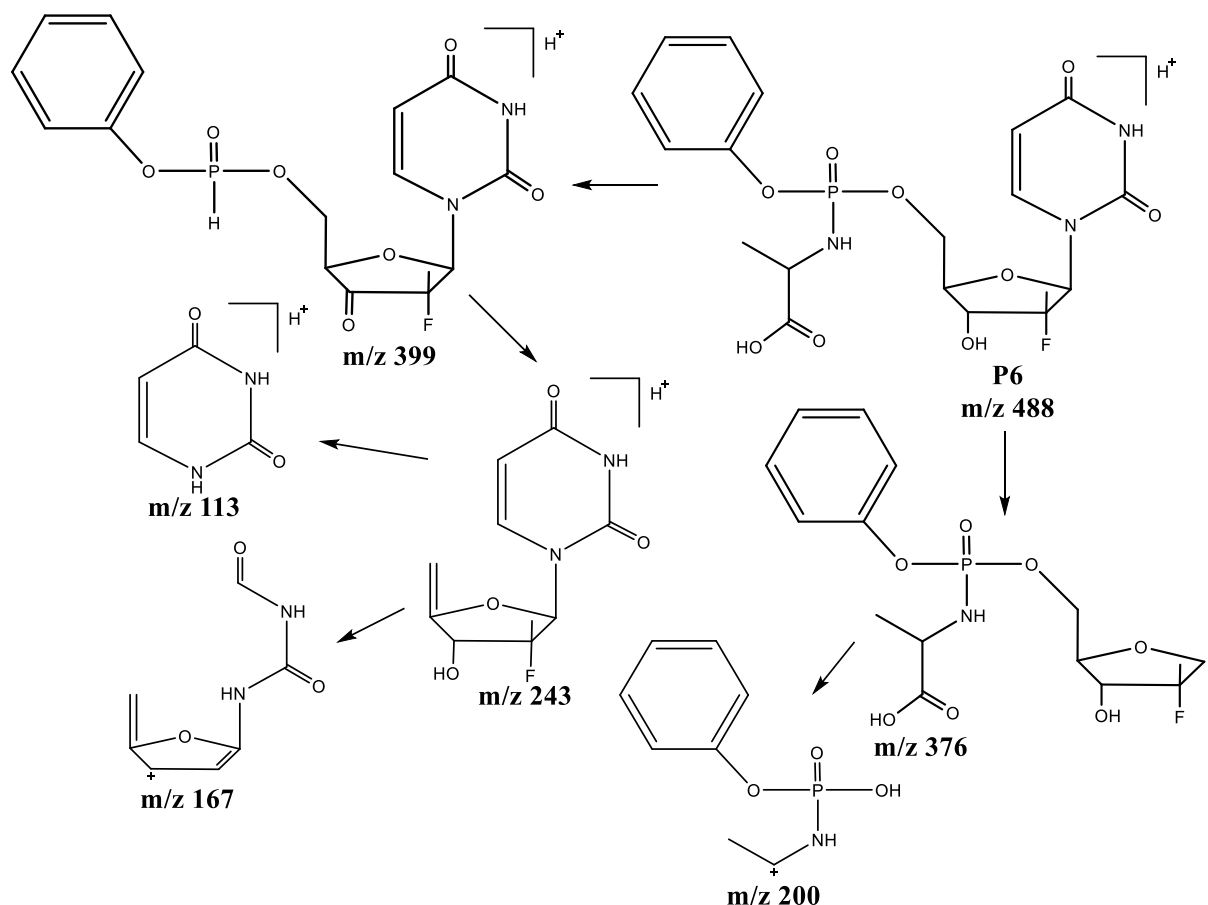


FIGURA 25 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P6, m/z 488 [M+H]⁺.

1.4.6 - Degradação forçada do sofosbuvir – Experimento 14

Decidiu-se estender o tempo de degradação para 10 horas do experimento 14 com a finalidade de aumentar a concentração dos produtos de degradação. O cromatograma de íons totais para o SOF degradado nas condições do experimento 14 (FIGURA 26) apresentou produtos de degradação picos em m/z iguais a 402, 454, 494 e 474 com os tempos de retenção nos tempos de retenção 0,82, 3,97, 5,27 e 5,96 minutos respectivamente.

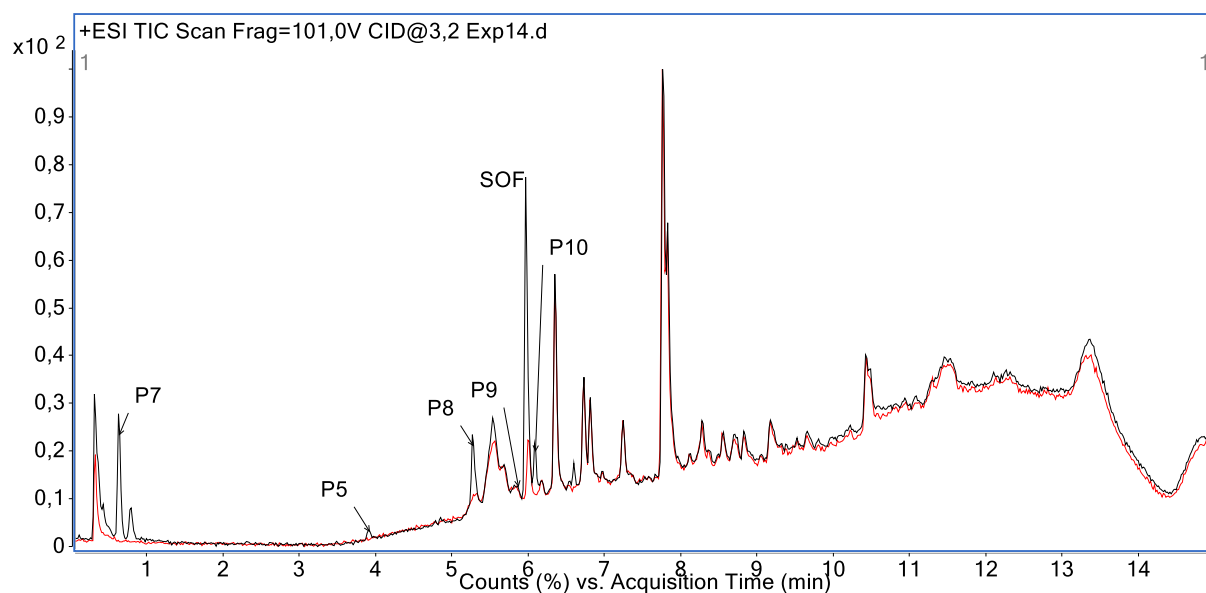


FIGURA 26 – Cromatograma de íons totais obtido a partir da degradação do sofosbuvir nas condições pH 5,5, temperatura 80°C e 7,5% de H₂O₂. (–) Branco. (–) Sofosbuvir degradado nas condições do experimento 14.

1.4.6.1 - P7 (m/z 402, [M+H⁺])

O produto de degradação P7 foi eluído em 0,84 minutos e apresentou m/z igual a 402 (C₁₃H₂₆FN₃O₈P⁺) [M+H]⁺. A FIGURA 27 mostra o espectro MS² do íon produto P7. Observa-se a formação de fragmentos em m/z iguais a 385 (C₁₃H₂₃FN₂O₈P⁺), 342 (C₁₂H₂₂FNO₇P⁺) e 300 (C₉H₁₆FNO₇P⁺) referentes a perdas sucessivas de 17 (NH₃), 43 (CHNO) e 42 (C₃H₆) unidades do íon precursor. Além disso, observou-se os fragmentos m/z 254 (C₈H₁₄FNO₅P⁺), 228 (C₆H₁₂FNO₅P⁺) e 132 (C₆H₁₄NO₂⁺), devido às perdas de, respectivamente, 46 (perda de ácido fórmico, CH₂O₂, do m/z 300), 26 (perda de C₂H₂ do m/z 254) e 270 (manutenção do anel de cinco membros, [M+H-C₇H₁₂FN₂O₆]⁺). Os fragmentos m/z 385 e 342 sugerem que o sofosbuvir sofreu térmolise na porção uracila perdendo C₃H₄O. Além disso, o fragmento m/z 300, já mencionado nos produtos de degradação P4, P5 e P6, mostra a ausência do benzeno em P7, o que sugere ocorrência de hidrólise

na estrutura do sofosbuvir. A FIGURA 28 mostra a proposta para a rota de fragmentação para P7.

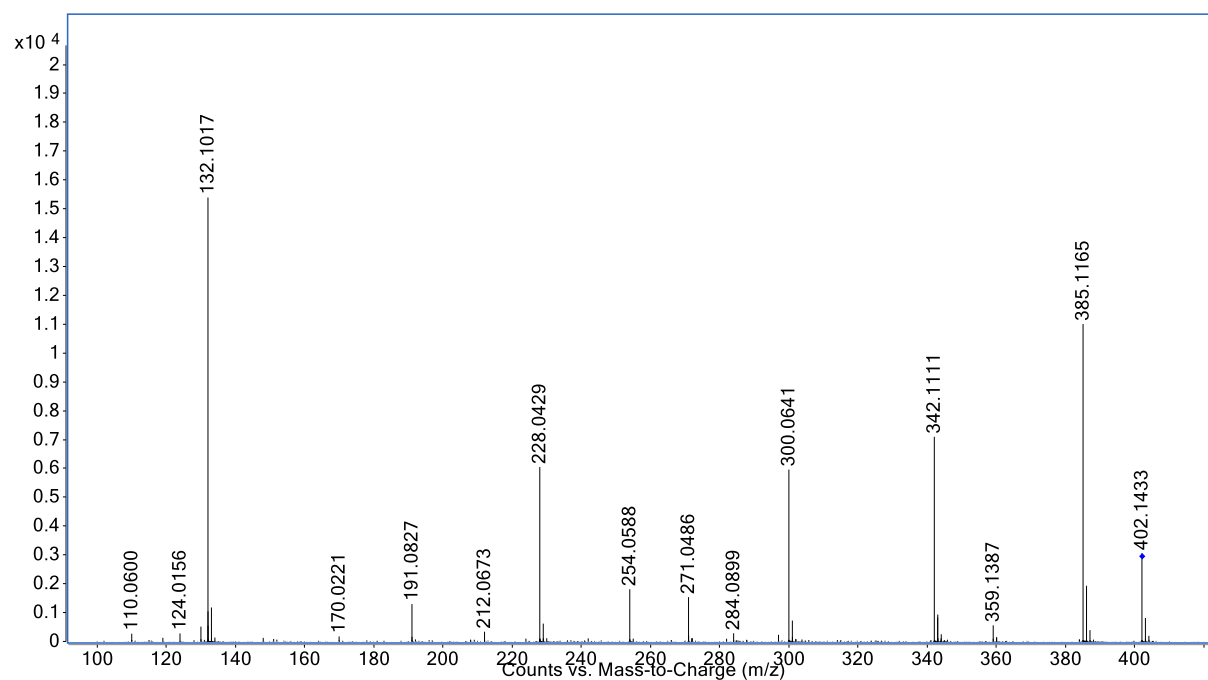


FIGURA 27 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P7 (C₁₉H₂₄FN₃O₉P⁺), m/z 402 [M+H]⁺.

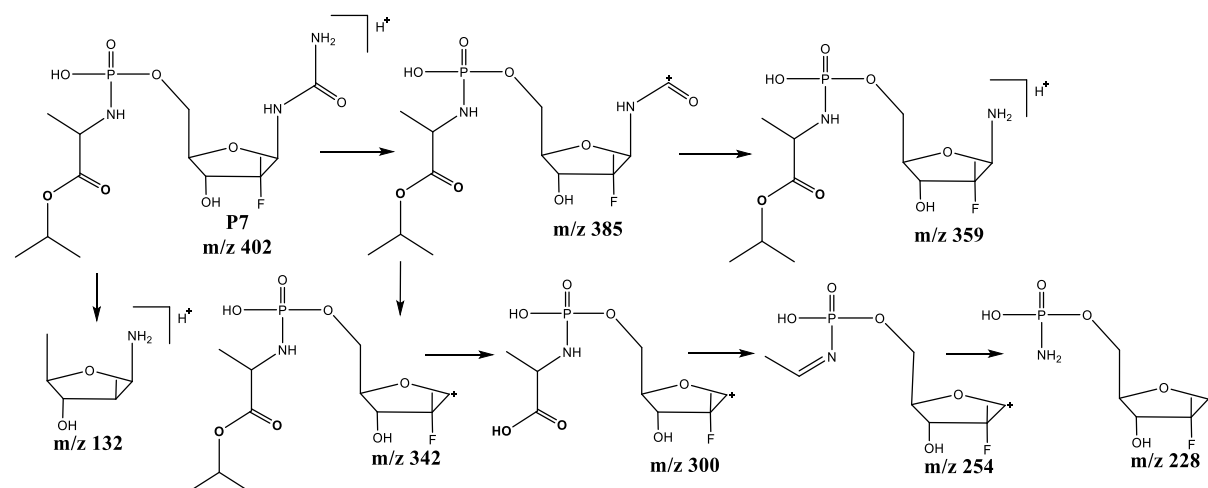


FIGURA 28 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P7, m/z 402 [M+H]⁺.

1.4.6.2 - P8 (m/z 494, [M+H⁺])

O produto de degradação P8 foi eluído em 5,52 minutos e apresentou m/z igual a 494 (C₁₉H₃₀FN₃O₉P⁺) [M+H]⁺. A FIGURA 29 mostra o espectro MS² do íon produto P8 com a formação dos íons m/z 478, 461, 418 e 376 referente às perdas sucessivas de 16 (oxigênio), 17 (NH₃), 43 (CHNO) e 42 (C₂H₂) unidades do íon precursor. O produto P8, assim como o íon m/z 402, apresentou os fragmentos m/z 254 e 228. Além destes, íons m/z 304 e 200, devido a perda de respectivamente, 72 (perda da porção ácida, C₂H₃COOH) e 176 (perda da porção ácida e do anel de cinco membros, C₇H₉FO₄) unidades do íon fragmento m/z 376. As perdas 17, 43 e 42, assim como P7, sugerem que a estrutura de P8 também sofreu térmolise na porção uracila similarmente como em P7. Além destas perdas, foi observado a perda de 16 unidades demonstrando que um átomo de oxigênio foi adicionado na estrutura de P8. O fragmento m/z 376 sugere que o anel de 5 membros e a porção do anel benzênico foi mantida na estrutura de P8. A proposta de fragmentação do produto de degradação pode ser visto na FIGURA 30.

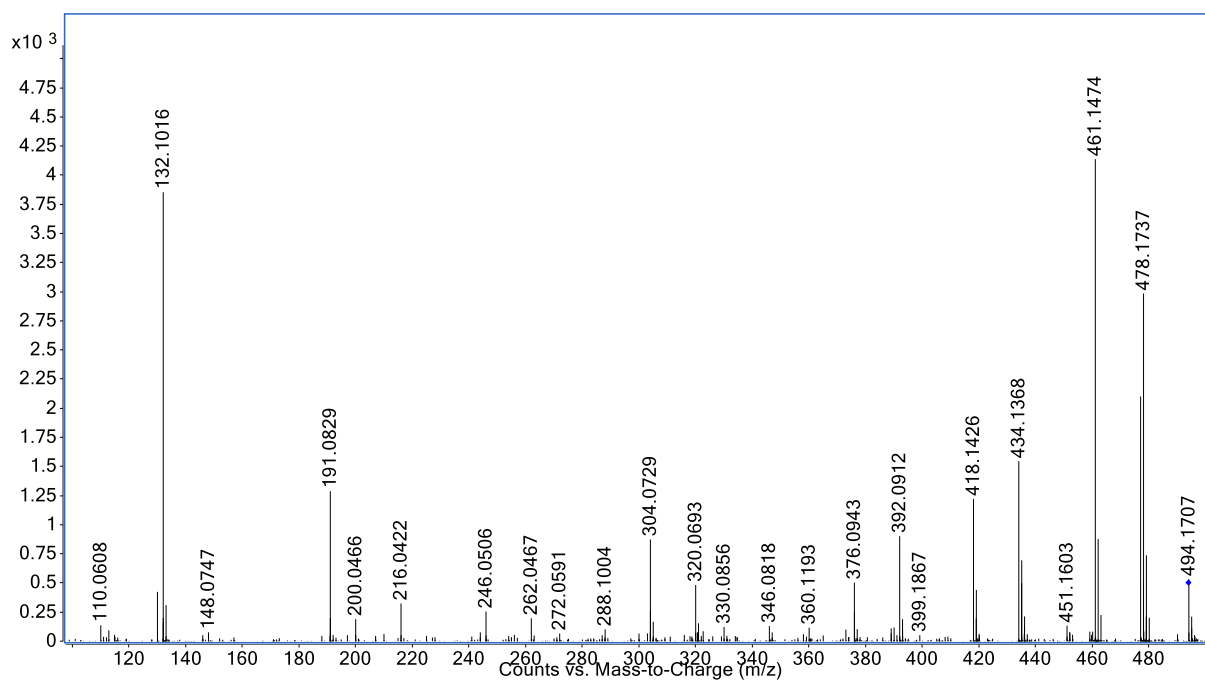


FIGURA 29– Espectro de massas coletado na análises MS2 do íon molecular protonado do P7 ($C_{19}H_{30}FN_3O_9P^+$), m/z 494 $[M+H]^+$.

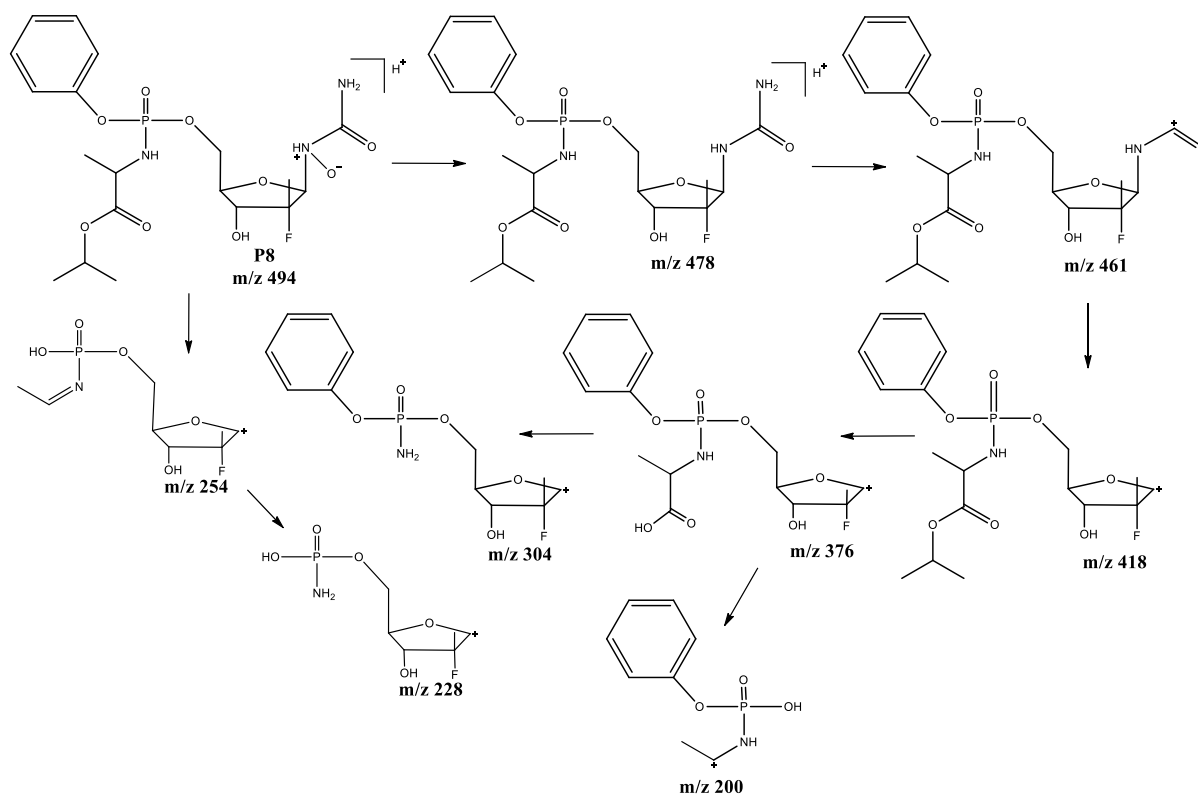


FIGURA 30 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P8, m/z 494 $[M+H]^+$.

1.1.1.1 - P9 (m/z 546, [M+H⁺])

O produto de degradação P9 foi eluído em 5,84 minutos com m/z 546 (C₂₂H₃₀FN₃O₁₀P⁺) [M+H]⁺. Este produto foi formado em condições oxidativas gerando íons fragmentos em m/z 504 (C₁₉H₂₄FN₃O₁₀P⁺), perda de C₂H₂ do íon precursor [M+H-C₂H₂]⁺, 415 (C₁₆H₁₇FN₂O₈P⁺), perda da porção amino ácida do íon precursor [M+H-C₆H₁₂NO₂]⁺ e 392 (C₁₃H₁₉N₃O₉P⁺), perda C₂H₂ juntamente com um átomo de oxigênio e flúor do íon precursor [M+H-C₂H₂OF]⁺ (FIGURA 31). Foram observados também íons fragmentos m/z 243 (perda de toda a porção fenil fosforoamidato do íon m/z 503) e 167 (perda de C₃H₅OF do íon m/z 243). A massa molecular de P9 mostra que houve um incremento de 16 unidades em relação a massa do SOF, o que implica que o produto de degradação deve ser um N-óxido. O fragmento m/z 415 corresponde um incremento de 16 unidades no fragmento m/z 399 característico do SOF, o que indica que o oxigênio possivelmente está anexado no nitrogênio da amida da porção pirimidínica conforme mostra a FIGURA 32.

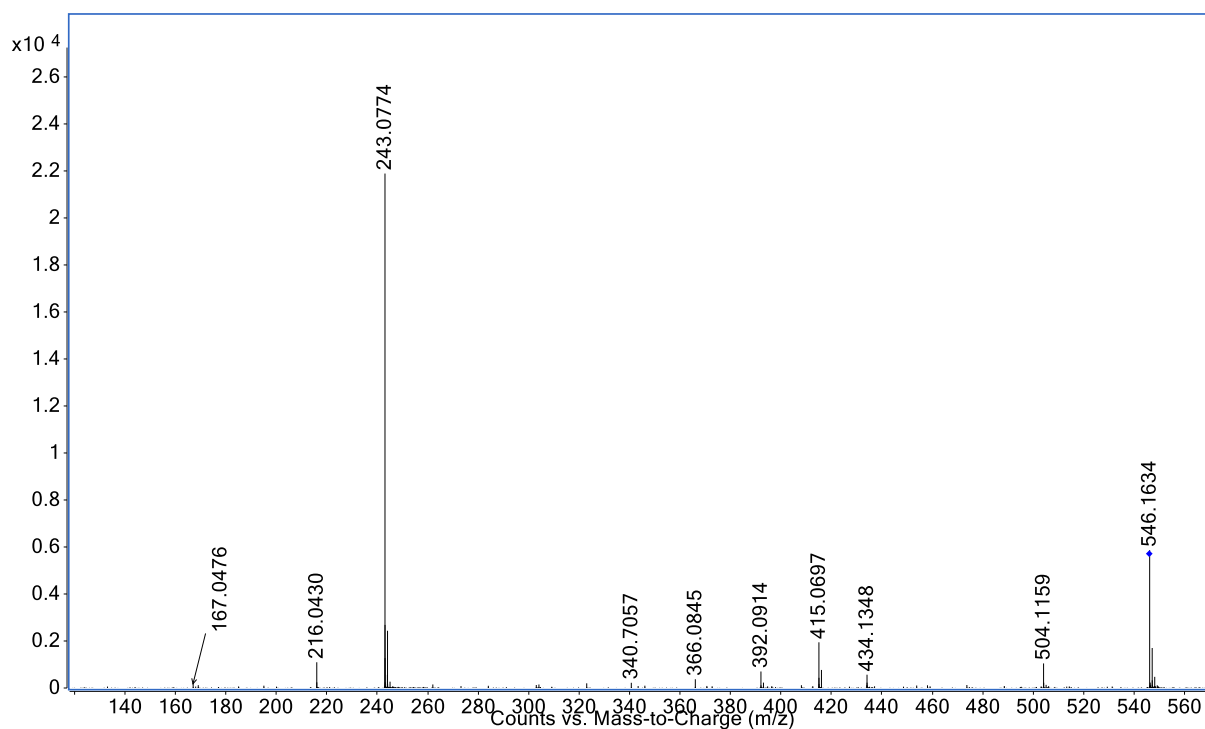


FIGURA 31 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado do P9 (C₂₂H₃₀FN₃O₁₀P⁺), m/z 546 [M+H]⁺.

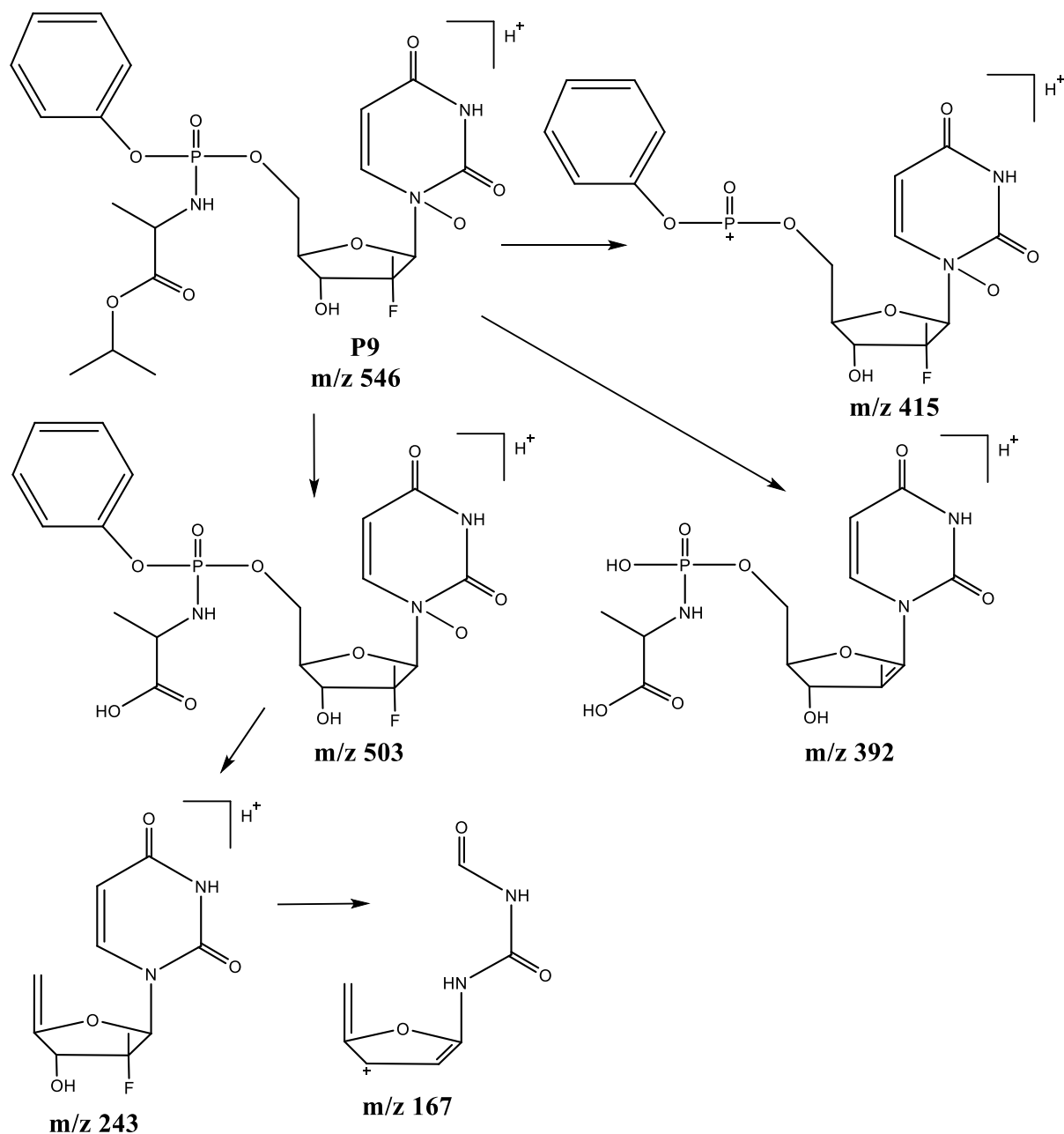


FIGURA 32 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P9, m/z 546 [M+H]⁺.

1.1.1.2 - P10 (m/z 478, [M+H⁺])

O produto de degradação P10 foi eluído em 6,09 minutos e apresentou m/z igual a 478 (C₁₉H₃₀FN₃O₈P⁺) [M+H]⁺. A FIGURA 33 mostra o espectro MS² do íon produto P10 o qual apresentou perfil espectral similar do produto degradação P8, mas com uma diferença de m/z de 16 unidades, sugerindo a ausência de um átomo de oxigênio. A proposta de fragmentação de P10 está representada na FIGURA 34

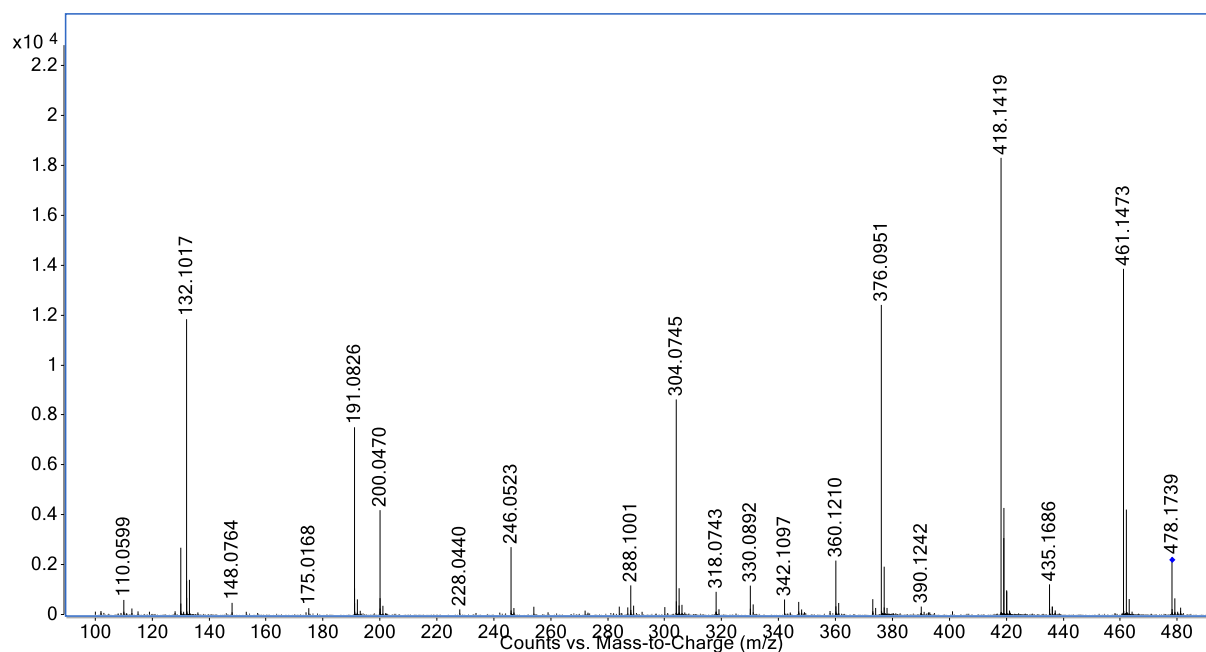


FIGURA 33 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P10, m/z 478 [M+H]⁺.

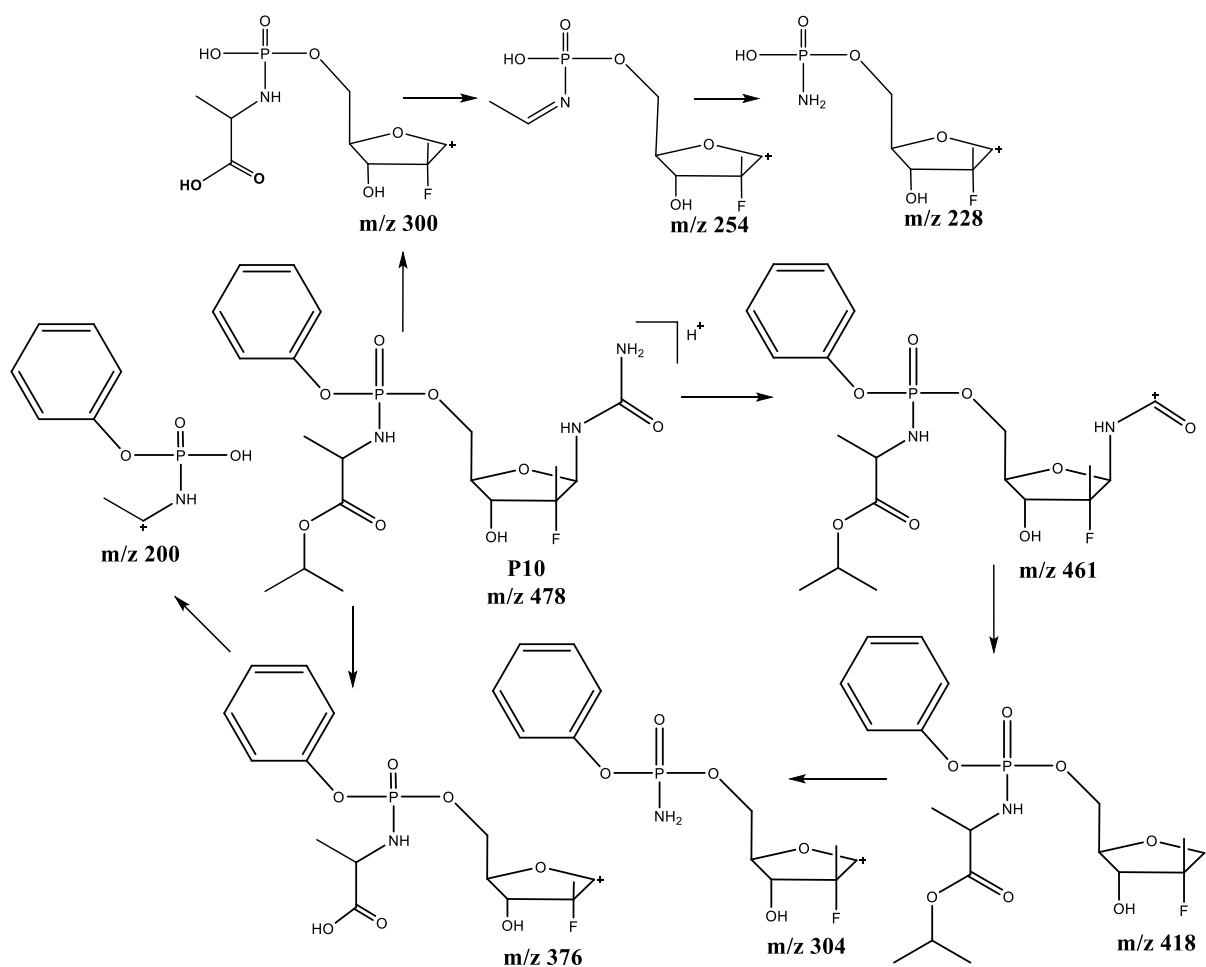


FIGURA 34 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação P10, m/z 478 $[M+H]^+$.

As FIGURA 35, 36 e 37 mostram os mecanismos de formação propostos para produtos de degradação P1-P10 do sofosbuvir.

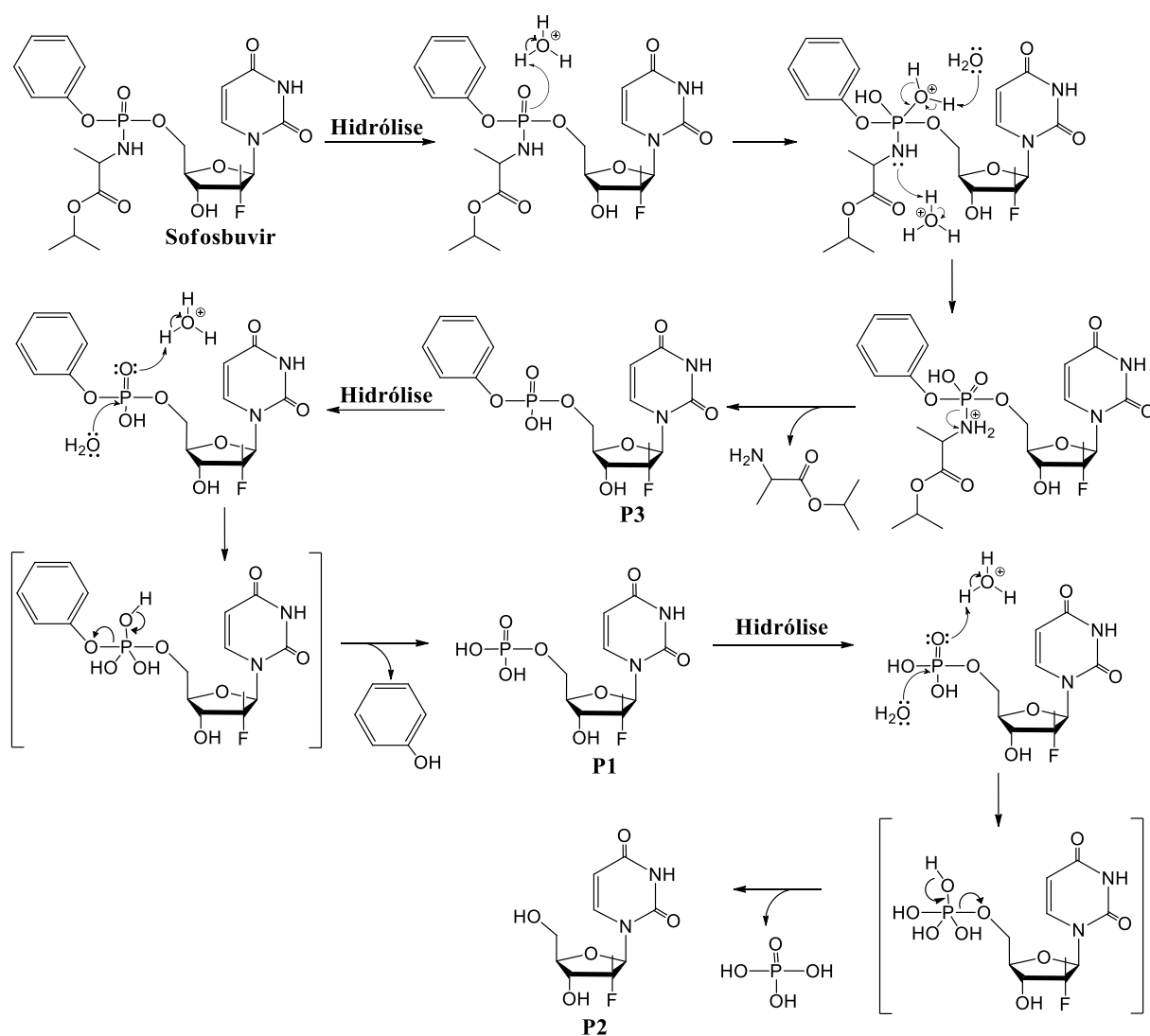


FIGURA 35 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação P1-P3 do SOF.

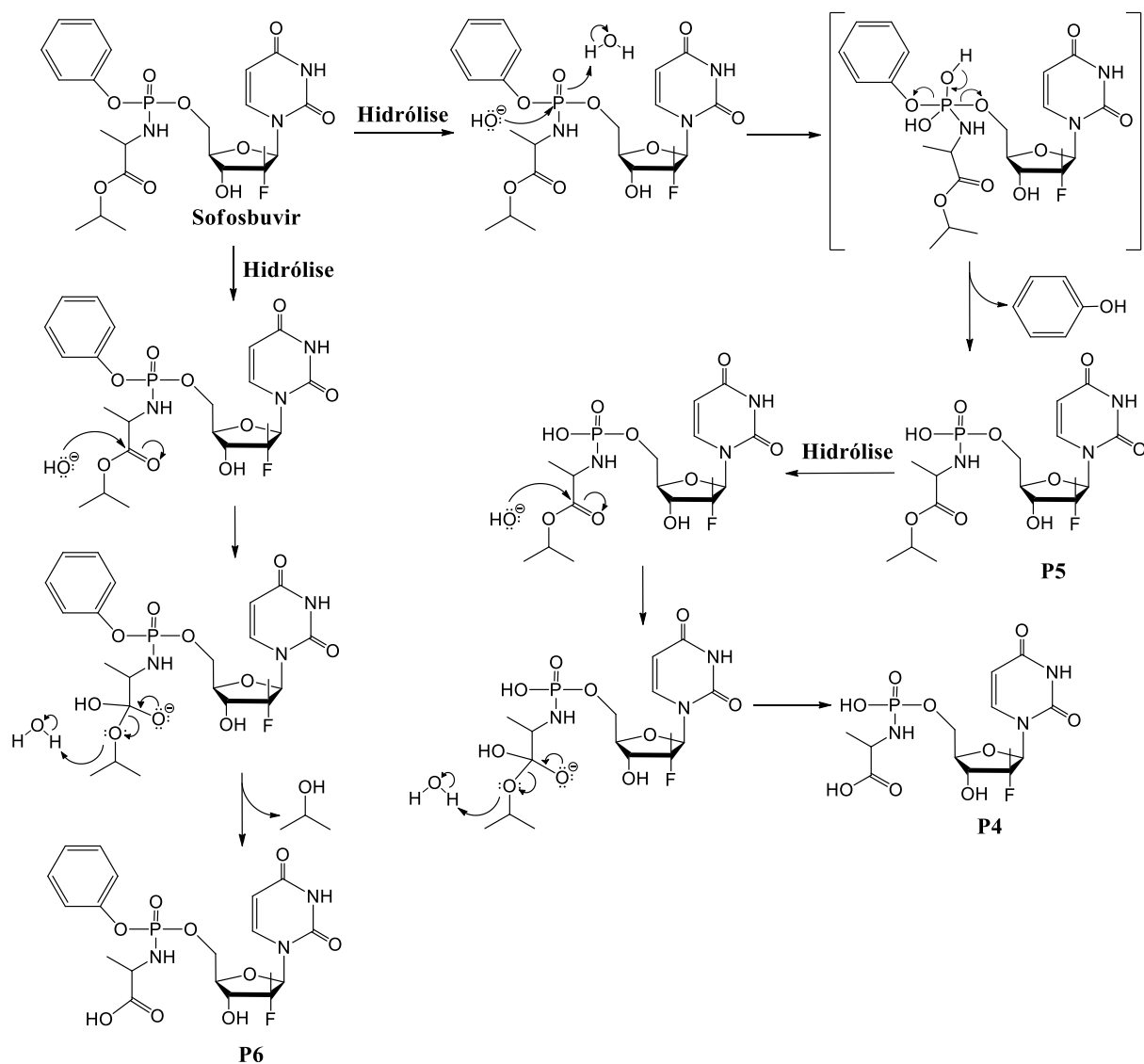


FIGURA 36 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação P4-P6 do SOF.

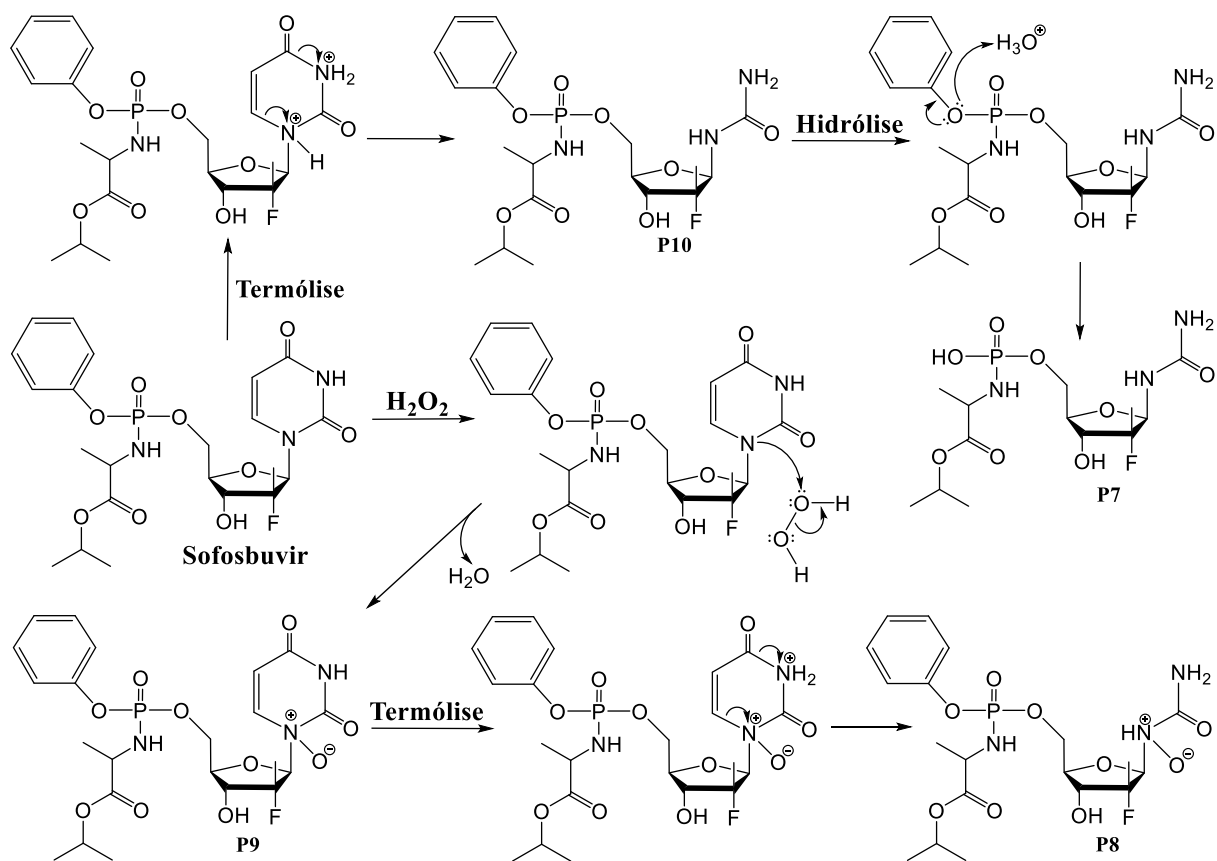


FIGURA 37 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação P7-P10 do SOF.

1.1.2 - Estudo de linearidade para quantificação da nitazoxanida

A região de linearidade para a NTZ foi de 1 a 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e obteve-se uma equação linear igual a $\text{Area}(\text{NTZ}) = 3,16 + 30,22[\text{NTZ}]$ com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9994, onde $\text{Area}(\text{NTZ})$ e $[\text{NTZ}]$ correspondem respectivamente ao sinal analítico e a concentração da NTZ. LD e LQ foram iguais a respectivamente 0,32 e 1,06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A FIGURA 38 mostra respectivamente os cromatogramas sobrepostos das soluções de NTZ e a curva analítica. LD e LQ foram calculados conforme a seção 1.4.1. Os valores de degradação da NTZ foram calculados similarmente aqueles obtidos para o SOF, porém utilizando uma solução de referência de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

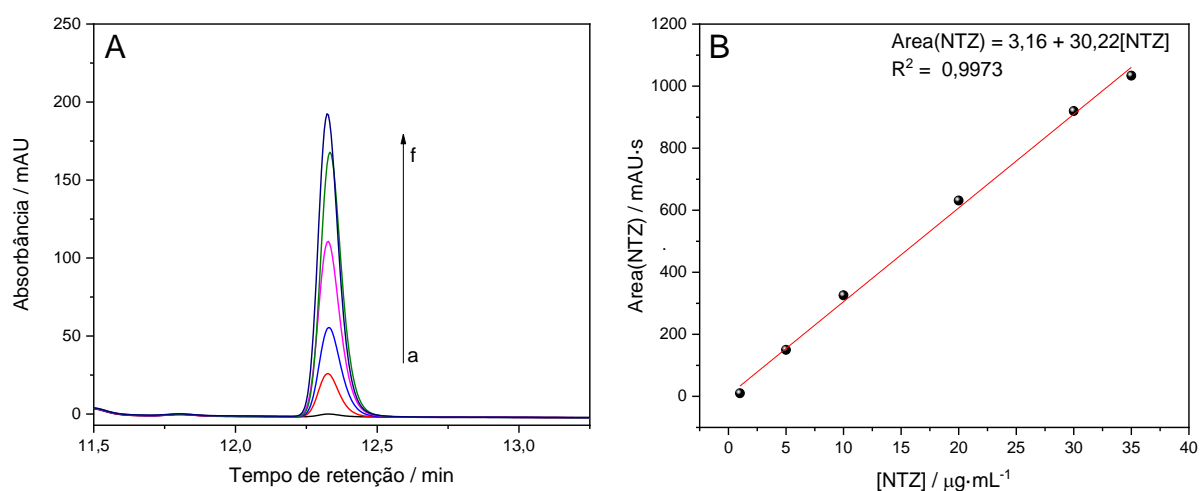


FIGURA 38 – Estudo de linearidade para nitazoxanida. A) Cromatogramas sobrepostos do padrão nitazoxanida nas concentrações a, b, c, d, e, e f iguais a 1, 5, 10, 20, 30 e 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. B) Curva analítica para a nitazoxanida.

1.1.3 - Degradação forçada da nitazoxanida

Os valores de degradação para a nitazoxanida foram obtidos de forma similar ao realizado para o sofosbuvir. As TABELA 14 e 15 mostram as porcentagens de degradação do nitazoxanida em cada uma das condições do planejamento experimental durante 80 minutos. A degradação do fármaco NTZ ocorreu entre 0 e 43%. Excetuando a condição 14 (pH 5,5, 5% H₂O₂ e temperatura 60 °C), as condições em meio básico tenderam a degradar mais que aquelas em meio ácido, considerando os experimentos na ausência de luz UV. Além disso, o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e temperatura também ocasionaram um incremento na degradação da NTZ.

Observou-se que os experimentos 6 e 8 (temperatura e pH em nível +1) possuem degradações maiores que os experimentos 2 e 4 em que somente o pH está em nível +1 ou os experimentos 5 e 7, os quais a temperatura está em nível +1. Tal fato evidencia que o sinergismo entre as variáveis pH e temperatura contribui para a degradação da NTZ. Vale dizer que em ensaios prévios mostraram que a NTZ sofre degradação excessiva em poucos minutos ao se utilizar solução de pH 13. A FIGURA 39 mostra a variação da degradação da NTZ sem a presença de luz UV em relação as variáveis pH×H₂O₂ (A), pH×Temperatura (B) e H₂O₂×Temperatura (C). Os pontos no gráfico representam cada experimento no planejamento experimental.

TABELA 14 – Porcentagens de degradação da NTZ para os experimentos realizados sem luz UV.

Exp.	pH	H₂O₂ (v/v)	Temperatura (°C)	Luz UV	Degradação (%)
1	2,7	1,0	28	Sem	1,41
2	8,3	1,0	28	Sem	2,16
3	2,7	4,0	28	Sem	5,62
4	8,3	4,0	28	Sem	4,99
5	2,7	1,0	52	Sem	1,75
6	8,3	1,0	52	Sem	9,68
7	2,7	4,0	52	Sem	5,78
8	8,3	4,0	52	Sem	16,29
9	1,0	2,5	40	Sem	7,08
10	10,0	2,5	40	Sem	13,60
11	5,5	0,0	40	Sem	3,29
12	5,5	5,0	40	Sem	10,23
13	5,5	2,5	20	Sem	3,65
14	5,5	2,5	60	Sem	43,03
15	5,5	2,5	40	Sem	5,58
16	5,5	2,5	40	Sem	6,65
17	5,5	2,5	40	Sem	6,78

TABELA 15 – Porcentagens de degradação da NTZ para os experimentos realizados com luz UV.

Exp.	pH	H₂O₂ (v/v)	Temperatura (°C)	Luz UV	Degradação (%)
18	2,7	0,0	28	Com	3,19
19	8,3	0,0	28	Com	0,00
20	2,7	0,0	52	Com	0,00
21	8,3	0,0	52	Com	6,39
22	1,0	0,0	40	Com	2,21
23	10,0	0,0	40	Com	9,97
24	5,5	0,0	20	Com	2,39
25	5,5	0,0	60	Com	4,25
26	5,5	0,0	40	Com	3,01
27	5,5	0,0	40	Com	3,27

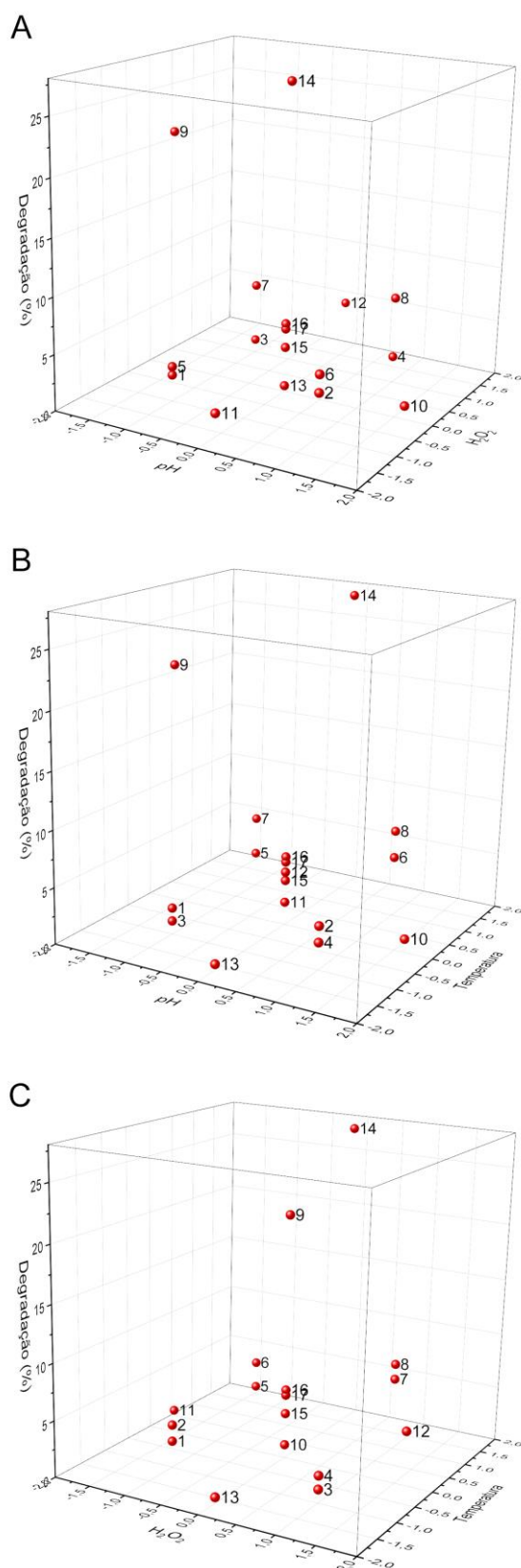


FIGURA 39 - Representação dos resultados da degradação da NTZ sem a presença de luz UV. (A) pH×H₂O₂, (B) pH×Temperatura e (C) H₂O₂×Temperatura.

De forma similar ao tratamento dos dados para o SOF, foi realizada a análise de variância para os resultados das degradações da NTZ (TABELA 16). Tentou-se criar um modelo quadrático, porém este foi capaz de explicar somente 66% de toda a informação do sistema. O modelo apresentou falta de ajuste que pode ser observado pelos testes F para a regressão e para a falta de ajuste. Os coeficientes obtidos para o modelo não foram significativos, uma vez que os erros para cada coeficiente são estatisticamente superiores aos próprios coeficientes ao nível de confiança de 95% (TABELA 17).

TABELA 16 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação da NTZ sem a presença de luz UV (experimentos 1 a 17).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$1,01 \times 10^3$	10	$1,01 \times 10^2$
Resíduo	$5,05 \times 10^2$	6	$8,42 \times 10$
Total	$1,51 \times 10^3$	16	$9,45 \times 10$
Erro Puro	$8,66 \times 10^{-1}$	2	$4,33 \times 10^{-1}$
Falta de Ajuste	$5,05 \times 10^2$	4	$1,26 \times 10^2$
		Var. máxima	
Var. explicada (R^2)	0,6656	explicável (R^2 máximo)	0,9994
Teste F Regressão	1,19	$F_{\text{crítico}}(10,6)$	4,06
Teste F Falta de Ajuste	291,28	$F_{\text{crítico}}(4,2)$	19,25

*Teste F com intervalo de confiança de 95%.

TABELA 17 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 1-17 para a NTZ.

Coef.	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁₁	b ₂₂	b ₃₃	b ₁₂	b ₁₃	b ₂₃	b ₁₂₃
Valor	7,4	2,2	2,2	6,3	-0,6	-2,0	4,2	-0,2	2,3	-0,5	-0,5
Erro	±20,5	±9,8	±9,8	±9,8	±11,1	±11,1	±11,1	±12,6	±12,6	±12,6	±12,6

Já com os experimentos realizados na presença de luz UV, as degradações ocorreram entre 0,00 e 9,97%. O experimento 23 (pH 10 e temperatura 40 °C) apresentou a maior degradação. A FIGURA 40 mostra a porcentagem de degradação com a variação do pH e da temperatura na presença de luz UV. Observa-se que as variáveis pH e temperatura possuem pouca contribuição na degradação da nitazoxanida, visto que quando estas variáveis estão em nível baixo (-1) ou somente pH é aumentado, há pouca ou quase nenhuma degradação. Porém, é interessante perceber a interação destas variáveis, desde que há um maior incremento na degradação quando a temperatura e pH estão no nível alto (+1) (experimento 21).

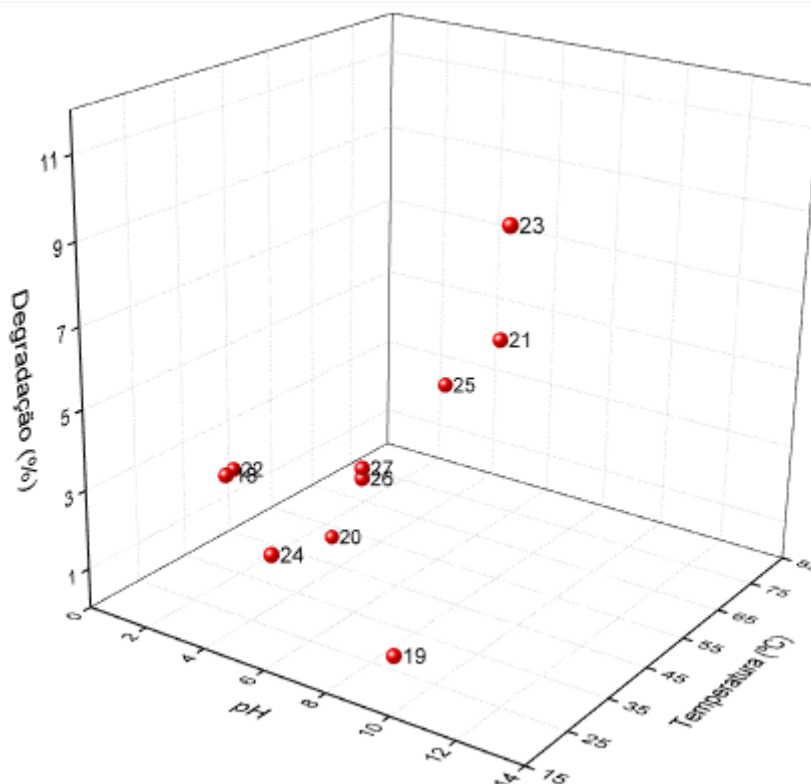


FIGURA 40 – Representação dos resultados da degradação da NTZ na presença de luz UV.

A análise de variância dos resultados da NTZ referentes aos experimentos 18–27 (TABELA 18) mostrou que o modelo matemático apresentou falta de ajuste. Embora o valor de F para a falta de ajuste tenha sido inferior ao $F_{\text{crítico}(3,1)}$, o valor de F para regressão (menor que o $F_{\text{crítico}(5,4)}$) mostrou que a média quadrática da regressão se confunde estatisticamente com o erro puro. Além disso, os coeficientes obtidos para o modelo matemático não foram significativos, uma vez que os erros para cada coeficiente são estatisticamente superiores aos próprios coeficientes ao nível de confiança de 95% (TABELA 19).

TABELA 18 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central para a degradação da NTZ com a presença de luz UV (experimentos 18 a 27).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$6,42 \times 10$	5	12,834
Resíduo	$1,48 \times 10$	4	3,692
Total	$7,89 \times 10$	9	8,771
Erro Puro	$3,31 \times 10^{-2}$	1	0,033
Falta de Ajuste	$1,47 \times 10$	3	4,912
		Var. máxima	
Var. explicada (R^2)	0,8129	explicável (R^2 máximo)	0,9995
Teste F Regressão	3,48	$F_{\text{crítico}}(5,4)$	6,26
Teste F Falta de Ajuste	148,31	$F_{\text{crítico}}(3,1)$	215,71

TABELA 19 – Coeficientes e erros associados ao modelo quadrático gerado a partir dos experimentos 18-27 para a NTZ.

Coef.	b_0	b_1	b_3	b_{11}	b_{33}	b_{13}
Valor	2,6	1,7	0,7	1,0	-0,04	2,4
Erro	$\pm 6,5$	$\pm 3,1$	$\pm 3,1$	$\pm 3,6$	$\pm 3,6$	$\pm 4,8$

1.1.4 - Elucidação dos produtos de degradação da nitazoxanida

Além das condições de degradação do planejamento experimental, foram analisados os perfis cromatográficos da nitazoxanida degradada em meio básico ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e oxidativo (5% de H_2O_2).

Este último foi analisado sem a presença de luz UV, já as demais condições foram analisadas na presença e ausência de luz UV. Os experimentos foram realizados a temperatura de 60 °C durante 90 minutos. Assim como na elucidação dos produtos de degradação do SOF, foram selecionados as amostras com perfis cromatográficos diferentes e com produtos de degradação com maior concentração para as análises de LC-MS/MS.

A FIGURA 41 mostra as condições de degradação que forneceram os perfis cromatográficos mais diferentes e com bandas de maior intensidade. Observou-se que a degradações em NaOH 0,1 mol·L⁻¹ durante 90 minutos e a condição do experimento 7 (pH 2,7, H₂O₂ 4% e temperatura de 52 °C) forneceram os perfis cromatográficos mais distintos e, portanto, foram selecionadas para análises de LC-MS/MS. A TABELA 20 mostra os produtos de degradação (D1-D5) e os fragmentos característicos. Observa-se que os erros das massas exatas dos produtos de degradação foram inferiores a 5 ppm, indicando que as fórmulas moleculares preditas possuem alta acurácia.

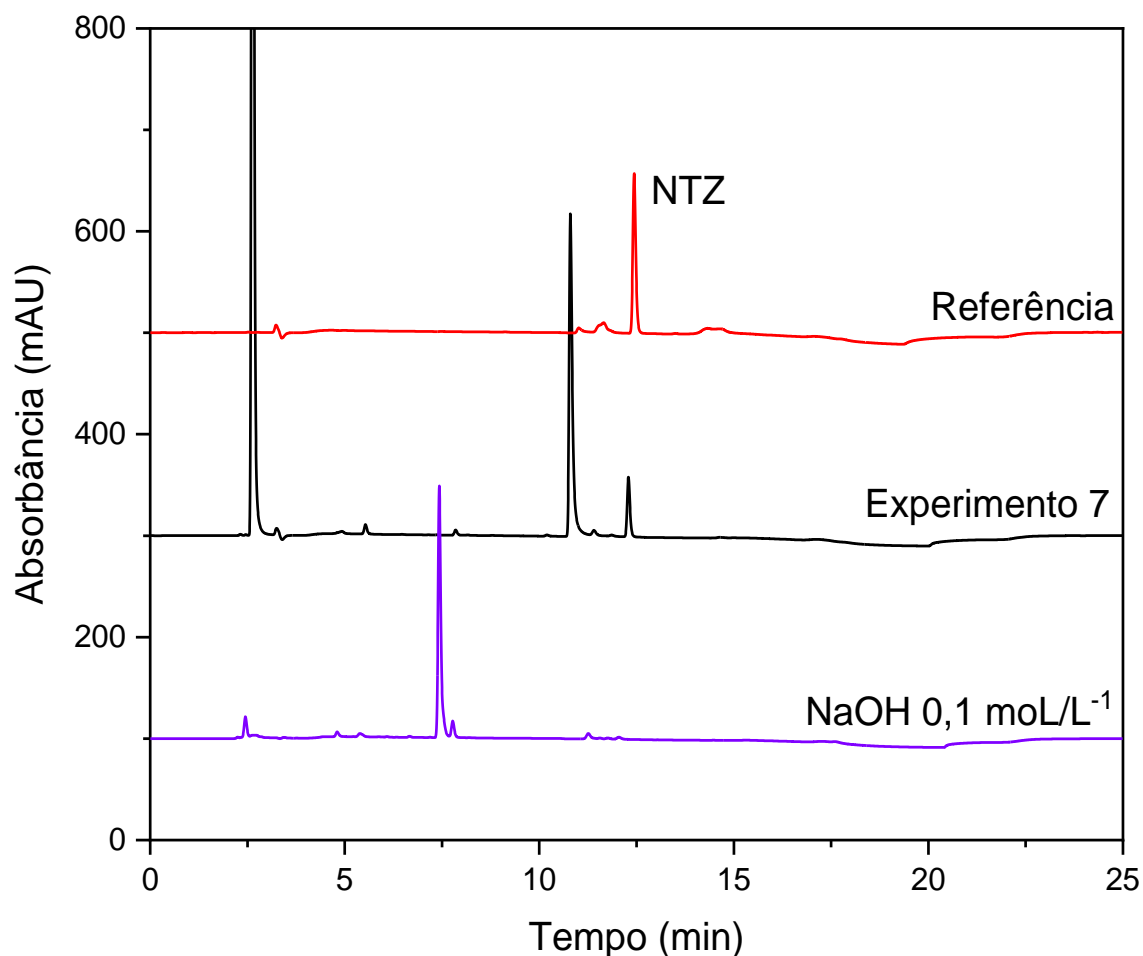


FIGURA 41 – Diferentes perfis cromatográficos obtidos nas condições de degradação estudadas para a NTZ.

TABELA 20 – Massa molecular observada e teórica da NTZ e seus produtos de degradação.

Composto	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Íons fragmentos
NTZ	306,0186	306,0190	1,31	$C_{12}H_8N_3O_5S^-$	264, 217, 185, 138
D1	137,0245	137,0244	-0,73	$C_7H_5O_3^-$	93
D2	163,0503	163,0502	-0,61	$C_8H_7N_2O_2^+$	121, 93
D3	136,0404	136,0404	0,00	$C_7H_6NO_2^-$	118, 93
D4	179,0466	179,0462	-2,23	$C_8H_7N_2O_3^-$	136, 118
D5	264,0089	264,0084	-1,89	$C_{10}H_6N_3O_4S^-$	234, 217, 189

1.1.4.1 - Nitazoxanida (m/z 306, [M-H]⁻)

Nitazoxanida foi identificada com o m/z 306 (C₁₂H₈N₃O₅S⁻) [M-H]⁻ no tempo de retenção de 6,70 minutos. O espectro de massas MS² da NTZ é mostrado na FIGURA 42. Observou-se íons fragmentos em m/z 264 (C₁₀H₆N₃O₄S⁻) (perda de 42 unidades do íon precursor [M-H-C₂H₂O]⁻), 217 (C₁₀H₅N₂O₂S⁻) (perda de dióxido de nitrogênio do ion fragmento m/z 264), 185 (C₅H₄N₃O₃S⁻) (perda da porção com anel benzênico do íon precursor [M-H-C₇H₄O₂]⁻) e 138 (C₅H₃N₂OS) (perda da porção com anel benzênico juntamente com dióxido de nitrogênio do ion precursor [M-H-C₇H₅NO₄]⁻). O perfil de fragmentação encontrado está de acordo com o encontrado na literatura.^{50, 53} A FIGURA 43 mostra a proposta de rota de fragmentação para NTZ.

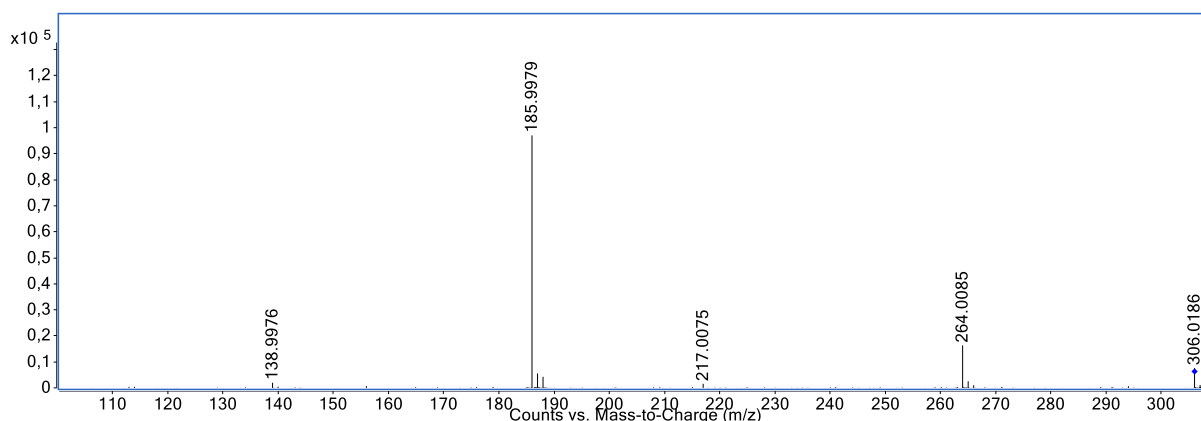


FIGURA 42 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular desprotonado da NTZ (C₁₂H₈N₃O₅S⁻) [M-H]⁻.

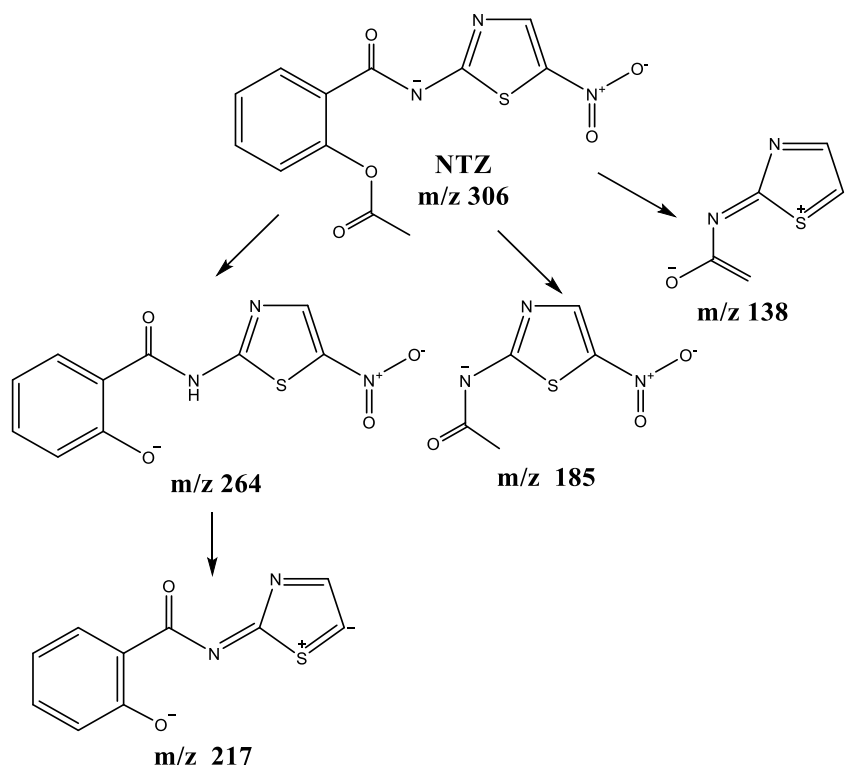


FIGURA 43 – Proposta de uma rota de fragmentação da NTZ, m/z 360 [M-H]⁻.

1.1.5 - Degradação forçada da nitazoxanida em meio básico

A detecção dos produtos de degradação da NTZ foi avaliada nos modos negativo e positivo. As FIGURA 44 e 45 mostram respectivamente o cromatograma de íons totais no modo negativo e positivo para a NTZ degradada em meio básico (NaOH 0,1 mol·L⁻¹) e seus brancos. O modo negativo de análises LC-MS/MS apresentou os produtos de degradação D1, D3 e D4 após uma degradação de 90 minutos. O produto de degradação D2 foi encontrado nos modos positivo e negativo com tempo de degradação de até 20 minutos. O modo positivo foi selecionado para analisar D2, pois este apresentou maior intensidade de sinal.

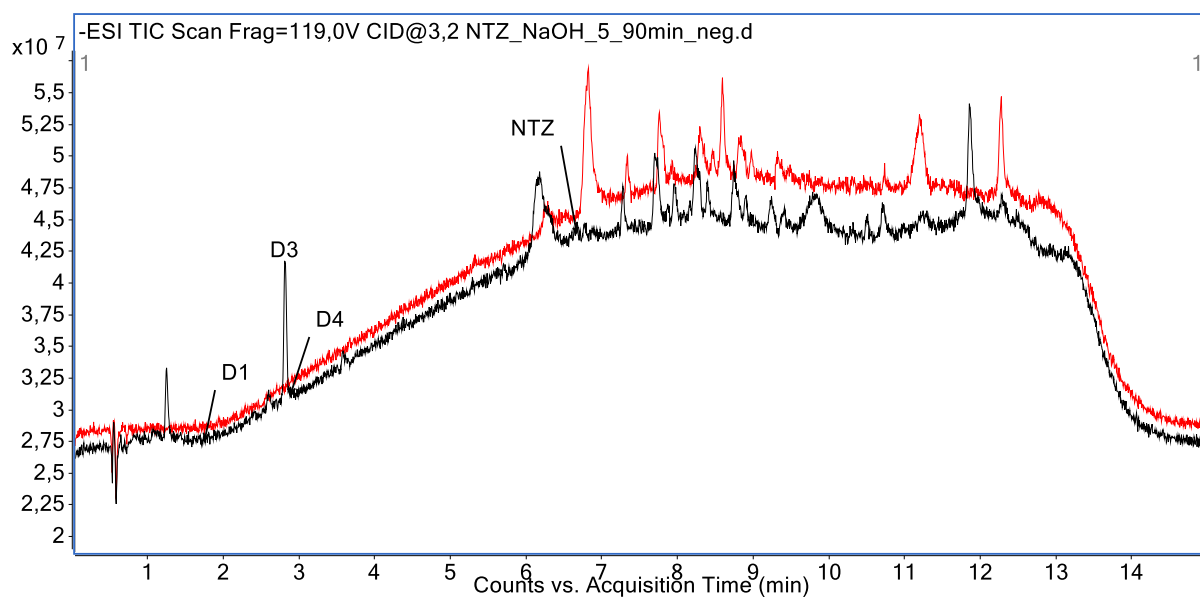


FIGURA 44 – Cromatograma de íons totais (modo negativo) obtido a partir da degradação da NTZ em meio básico durante 90 minutos. (–) Branco. (–) NTZ degradada em meio básico.

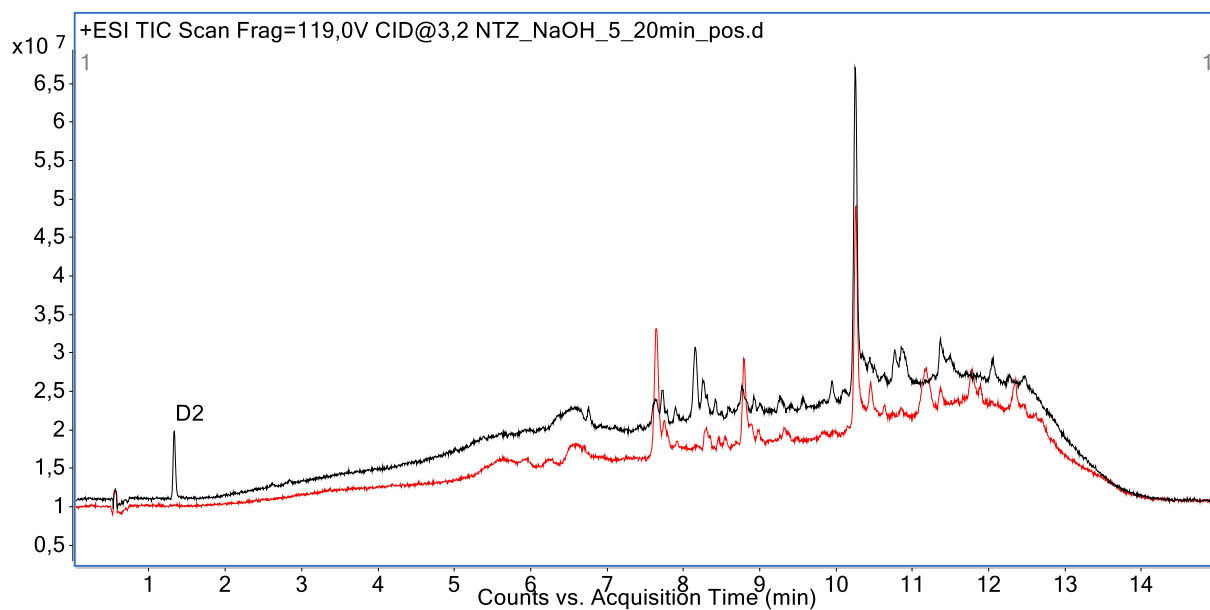


FIGURA 45 – Cromatograma de íons totais (modo positivo) obtido a partir da degradação da NTZ em meio básico durante 20 minutos. (–) Branco. (–) NTZ degradada em meio básico.

1.1.5.1 - D1 (m/z 137, [M-H]⁻)

O produto de degradação D1 foi eluído em 1,7 minutos e apresentou m/z igual a 137 (C₇H₅O₃⁻) [M-H]⁻. A FIGURA 46 mostra o espectro MS² do íon produto D1 o qual apresentou um pico intenso de m/z 93. Este íon fragmento foi gerado devido à perda do grupo ácido do íon precursor [M-H-COOH]⁻. O produto de degradação D1 é o ácido salicílico⁵³ e foi detectado a partir da hidrólise da nitazoxanida após 90 minutos de reação (FIGURA 47).

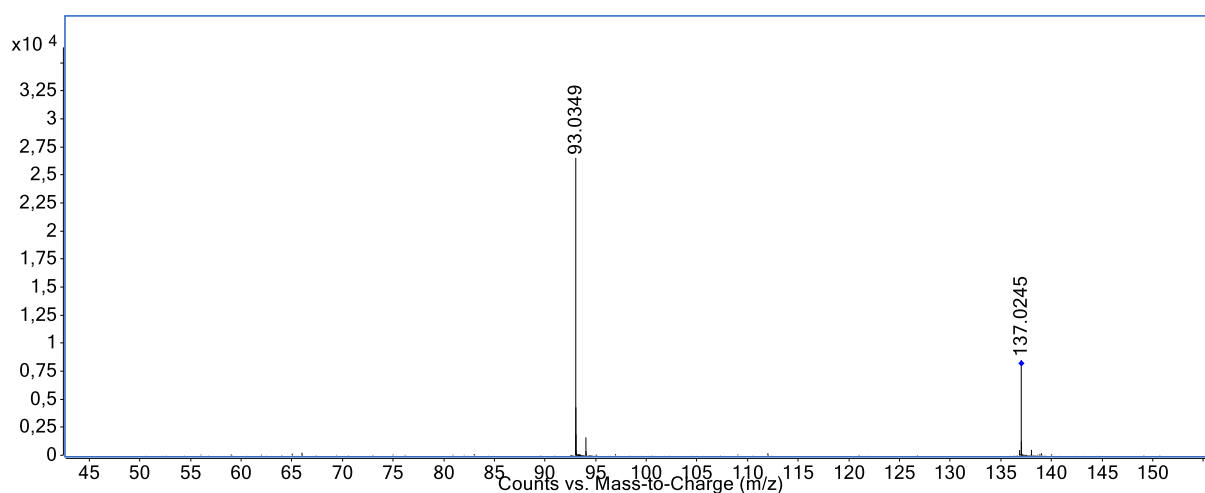


FIGURA 46 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular desprotonado D1 (C₇H₅O₃⁻), m/z 137 [M-H]⁻.

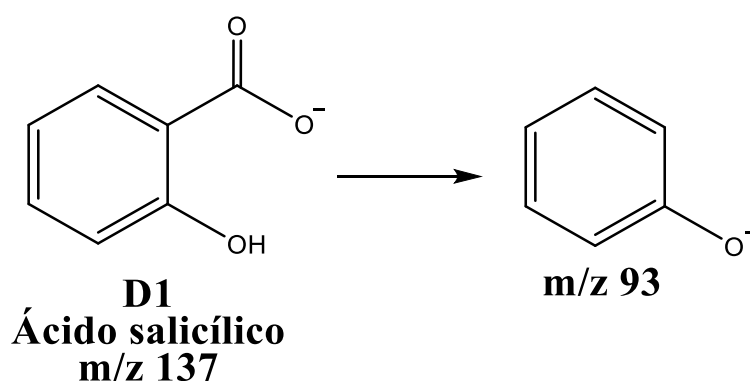


FIGURA 47 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D1, m/z 137 [M-H]⁻.

1.1.5.2 - D2 (m/z 163, [M+H]⁺)

O produto de degradação D2, eluído em 1,35 minutos, foi detectado no modo positivo com maior intensidade que no modo negativo e apresentou m/z igual a 163 (C₈H₇N₂O₂⁺) [M+H]⁺. Este produto de degradação foi gerado nos primeiros 20 minutos de degradação e foi completamente consumido após 90 minutos. A FIGURA 48 mostra o espectro MS² do íon produto D2 o qual apresentou um pico intenso de m/z igual a 121 devido à perda de CH₂N₂ do íon precursor. Além disso, foi observado ion m/z 93 formado pela perda de CO. A rota de fragmentação pode ser visualizada na FIGURA 49. De acordo com o íon fragmento m/z 93, nota-se que a estrutura de D2 contém a anel aromático e o fragmento m/z 121 sugere que a porção éster da nitazoxanida foi mantida. A fórmula molecular predita com erro inferior a 5 ppm, assim como os íons fragmentos gerados, sugere reações intermoleculares e hidrólise para a geração de D2.

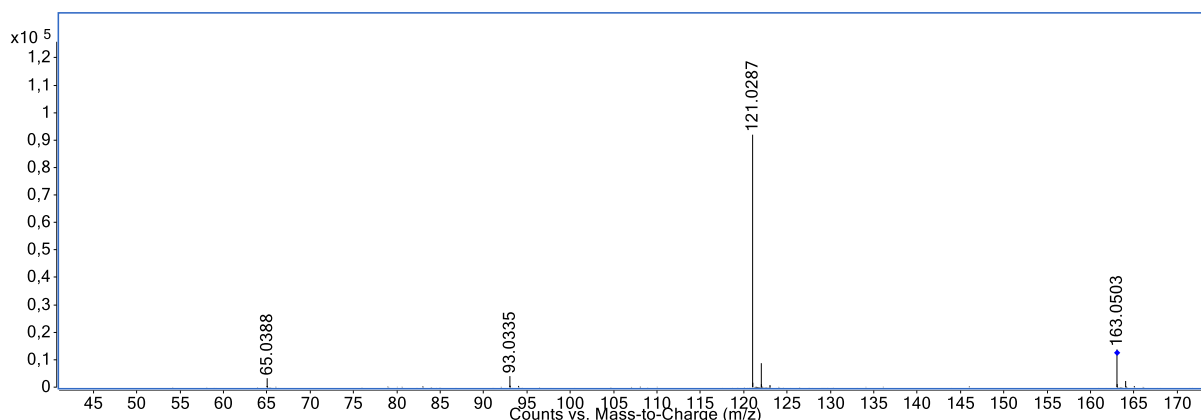


FIGURA 48 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular protonado D2 (C₈H₇N₂O₂⁺), m/z 163 [M+H]⁺.

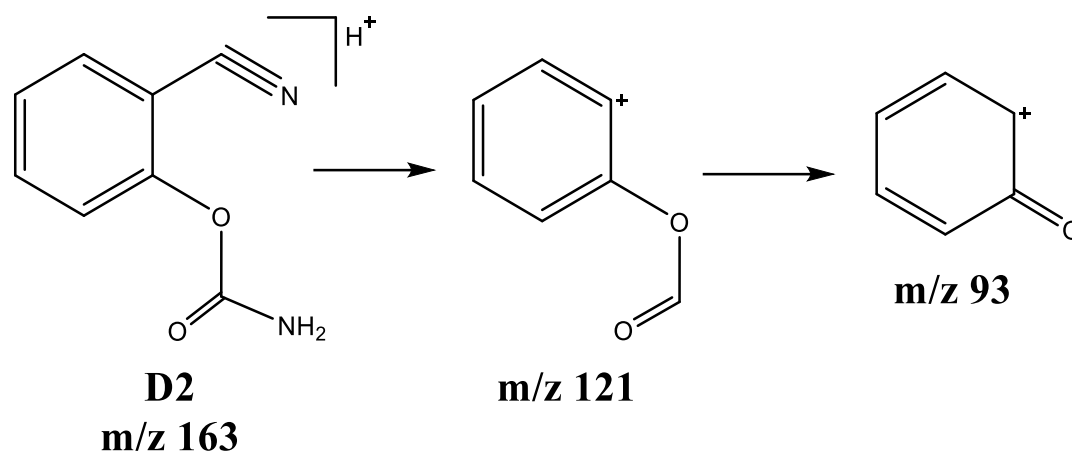


FIGURA 49 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D2, m/z 163 [M+H]⁺.

1.1.5.3 - D3 (m/z 136, [M-H]⁻)

O produto de degradação D3 foi eluído em 2,83 minutos e apresentou m/z igual a 136 (C₇H₆NO₂⁻) [M-H]⁻. A FIGURA 50 mostra o espectro MS² do íon produto D3 o qual apresentou picos em m/z iguais a 118 (perda de H₂O do íon precursor) e 93 (perda do grupo amida do íon fragmento 118). O fragmento m/z 93, assim como em D2, sugere a presença do anel benzênico e o fragmento m/z 118 a ausência do grupo ester na estrutura de D3. A FIGURA 51 mostra a rota de fragmentação para D3.

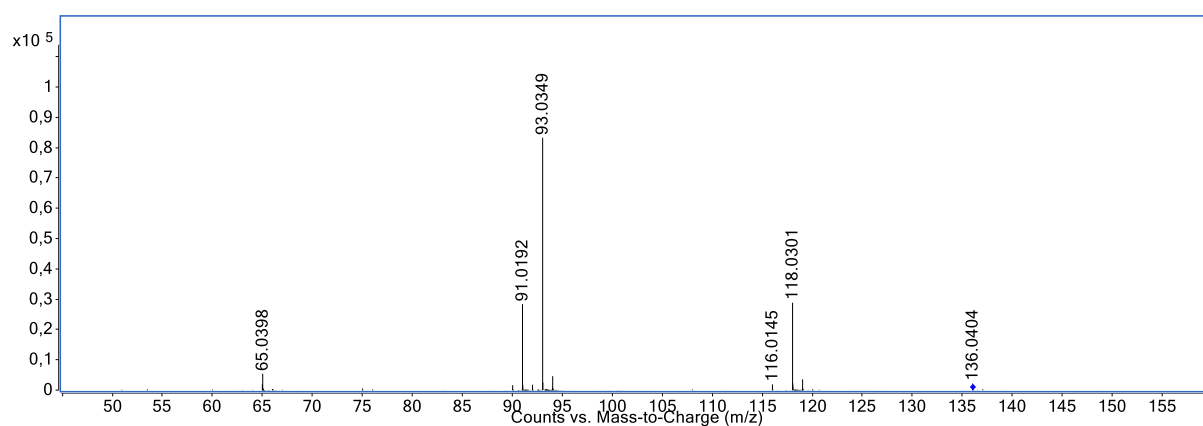


FIGURA 50 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular desprotonado D3 (C₇H₆NO₂⁻), m/z 136 [M-H]⁻.

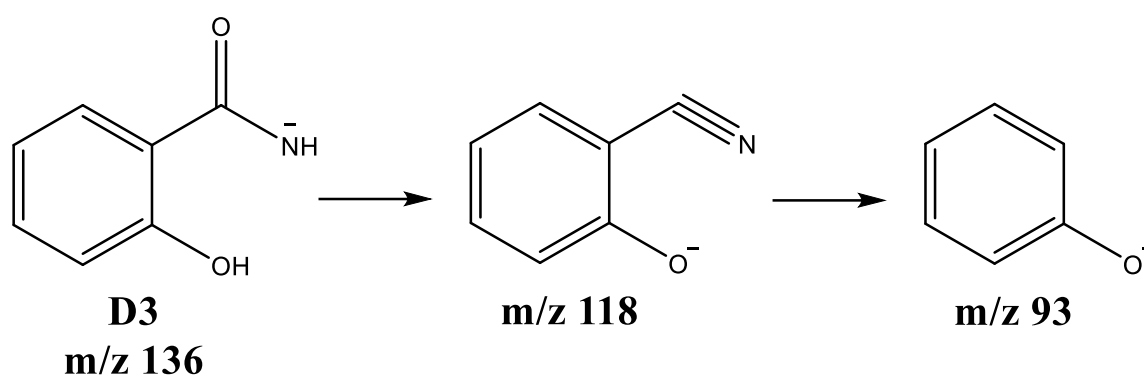


FIGURA 51 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D3 (C₇H₆NO₂⁻), m/z 136 [M-H]⁻.

1.1.5.4 - D4 (m/z 179, [M-H]⁻)

O produto de degradação D4 foi eluído em 2,89 minutos e apresentou m/z igual a 179 (C₈H₇N₂O₃⁻) [M-H]⁻. A FIGURA 52 mostra o espectro MS² do íon produto D4 o qual apresentou picos em m/z iguais a 136 (perda de CONH do íon precursor) e 118 (perda de H₂O do íon fragmento 136). A FIGURA 53 mostra a rota de fragmentação para D4.

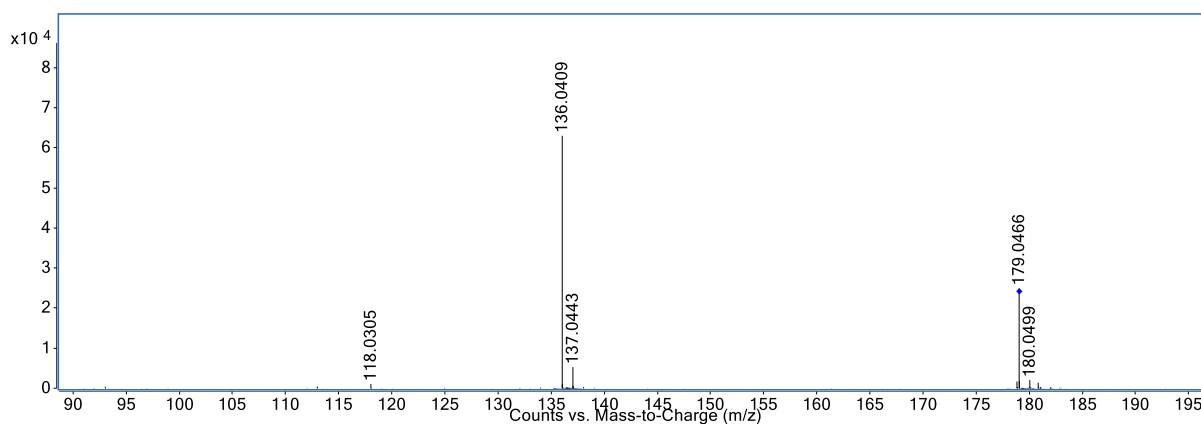


FIGURA 52 – Espectro de massas coletado na análises MS^2 do íon molecular desprotonado D4 ($C_8H_7N_2O_3^-$), m/z 179 $[M-H]^-$.

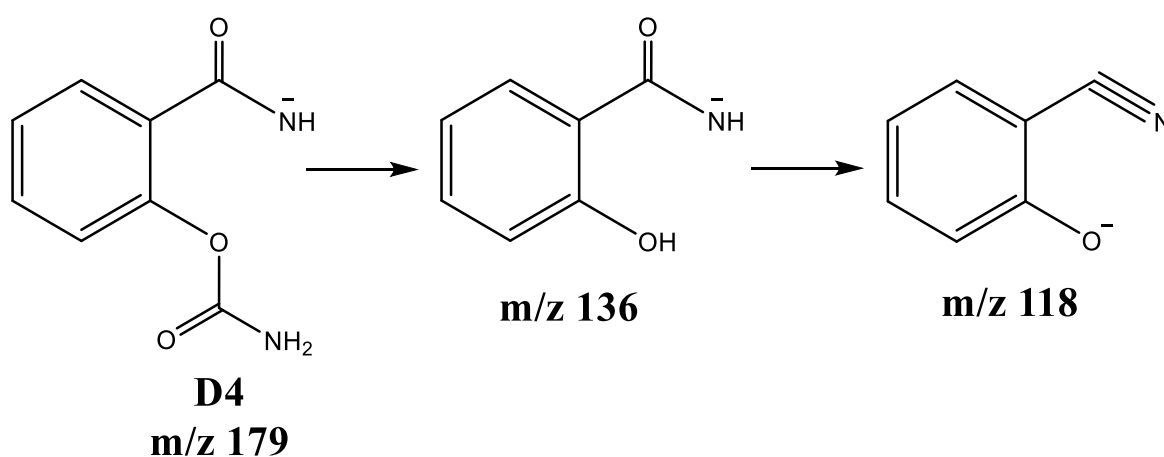


FIGURA 53 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D4, m/z 179 $[M-H]^+$.

1.1.6 - Degradação forçada da nitazoxanida - Experimento 7

A FIGURA 54 mostra o cromatograma de íons totais no modo negativo para a amostra degradada na condição do experimento 7 (pH 2,7, H_2O_2 4% e temperatura de 52 °C) e seu respectivo branco. Foi detectado somente a presença de 1 produto de degradação denominado como D5. Não foram

detectados picos que pudessem estar relacionados com produtos de degradação da NTZ no cromatograma de íons totais no modo negativo.

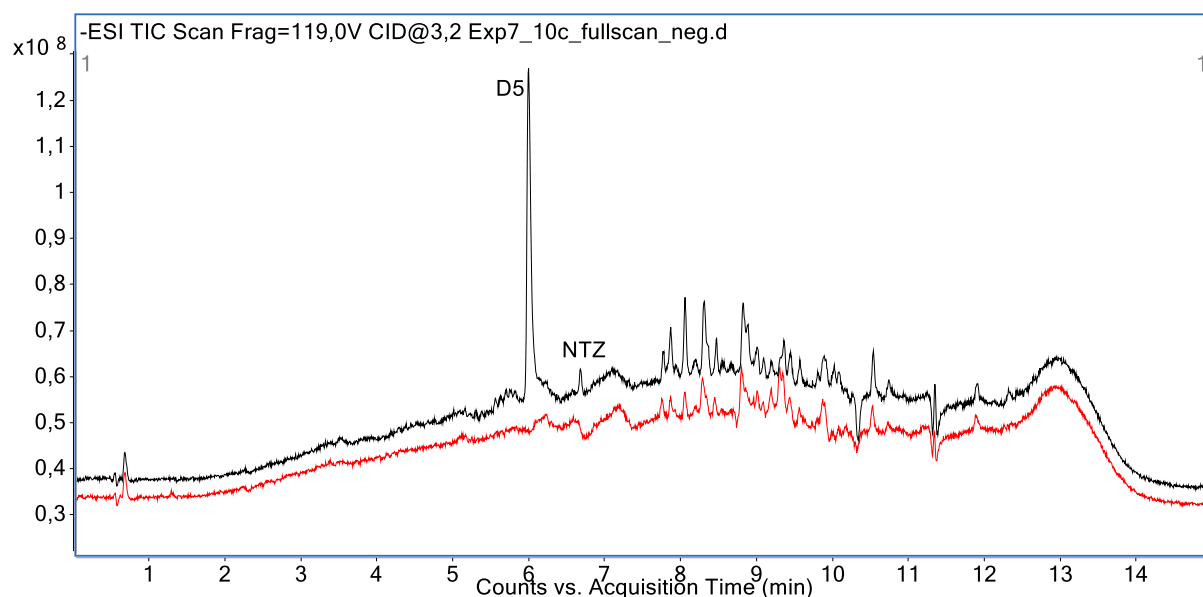


FIGURA 54 – Cromatograma de íons totais (modo negativo) obtido a partir da degradação da nitazoxanida. (–) Branco. (–) Nitazoxanida degradada na condição do experimento 7.

1.1.6.1 - D5 (m/z 264, $[M-H]^-$)

O produto de degradação D5 foi eluído em 5,99 minutos e apresentou m/z igual a 264 ($C_{10}H_6N_3O_4S^-$) $[M-H]^-$. A FIGURA 55 mostra o espectro MS^2 do íon produto D5, o qual está em concordância com a literatura.^{50, 53} Observa-se a formação de fragmentos em m/z iguais a 217 (perda de NHO_2 do íon precursor), 189 (perda do anel benzênico do íon precursor $[M-H-C_6H_2]^-$) e 143 (perda do anel benzênico juntamente com o rompimento do grupo amida do íon precursor $[M-H-C_7H_4O_2]^-$). A proposta de rota de fragmentação para D5 está apresentada na FIGURA 56

A FIGURA 57 mostra os mecanismos de formação propostos para produtos de degradação D1-D5 da NTZ.

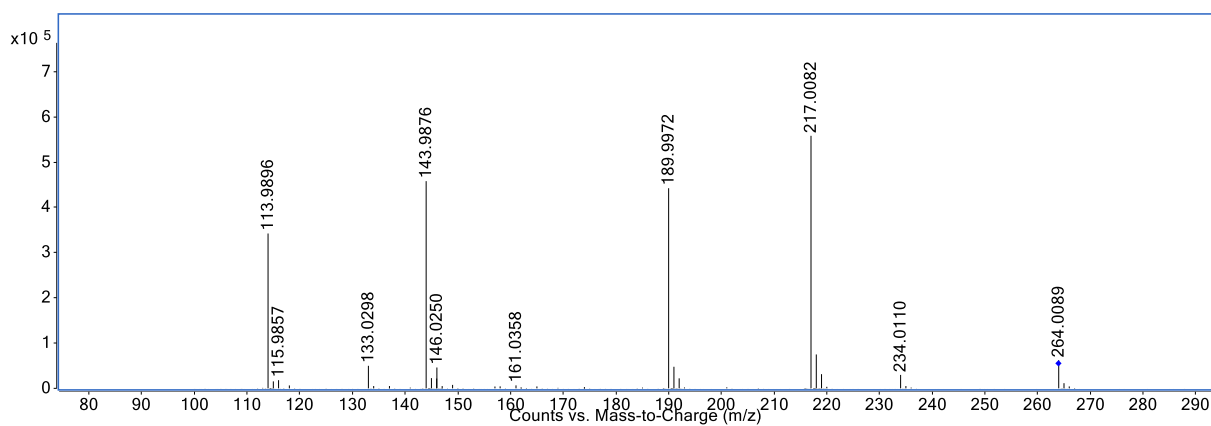


FIGURA 55 – Espectro de massas coletado na análises MS² do íon molecular desprotonado D5 (C₁₀H₆N₃O₄S⁻), m/z 264 [M-H]⁻.

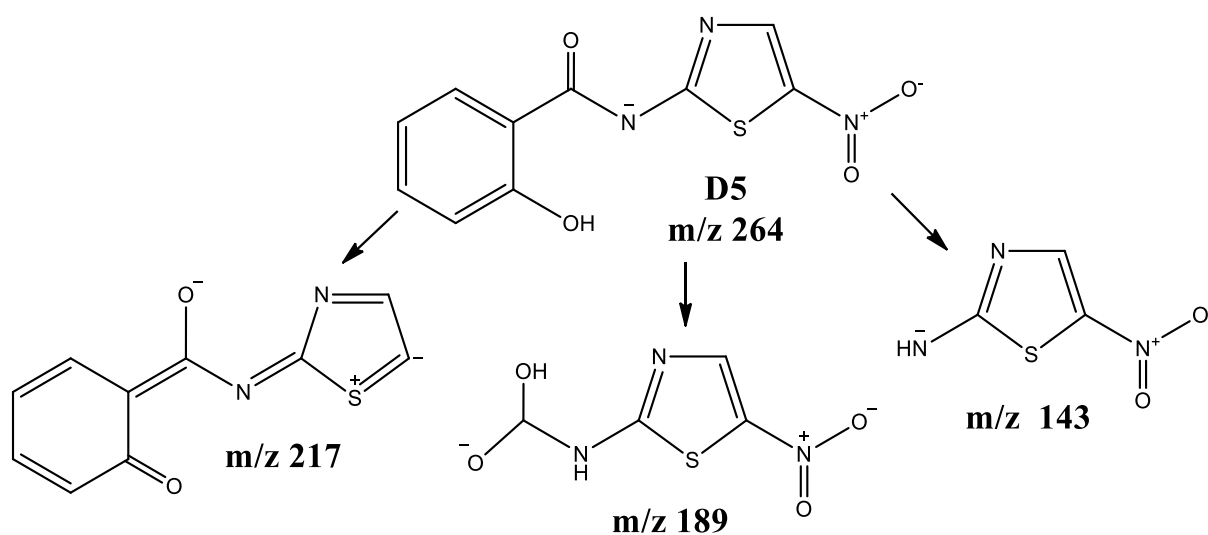


FIGURA 56 – Proposta de uma rota de fragmentação do produto de degradação D5 (C₁₀H₆N₃O₄S⁻), m/z 264 [M-H]⁻.

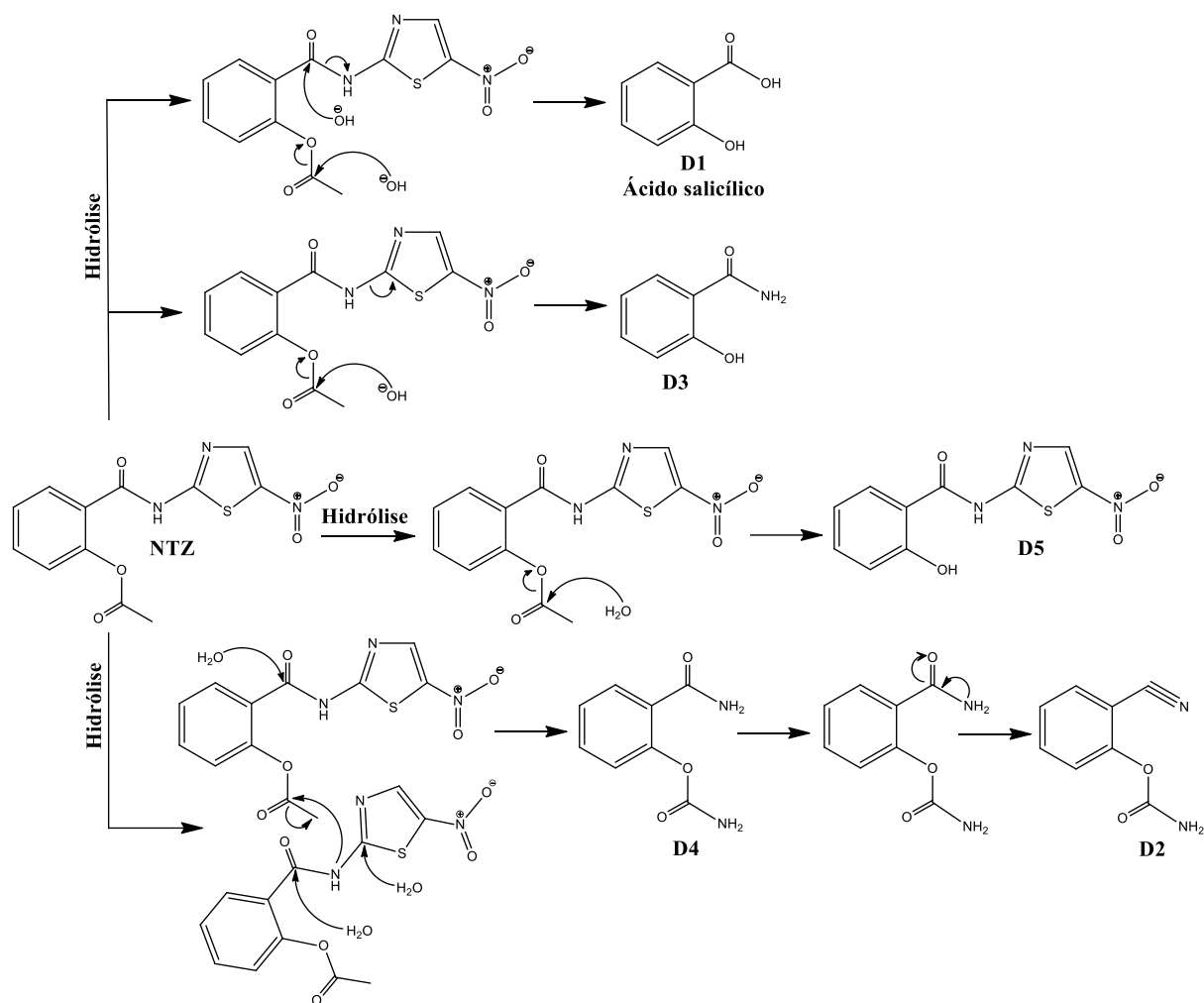


FIGURA 57 – Mecanismos de formação dos produtos de degradação D1-D3 da nitazoxanida.

1.5 - CONCLUSÕES

1.2 - Conclusões

O estudo de degradação forçada multivariada envolvendo o fármaco SOF sem luz UV mostrou que as variáveis temperatura, pH e o sinergismo entre o H₂O₂ e a temperatura favoreceram a degradação do SOF. A variável H₂O₂, assim como as demais interações entre as variáveis, aparentemente não contribuíram para a degradação do SOF. Os experimentos realizados na presença de luz UV mostraram que houve uma maior degradação do SOF em pH 1.

Os experimentos sem luz UV realizados com a NTZ mostraram que as variáveis pH, temperatura, H₂O₂ e o efeito sinérgico do pH com a temperatura contribuíram para a degradação da NTZ. Considerando os experimentos realizados com luz UV, a condição do experimento 23 (pH 10 e temperatura 40 °C) apresentou a maior degradação. As variáveis pH e temperatura não apresentaram influência de forma clara na degradação da NTZ. Porém, foi observado um efeito sinérgico entre as variáveis pH e temperatura na degradação da NTZ.

Os modelos matemáticos gerados para prever a porcentagem de degradação dos fármacos SOF e NTZ apresentaram falta de ajuste. Os dados não se adequaram à superfície quadrática, havendo muita degradação em algumas condições específicas.

O fármaco sofosbuvir gerou 10 produtos de degradação durante os estudos de estresse (P1-P10). Estes foram produzidos por meio de reações de hidrólise, oxidação e termólise, sendo 4 destes (P2, P7, P8 e P10) ainda não reportados na literatura. Já a degradação da nitazoxanida produziu 5 produtos de degradação (D1-D5) formados a partir de reações de hidrólises e intermoleculares. As estruturas químicas dos produtos de degradação foram confirmadas através do erro da massa exata, os quais foram inferiores a 5 ppm, perfil de fragmentação e com dados da literatura. Além disso, foram propostas rotas de fragmentação para os compostos elucidados.

CAPÍTULO 2

**Impacto do polímero na estabilidade térmica de
dispersões sólidas amorfas contendo Ritonavir**

2.1 - INTRODUÇÃO

2.1 - Introdução

Durante o processo de extrusão por extrusão a quente (HME, do inglês, *hot-melt extrusion*) para produzir dispersões sólidas amorfas (ASDs - *amorphous solid dispersions*) há a exposição do fármaco e do polímero a altas temperaturas e a um ambiente de cisalhamento,^{57, 58} podendo ocorrer a degradação do fármaco e/ou polímero devido a exposição acumulativa do tempo e temperatura.^{59, 60} O delineamento do processo de manufatura de ASDs que assegure a estabilidade térmica do fármaco-polímero é essencial para garantir um produto final com teor, pureza e potenciais características físico químicas, assim como a segurança e eficácia do produto final.¹⁹

Fármacos em estado cristalino degradam-se comumente em temperaturas acima da temperatura de fusão. Portanto, o uso de baixas temperaturas de processamento são requeridas para prevenir a degradação.^{61, 62} Entretanto, HME requer geralmente temperaturas de 15-60 °C acima da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero para que o sistema seja suficientemente fundido durante o processo.⁶³ Em termos práticos, a temperatura de processamento no HME é em torno de 130 °C e costumeiramente maior para polímeros como copovidona (PVP/VA) e acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS). Para fármacos com baixa temperatura de fusão, como a do Ritonavir (RTV, T_m 126 °C) que é comercialmente manufaturado em formulação de dispersão sólida amorfa por HME, a seleção de polímeros que permita extrusar com sucesso e, simultaneamente minimizar a termo-degradação, constitui um desafio inerente desta técnica.⁶⁴⁻⁶⁶

A degradação de fármacos pode ser minimizada ou acelerada dependendo do polímero utilizado. Moseson *et al.* observaram em estudos termogravimétricos que a degradação do posaconazol foi reduzida na presença de alguns polímeros quando comparado a sua forma pura, indicando uma maior susceptibilidade do sistema fármaco-polímero em sofrer degradação. O polímero

PVP/VA teve um efeito mais protetivo para itraconazol do que quando formulado com HPMCAS. Além disso, a temperatura *onset* (T_{onset}), temperatura a qual se inicia o processo de degradação, para indometacina foi reduzida pela presença do polímero PVP/VA, indicando a presença de um mecanismo de proteção para o ativo.⁵⁹ De forma semelhante, Vyazovkin *et al.* encontraram que o polivinilpirrolidona (PVP) poderia ter ou não efeito protetivo para indometacina, dependendo da natureza intermolecular e da fração fármaco-polímero.^{67, 68}

Além disso, Ferreira *et al.* observaram que o acetato de celulose forneceu uma proteção para o ibuprofeno e naproxeno contra a degradação térmica e tal fato foi justificado devido a presença de interações de hidrogênio nas formulações.⁶⁹ Esses estudos demonstram que o mecanismo de diminuição da degradação oferecida por um polímero é complexo e merece uma investigação mais aprofundada.

Neste trabalho os mecanismos de proteção contra a degradação térmica foi investigada usando como molécula RTV. RTV em formulações de dispersões sólidas amorfas com diversos polímeros (PVP, PVP/VA, hidroxipropil metilcelulose (HPMC) e HPMCAS) foram preparadas por evaporação de solvente e estudadas isotermicamente por termogravimetria (TGA) e forno convencional em uma faixa de temperatura representativa de um típico processo de HME. A concentração de RTV 20% (*m/m*) nas formulações foi primariamente investigado uma vez que esta é similar a formulação comercial de Norvir®.^{70, 71} Os modelos de degradação dessas amostras foram comparadas com ASD preparadas por HME. Os produtos de degradação do RTV foram elucidados usando espectrometria de massas acoplado com cromatografia líquida (LC-MS/MS) e para determinar as rotas de degradação envolvidas durante a degradação térmica do RTV. Os possíveis mecanismos de proteção contra degradação baseados no tipo de polímero, tais como interação intermolecular, T_g e compatibilidade entre fármaco-polímero, também foram avaliados.

2.1.1 - Dispersão sólida

Na literatura têm sido reportado que aproximadamente 40% dos fármacos comercializados apresentam baixa solubilidade em meio aquoso e, a maioria destes, estão dentro das classes II e IV de acordo com a BCS (*Biopharmaceutics Classification System*). Insumos farmacêuticos ativos (IFA) de baixa solubilidade representam um significativo desafio para os pesquisadores, uma vez que estes IFA's não são absorvidos completamente no trato gastrointestinal, resultando em baixa biodisponibilidade e uma insatisfatória eficácia terapêutica.⁷²⁻⁷⁶

Diversas abordagens são utilizadas para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos, tais como redução do tamanho de partícula,^{77, 78} complexação, formação de sal, e dispersão de fármacos em matrizes carregadoras.^{79, 80} Esta última consiste em um efetivo sistema de liberação de altas doses de fármacos em que o IFA é disperso em um carregador. A cristalinidade do IFA pode ser alterada para o estado amorfo pela interação com a matriz carregadora aumentando assim a solubilidade e dissolução.^{75, 81} O IFA nestes sistemas é disperso geralmente em um excipiente hidrofílico o qual pode ser uma molécula pequena ou um polímero biologicamente inativo. A dispersão sólida não é uma mistura física de sólidos, mas sim uma integração de fármaco e excipiente, e portanto, um sistema de fase única com partículas menores. A dispersão eficiente do IFA em matriz, a diminuição do tamanho de partículas, e o carácter hidrofílico do excipiente resultam em um aumento da dissolução do fármaco.⁸²

Uma importante característica de uma ASD é a possibilidade de transformar um IFA cristalino em amorfo. Sólidos cristalinos possuem moléculas organizadas de forma altamente ordenadas e um retículo cristalino que resultam em uma estrutura de partículas rígidas e fisicamente estável. Para a dissolução de um fármaco em estado cristalino a água deve primeiro romper as ligações do retículo cristano para permitir a solvatação e, somente então, dissolver o IFA. Já

os sólidos amorfos são organizados de forma irregular e possuem tamanho de partículas menores do que o sólido cristalino, resultando em uma maior área superficial. Tal fato somado a falta da energia reticular contribuem para aumentar a dissolução do fármaco.^{73, 82}

Porém, a instabilidade física de uma ASD é a principal desvantagem e pode reduzir a aplicação em produtos comerciais. A grosso modo, a solubilidade do IFA é governada pelo potencial químico e a energia livre de uma ASD é aumentada, tornando o sistema termodinamicamente instável e conduz o sistema à recristalização. Todavia, determinados polímeros podem inibir este processo através da alta viscosidade, T_g ou pelas interações entre o fármaco e polímero.^{83,}

84

2.1.2 - Hot-melt extrusion

HME foi estabelecido em meados de 1930 por indústrias alimentícias e plásticos. No início da década de 1970, HME foi expandido para a indústria farmacêutica, onde tem sido usado como uma tecnologia inovadora de manufatura para o desenvolvimento de sistema de liberação de fármacos.⁸⁵⁻⁸⁷

A tecnologia HME consiste em um processo contínuo em que as matérias-primas são aquecidas até a fusão, ou até apresentarem baixa viscosidade, e são transferidas progressivamente para moldagem por meio da movimentação das roscas sem fim (parafusos) dentro de um cilindro extrusor (barril). Durante o processo o fármaco é disperso em um carregador para formar uma sistema de fase única em que o IFA é amorfizado.^{88, 89}

Os mecanismos de melhoramento da solubilidade envolvem a alteração de propriedades físico-químicas do IFA. Em suma, HME converte a estrutura cristalina do IFA para estado amorfo e previne a recristalização por meio de interações não covalentes entre o IFA e as cadeias poliméricas ou por meio de impedimentos estéricos. Desde que o IFA é dissolvido eficazmente em um

carregador, a menor energia livre de Gibbs e a falta da energia reticular causam uma melhoria na solubilidade do IFA.⁹⁰ Esse fato faz com que a HME seja empregada com sucesso para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos.⁸⁹ Além disso, o HME pode também ser aplicado para alterar o sistema de liberação de formulações de fármacos, produção de comprimidos, preparar co-formulações e filmes transdérmicos.⁹¹⁻⁹³

Para melhor entendimento, o processo de HME pode ser dividido em 4 etapas: (1) adição dos componentes na extrusora através do funil de alimentação, (2) mistura, moagem e diminuição do tamanho das partículas, (3) compressão do material através do modelador, (4) extrusão a partir do modelador e processamento contínuo.⁹⁴ A primeira etapa, a qual o material a ser extrusado é introduzido no alimentador, é essencial garantir que material a ser adicionado no funil de alimentação tenha boas propriedades de fluxo para evitar qualquer variação no tempo de residência e alterar o fluxo dos extrusados durante o processo.⁸⁰ A etapa 2 ocorre no barril extrusor que pode conter uma ou duas roscas sem fim rotacionadas por um motor. O IFA e o carregador são fundidos pela transferência de calor fornecida pelo barril e através do movimento das roscas sem fim o material é friccionado entre os parafusos e as paredes do cilindro.⁹² Portanto, o movimento de rotação é responsável por direcionar e homogeneizar o IFA e o carregador. O sistema configurado com duas roscas sem fim pode assumir co-rotação ou rotação em sentidos opostos.⁹⁵ Comparado a uma única rosca sem fim, o sistema com duas roscas favorece uma melhor distribuição, dispersão do IFA na matriz e é mais adequados para componentes mais sensíveis a degradação termo-mecânica.⁹⁶ O cilindro é dividido em zonas onde cada uma possui uma temperatura para aquecimento ou resfriamento. Nas etapas 3 e 4 o material em fluxo contínuo é comprimido e passa pelo processo de modelagem o qual pode se transformar em pó, comprimido, filme, grânulos ou lâminas.^{95, 97, 98} Além disso, a amostra extrusada pode ser monitorada em tempo real por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR, do inglês near-infrared spectroscopy)⁹⁹ e Raman

para a avaliação da qualidade do produto e entendimento do processo de extrusão^{85, 94}. A FIGURA 58 ilustra uma típica extrusora com as principais variáveis de entrada e saída.

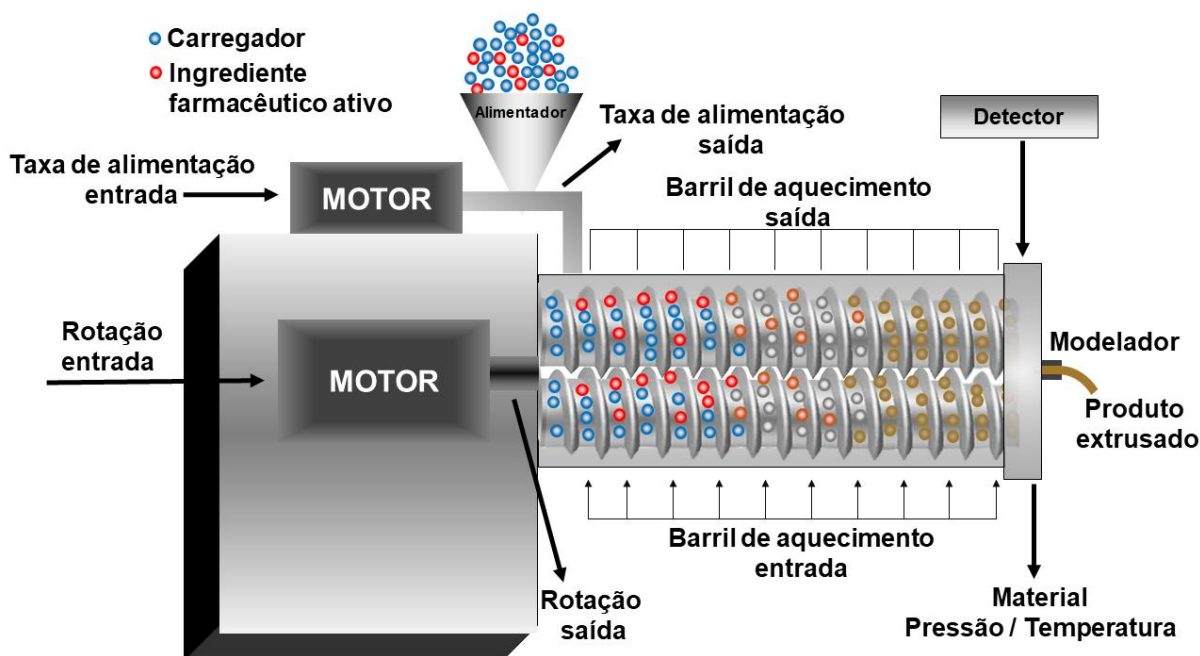


FIGURA 58 – Esquema de uma típica extrusora com as principais variáveis de entrada e saída (adaptado de Patil *et al.*⁸⁵).

Todos os parâmetros de processo de extrusão devem ser avaliados para garantir a qualidade do produto final. Portanto, a mistura dos componentes, assim como a velocidade de rotação das roscas sem fim, tempo de residência e temperatura de extrusão são parâmetros críticos que afetam a dissolução do produto extrusado e devem ser otimizados.

Além de melhorar a biodisponibilidade e solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, o HME permite preparar ASDs em escala industrial, produzir formulações farmacêuticas de forma eficiente e contínua, não requer solvente, possui poucas etapas de processo e a possibilidade de modificar a liberação do fármaco (retardado, modulado, prolongado, etc.). Vale salientar que as ferramentas incluídas na abordagem *Quality by Design* (QbD), tais como

tecnologia analítica de processos (*Process Analytical Technology* - PAT), delineamento de experimentos (*Design of Experiment* - DoE), delineamento espacial (*Design Space* - DS), as quais são fortemente recomendadas pela agência reguladora americana *Food and Drug Administration* (FDA), podem também ser facilmente empregadas durante o processo de HME.^{93, 100, 101}

Os processos de extrusão a quente podem ocorrer nos regimes de solubilização e miscibilidade. Em ambos processos a temperatura de processo deve exceder significativamente o T_g dos excipientes, em geral 15-60 °C acima da temperatura de fusão dos polímeros semi-cristalinos ou T_g dos polímeros amorfos.¹⁰² Durante o regime de solubilização a temperatura de processo é mais baixa que a temperatura de fusão do IFA. Nesta situação as ligações do retículo cristalino devem ser rompidas no *bulk* do IFA antes de ocorrer a difusão deste na matriz polimérica. Caso a razão IFA/polímero supere a solubilidade, somente uma fração das moléculas de IFA são dissolvidas e a quantidade remanescente permanece na forma cristalina dispersa na matriz. O incremento da temperatura de processamento aumenta a solubilidade e diminui a viscosidade do polímero fundido, facilitando a difusibilidade e o processo de mistura do IFA na matriz.⁹⁰ Ademais, o cisalhamento e o processo de mistura permitem o aumento da área superficial por meio da diminuição do tamanho de partícula.⁹⁷

Já o regime de miscibilidade ocorre quando a temperatura de processamento é maior que a temperatura de fusão do IFA. As espécies são fundidas e o líquido é disperso e solubilizado na matriz devido ao aumento da interface. Quando a razão IFA/polímero é maior que a solubilidade observa-se a coexistência de duas fases. Devido as condições de estabilidade, o regime de miscibilidade somente é aplicável para fármacos não termicamente lábeis.⁹⁰ Além dos parâmetros de processo (temperatura, torque, força de cisalhamento, torque, etc.) e do equipamento (configuração da rosca sem fim, taxa de alimentação), a solubilidade do IFA na matriz polimérica, a viscosidade e a estabilidade térmica

são parâmetros que devem ser considerados durante a escolha dos excipientes.⁷²

91

2.1.3 - Aspectos gerais do fármaco e dos polímeros

2.1.3.1 - Ritonavir

Ritonavir, conhecido quimicamente como (1,3-tiazol-5-ilmetil N - [(2S, 3S, 5S) -3- hidroxi-5 - [[(2S) -3-metil-2 - [[metil - [(2-propan-2- il-1,3-tiazol-4-il) metil] carbamoil] amino] butanoil] amino]-1,6-difenil-hexan-2-il] carbamato), pertencente a classe 2 do BCS (baixa solubilidade e alta permeabilidade), é solúvel em metanol, etanol, acetonitrila e isopropanol, mas possui baixa solubilidade em meio aquoso (FIGURA 59).^{103, 104}

Em 1996, o RTV foi aprovado pelo FDA e comercializado como cápsulas e soluções orais com o nome de Norvir[®] pela Abbott Laboratories. Este medicamento é destinado para o tratamento de pessoas acometidas pela infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*).^{105, 106} Entretanto, em 1998 lotes de cápsulas de RTV não atenderam aos requerimentos exigidos nos ensaios de dissolução devido a um novo poliformo (forma II), identificado como de menor perfil de dissolução do que a forma originalmente utilizada. Imediatamente Norvir[®] foi reformulado e passou a ser produzido na forma de comprimidos através do HME.¹⁰⁷

RTV atua como inibidor das proteases HIV-1 e HIV-2, causando diminuição do RNA viral e interferindo no ciclo de replicação do HIV. O fármaco se liga facilmente com proteínas e o metabolismo ocorre principalmente no fígado.^{103, 108} Atualmente RTV é também vendido como Kaletra[®] (RTV formulado com Lopinavir) e Viekirax (RTV formulado com Ombistavir e Paritaprevir) destinados ao tratamento de, respectivamente, HIV/AIDS e hepatite

C. Em todas as formulações comerciais o RTV se apresenta como dispersão sólida amorfa processada por HME usando PVP/VA e monolaurato de sorbitan.^{70, 109} A TABELA 21 mostra, além dos formulações comerciais, trabalhos encontrados na literatura que prepararam RTV-ASD por HME.

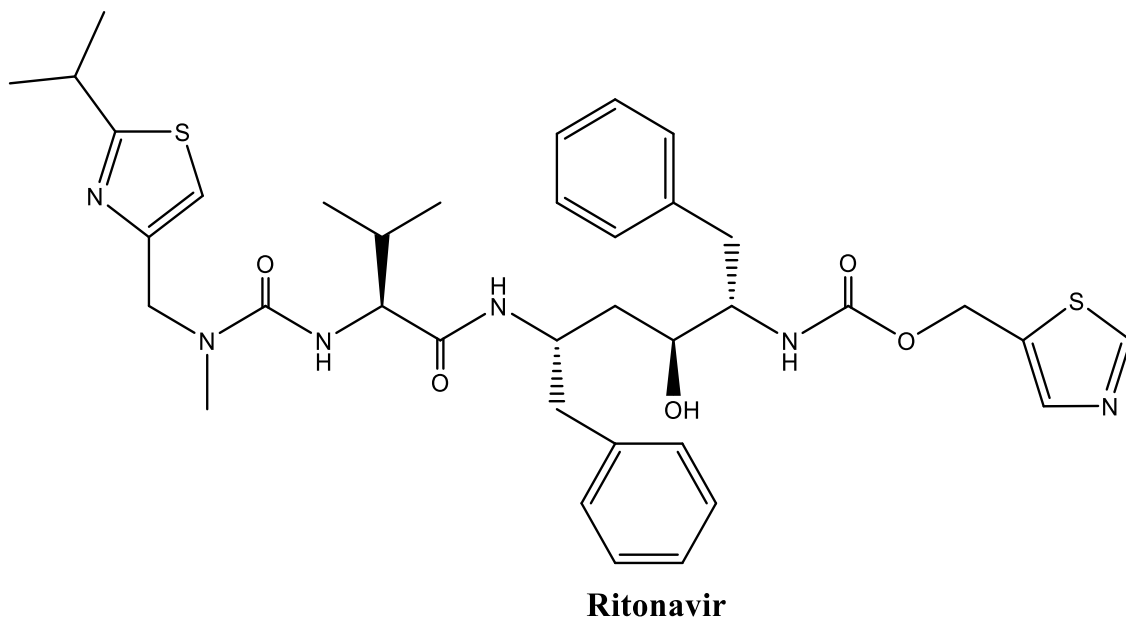


FIGURA 59 – Estrutura química do ritonavir.

TABELA 21 – RTV em dispersão sólidas amorfas preparadas por HME.

Fármaco	Carregador	Ano	Autor (s)
Ritonavir	PVP/VA 64	2020	Denninger <i>et al.</i> ⁷¹
Ritonavir	PVP/VA 64	2019	Yanna <i>et al.</i> ¹¹⁰
Ritonavir	HPMC	2016	Kaushik and O'Donnel ¹¹¹
Ritonavir	HPMC	2016	Kaushik <i>et al.</i> ¹¹²
Ritonavir	Soluplus	2016	Desai <i>et al.</i> ¹¹³
Ritonavir/Ombitasvir/ Paritaprevir	PVP/VA 64	2014	Viekirax ^{®114}
Ritonavir	PVP/VA 64	2010	Kanzer <i>et al.</i> ¹¹⁵
Ritonavir	PVP/VA 64	2010	Norvir ^{®70}
Ritonavir/Ladispavir	PVP/VA 64	2005	Kaletra ^{®116}

2.1.3.2 - Polivinilpirrolidona (PVP)

O polímero polivinilpirrolidona (PVP), conhecido como polividona ou povidona, possui fórmula molecular $(C_6H_9NO)_n$ e é usado comumente como aglutinante em formulações farmacêuticas. O PVP é encontrado como um pó higroscópico branco amarelado que absorve até 40% da água do seu peso.¹¹⁷ A FIGURA 60 mostra a estrutura molecular do PVP.

Devido ao fato da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, o PVP interage com vários solventes, como água, metanol, etanol, clorofórmio, cloreto de metileno, dicloetano, nitroparafinas e aminas.^{118, 119} A classificação do PVP é indicado pela menção do nome comercial seguido pelo valor de K – valor de Fikentscher, derivado da viscosidade de uma solução¹²⁰. A relação entre o valor de K e a massa molecular do PVP pode ser visto na TABELA 22.

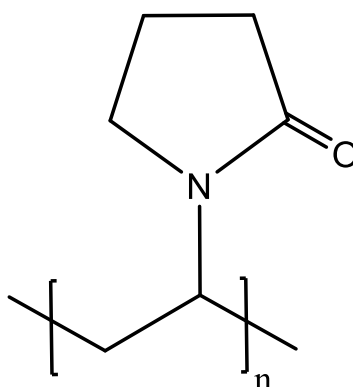


FIGURA 60 – Estrutura química do polímero polivinilpirrolidona (PVP).

TABELA 22 – Relação entre a massa molecular e o valor K para o polímero PVP.¹²¹

K	Massa molecular / g·mol⁻¹
12	$3,1 \times 10^3 - 5,7 \times 10^3$
17	$7,9 \times 10^3 - 10,8 \times 10^3$
25	$2,3 \times 10^4 - 5,1 \times 10^4$
30	$3,5 \times 10^4 - 5,1 \times 10^4$
90	$9,0 \times 10^5 - 1,3 \times 10^6$

2.1.3.3 - Polivinilpirrolidona/acetato de vinila – Copovidona (PVP/VA 64)

Copovidona (PVP/VA 64) é um copolímero linear aleatório do N-vinil-2-pirrolidona e acetato de vinila na razão 6:4.¹²² A FIGURA 61 mostra a estrutura molecular do PVP/VA, dado pela fórmula molecular $(C_6H_9NO)_m \cdot (C_4H_6O_2)_n$.¹²³ A adição da porção acetato de vinila faz com que o PVP/VA tenha uma menor hidrofiliçidade e higroscopicidade menor que o PVP. Além disso, acetato de vinila também tem efeito positivo na plasticidade do polímero e faz com que T_g seja menor que o PVP. PVP/VA é solúvel em água e solventes orgânicos (etanol, metanol, isopropano, cloreto de metileno, glicerol e propilenoglicol) e é geralmente usado como aglutinador úmido/seco e para melhorar a biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade em meio aquoso.¹²⁴⁻¹²⁶

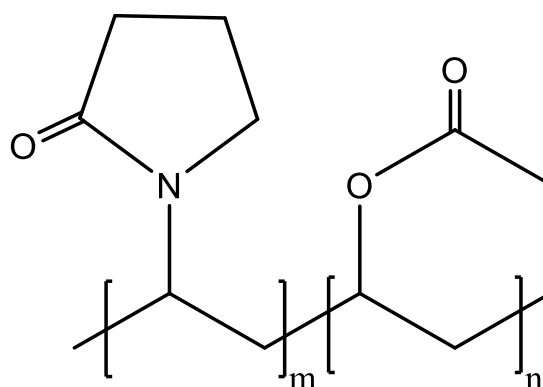


FIGURA 61 – Estrutura química do polímero copovidona (PVP/VA 64).

2.1.3.4 - Hidroxipropil metilcelulose (HPMC)

O polímero hidroxipropil metilcelulose (HPMC), conhecido como hipromelose, é produzido pela reação alcalina da celulose tratada com clorometano para introduzir grupos metoxi e com óxido de propileno para adicionar éter de propileno glicol (FIGURA 62).¹²⁷⁻¹²⁹ HPMC está disponível em graus contendo 16,5-30% de grupos metoxi e 4,0-32% de grupos hidroxipropoxi, o que influencia as propriedades físico-químicas.^{130, 131}

HPMC possui aparência levemente amarelada em pó ou grânulos é praticamente insolúvel em acetona, etanol desidratado e clorofórmio, mas solúvel em acetonitrila e metanol.¹³² Devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade, o HPMC tem sido usado na indústria farmacêutica como aglutinador, estabilizador, formador de filme e como matriz para controlar o sistema de liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.^{127, 129, 133}

O HPMC possui uma grande faixa de T_g , o qual pode variar de 160 a 210 °C, e degrada significativamente em temperaturas acima de 200 a 250 °C, dependendo do grau de substituição.^{134, 135} A maioria dos polímeros derivados de celulose não são adequados para o processo de extrusão a quente devido à alta viscosidade, podendo gerar altos valores de torque.¹³⁶

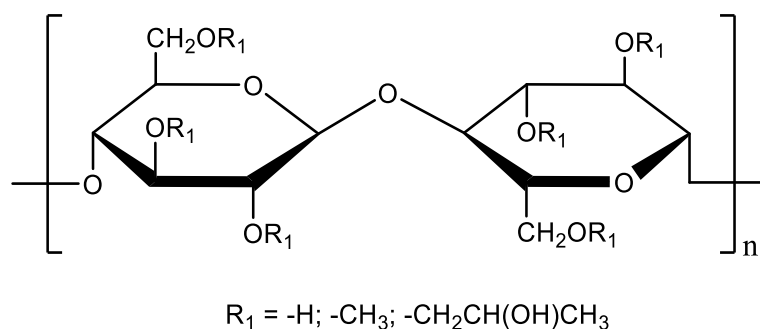


FIGURA 62 – Estrutura química do polímero hidroxipropil metilcelulose (HPMC).

2.1.3.5 - Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose

Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS) é preparado a partir do HPMC pela esterificação com ácido acético anidro, ácido succínico anidro e catalizado com acetato de sódio. Essa reação produz predominantemente os substituintes metil (CH_3), acetil ($COCH_3$), succinoil (COC_2H_4COOH), hidroxipropil ($CH_2CH(OH)CH_3$) e H.¹³⁷ A FIGURA 63 mostra a estrutura molecular do HPMCAS.

A massa molecular do HPMCAS pode variar entre aproximadamente 13000 a 18000 $g \cdot mol^{-1}$ e geralmente é classificado considerando o tamanho de partícula, fino (F) ou granular (G), e o conteúdo do substituinte acetil, L (5 – 9% de acetil), M (7 – 11%) e H (10 – 14%).¹³⁸⁻¹⁴⁰

O HPMCAS é solúvel em acetona, metanol, e diclorometano:etanol (1:1) e etanol:água (8:2) tornando possível a manufatura de ASDs por evaporação de solvente. Além das propriedades como, HPMCAS também é um promissor polímero para ser utilizado no processo de extrusão a quente, uma vez que possui viscosidade e T_g adequados para extrusão e por ser um polímero aniônico capaz de interagir com fármacos de baixa solubilidade. Entretanto, na manufatura de ASDs por HME utilizando HPMCAS deve se considerar a estabilidade do

polímero sob cisalhamento e alta temperatura, pois tais condições podem gerar ácido acético e ácido succínico.^{138, 141}

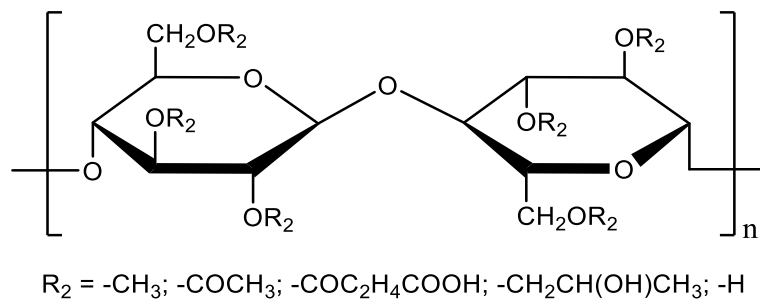


FIGURA 63 – Estrutura química do polímero Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCAS).

2.2 - OBJETIVOS

2.2 - Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a estabilidade térmica do fármaco RTV em dispersões sólidas amorfas com diferentes polímeros, preparadas pelos métodos de evaporação de solvente e por *hot-melt extrusion*. Além disso, os objetivos secundários deste trabalho são:

- Preparar dispersões sólidas amorfas de RTV com polímeros de diferentes propriedades físico-químicas por evaporação de solvente e *hot-melt extrusion*.
- Avaliar a estabilidade das amostras sob condições de estresse térmico.
- Selecionar os polímeros a serem utilizados no processo de extrusão.
- Avaliar as amostras extrusadas em diferentes temperaturas de processamento.
- Caracterizar as amostras por TGA, calorimetria exploratória diferencial, difração de raio-X e infravermelho
- Identificar e elucidar os produtos de degradação do RTV gerados durante a degradação térmica.
- Propor mecanismos de reação para os processos de degradação.
- Compreender a estabilidade térmica do RTV-ASDs com diferentes tipos de polímeros.

2.3 - PARTE EXPERIMENTAL

2.3 - Parte experimental

2.3.1 - Reagentes

Foram utilizados os polímeros polivinilpirrolidona (Kollidon® K-12, K-17, K-30 e K-90) e copolímero polivinilpirrolidona/acetato de vinila (Kollidon® VA 37, VA 64 e VA 73) obtidos da BASF (Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany). Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose (Aqoat MF e LF) foram adquiridos da Shin-Etsu (Totowa, NJ) e hidroxipropilmetilcelulose (Affinisol HME 100 LV) da Dow Chemical Company (Midland, Michigan, EUA). O Ritonavir foi obtido da ChemShuttle (Hayward, CA). Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico ou HPLC.

2.3.2 - Métodos e equipamentos

2.3.2.1 - Dispersões sólidas amorfas por rota-evaporação

As dispersões sólidas amorfas rota-evaporadas foram preparadas em uma composição binária de RTV e polímero. A mistura foi solubilizada em 50 mL de metanol em um balão de fundo redondo. Estas amostras foram submetidas a 45 °C e pressão reduzida em um rota-evaporador. Após a evaporação do solvente, as amostras foram deixadas *overnight* à vácuo e moídas utilizando moagem criogênica durante 30 segundos. As amostras foram preparadas na concentração de 20% (*m/m*) de RTV e 10-50% (*m/m*) para as amostras compostas com os polímeros PVP/VA 64 e PVP K-30.

As dispersões sólidas amorfas rota-evaporadas foram preparadas usando um rota-evaporador Hei-VAP Core da Heidolph Instruments (Schwabach,

Alemanha) e moinho criogênico SPEX Freezer/Mill 6775 (Metuchen, NJ, Estados Unidos).

2.3.2.2 - Dispersões sólidas amorfas por extrusão

As amostras foram extrusadas a 20% (*m/m*) de RTV com os polímeros PVP/VA 64, HPMCAS MF e HPMC. Realizou-se a homogeneização das misturas binárias com o auxílio de um almofariz e pistilo para posteriormente serem adicionadas manualmente no alimentador da extrusora. As amostras foram extrusadas com um tempo de residência de 5 minutos, o qual foi considerado o a partir do início da alimentação da extrusora até a abertura da válvula de recirculação para começar a extrusão, roscas sem fim a 50 rpm e temperaturas de 130 a 160 °C, variando a cada 10 °C. As amostras extrusadas em formato de bastão foram moídas durante 30 segundos com moinho criogênico. As amostras foram extrusadas em uma extrusora Xplore Pharma Melt Extruder (Geleen, Holanda) com um barril de aquecimento de 2 mL e uma sistema de rosca dupla configurado em co-rotação.

2.3.2.3 - Análises de infravermelho

Espectros de infravermelho foram coletados de filmes de amostras amorfas preparadas por *spin coating*. Preparou-se soluções de RTV, polímeros e RTV-polímero em metanol e foram adicionados alíquotas de 50 µL em discos de ZnSe (Harrick Scientific Products). Os discos foram imediatamente rotacionados a 1000 rpm durante 3 s, seguido de 4500 rpm por 30 s em um KW-4^a spin coater (Chematech Technology Inc., Northridge, Califórnia, Estados Unidos).

Espectros de infravermelho foram obtidos com um espectrômetro Bruker Optics Vertex 70 series (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) equipado com uma fonte infravermelho global, divisor óptico de brometo de

potássico (KBr) e um detector DTGS. Os dados foram adquiridos através dos software OPUS versão 7.2 build: 7, 2, 139, 1294. Os espectros foram coletados na faixa espectral de 4500 a 600 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução e varredura de 64 scans. Detector e amostrador estiveram continuamente em contato fluxo de ar seco para evitar interferência de umidade.

2.3.2.4 - Caracterização das amostras em estado sólido por DSC e difração de raio-X

As análises de calorimetria exploratório diferencial (DSC, do inglês differential scanning calorimetry) foram realizadas pesando aproximadamente 3-5 mg da amostra em cadinhos de alumínio herméticos e submetendo-os no método de aquecimento/resfriamento/aquecimento. O ponto de fusão e T_g e o T_g do RTV foram confirmados pelo aquecimento do RTV em estado cristalino até 150 °C, seguido pelo resfriamento para 0 °C e novamente aquecido até 150 °C com uma rampa de temperatura de 10 °C·min⁻¹. Para determinar o T_g dos polímeros e das dispersões sólidas, as amostras foram aquecidas de 0 °C a 200 °C a 5 °C·min⁻¹ com modulação de $\pm 0,796$ °C a cada 60 segundos. As amostras foram então resfriadas para 0 °C e aquecidas até 200 °C com uma rampa de temperatura a 10 °C·min⁻¹. Realizou-se as análises em triplicata e o ponto de inflexão do T_g foi obtido a partir da segunda rampa de aquecimento. Os experimentos foram realizados em um calorímetro Q2000 *differential scanning calorimeter* (DSC) equipado com um acessório de resfriamento (TA Instruments, New Castle, Delaware, Estados Unidos) purgado com nitrogênio a 50 mL·min⁻¹

Difratogramas de raio-X foram coletados usando um difratômetro Rigaku SmartLab (Rigaku Americas, The Woodlands, Texas, Estados Unidos) no modo Bragg-Brentano com uma fonte de radiação Cu- α e ultra-detector d/tex. RTV, polímeros e as dispersões sólidas foram colocadas em um amostrador de

vidro e escaneado de 5 a 30° 2 θ , usando um passo de 0,02° e uma taxa de varredura de 2° min⁻¹.

2.3.2.5 - Estudos de estabilidade térmica

Um analisador termogravimétrico Discovery TGA 5500 (TA Instruments, New Castle, Delaware, Estados Unidos) foi usado para expor as amostras a condições isotérmica e de gradiente de temperatura. Em um primeiro momento, o RTV puro foi exposto a um gradiente de temperatura com taxa de aquecimento de 1 a 10 °C/min para inicialmente avaliar a susceptibilidade do IFA em degradar termicamente. A T_{onset} foi calculada por dois métodos: (1) porcentagem de perda de massa e (2) interseção da tangente da linha de base. O método da interseção da tangente foi realizado com o software TRIOS. Para a porcentagem de perda de massa, os dados foram normalizados para 100% na temperatura de 120 °C e a temperatura a qual alcançou a perda de massa igual a 0,1, 0,5 e 1,0% foi considerado T_{onset} . Perdas de massa abaixo de 120 °C foram atribuídas à umidade e perdas de solvente.

Em outro conjunto de experimentos a perda de massa do RTV, polímeros e das dispersões sólidas foram avaliadas isotermicamente a diferentes temperaturas entre 120 a 180 °C por 60 minutos. Em seguida, os experimentos termogravimétricos foram realizados expondo RTV puro e as amostras preparadas por evaporação de solvente em condições isotérmicas a diferentes temperaturas entre 120 a 180 °C durante 5 minutos. Utilizou-se purga de nitrogênio e os experimentos termogravimétricos foram realizados em duplicatas, utilizando uma massa de aproximadamente 7 mg. A rampa de temperatura foi de 50 °C·min⁻¹ para atingir a isoterma. Após a degradação térmica, as amostras foram analisadas por HPLC e LC-MS/MS.

RTV, RTV-PVP/VA 64 e RTV-HPMC, preparados a 20% (*m/m*) por evaporação de solvente, foram aquecidos isotermicamente usando uma estufa

convencional Precision STM 80 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e TGA. Aproximadamente 7 mg das amostras foram degradadas a 160 °C por 30 minutos, sendo o teor de RTV determinado por HPLC em diferentes tempos de degradação. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.3.2.6 - Quantificação de RTV por HPLC

O teor de RTV foi determinado por análises cromatográficas usando um HPLC HP Agilent Series 1100 (Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) com uma coluna Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm). O método foi conduzido em modo isocrático com ácido fórmico 0,1% (v/v):acetonitrila (35:65), fluxo de fase móvel 1,0 mL·min⁻¹, volume da injeção de 10 µL e comprimento de onda de 240 nm.

A curva de calibração foi construída na faixa 5 a 350 µg·mL⁻¹ a partir de uma solução estoque de RTV 1,0 mg·mL⁻¹. As amostras foram solubilizadas em metanol com auxílio de um ultrassom de forma que a concentração de RTV analisada estivesse dentro da região de linearidade da curva de calibração. O teor de RTV foi determinado comparando os sinais analíticos da solução da amostra degradada e solução de referência (amostra não degradada).

2.3.2.7 - Análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Os produtos de degradação do RTV foram analisados por um espectrômetro de massa Agilent Quadrupole Time-of-Flight (Q-ToF) 6550 acoplado a um cromatógrafo Agilent 1260 Infinity Series (Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos). Análises cromatográficas foram realizadas em modo isocrático com ácido fórmico 0,1% (v/v): acetonitrila (25:75) com uma coluna ZORBAX

Extend-C18 (2,1 × 50 mm, 1,8 µm), fluxo da fase móvel de 0,3 µL min⁻¹, volume de injeção de 2 µL e comprimento de onda 240 nm. Para as análises espectrométricas foi utilizada uma fonte de íons Dual AJS ESI e ionização eletrospray (ESI) com este último selecionado em modo positivo de ionização. O detector de massas operou com as seguintes condições: gás nebulizador 35 psig, fluxo de gás 14 L·min⁻¹, temperatura do gás 225°C, fluxo do sheath gas 11 L·min⁻¹, temperatura do sheath gas 375°C, potencial do capilar 3,5 kV, nozzle voltage 1 kV, fragmentor 175 V, skimmer 65 V e radiofrequência do octapolo 750 V. Os dados foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1700.

2.3.2.8 - Análise estatística

Análise de variância fator único (ANOVA) foi utilizada para comparar a diferença de degradação entre as amostras. Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando o software Microsoft Excel 2019.

2.4 - RESULTADOS E DISCUSÃO

2.4 - Resultados e discussão

2.4.1 - Propriedades físico-químicas

RTV foi formulado com uma série de polímeros com a finalidade de verificar o impacto do polímero na degradação do ativo. RTV apresentou ponto de fusão igual a 126 °C e os polímeros puros tiveram valores de T_g entre 64 e 178 °C. As dispersões sólidas com composição de 20% (*m/m*) preparadas pelo método de rota-evaporação apresentaram T_g de 54-135 °C. O único valor de T_g encontrado para as dispersões sólidas amorfas indica que estas consistem em um sistema de fase única.

As FIGURA 64 e 65 mostram os resultados obtidos após as análises por DSC e as TABELA 23 e 24 os valores de T_g das amostras puras e ASDs obtidos a partir do ponto de inflexão. A formação dos ASDs preparadas por evaporação de solvente e HME foram confirmadas por DRX , como mostram as FIGURA 66 e 67.

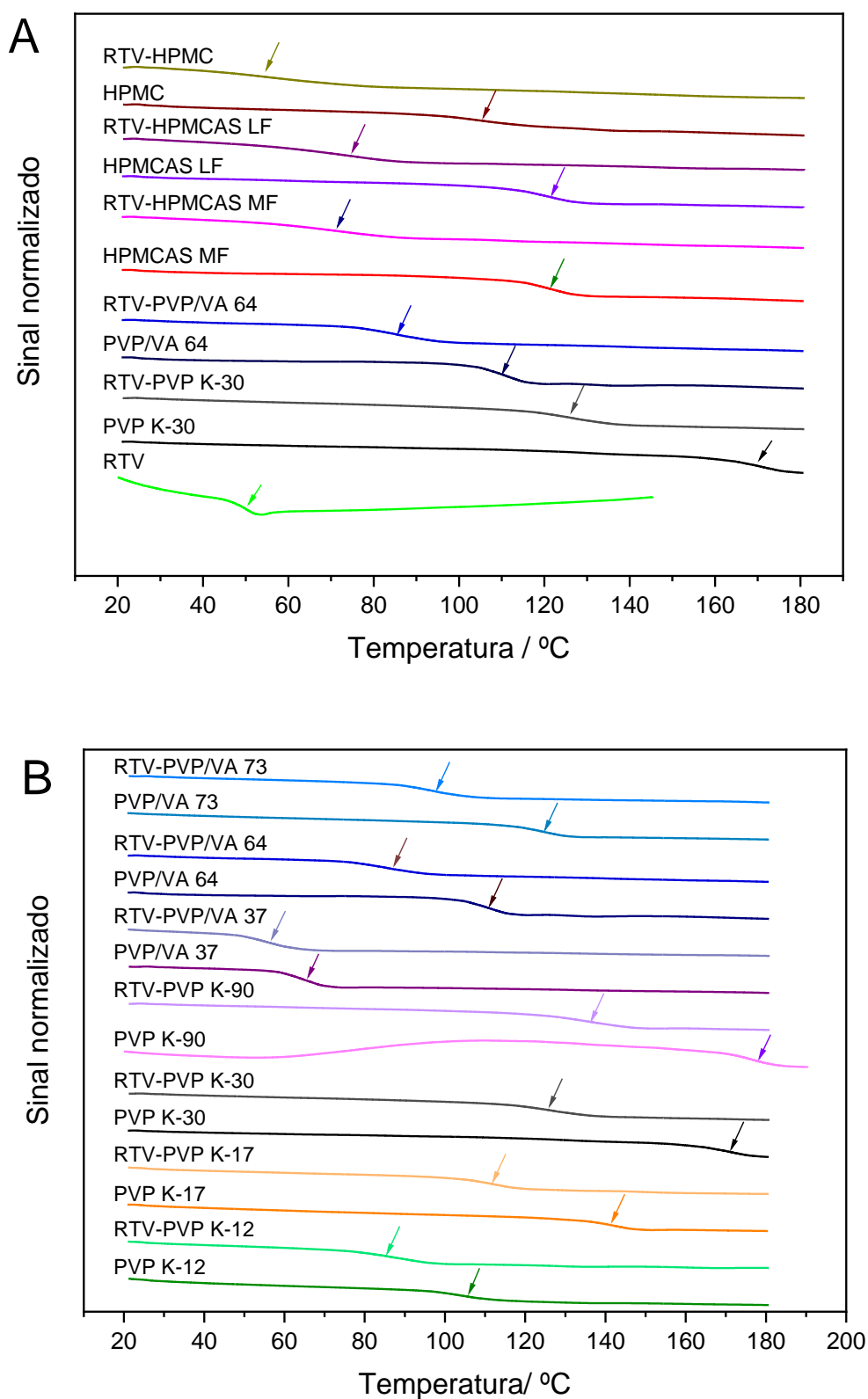


FIGURA 64 – Curvas calorimétricas com indicação da T_g . A) RTV, polímeros e RTV-polímero. B) RTV-PVP e RTV-PVP/VA com polímeros de diferentes graus.

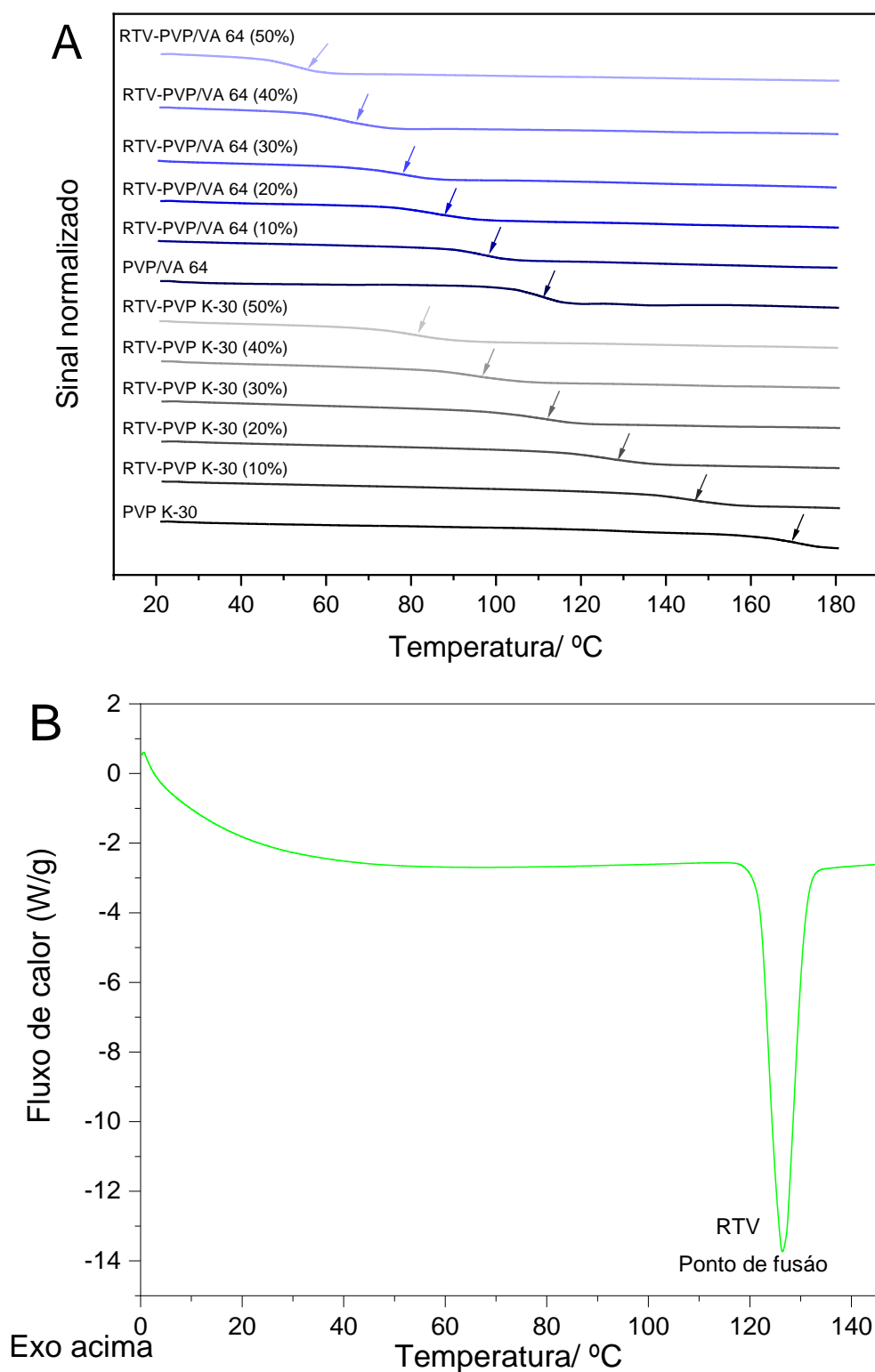


FIGURA 65 – Curvas calorimétricas com indicação da T_g . A) RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 em diferentes concentrações de RTV. B) Curva calorimétrica indicando o ponto de fusão do RTV.

TABELA 23 – Temperatura de transição vítrea (T_g) dos componentes e do RTV-ASD.

Componente	T_g (°C)	RTV-ASD (20% m/m)	
			T_g (°C)
PVP K-12	105,5 ± 0,3	RTV-PVP K-12	86,1 ± 0,1
PVP K-17	141,5 ± 0,2	RTV-PVP K-17	111,9 ± 0,2
PVP K-30	170,3 ± 0,7	RTV-PVP K-30	126,5 ± 0,4
PVP K-90	177,9 ± 0,5	RTV-PVP K-90	135,4 ± 2,0
PVP/VA 37	64,3 ± 0,2	RTV-PVP/VA 37	54,6 ± 0,5
PVP/VA 64	110,5 ± 0,1	RTV-PVP/VA 64	85,8 ± 0,1
PVP/VA 73	124,5 ± 0,2	RTV-PVP/VA 73	97,9 ± 0,1
HPMCAS LF	121,4 ± 0,2	RTV-HPMCAS LF	75,0 ± 2,0
HPMCAS MF	121,1 ± 0,1	RTV-HPMCAS MF	72,6 ± 2,2
HPMC	106,4 ± 0,2	RTV-HPMC	54,3 ± 2,3
RTV	50,0 ± 0,04		

Média ± Desvio padrão, n = 3.

TABELA 24 – Temperatura de transição vítrea (T_g) das dispersões sólidas RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 em diferentes concentrações

Concentração (%)	T_g (°C)	
	RTV-PVP K-30	RTV-PVP/VA 64
0	170,3 ± 0,7	110,5 ± 0,1
10	146,9 ± 0,3	97,1 ± 0,7
20	126,5 ± 0,4	85,8 ± 0,1
30	112,1 ± 0,1	75,7 ± 2,4
40	95,6 ± 0,3	64,9 ± 0,3
50	80,4 ± 1,0	53,2 ± 2,0

Média ± Desvio padrão, n = 3.

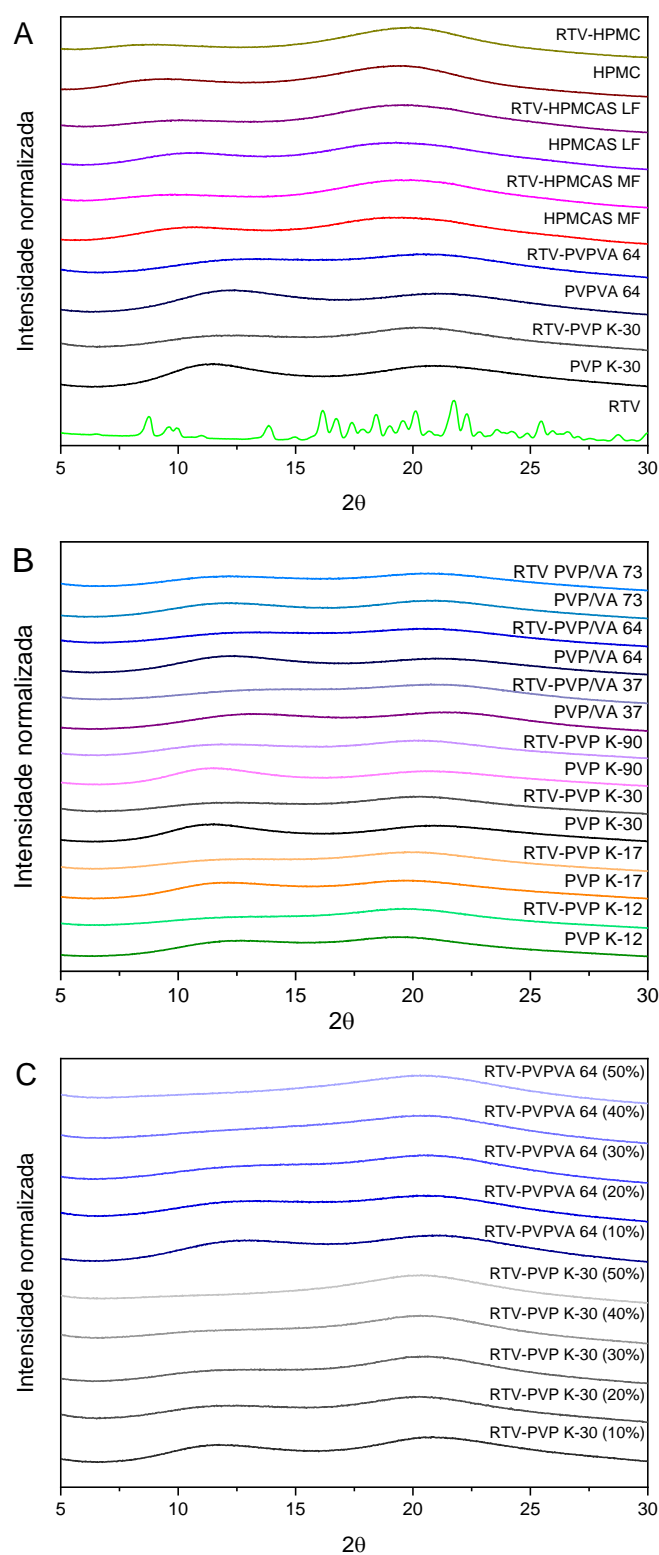


FIGURA 66 – Difrátogramas de RTV-ADS preparados por evaporação de solvente. A) RTV, polímeros, e RTV-ASDs preparados com 20% *m/m*. B) Polímeros e RTV-ASD preparados diferentes graus de PVP e PVPVA (20% *m/m*). C) RTV-ASD preparados com PVP K-30 e PVP/VA 64 em diferentes concentrações.

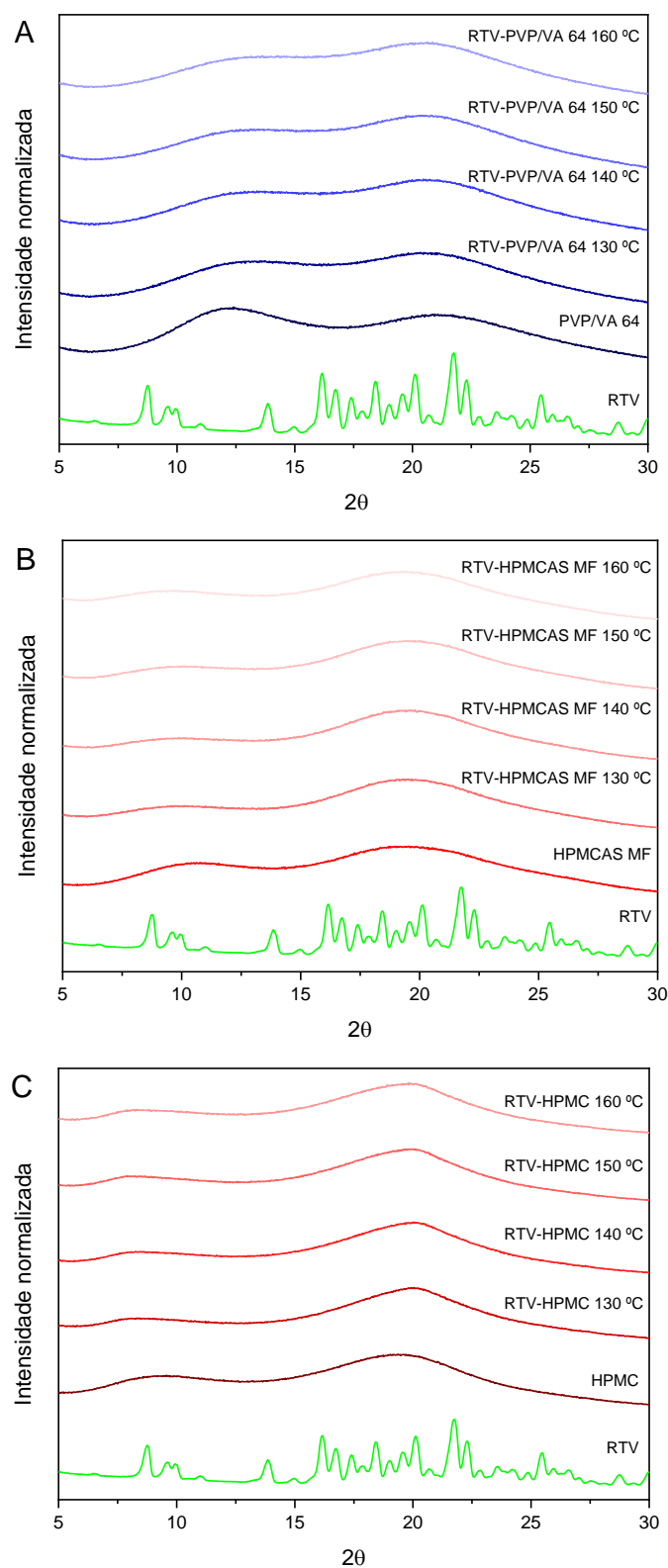


FIGURA 67 – Difratoformas do RTV-ASD preparados por HME com 20% m/m e temperaturas de 130 a 160 °C. A) RTV, PVP/VA 64 e RTV-PVP/VA 64. B) RTV, HPMCAS MF e RTV-HPMCAS MF. C) RTV, HPMC e RTV-HPMC.

2.4.2 - Degradação térmica considerando a perda de massa

O RTV é susceptível à degradação térmica em temperatura superior à temperatura de fusão ($T_m = 126\text{ °C}$), como mostra a FIGURA 68. Dependendo da taxa de aquecimento e o método de detecção do T_{onset} , este pode variar entre 135-214 °C. A utilização de experimentos não isotérmicos podem gerar conclusões genéricas e errôneas sobre a estabilidade térmica e adequabilidade do RTV no processo de HME, sendo importante a avaliação de isoterma. A ampla faixa de valores T_{onset} demonstra que a extensão da degradação esperada para RTV em altas temperaturas será impactada pela exposição acumulativa das variáveis tempo e temperatura. Portanto, experimentos isotérmicos foram utilizados para avaliar as formulações dos ASDs na degradação do RTV.

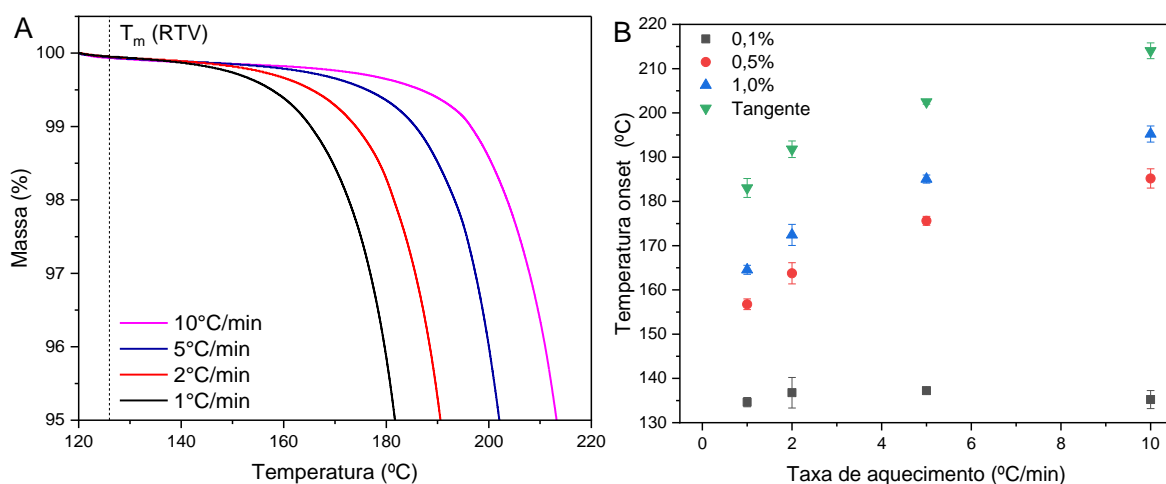


FIGURA 68 – A) Curvas não isotérmicas para perdas de massas do RTV puro. B) Temperaturas *onset* (T_{onset}) determinadas pelo aquecimento não isotérmico (1-10 °C/min) através de métodos de porcentagem de perda massa e interseção da tangente.

A perda de massa do RTV, dos polímeros e das dispersões sólidas durante 60 minutos, foi monitorado através dos experimentos termogravimétricos (FIGURA 69, 70 e 71). RTV e RTV-HPMC apresentaram maior perda de massa, respectivamente 36% e 9%, durante aquecimento a 180 °C, sendo que nos 5 primeiros minutos estas amostras exibiram perdas de massa iguais a 8,0% e 6,4%. Já as demais amostras apresentaram perdas de massa menor que 1,5%. Os resultados indicam que a perda de massa não é uma medida adequada para estimar a degradação do RTV em sua forma pura ou em dispersões sólidas amorfas. Portanto, cuidados devem ser tomados com as conclusões destes experimentos, desde que são comumente utilizados como ensaios prévios para a seleção de polímeros para os experimentos de HME. Os baixos níveis de perda de massa indicam que esta não deve influenciar significativamente na quantificação do teor de RTV na maioria das amostras. Portanto, as amostras foram expostas durante 5 minutos no estudos de estabilidade térmica.

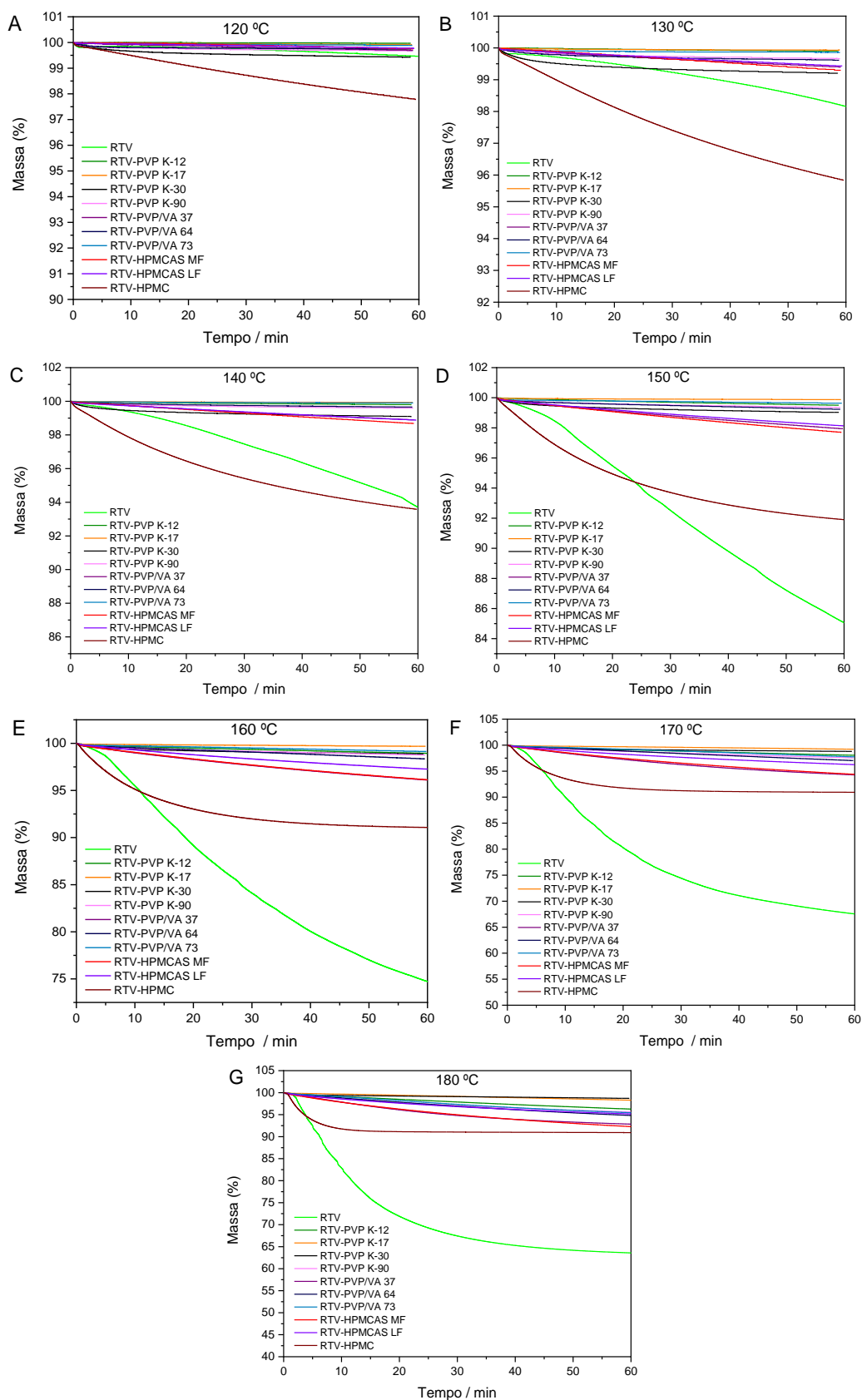


FIGURA 69 – Curvas isotérmicas de perda de massa do RTV e RTV-ASDs (20% *m/m*) em 120 (A), 130 (B), 140 (C), 150 (D), 160 (E), 170 (F) e 180 °C (G).

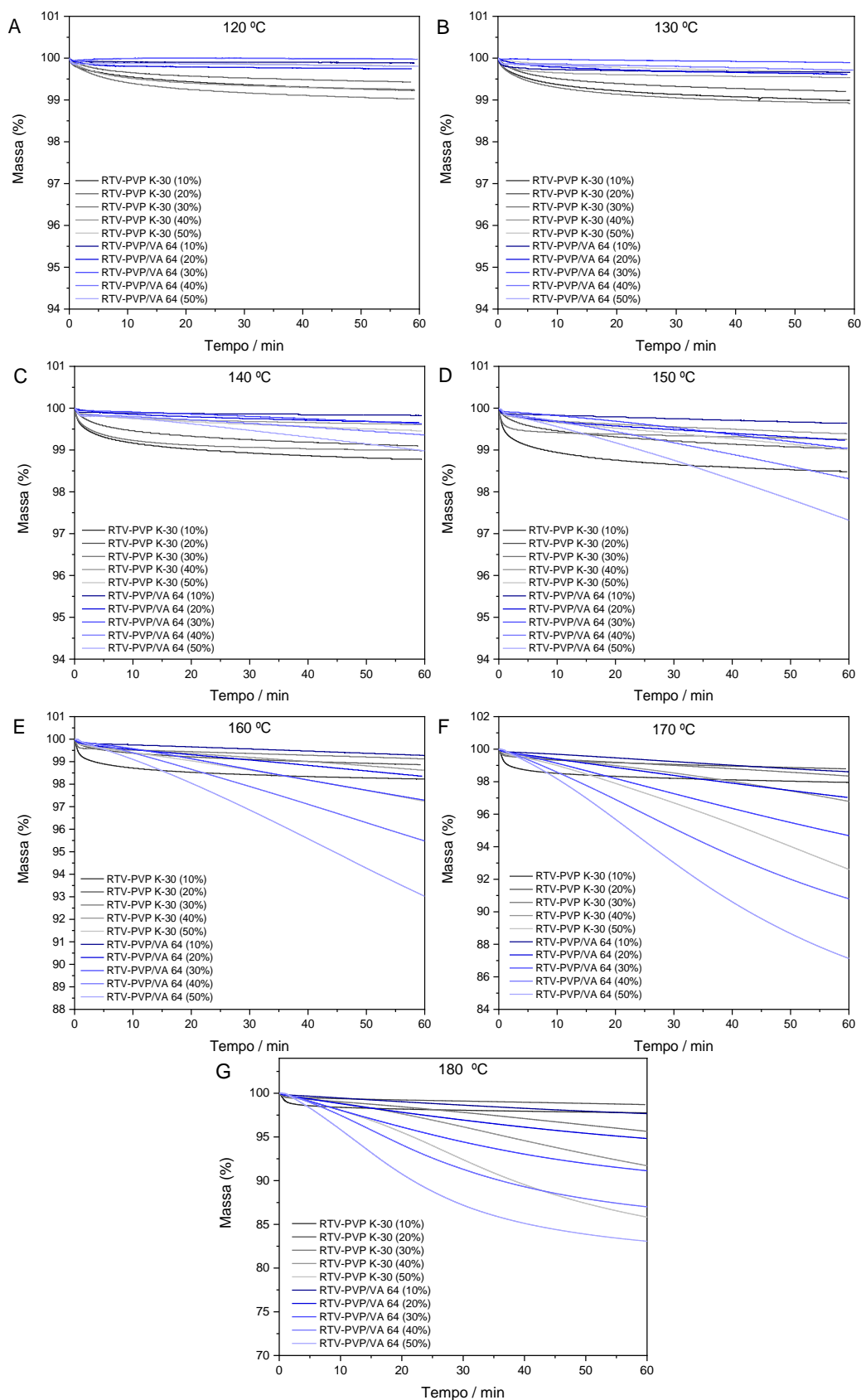


FIGURA 70 – Curvas isotérmicas de perda de massa do RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 (10-50% *m/m*) em 120 (A), 130 (B), 140 (C), 150 (D), 160 (E), 170 (F) e 180 °C (G).

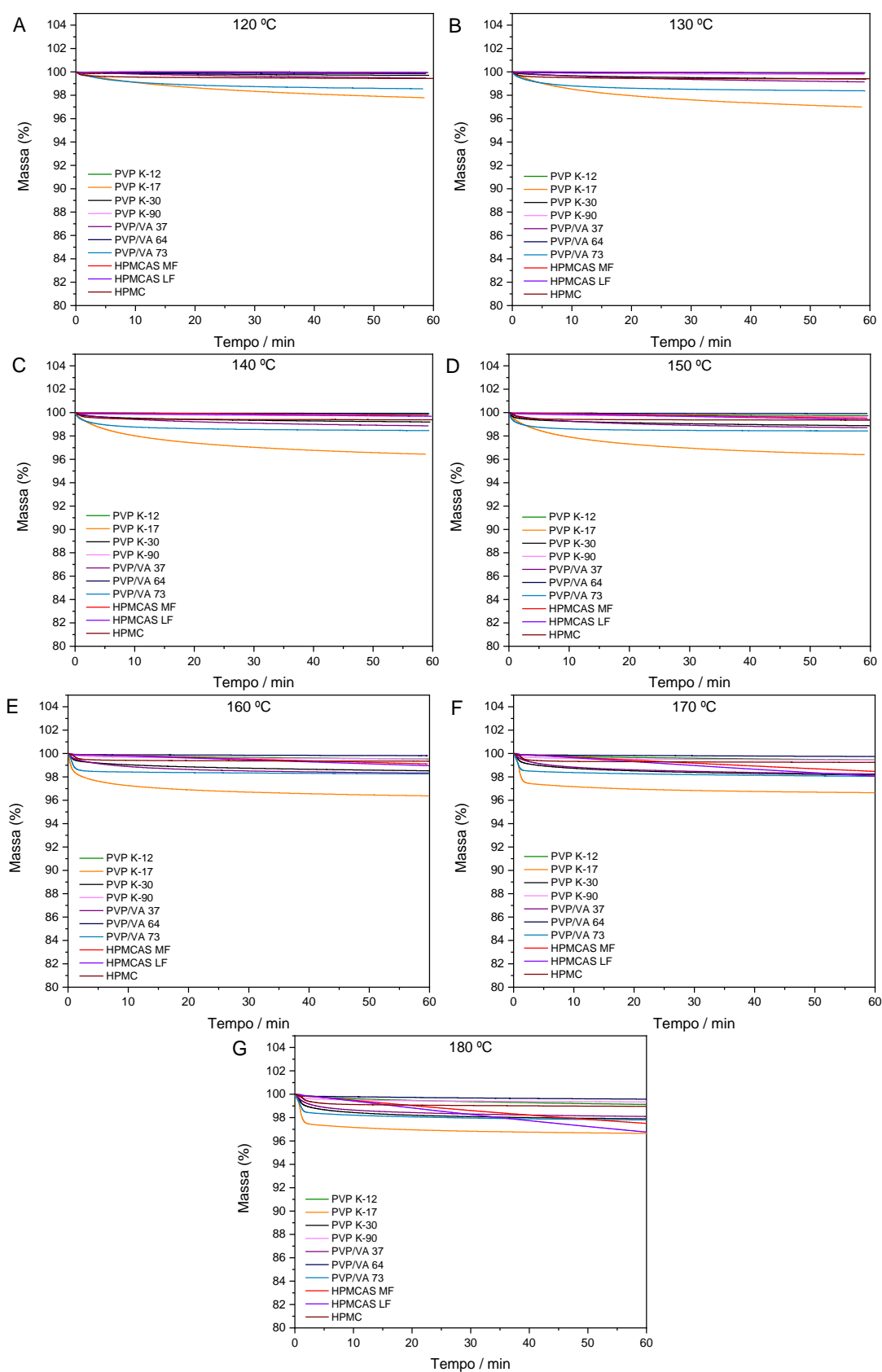


FIGURA 71 – Curvas isotérmicas de perda de massa polímeros puros em 120 (A), 130 (B), 140 (C), 150 (D), 160 (E), 170 (F) e 180 °C (G).

2.4.3 - Curva de calibração para o RTV

Realizou-se o estudo de linearidade para quantificação do RTV por HPLC e foi obtido uma região de linearidade entre 5 e 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Obteve-se uma equação linear igual a $\text{Área} = -1,31 + 6,83[\text{RTV}]$ e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999, onde Área e [RTV] correspondem respectivamente ao sinal analítico e a concentração do RTV. O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram respectivamente iguais a $7,2 \times 10^{-3}$ e $2,4 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A FIGURA 72 mostra os cromatogramas sobrepostos e a curva analítica obtida com as áreas dos picos do padrão RTV. LD e LQ foram determinados usando $3 \times (\text{desvio padrão do branco} / \text{coeficiente angular})$ e $10 \times (\text{desvio padrão do branco} / \text{coeficiente angular})$, sendo $n=10$.

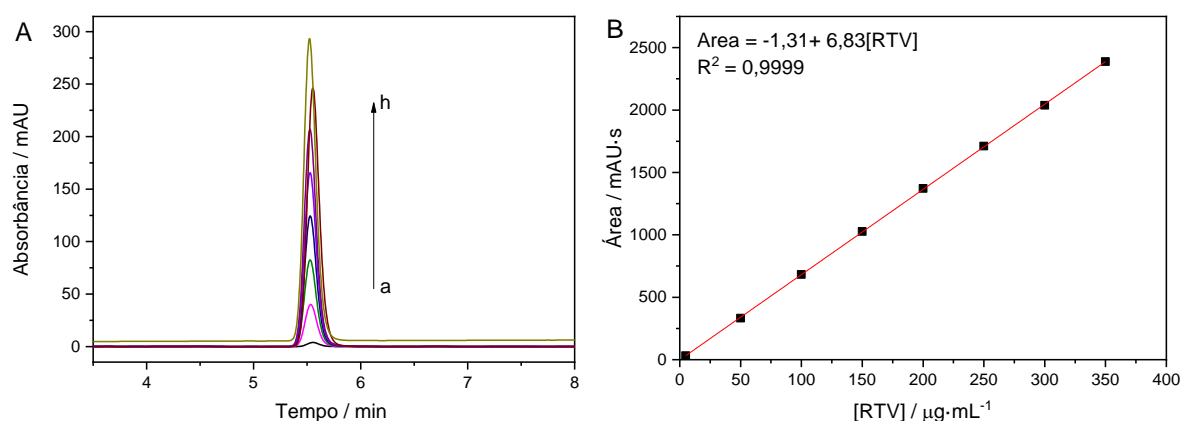


FIGURA 72 – Cromatogramas sobrepostos referentes as diferentes concentrações de RTV: a) 5, b) 50, c) 100, d) 150, e) 200, f) 250, g) 300 e h) 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Curva de calibração para o RTV.

2.4.4 - Degradação térmica considerando o tipo de polímero.

O aquecimento isotérmico das dispersões sólidas amorfas foi realizado por TGA nas temperaturas de 120 a 180 °C durante 5 minutos e o teor de RTV determinado por HPLC (FIGURA 73). As amostras utilizadas neste estudo foram preparadas pelo método de evaporação de solvente, uma vez que estas não passaram por processos térmicos que pudessem ocorrer degradação e também por conter interações que pudessem prevenir ou favorecer a estabilidade química.^{59, 142} As amostras RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 apresentaram pouca degradação até 160 °C e menor degradação que o RTV puro em toda faixa de temperatura estudada (FIGURA 74). Entretanto, RTV-HPMCAS MF, RT-HPMCAS LF e RTV-HPMC foram menos estáveis termicamente que o RTV puro, atingindo completa ou quase completa degradação em 180 °C.

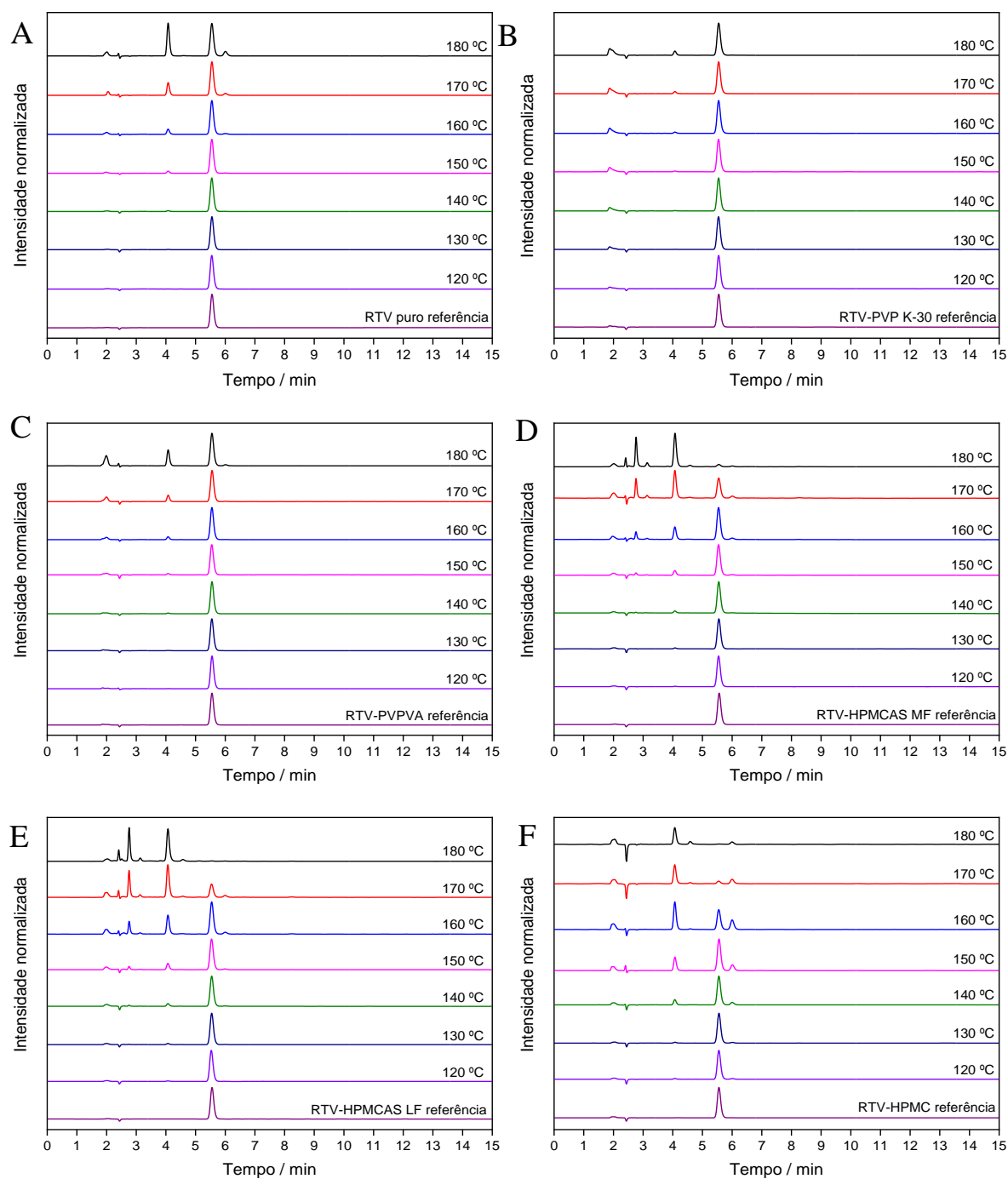


FIGURA 73 – Cromatogramas das amostras de referênci;a (sem degradaçã;o) e RTV-ASDs (20% *m/m*) degradados de 120 a 180 °C. A) RTV-PVP K-30, B) RTV-PVP/VA 64, C) RTV puro, D) RTV-HPMCAS MF, E) RTV-HPMCAS LF e F) RTV-HPMC.

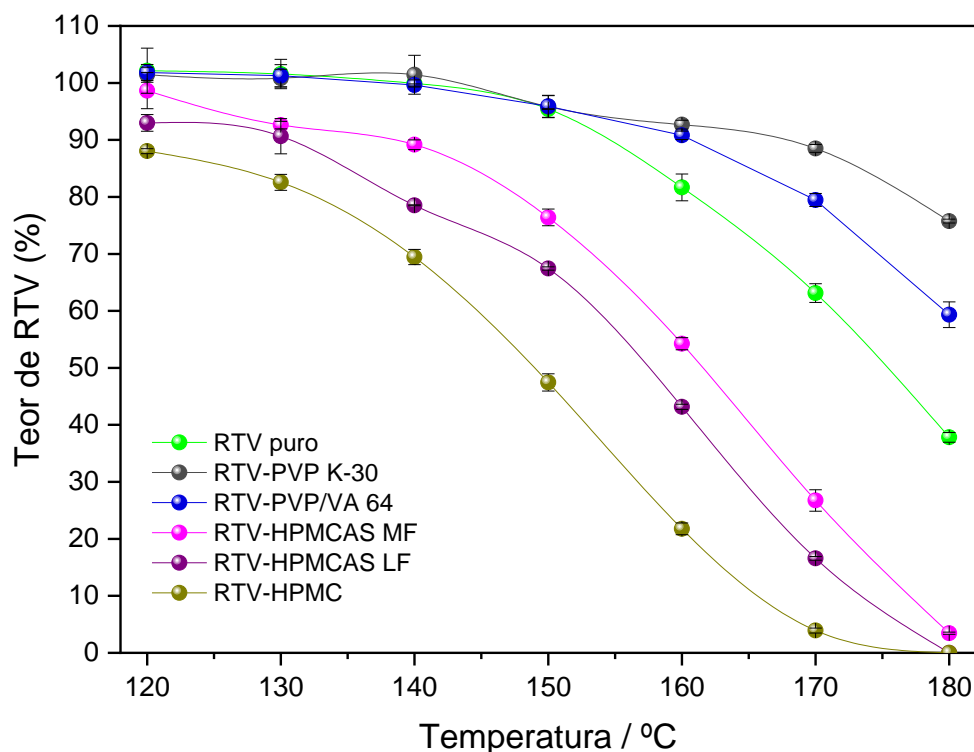


FIGURA 74 – Teor de RTV nas dispersões sólidas amorfas a 20% (*m/m*) e RTV puro. As barras de erro representam o desvio padrão para $n = 2$.

2.4.5 - Degradação térmica considerando massa molecular do PVP e a química do PVP/VA

Como as dispersões sólidas contendo PVP K-30 e PVP/VA 64 apresentaram uma melhor estabilidade térmica frente ao RTV puro, uma série de experimentos foram realizados para compreender o mecanismo de proteção dos polímeros PVP e PVP/VA.

Primeiramente, a estabilidade térmica do RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 nas concentrações de 10-50% (*m/m*) foi avaliada com a finalidade de verificar a relação entre concentração de RTV e estabilidade. A

FIGURA 75 mostra os teores de RTV para os sistemas estudados. De acordo com ANOVA fator único (TABELA 25), as amostras não apresentaram diferenças estatísticas ao nível de confiança de 95% entre as diferentes

concentrações ($F_{\text{valor}} < F_{\text{crítico}}$). Portanto, o efeito protetivo dos polímeros PVP K-30 e PVP/VA 64 não foi atribuído à concentração de RTV.

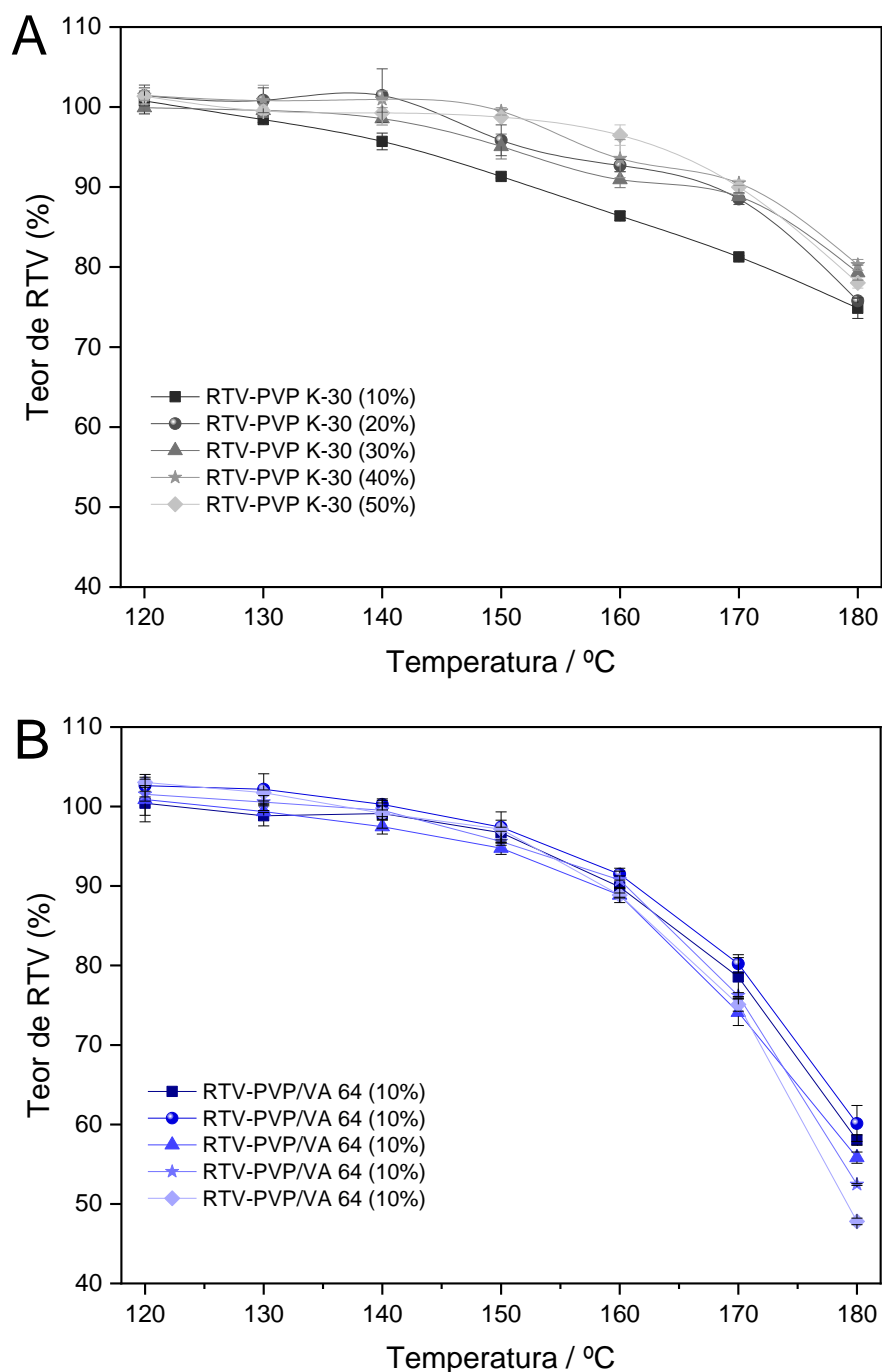


FIGURA 75 – Teor de RTV em ASDs (10-50% *m/m*) após exposição isotérmica de 120-180 °C utilizando TGA durante 5 minutos. A) RTV-PVP K-30 e B) RTV-PVP/VA 64. As barras de erro representam o desvio padrão para $n = 2$.

TABELA 25 – ANOVA fator único para RTV-PVP K-30 e RTV-PVP/VA 64 em diferentes concentrações.

Amostra	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{valor}	P _{valor}	F _{crítico}
RTV-PVP K-30	Entre grupos	129,160	4	32,290	0,445	0,775	2,690
	Dentro dos grupos	2177,497	30	72,583			
	Total	2306,657	34				
RTV- PVP/VA 64	Entre grupos	49,0570	4	12,264	0,041	0,997	2,690
	Dentro dos grupos	8914,906	30	297,164			
	Total	8963,963	34				

2.4.6 - Relação entre a degradação térmica e T_g

A relação entre a mobilidade molecular (representada pela T_g) e as possíveis interações moleculares foram investigadas utilizando PVP de diferentes pesos moleculares (K-12, K-17, K-30 e K-90) e PVP/VA com diferentes razões entre os grupos PVP e VA (PVP/VA 37, 64 e 73). RTV-ASDs preparados na concentração de 20% com várias classes de PVP geraram valores de T_g entre 64 – 177 °C (TABELA 23). A estabilidade térmica dessas amostras (FIGURA 76A) não mostrou ser estatisticamente diferente (TABELA 26). As diferentes classes de PVP diferem em massa molecular, o qual está intimamente ligado à viscosidade. Logo, inferimos que a mobilidade do polímero não impacta na degradação do RTV-PVP.

Em relação as amostras RTV-PVP/VA ASDs (FIGURA 76B), RTV-PVP/VA 37 (maior conteúdo de VA) atingiu a maior taxa de degradação,

indicando que a porção PVP do polímero pode melhorar a estabilidade química e sugerindo interações intermoleculares. Entretanto, RTV-PVP/VA 64 e RTV-PVP/VA 73 não apresentaram diferença significativa nas degradações (TABELA 26).

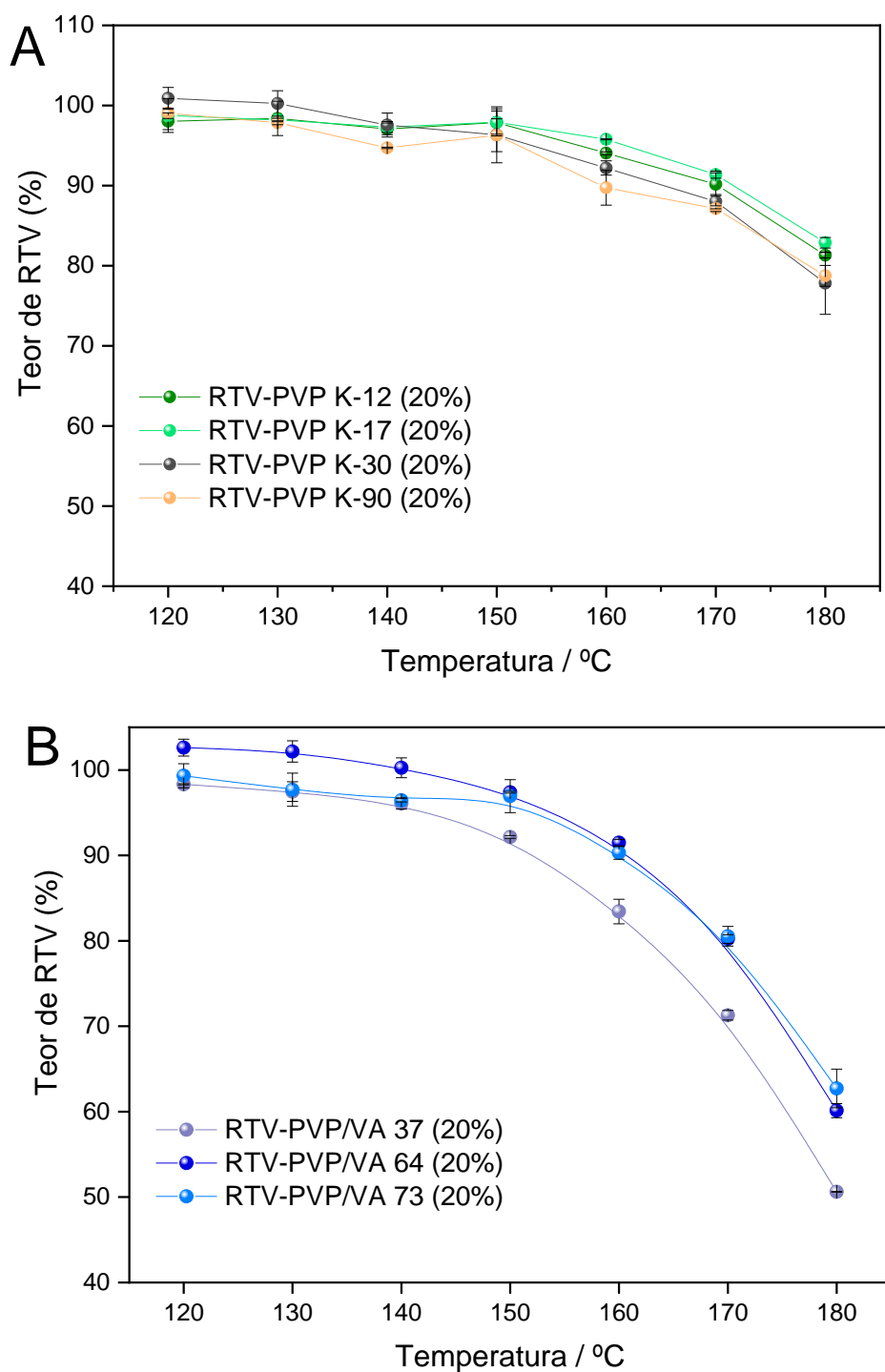


FIGURA 76 – Teor de RTV em ASDs com diferentes classes de polímeros PVP (A) e PVP/VA 64 (B) na concentração de 20% (*m/m*) após exposição isotérmica de 120-180 °C utilizando TGA durante 5 minutos. As barras de erro representam o desvio padrão para $n = 2$.

TABELA 26 – ANOVA fator único RTV com diferentes classes de PVP e para as amostras RTV-PVP/VA 64 e 73.

Amostra	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{valor}	P_{valor}	F_{crítico}
Diferentes classes de PVP	Entre grupos	20,434	3	6,811	0,140	0,935	3,009
	Dentro dos grupos	1166,635	24	48,610			
	Total	1187,069	27				
RTV-PVP/VA 64 e 73	Entre grupos	7,599	1	7,599	0,036	0,852	4,747
	Dentro dos grupos	2520,684	12	210,057			
	Total	2528,283	13				

Foi feita uma tentativa de correlacionar a T_g e a extensão da degradação plotando o teor de RTV em função T/T_g (temperaturas em Kelvin) para se investigar a mobilidade molecular das dispersões sólidas amorfas (FIGURA 77). Entre os diferentes ASDs compostos por RTV-PVP K-30, RTV-PVP/VA 64, RTV-HPMCAS e RTV-HPMC foi observado que a estabilidade aumenta com o aumento do T_g (FIGURA 77A). Entretanto, HPMCAS MF (T_g 72,6 °C) não seguiu esta tendência, uma vez que este forneceu uma maior estabilidade em relação ao polímero HPMCAS LF (T_g 75,0 °C). Além disso, as diferentes classes de PVP e PVP/VA apresentaram uma ampla faixa de T_g , mas não foi observada uma diferença significativa na degradação (FIGURA 77B e C). De forma similar, enquanto T_g varia com a concentração de PVP K-30 e PVP/VA 64 em ASDs, novamente não foi observado diferença significativa na degradação do RTV (FIGURA 77D). Portanto, não foi encontrado uma relação clara entre T_g

e a degradação do RTV. Vale notar que a T_g fornece somente um rudo indicador da mobilidade molecular, sendo que interações específicas, tais como ligações de hidrogênio e altas concentrações do princípio ativo, podem causar desvios na correlação entre T_g e mobilidade molecular. Estes dados sugerem que as diferentes estabilidades são mais propensas a se relacionarem com as propriedades químicas do polímero.

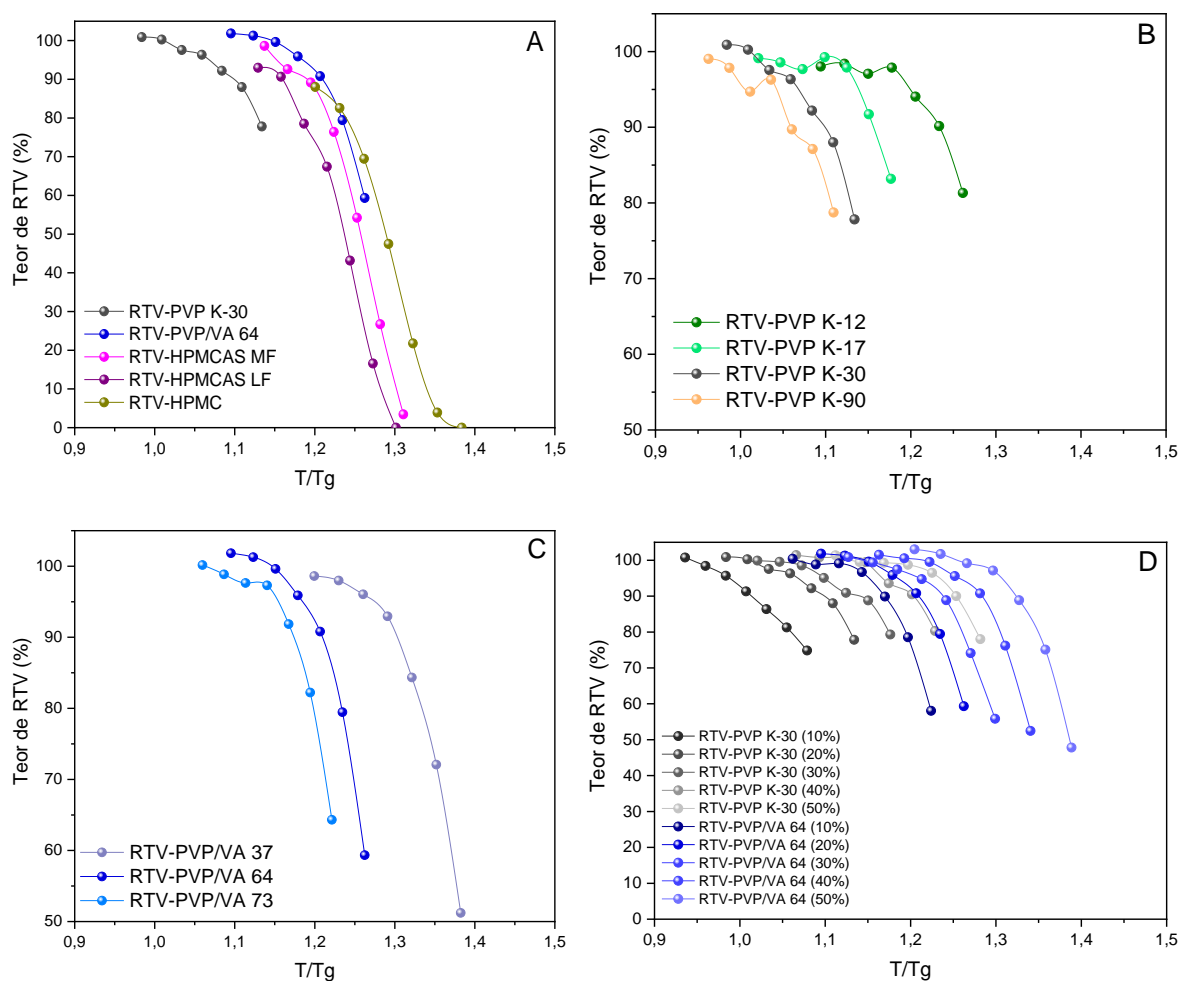


FIGURA 77 – Relação entre o teor de RTV para uma dada temperatura e T_g (razão em Kelvin). RTV-ASDs foram preparadas com diferentes polímeros a 20% (*m/m*) (A), diferentes classes de PVP a 20% (*m/m*) (B), diferentes classes de PVP/VA a 20% (*m/m*) (C) e diferentes concentrações com os polímeros PVP K-30 e PVP/VA 64 (D).

2.4.7 - Estabilidade térmica das amostras preparadas por HME

As amostras foram extrusadas em uma câmara de aquecimento de 2 mL e com um sistema de dupla-rosca de transporte configurado em co-rotação, conforme FIGURA 78. A degradação do RTV por HME foi avaliada com três polímeros: PVP/VA 64, HPMCAS MF e HPMC. Embora o polímero PVP K-30 tenha fornecido a maior estabilidade térmica para o RTV-ASDs, a alta viscosidade e T_g para este polímero requer altas temperaturas de processamento durante a extrusão. Já o polímero HPMCAS LF apresentou menor estabilidade para o RTV quando comparado à classe MF e, portanto, não foi estudado.

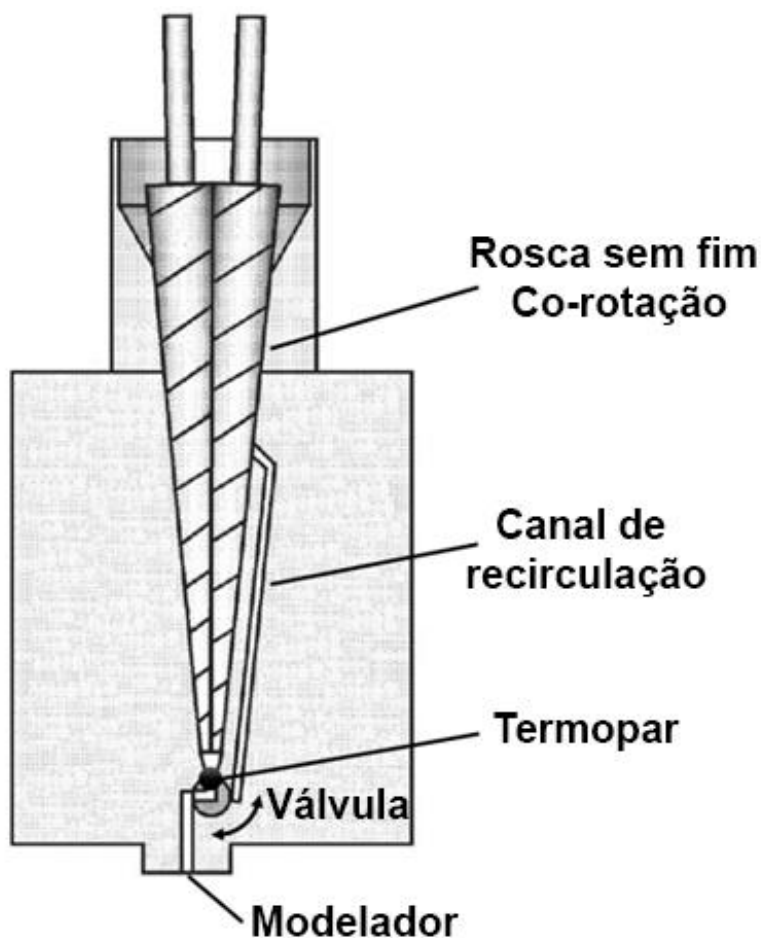


FIGURA 78 – Esquema do barril de aquecimento utilizado na extrusora Xplore.

A FIGURA 79 mostra as amostras extrusadas após o processamento por HME em diferentes temperaturas. As amostras de RTV-PVP/VA 64 eram claras e não apresentaram mudança na coloração em qualquer temperatura. As ASDs contendo HPMCAS MF e HPMC tiveram colorações amareladas, levemente escurecidas com o aumento da temperatura, o que pode sugerir a degradação do fármaco e/ou polímero.^{135, 138} Os produtos de degradação R4, R5 e R6 foram observados nas amostras extrusadas (FIGURA 80), os quais também estiveram presentes nas amostras preparadas por evaporação de solvente e degradadas por TGA. A degradação das amostras extrusadas foi clara tanto pela diminuição do teor de RTV quando pelo aumento da porcentagem dos produtos de degradação (FIGURA 81). Em todas as temperaturas a estabilidade térmica do sistemas RTV-ASDs, PVP/VA 64 > HPMCAS MF > HPMC, foi consistente com a ordem de estabilidade encontradas pelos experimentos realizados isotermicamente por TGA (FIGURA 74).

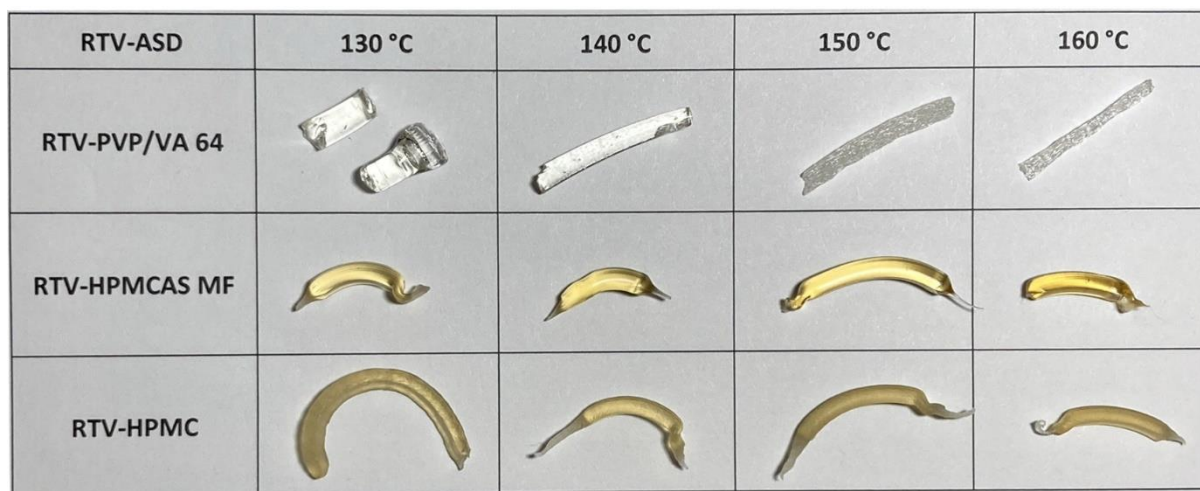


FIGURA 79 – Amostras extrusadas após processamento em diferentes temperaturas.

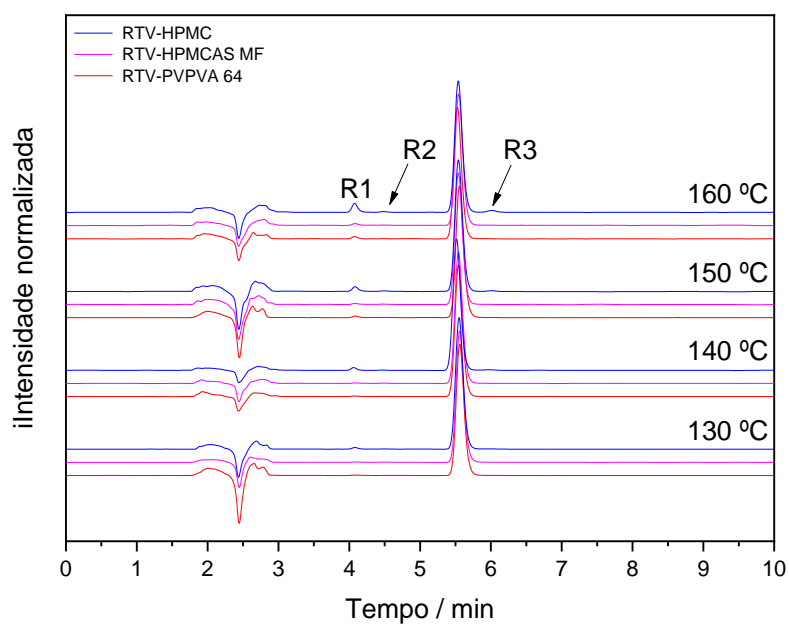


FIGURA 80 – Cromatogramas das amostras extrusadas em diferentes temperaturas.

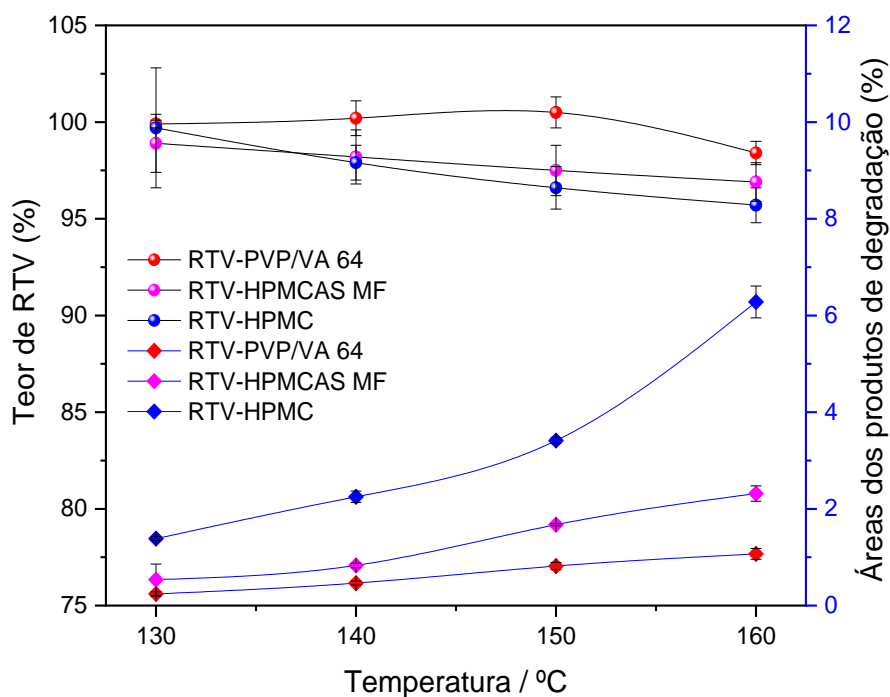


FIGURA 81 – Perfil de degradação das amostras processadas por HME representadas pelo teor de RTV (%) e pela soma das áreas cromatográficas dos produtos de degradação em relação à temperatura de processamento. As barras de erro representam o desvio padrão para n=3.

2.4.8 - Cinética de degradação

Os experimentos realizados por HME resultaram notavelmente em uma diminuição na extensão da degradação do RTV quando comparadas aos resultados obtidos pelos experimentos realizados no TGA. A fim de investigar as diferenças das taxas de degradação, RTV puro, RTV-PVP/VA 64 e RTV-HPMC foram degradados usando um forno convencional e TGA em uma exposição isotérmica a 160 °C.

A FIGURA 82 mostra o teor de RTV com exposição até 30 minutos. O teor de RTV nas amostras degradadas pelo TGA tiveram notavelmente uma maior taxa de degradação do que a estufa convencional, alcançando degradação até 5 vezes mais rápido para o RTV puro. Todas as amostras mostraram taxas de degradação de primeira ordem (FIGURA 83). As amostras degradadas em estufa tiveram taxa de degradação similar às amostras obtidas pelo HME.

Para a exposição de 5 minutos, o teor de RTV para a amostra RTV-PVP/VA 64 foi de 98,4% e 98,7%, respectivamente para HME e estufa, enquanto a amostra RTV-HPMC apresentou 95,7% para HME e 82,9% para a estufa. Já os experimentos realizados no TGA produziram maior degradação para ambas amostras, 95,3% (RTV-PVP/VA 64) e 30,2% (RTV-HPMC).

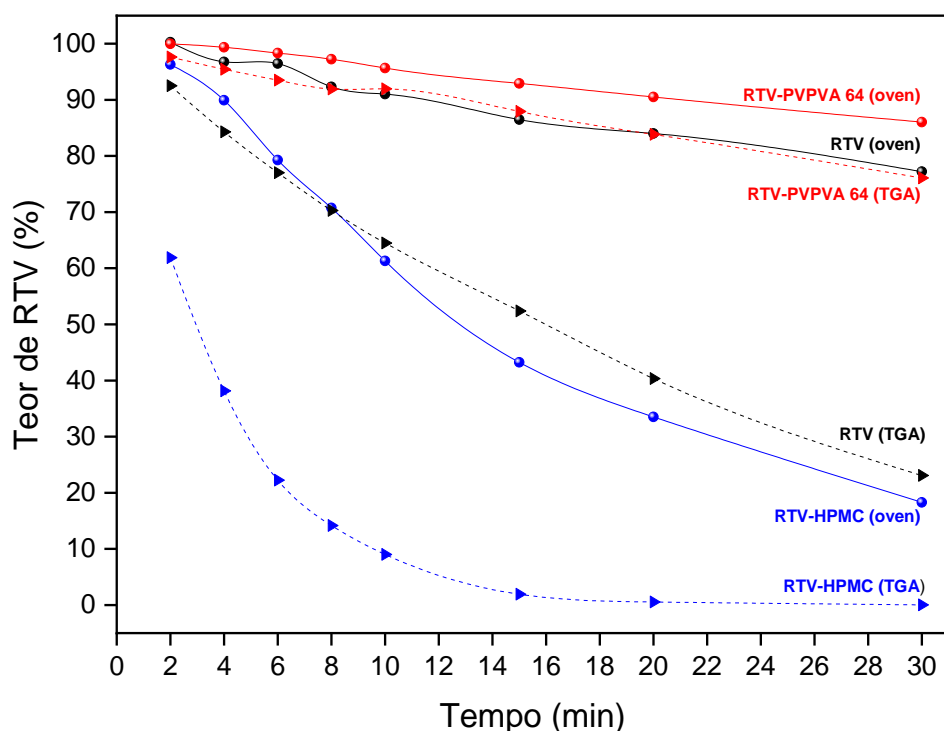


FIGURA 82 – Comparação dos teores de RTV para RTV puro, RTV-PVP/VA 64 e RTV-HPMC degradados por TGA e estufa convencional a 160 °C durante 30 minutos.

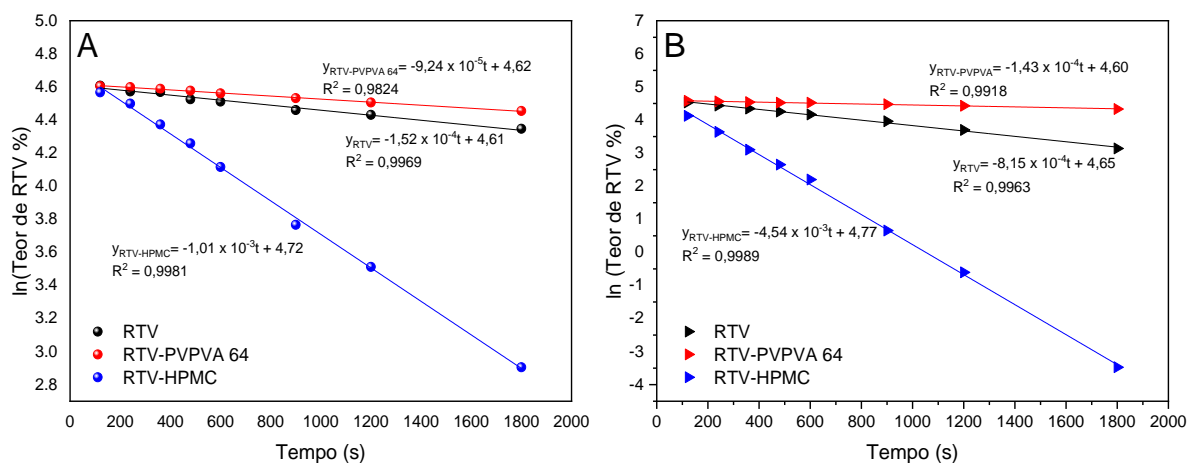


FIGURA 83 – Logaritmo (ln) do teor de RTV vs tempo. Degradação das amostras usando (A) estufa convencional e (B) TGA .

2.4.9 - Análises de infravermelho

As interações intermoleculares foram avaliadas por espectroscopia de infravermelho. A FIGURA 84 mostra os espectros do RTV puro em estado amorfo, polímeros puros, e as dispersões sólidas amorfas (20% *m/m*) com HPMC, HPMCAS LF, HPMCAS MF. Já a FIGURA 85 mostra os espectros das amostras formuladas com PVP e PVP/VA em diferentes graus e concentrações. O espectro do RTV apresentou bandas características em 3294 cm^{-1} (N-H, estiramento de amina secundária), 2962 cm^{-1} (interação de hidrogênio), 1716 ($\text{C}=\text{O}$, estiramento de grupo carbamato), 1633 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$, estiramento de grupo amida) e 1525 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$, estiramento de carbono aromático).¹⁴³⁻¹⁴⁵ Os polímeros HPMCAS LF e MF apresentaram bandas em 3479 cm^{-1} (estiramento O-H), 2937 cm^{-1} (estiramento - CH_3), 1742 cm^{-1} (estiramento do grupo $\text{C}=\text{O}$), 1374 cm^{-1} (estiramento C-H), 1056 cm^{-1} (estiramento do grupo C-O-C).^{91, 146} O espectro do HPMC apresentou bandas em 3475 cm^{-1} (estiramento O-H), 2931 cm^{-1} (estiramento C-H), 1082 cm^{-1} (estiramento do grupo C-O-C).^{146, 147} PVP K-30 mostrou bandas características em 3327 cm^{-1} (estiramento O-H), 2952 cm^{-1} (estiramento assimétrico de CH_2 de anel), 1681 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$), 1423 cm^{-1} (estiramento CH_2) e 2952 cm^{-1} (estiramento C-N).^{148, 149} Por último, o espectro de PVP/VA 64 apresentou duas bandas principais em 1735 e 1683 cm^{-1} atribuídas ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ das porções acetato de vinila e vinilpirrolidona, respectivamente.¹⁴³

Não foi possível detectar mudanças expressivas nos espectros das dispersões sólidas amorfas quando comparado aos espectros dos componentes puros (FIGURA 84 e 85). RTV-HPMCAS MF e RTV-HPMCAS LF não apresentaram deslocamento ou surgimento de novas bandas em relação ao ativo ou aos polímeros puros. RTV-HPMC apresentou bandas com leves deslocamentos em 1639 e 1722 cm^{-1} os quais são atribuídos ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ (1633 e 1716 cm^{-1}) do RTV. Estes deslocamentos podem indicar rompimentos

nas interações intramoleculares do RTV e formação de interações entre o ativo e o polímero.

De forma semelhante, pequenos deslocamentos espectrais, tais como um ombro em 1720 cm^{-1} para diferentes concentrações de RTV em RTV-PVP K-30 podem indicar interações de hidrogênio na dispersão sólida amorfa ou sobreposição de bandas do RTV e PVP. O espectro do RTV-PVP/VA 64 (FIGURA 85C e D), assim como RTV-PVP/VA 37 e RTV-PVP/VA 73, mostrou que a banda em 1681 cm^{-1} (estiramento C=O da porção PVP) está levemente deslocada e alargada em relação à forma pura do polímero, fato já observado na literatura.¹⁴³ Essas mudanças espectrais podem sugerir que as interações entre PVP/VA e RTV estão ocorrendo preferencialmente na carbonila da porção vinilpirrolidona.

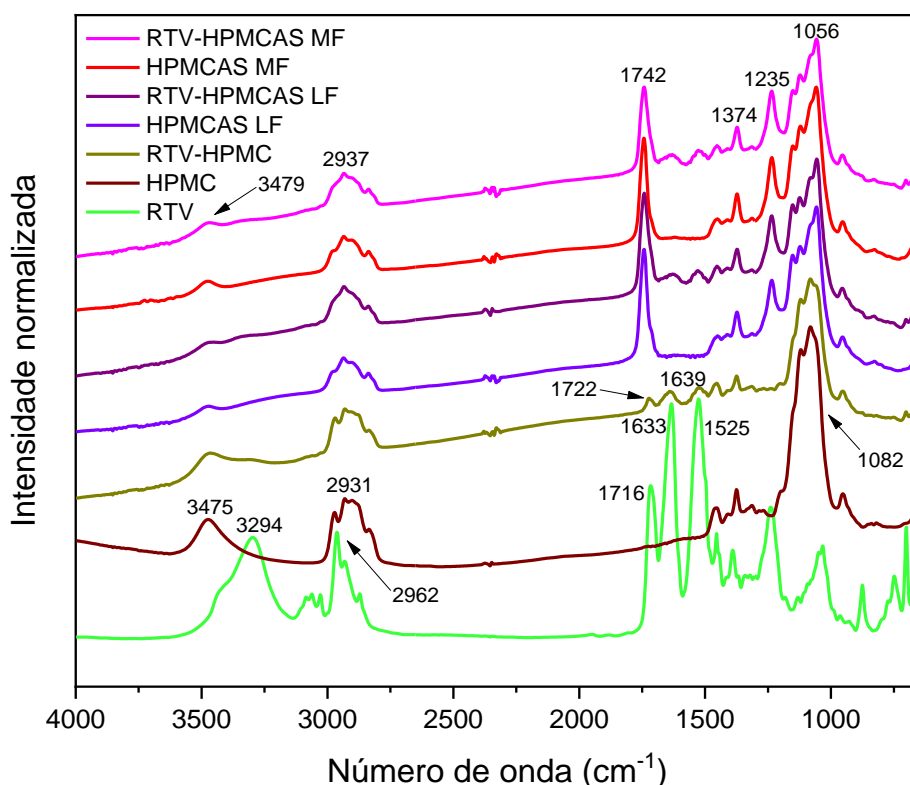


FIGURA 84 – Espectro de infravermelho do RTV, HPMC, RTV-HPMC, HPMCAS LF, RTV-HPMCAS LF, HPMCAS MF, and RTV-HPMCAS MF. As dispersões sólidas amorfas estão na concentração de 20% (*m/m*).

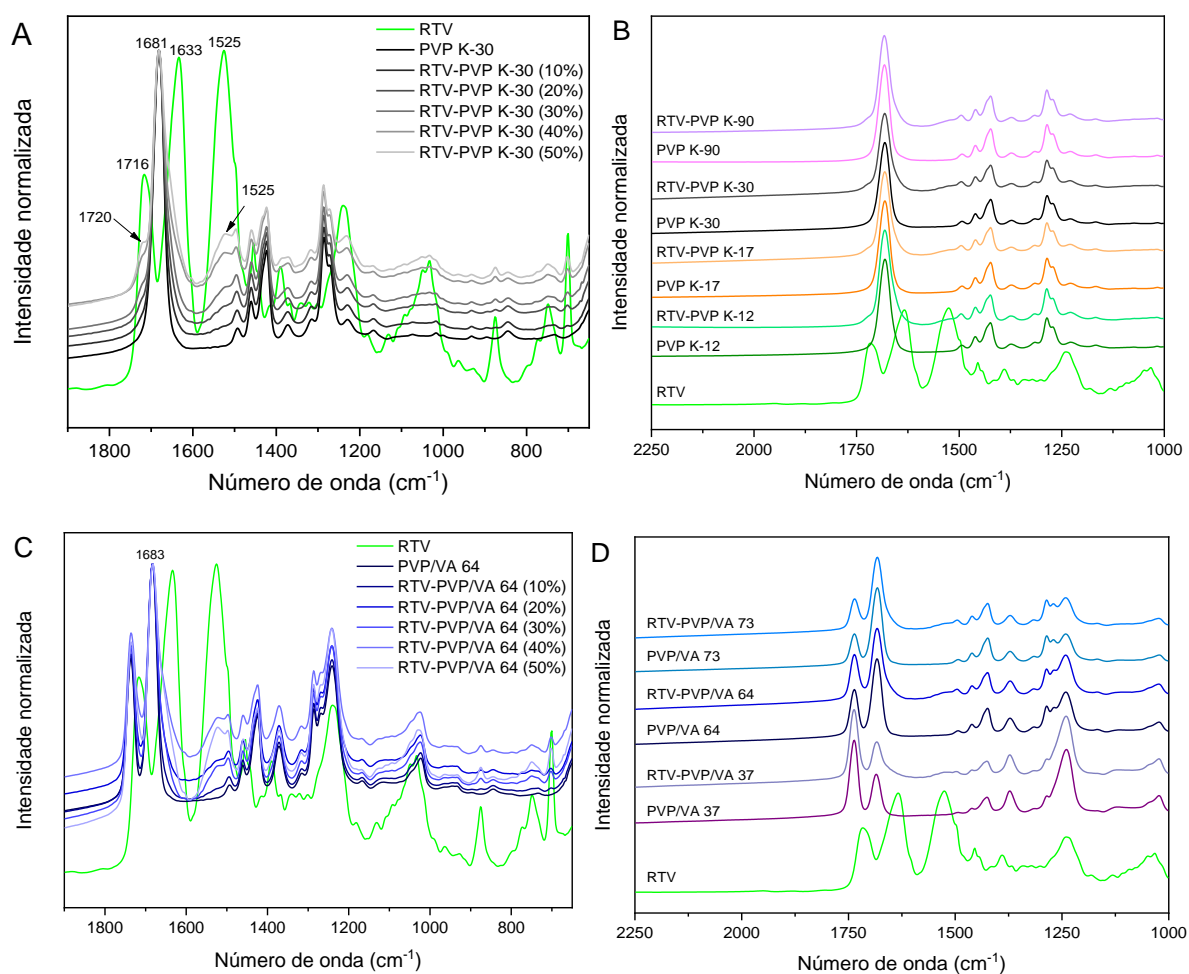


FIGURA 85 – Espectros de infravermelho. A) RTV, PVP K-30, e RTV-PVP K-30 nas concentrações de 10 to 50% (*m/m*). B) RTV, PVP K-12, PVP K-17, PVP K-30, PVP K-90 e seus ASDs (20% *m/m*). C) RTV, PVP/VA 64 e RTV-PVP/VA 64 nas concentrações de 10 a 50% (*m/m*). D) RTV, PVP/VA 37, PVP/VA 64, PVP/VA 73 e seus ASD (20% *m/m*).

2.4.10 - Elucidação estrutural dos produtos de degradação

Os estudos de LC-MS/MS foram realizados para elucidar as estruturas dos produtos de degradação e avaliar os mecanismos envolvidos durante a degradação térmica do RTV. Para esse propósito utilizou-se a amostra

RTV-HPMCAS LF degradada isotermicamente a 170 °C durante 5 minutos por TGA, a qual apresentou maior número de bandas cromatográficas sem a ocorrência de degradação completa do fármaco. A TABELA 27 mostra as massas experimentais, teórica e a fórmula molecular encontrada para cada produto de degradação. As estruturas foram elucidadas com erros de massa exata inferior a 5 ppm. O espectro de massa MS² estão apresentados nas FIGURA 86 e 87.

TABELA 27 – Massas experimentais encontradas para o RTV e seus produtos de degradação.

Composto	Massa experimental	Massa teórica	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Íons fragmentos
RTV	721,3192	721,3200	-1,11	C ₃₇ H ₄₉ N ₆ O ₅ S ₂ ⁺	507, 426, 296, 268, 197, 171, 140
R1	171,0951	171,0950	1,17	C ₈ H ₁₅ N ₂ S ⁺	140
R2	271,1107	271,1111	-1,48	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₃ S ⁺	253, 171, 140
R3	213,1059	213,1056	1,41	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ OS ⁺	171, 156, 140
R4	703,3093	703,3095	-0,28	C ₃₇ H ₄₇ N ₆ O ₄ S ₂ ⁺	533, 296, 268
R5	551,2319	551,2315	0,73	C ₂₉ H ₃₅ N ₄ O ₅ S ⁺	507, 489, 392, 143
R6	436,2225	436,2231	-1,38	C ₂₅ H ₃₀ N ₃ O ₄ ⁺	392, 250, 143
R7	606,3127	606,3103	3,96	C ₃₃ H ₄₄ N ₅ O ₄ S ⁺	296, 268, 197, 171

Todos os produtos de degradação foram formados por reações de hidrólises, exceto o R4 que foi produzido a partir da desidratação do RTV. De acordo com os perfis cromatográficos das amostras degradadas (FIGURA 73), R4 foi o principal produto de degradação térmica do RTV e sua formação gera moléculas de água que podem favorecer a formação dos demais produtos de degradação (R1-R3 e R5-R7).

O espectro de LC-MS/MS do RTV ($[M+H]^+$, m/z 721) eluído em 6,49 minutos (FIGURA 86A) produziu íons produtos com m/z 426 (perda de $C_{14}H_{21}N_3O_2S$ do íon precursor m/z 721), m/z 296 (perda de $C_{23}H_{27}N_3O_3S$ do íon precursor m/z 721), m/z 268 (perda de CO do íon produto m/z 296), m/z 197 (perda de C_4H_9N do íon produto m/z 296), m/z 171 (perda de CH_2O do íon produto m/z 197) e m/z 140 (perda de CH_5N do íon produto em m/z 171). As predições estruturais dos produtos de degradação foram feitas considerando as mudanças no perfil de fragmentação e comparação com estrutura do RTV, desde que qualquer mudança no conteúdo estrutural da molécula de RTV certamente produziria íons característicos, resultando em perfis de fragmentação diferentes. A massa experimental foi usada para obter a fórmula molecular para os produtos de degradação.

O espectro *full scan* com a presença de R1 ($[M+H]^+$, m/z 171) eluído em 1,28 minutos (FIGURA 86B) mostra que o íon m/z 140 pode ter sido formado pela perda de CH_5N do íon precursor m/z 171. R1 foi reportado por Rao *et al* como um produto de reação de hidrólise dos grupos carbamato e amida do RTV que também pode gerar P6 devido a clivagem da molécula.¹⁵⁰

O espectro MS/MS de R2 ($[M+H]^+$, m/z 271) eluído em 1,76 minutos (FIGURA 86C) apresentou íons fragmentos em m/z 171 e 140, sugerindo que R2 contém a estrutura de R1 e íon fragmento m/z 253 indica a perda de água do íon precursor m/z 271.

O espectro MS/MS de R3 ($[M+H]^+$, m/z 213) eluiu em 2,05 minutos (FIGURA 86D) e também apresentou os íons fragmentos m/z 171 e 140, mas não

o íon com m/z 253. A estrutura da porção RTV com dois grupos amidas podem ter reagido, desde que interconversões são esperadas em reações de degradação (FIGURA 89).

O espectro MS/MS de R4 ($[M+H]^+$, m/z 703) eluído em 3,07 minutos (FIGURA 87A) apresentou os principais íons fragmentos do RTV e a uma diferença de massa de 18 unidades, sugerindo a perda de água na estrutura do RTV.

O espectro MS/MS de R5 eluído em 3,92 minutos (FIGURA 87B) apresentou íons produtos m/z 533 (perda $C_5H_3NO_2S$ from m/z 533), 507 (perda de CO_2 do íon m/z 551), 489 (perda de água do íon m/z 507), 392 (perda de $C_5H_3NO_2S$ do íon m/z 533), 143 (perda da porção dos dois anéis aromáticos do íon m/z 392). O perfil espectral sugere que a estrutura principal do RTV foi mantida no produto de degradação R5. Os fragmentos m/z 533 e 392 indicam que houve uma ciclização devido a reação entre o nitrogênio e a grupo carbonila.

O espectro MS/MS de R6 ($[M+H]^+$, m/z 436) eluído em 4,95 minutos (FIGURA 87C) apresentou íons produtos m/z 392 (perda de CO_2 do m/z 436), 250 (perda de anel de 5 membros do m/z 392), 233 (perda de NH_3 do íon m/z 250) e m/z 143. O espectro MS/MS de R6 apresentou ions m/z 392 e 143 encontrados na estrutura de R5, porém houve a perda do anel de tiazol ocorrido pela formação do grupo oxazolidona.

O espectro MS/MS de R7 ($[M+H]^+$, m/z 606) eluído em 6,95 minutos (FIGURA 87D) apresentou íons produtos com m/z 436 (perda de $C_8H_{14}N_2S$ do íon precursor m/z 606), 296 (perda de $C_{19}H_{22}N_2O_2$ do íon m/z 606), 268, 197, 171 e 140. O íon fragmento m/z 436 sugere que o íon m/z 606 possui uma estrutura similar a de R6. O íon fragmento m/z 171 indica que a porção com anel de tiazol também está incluído na estrutura de R7. As FIGURA 88 e 89 mostram, respectivamente, as rotas de fragmentação e os mecanismos propostos para os produtos de degradação do RTV.

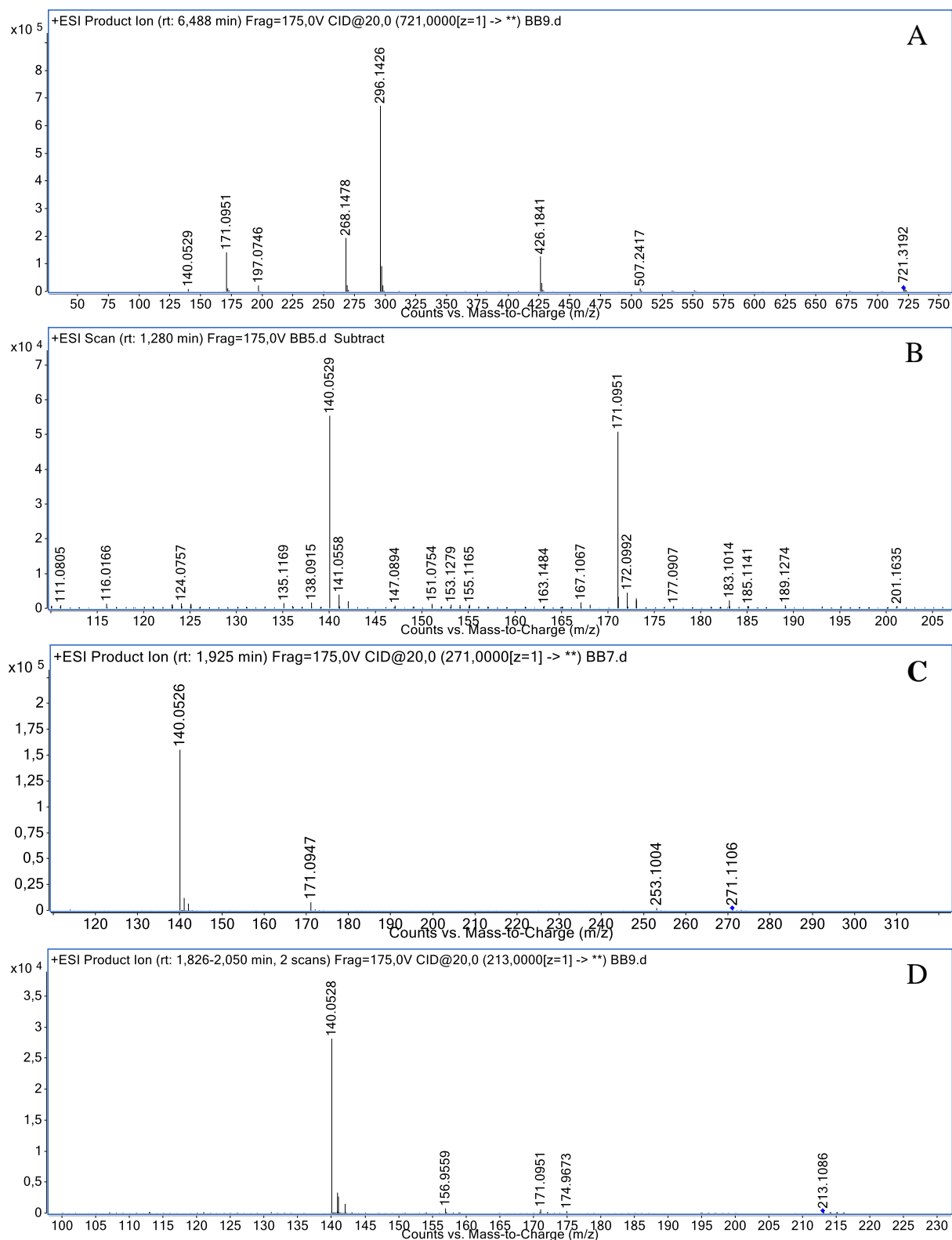


FIGURA 86 – Espectros de massas do RTV e seus produtos de degradação. A) espectro MS² do RTV (m/z 721), B) espectro *full scan* com a presença de R1 (m/z 171), C) espectro MS² de R2 (m/z 271), D) espectro MS² de R3 (m/z 213).

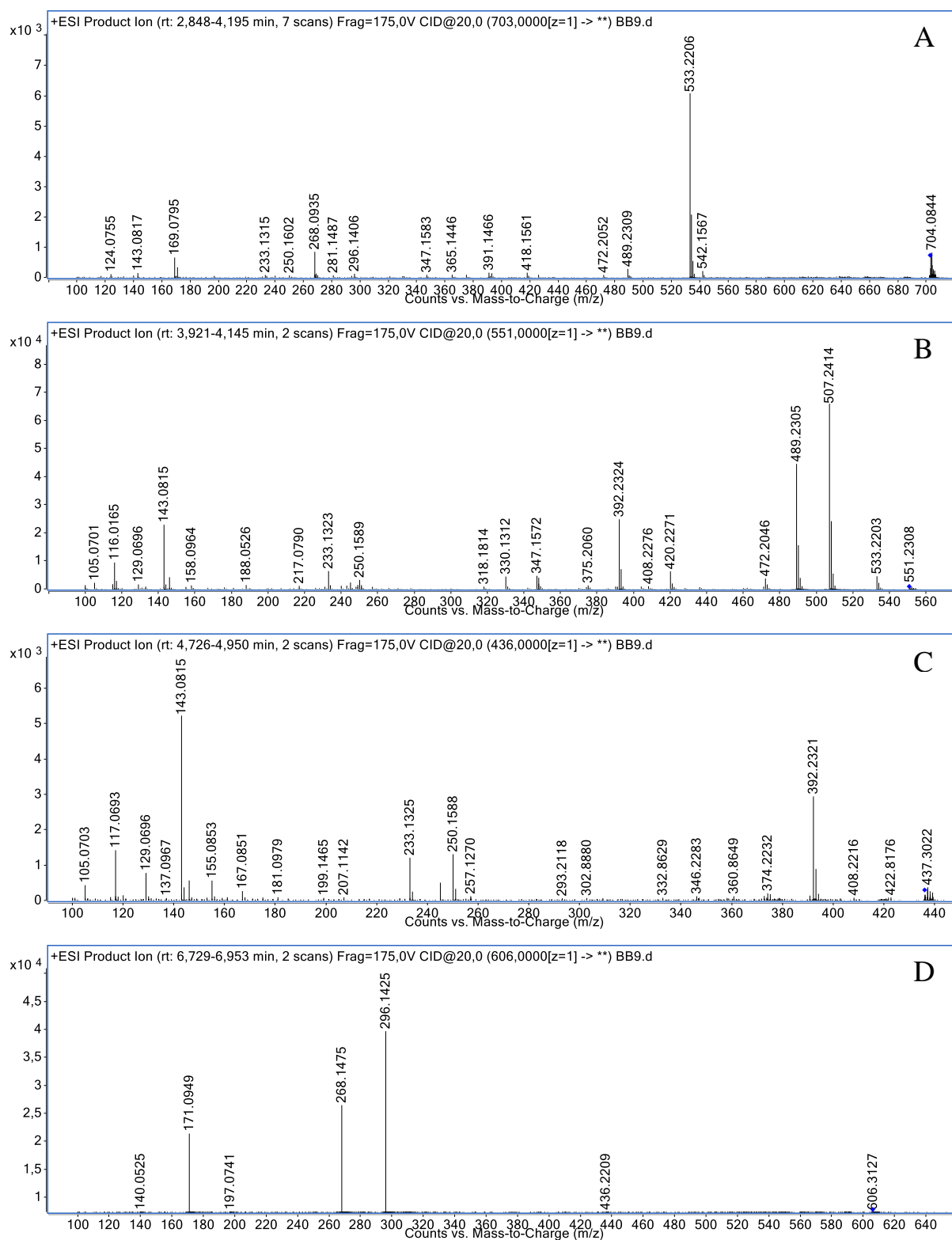


FIGURA 87 – Espectros MS² dos produtos de degradação. A) R4 (m/z 703), B) R5 (m/z 551), C) R6 (m/z 436), e D) R7 (m/z 606).

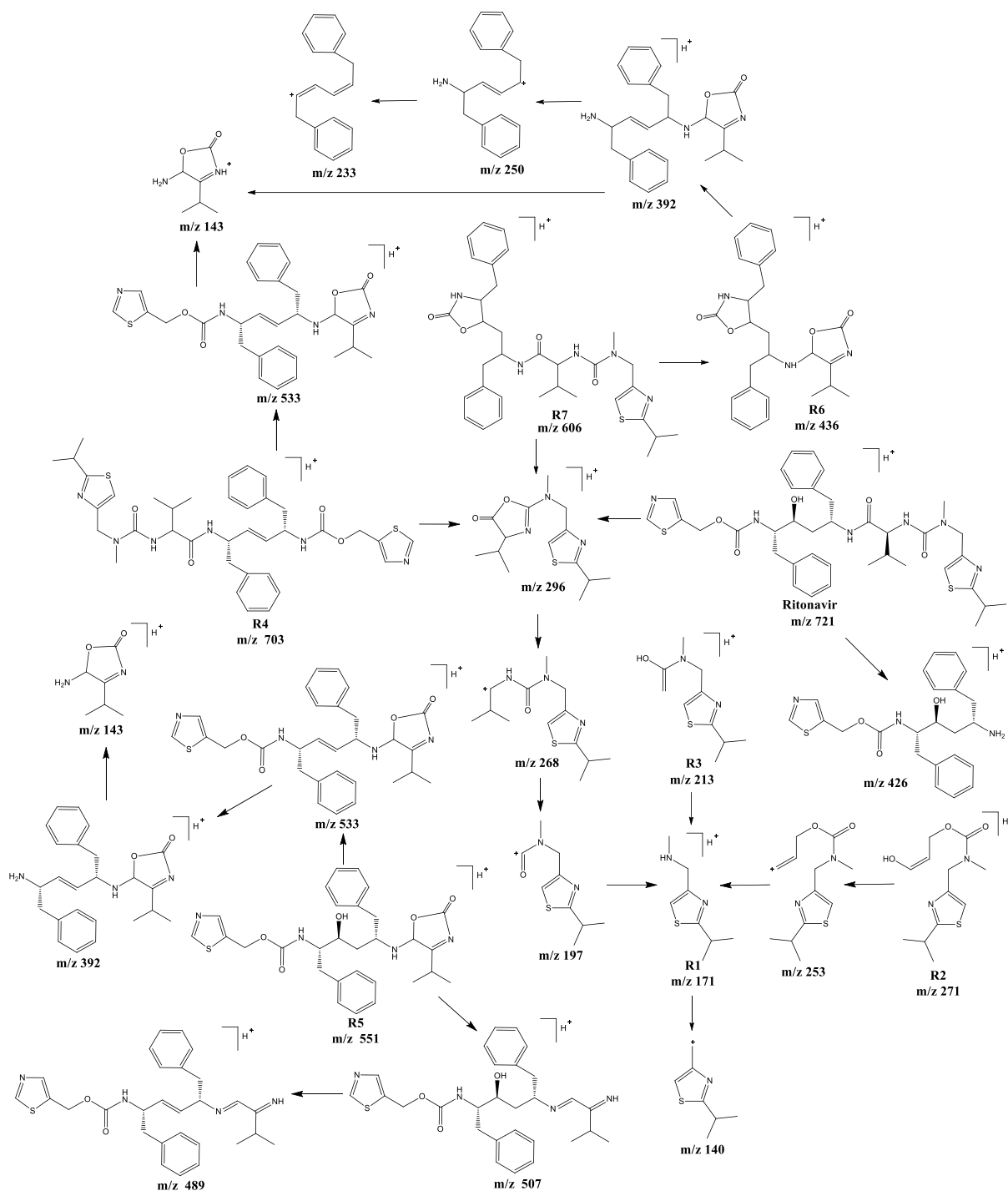


FIGURA 88 – Rotas de fragmentação propostas para o RTV e seus produtos de degradação (R1-R7).

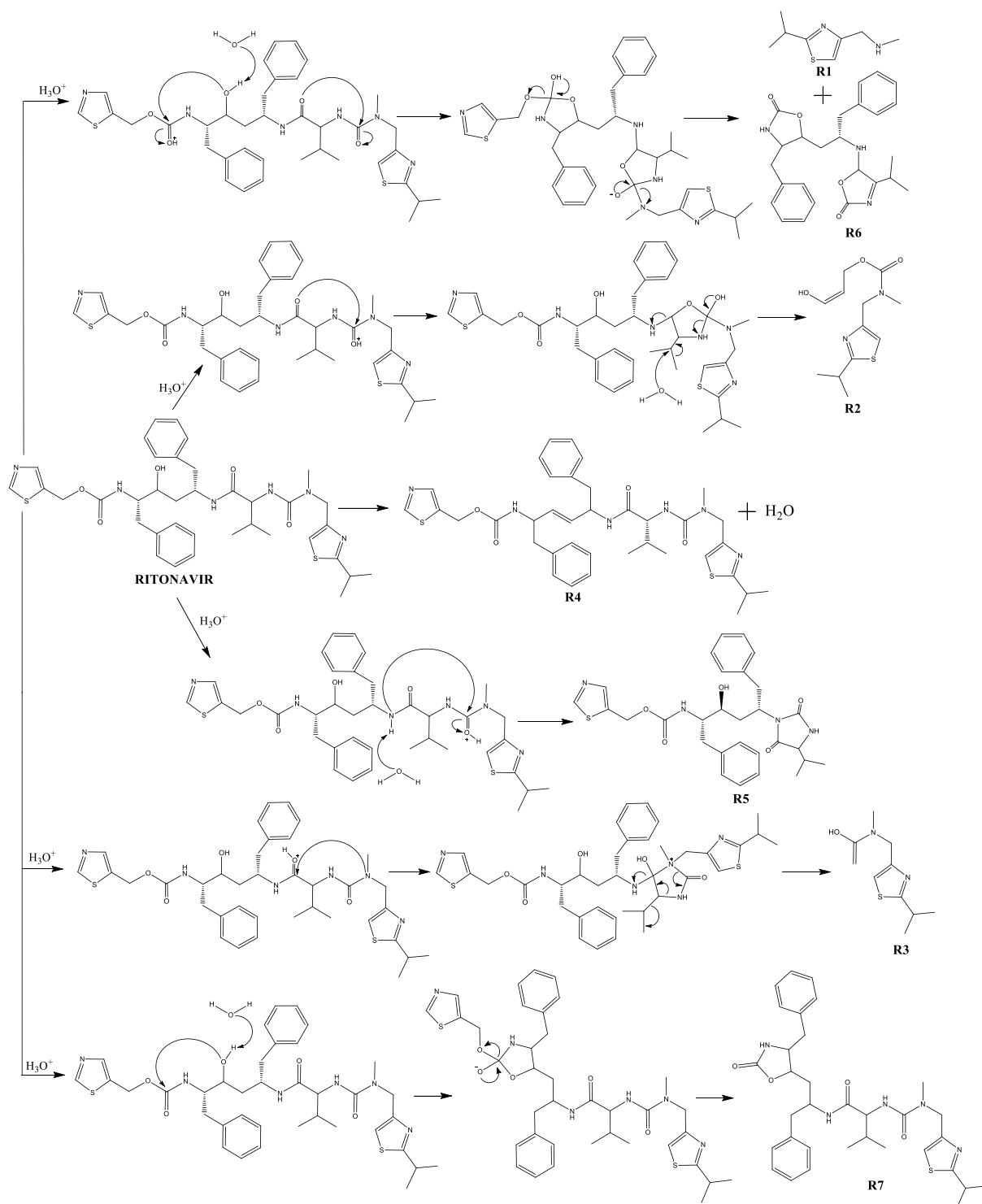


FIGURA 89 – Mecanismos de reação propostos para os produtos de degradação do RTV.

2.4.11 - Mecanismos da degradação térmica

O RTV sofreu extensiva degradação em temperaturas elevadas de processamento para preparar as dispersões sólidas amorfas, o que está em acordo com a literatura.^{65, 110, 112} A degradação do RTV foi impactada pelo tipo de polímero utilizado nas dispersões sólidas amorfas em que as formulações contendo PVP e PVPV/VA tiveram um efeito protetivo, enquanto as formulações HPMCAS e HPMC catalizaram a degradação do RTV.

Diversas hipóteses foram consideradas para investigar o mecanismo de degradação térmica do RTV: mobilidade molecular, interações intermoleculares e compatibilidade entre o ativo e polímero. A primeira hipótese, mobilidade molecular, não demonstrou ter uma relação direta com a extensão da degradação do RTV. Não foi observada a correlação entre o tipo de polímero e a T_g ou pela normalização T/T_g (FIGURA 77). As formulações contendo PVP com diferentes pesos moleculares apresentaram T_g de 80-170 °C. Todavia, a degradação do RTV com estes polímeros não foi estatisticamente diferente. Fato semelhante ocorreu com os sistemas compostos por PVP/VA, em que RTV-PVP/VA 64 e RTV-PVP/VA 73 apresentaram diferentes T_g e uma de degradação também não estatisticamente diferente. Por último, RTV de 10-50% (*m/m*) nas dispersões sólidas amorfas contendo PVP K-30 e PVP/VA 64 tiveram T_g completamente diferentes, mas não houve influência da concentração na extensão da degradação do fármaco (FIGURA 75).

A segunda hipótese, relacionada com as interações intermoleculares, pode oferecer algum suporte para a compreensão da melhoria na estabilidade para os sistemas RTV-PVP e RTV-PVP/VA. Como a maioria dos produtos de degradação foram formados a partir de ataques intramoleculares durante as reações de hidrólise (FIGURA 89), as interações intermoleculares podem estar protegendo o RTV amorfizado. Os espectros de FT-IR dos sistemas RTV-PVP e RTV-PVP/VA mostraram pequenos deslocamentos em determinadas bandas que

podem ser um indicativo de interações de hidrogênio em regiões espectrais atribuídas a grupos propensos a reagir (FIGURA 85). A proteção de tais grupos faz com que a degradação seja minimizada. Além disso, esta hipótese corrobora para a ordem de estabilidade do RTV-PVP e RTV-PVP/VA, uma vez que a maior quantidade de interações deve possivelmente estar ocorrendo com o grupo carbonila do grupo vinilpirrolidona. Os espectros de RTV e HPMCAS ou HPMC não mostraram evidências diretas de interações intermoleculares, já que as alterações espectrais foram pequenas.

A terceira hipótese, compatibilidade RTV-polímero, demonstrou ter maior influência na estabilidade térmica do RTV. As dispersões sólidas amorfas compostas por RTV e polímeros próticos (HPMCAS e HPMC) apresentaram maior degradação do que os polímeros apróticos (PVP ou PVP/VA) e o RTV puro. A maior taxa de degradação do RTV ocorreu com HPMC, o qual apresenta a maior grau de substituição de grupos metoxil (28-30%) e hidroxipropoxil (7-12%). Além disso, HPMCAS contêm de 5-9% de acetil e 14-18% de succinoil para o grau LF e 7-11% e 10-14% para o grau MF. Estes polímeros sofrem hidrólise em altas temperaturas e geraram ácido acético e ácido succínico que podem reagir com o princípio ativo.^{138, 151, 152} Como todos os produtos de degradação foram gerados por processos que podem ser catalizados por hidroxilas ou íons de hidrogênio, a maior porcentagem de grupos succinoil está em concordância com o maior nível de degradação encontrado para RTV formulado com HPMCAS LF quando comparado com HPMCAS MF.

2.4.12 - Cinética da degradação térmica e processamento por HME.

Os RTV-ASDs com os polímeros PVP/VA 64, HPMCAS MF e HPMC foram extrusados com sucesso dentro do domínio experimental estudado. As amostras extrusadas tiveram a mesma ordem de degradação encontrada nos

experimentos isotérmicos realizados no TGA, mas com uma taxa de degradação menor. Dentre os sete produtos de degradação encontrados, foram identificados R4, R5 e R6 nas amostras extrusadas e somente RTV-PVP/VA 64 produzido em 130 °C e 140 °C possuíram porcentagem de área cromatográfica inferior a 0,5%.

Embora os experimentos termogravimétricos utilizem menor quantidade de amostra, os resultados demonstraram uma falta de predição da técnica TGA com relação à estabilidade térmica. Portanto, o uso desta abordagem para seleção de polímeros e determinação de formulações adequadas para processamento térmico deve ser cuidadosa. Os experimentos de perda de massa não mostraram adequadamente a ordem de extensão da degradação do RTV formulado com polímeros (FIGURA 69), mas sugeriu apenas que o HPMC acelerou a degradação do RTV. Já os experimentos isotérmicos realizados no TGA, nos quais o teor de RTV foi determinado, forneceram uma ordem de compatibilidade do ativo-polímero e uma compreensão da degradação, mesmo superestimando a extensão de degradação.

A degradação superestimada através nos experimentos termogravimétricos pode também ser observada em outros estudos na literatura.⁵⁹

¹⁵³ Uma das razões para este fato sugere que as diferenças de cinética incluem a variação de temperatura no aquecimento/resfriamento para atingir a temperatura desejada e as diferentes atmosferas em que as amostras são inseridas. Por exemplo, o TGA requer um tempo de exposição da amostra para ir da temperatura ambiente até temperatura desejada. A segunda diferença entre HME e o TGA é o ambiente químico em que as amostras são expostas (purga de ar sintético e N₂). A purga de nitrogênio do sistema no TGA pode ter eliminado compostos voláteis produzidos durante a degradação, contribuindo para uma degradação adicional baseada no princípio de Le Chatelier. O uso de uma estufa convencional para a degradação térmica na etapa de *screening* de dispersões sólidas amorfas pode ser uma abordagem mais apropriada, desde que há pouco consumo de reagentes e os resultados foram mais consistentes com aqueles obtidos com o HME.

2.5 - CONCLUSÕES

2.5 - Conclusões

Mecanismos de estabilização do RTV com respeito à degradação térmica foram investigados utilizando diferentes polímeros. Polímeros apróticos, como PVP e PVP/VA, forneceram uma melhoria da estabilidade térmica do RTV, enquanto os polímeros próticos, HPMCAS MF, HPMCAS LF e HPMC, aceleraram a degradação térmica. Os mecanismos de estabilidade térmica do RTV estão relacionados com os grupos substituintes dos polímeros, em que polímeros próticos, tais como os derivados de celulose possuíram uma tendência a catalisar as reações de degradação do RTV quando comparadas aos polímeros apróticos (PVP e PVP/VA). Poucas evidências mostraram que a estabilidade térmica está associada a mobilidade molecular e foram observados indícios sutis de interações intermoleculares entre RTV e os polímeros.

O RTV produziu sete produtos de degradação em temperaturas elevadas. Os produtos de degradação foram elucidados com erro de massa exata inferiores a 5 ppm. A maioria dos produtos de degradação (R1-R3 e R5-R7) foram oriundos de reações de hidrólises, enquanto o produto de degradação inicial, R4, surgiu a partir da desidratação do RTV. Dentre os produtos de degradação, R4, R5 e R6 estiveram presentes nas dispersões sólidas amorfas preparadas por *hot-melt extrusion*.

Este estudo foi fundamental para entender os mecanismos de degradação térmica do fármaco RTV puro e como a degradação é alterada quando este está em formulações com polímeros de diferentes propriedades físico-químicas.

2.6 - CONCLUSÕES GERAIS

2.6 - Conclusões gerais

O primeiro capítulo deste trabalho demonstrou a importância da aplicação da abordagem multivariada em estudos de degradação forçada. Os fármacos SOF e NTZ foram submetidos a diferentes condições de estresse e a avaliação da estabilidade foi realizada através do teor obtido por HPLC. Foi possível avaliar os degradantes pH, H₂O₂, temperatura, radiação UV, assim como o efeito sinérgico entre as variáveis na degradação dos fármacos SOF e NTZ.

No segundo capítulo foi avaliada a estabilidade térmica do RTV em dispersões sólidas amorfas preparadas por evaporação de solvente e HME utilizando diferentes matrizes poliméricas. A estabilidade do RTV mostrou estar intimamente relacionada com as propriedades químicas do polímero. Polímeros com substituintes próticos forneceram maiores degradações do RTV frente aos polímeros apróticos. Poucos indícios foram observados na relação entre a estabilidade térmica do RTV e mobilidade molecular ou interações intermoleculares fármaco-polímero.

As análises por LC-MS/MS foram imprescindíveis na elucidação estrutural dos produtos de degradação e ajudaram a entender os processos de degradação envolvidos nas condições de estresse.

2.7 - REFERÊNCIAS

2.7 - Referências

1. Jain, D.; Basniwal, P. K.; *Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 86, 11.
2. Nageswara Rao, R.; Nagaraju, V.; *An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 33, 335.
3. Melo, S.; Homem-De-Mello, M.; Silveira, D.; Simeoni, L.; *Advice on degradation products in pharmaceuticals: a toxicological evaluation, PDA journal of pharmaceutical science and technology/PDA* **2013**, 68, 221.
4. C Kogawa, A.; Rn Salgado, H.; *Impurities and forced degradation studies: a review, Current Pharmaceutical Analysis* **2016**, 12, 18.
5. Maggio, R. M.; Calvo, N. L.; Vignaduzzo, S. E.; Kaufman, T. S.; *Pharmaceutical impurities and degradation products: uses and applications of NMR techniques, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 101, 102.
6. Guideline, I. H. T., Impurities in new drug substances Q3A (R2), 2006.
7. Singh, S.; Junwal, M.; Modhe, G.; Tiwari, H.; Kurmi, M.; Parashar, N.; Sidduri, P.; *Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products, TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 49, 71.
8. Guideline, I. H. T.; *Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), current step* **2003**, 4.
9. Chen, W.-H.; Lin, Y.-Y.; Chang, Y.; Chang, K.-W.; Hsia, Y.-C.; *Forced degradation behavior of epidepride and development of a stability-indicating method based on liquid chromatography–mass spectrometry, Journal of Food and Drug Analysis* **2014**, 22, 248.
10. Freitas, N. C. C.; Nascimento, A. P.; *Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor*

- em atenolol comprimidos, Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2015**, 35, 285.
11. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412, acessado em julho de 2022.
 12. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução RE n° 01 de 29 de julho de 2005 – Guia para a realização de estudos de estabilidade, https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0001_29_07_2005.html, acessado em junho de 2022.
 13. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Informe Técnico n° 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE n°1 de 29 de julho de 2005, <http://www.sindusfarma.org.br/informativos/BBPAF03808.doc>, acessado em junho de 2022.
 14. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Consulta pública N° 11, de 23 de Janeiro de 2012, https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/cop0011_23_01_2012.html, acessado em junho de 2022.
 15. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 53, de 4 de dezembro de 2015, http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892, acessado em junho de 2022.

16. WHO Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations: thirty-ninth report, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43157>, acessado em junho de 2022.
17. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução da diretoria colegiado - RDC N° 24, de 14 de junho de 2011, https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0024_14_06_2011.pdf, acessado em junho de 2022.
18. Perguntas & respostas. Assunto: RDC 53/2015 e guia 4/2015, <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-e-respostas-rdc-53-2015-e-guia-04-2015.pdf/view>, acessado em junho de 2022.
19. Q3B(R2): impurities in new drug products, <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/ICH%20Q3B%20R2.pdf> acessado em junho de 2022.
20. Blessy, M.; Patel, R. D.; Prajapati, P. N.; Agrawal, Y. K.; *Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review, Journal of Pharmaceutical Analysis* **2014**, *4*, 159.
21. Guideline, I. H. T.; *Stability testing: photostability testing of new drug substances and products, Q1B, Current Step* **1996**, *4*.
22. Bakshi, M.; Singh, S.; *Development of validated stability-indicating assay methods—critical review, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, *28*, 1011.
23. Bansal, G.; Singh, M.; Jindal, K. C.; Singh, S.; *Ultraviolet-photodiode array and high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric studies on forced degradation behavior of glibenclamide and development of a validated stability-indicating method, Journal of AOAC International* **2008**, *91*, 709.
24. Jelić, D.; *Thermal stability of amorphous solid dispersions*, **2021**, *26*, 238.

25. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, Química Nova* **2006**, 29, 338.
26. Breitzkreitz, M. C.; Souza, A. M. D.; Poppi, R. J.; *Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III, Química Nova* **2014**, 37, 564.
27. Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, Å.; Pettersen, J.; Bergman, R.; *Experimental design and optimization, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1998**, 42, 3.
28. Ferreira, S. L. C.; Bruns, R. E.; Da Silva, E. G. P.; Dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; David, J. M.; De Andrade, J. B.; Breitzkreitz, M. C.; Jardim, I. C. S. F.; Neto, B. B.; *Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, Journal of Chromatography A* **2007**, 1158, 2.
29. Reh, F. J.; *Pareto's principle-The 80-20 rule, BUSINESS CREDIT-NEW YORK THEN COLUMBIA MD-* **2005**, 107, 76.
30. Sakkas, V. A.; Islam, M. A.; Stalikas, C.; Albanis, T. A.; *Photocatalytic degradation using design of experiments: a review and example of the Congo red degradation, Journal of hazardous materials* **2010**, 175, 33.
31. Teófilo, R. F.; Ferreira, M.; *Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, Química nova* **2006**, 29, 338.
32. Silva, K. E. R. D.; Alves, L. D. S.; Soares, M. F. D. L. R.; Passos, R. C. D. S.; Faria, A. R. D.; Rolim-Neto, P. J.; *Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica, Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada* **2009**, 30, 129.
33. Sonawane, S.; Gide, P.; *Application of experimental design for the optimization of forced degradation and development of a validated*

- stability-indicating LC method for luliconazole in bulk and cream formulation, Arabian Journal of Chemistry* **2016**, 9, Supplement 2, S1428.
34. Kurmi, M.; Kumar, S.; Singh, B.; Singh, S.; *Implementation of design of experiments for optimization of forced degradation conditions and development of a stability-indicating method for furosemide, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 96, 135.
35. *An experimental design approach for the forced degradation studies and development of a stability-indicating LC method for eplerenone in tablets, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2011**, 34, 2020.
36. Akar Sen, G.; *Application of full factorial experimental design and response surface methodology for chromite beneficiation by Knelson concentrator, Minerals* **2016**, 6, 5.
37. Ardila, J. A.; De Alvarenga Junior, B. R.; Durango, L. C.; Soares, F. L. F.; Perlatti, B.; De Oliveira Cardoso, J.; Oliveira, R. V.; Forim, M. R.; Carneiro, R. L.; *Design of experiments applied to stress testing of pharmaceutical products: A case study of Albendazole, European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, 165, 105939.
38. Keating, G. M.; Vaidya, A.; *Sofosbuvir: first global approval, Drugs* **2014**, 74, 273.
39. Pan, C.; Chen, Y.; Chen, W.; Zhou, G.; Jin, L.; Zheng, Y.; Lin, W.; Pan, Z.; *Simultaneous determination of ledipasvir, sofosbuvir and its metabolite in rat plasma by UPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, Journal of Chromatography B* **2016**, 1008, 255.
40. 22nd World health organization model list of essential medicines, <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>, acessado em junho de 2022.

41. WHO Model list of essential medicines 22nd list, 2021, <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>, acessado em junho de 2022.
42. Gane , E. J.; Stedman , C. A.; Hyland , R. H.; Ding , X.; Svarovskaia , E.; Symonds , W. T.; Hindes , R. G.; Berrey , M. M.; *Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C, New England Journal of Medicine* **2013**, 368, 34.
43. Summers, B. B.; Beavers, J. W. F.; Klibanov, O. M.; *Sofosbuvir, a novel nucleotide analogue inhibitor used for the treatment of hepatitis C virus, Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2014**, 66, 1653.
44. Swain, D.; Samanthula, G.; *Study on the forced degradation behaviour of ledipasvir: identification of major degradation products using LC–QTOF–MS/MS and NMR, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, 138, 29.
45. Highlights of prescribing information. SOVALDI® (sofosbuvir) tablets, for oral use. SOVALDI® (sofosbuvir) oral pellets, http://www.gilead.com/~media/Files/pdfs/medicines/liver-disease/sovaldi/sovaldi_pi.pdf, acessado em junho de 2022.
46. Malesuik, M. D.; *Nitazoxanida: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade*, **2010**.
47. Rane, V. P.; Sangshetti, J. N.; Patil, K. R.; Yeole, R. D.; Shinde, D. B.; *Stability-indicating LC determination of nitazoxanide in bulk drug and in pharmaceutical dosage form, Chromatographia* **2008**, 67, 455.
48. Fox, L. M.; Saravolatz, L. D.; *Nitazoxanide: A New Thiazolide Antiparasitic Agent, Clinical Infectious Diseases* **2005**, 40, 1173.
49. Hegazy, M.; Kessiba, A.; El Gindy, A. E.; Abdelkawy, M.; *Validated stability indicating RP-HPLC for quantitation of nitazoxanide in presence of its alkaline degradation products and their characterization by HPLC-*

- tandem mass spectrometry, Journal of chromatographic science* **2013**, 52, 1071.
50. Malesuik, M. D.; Gonçalves, H. M. L.; Garcia, C. V.; Trein, M. R.; Nardi, N. B.; Schapoval, E. E. S.; Steppe, M.; *Identification, characterization and cytotoxicity in vitro assay of nitazoxanide major degradation product, Talanta* **2012**, 93, 206.
51. Cimerman, S.; Ladeira, M. C. T.; Iuliano, W. A.; *Blastocistose: nitazoxanida como nova opção terapêutica, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2003**, 36, 415.
52. Narayana, K. L.; Manohara, Y.; *Visible spectrophotometric determination of nitazoxanide in bulk and pharmaceutical dosage forms, Asian Journal of Chemistry* **2007**, 19, 2527.
53. Ali, N. W.; Abbas, S. S.; Zaazaa, H. E.-S.; Abdelrahman, M. M.; Abdelkawy, M.; *Validated stability indicating methods for determination of nitazoxanide in presence of its degradation products, Journal of Pharmaceutical Analysis* **2012**, 2, 105.
54. Gilles, H. M.; Hoffman, P. S.; *Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide, Trends in parasitology* **2002**, 18, 95.
55. Rane, V. P.; Sangshetti, J. N.; Patil, K. R.; Yeole, R. D.; Shinde, D. B.; *Stability-indicating LC determination of nitazoxanide in bulk drug and in pharmaceutical dosage form, Chromatographia* **2008**, 67, 455.
56. Hemphill, A.; Mueller, J.; Esposito, M.; *Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections, Expert opinion on pharmacotherapy* **2006**, 7, 953.
57. Ma, X.; Huang, S.; Lowinger, M. B.; Liu, X.; Lu, X.; Su, Y.; Williams, R. O., 3rd; *Influence of mechanical and thermal energy on nifedipine amorphous solid dispersions prepared by hot melt extrusion: Preparation and physical stability, International journal of pharmaceutics* **2019**, 561, 324.

58. Huang, S.; Williams, R. O., 3rd; *Effects of the preparation process on the properties of amorphous solid dispersions*, *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19*, 1971.
59. Moseson, D. E.; Jordan, M. A.; Shah, D. D.; Corum, I. D.; Alvarenga Jr, B. R.; Taylor, L. S.; *Application and limitations of thermogravimetric analysis to delineate the hot melt extrusion chemical stability processing window*, *Int. J. Pharm.* **2020**, *590*, 119916.
60. Dinunzio, J. C.; Brough, C.; Hughey, J. R.; Miller, D. A.; Williams, R. O.; McGinity, J. W.; *Fusion production of solid dispersions containing a heat-sensitive active ingredient by hot melt extrusion and Kinetisol® dispersing*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2010**, *74*, 340.
61. Moseson, D. E.; Taylor, L. S.; *The application of temperature-composition phase diagrams for hot melt extrusion processing of amorphous solid dispersions to prevent residual crystallinity*, *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *553*, 454.
62. Evans, R. C.; Kyeremateng, S. O.; Asmus, L.; Degenhardt, M.; Rosenberg, J.; Wagner, K. G.; *Development and performance of a highly sensitive model formulation based on torasemide to enhance hot-melt extrusion process understanding and process development*, *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19*, 1592.
63. Li, S.; Tian, Y.; Jones, D. S.; Andrews, G. P.; *Optimising drug solubilisation in amorphous polymer dispersions: rational selection of hot-melt extrusion processing parameters*, *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, 200.
64. Zhao, Y.; Xie, X.; Zhao, Y.; Gao, Y.; Cai, C.; Zhang, Q.; Ding, Z.; Fan, Z.; Zhang, H.; Liu, M.; Han, J.; *Effect of Plasticizers on Manufacturing Ritonavir/Copovidone Solid Dispersions Via Hot-Melt Extrusion: Preformulation, Physicochemical Characterization, and PPharmacokinetics in Rats*, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *127*, 60.

65. Lafontaine, J. S.; Jermain, S. V.; Prasad, L. K.; Brough, C.; Miller, D. A.; Lubda, D.; McGinity, J. W.; Williams, R. O.; *Enabling thermal processing of ritonavir–polyvinyl alcohol amorphous solid dispersions by KinetiSol® Dispersing, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *101*, 72.
66. Kaushik, R.; O'donnell, K.; Singh, G., *Impact of Extrusion Process Parameters on Drug Recovery and Dissolution Performance of Solid Dispersions of Ritonavir and AFFINISOL™ HPMC HME*, DOW Technical Bulletin, 2016.
67. Jelić, D.; Liavitskaya, T.; Vyazovkin, S.; *Thermal stability of indomethacin increases with the amount of polyvinylpyrrolidone in solid dispersion, Thermochimica Acta* **2019**, *676*, 172.
68. Ben Osman, Y.; Liavitskaya, T.; Vyazovkin, S.; *Polyvinylpyrrolidone affects thermal stability of drugs in solid dispersions, International journal of pharmaceutics* **2018**, *551*, 111.
69. Ferreira, M. V.; Filho, L. a. P.; Takeuchi, R. M.; Assunção, R. M. N.; *Thermal decomposition kinetics of ibuprofen and naproxen drugs incorporated in cellulose acetate matrices, Macromolecular Symposia* **2020**, *394*, 2000156.
70. Ellenberger, D. J.; Miller, D. A.; Kucera, S. U.; Williams, R. O. J. a. P.; *Generation of a weakly acidic amorphous solid dispersion of the weak base ritonavir with equivalent in vitro and in vivo performance to norvir tablet,* **2018**, *19*, 1985.
71. Denninger, A.; Westedt, U.; Rosenberg, J.; Wagner, K. G.; *A Rational design of a biphasic dissolution setup — modelling of biorelevant kinetics for a ritonavir hot-melt extruded amorphous solid dispersion,* **2020**, *12*, 237.

72. Lafontaine, J. S.; McGinity, J. W.; Williams, R. O. J. a. P.; *Challenges and strategies in thermal processing of amorphous solid dispersions: a review*, **2016**, *17*, 43.
73. Karagianni, A.; Kachrimanis, K.; Nikolakakis, I. J. P.; *Co-amorphous solid dispersions for solubility and absorption improvement of drugs: Composition, preparation, characterization and formulations for oral delivery*, **2018**, *10*, 98.
74. Kawabata, Y.; Wada, K.; Nakatani, M.; Yamada, S.; Onoue, S.; *Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications*, *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *420*, 1.
75. Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. J. I. P.; *Drug solubility: importance and enhancement techniques*, **2012**, *2012*.
76. Pawar, S. R.; Barhate, S. D. J. J. O. D. D.; Therapeutics; *Solubility enhancement (solid dispersions) novel boon to increase bioavailability*, **2019**, *9*, 583.
77. Wang, H.; Li, Q.; Reyes, S.; Zhang, J.; Xie, L.; Melendez, V.; Hickman, M.; Kozar, M. P. J. M. R.; Treatment; *Formulation and particle size reduction improve bioavailability of poorly water-soluble compounds with antimalarial activity*, **2013**, *2013*.
78. Zeng, Q.; Xie, L.; Zhang, J.; Vuong, C.; Potter, B.; Aylor, S.; Sousa, J.; Black, C.; Li, Q. J. M. M.; *Improving relative bioavailability of oral imidazolidinedione by reducing particle size using homogenization and Ultra-Sonication*, **2019**, *184*, 106.
79. Chaudhari, S. P.; Dugar, R. P. J. J. O. D. D. S.; Technology; *Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs*, **2017**, *41*, 68.
80. Mendonsa, N.; Almutairy, B.; Kallakunta, V. R.; Sarabu, S.; Thipsay, P.; Bandari, S.; Repka, M. a. J. J. O. D. D. S.; Technology; *Manufacturing*

- strategies to develop amorphous solid dispersions: An overview*, **2019**, 101459.
81. Tran, P. H.; Tran, T. T. J. I. J. O. P.; *Dosage form designs for the controlled drug release of solid dispersions*, **2020**, 119274.
82. Sawicki, E.; Schellens, J.; Beijnen, J.; Nuijen, B. J. C. T. R.; *Inventory of oral anticancer agents: pharmaceutical formulation aspects with focus on the solid dispersion technique*, **2016**, 50, 247.
83. Ma, X.; Williams Iii, R. O. J. J. O. D. D. S.; *Technology; Characterization of amorphous solid dispersions: An update*, **2019**, 50, 113.
84. Yu, L. J. a. D. D. R.; *Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization*, **2001**, 48, 27.
85. Patil, H.; Tiwari, R. V.; Repka, M. a. J. a. P.; *Hot-melt extrusion: from theory to application in pharmaceutical formulation*, **2016**, 17, 20.
86. Maniruzzaman, M.; Nokhodchi, A. J. D. D. T.; *Continuous manufacturing via hot-melt extrusion and scale up: regulatory matters*, **2017**, 22, 340.
87. Thiry, J.; Krier, F.; Evrard, B. J. I. J. O. P.; *A review of pharmaceutical extrusion: critical process parameters and scaling-up*, **2015**, 479, 227.
88. Patil, H.; Kulkarni, V.; Majumdar, S.; Repka, M. a. J. I. J. O. P.; *Continuous manufacturing of solid lipid nanoparticles by hot melt extrusion*, **2014**, 471, 153.
89. Yang, Z.; Hu, Y.; Tang, G.; Dong, M.; Liu, Q.; Lin, X. J. J. O. D. D. S.; *Technology; Development of ibuprofen dry suspensions by hot melt extrusion: Characterization, physical stability and pharmacokinetic studies*, **2019**, 54, 101313.
90. Repka, M. A.; Bandari, S.; Kallakunta, V. R.; Vo, A. Q.; Mcfall, H.; Pimparade, M. B.; Bhagurkar, A. M. J. I. J. O. P.; *Melt extrusion with poorly soluble drugs—an integrated review*, **2018**, 535, 68.
91. Zhang, Q.; Zhao, Y.; Zhao, Y.; Ding, Z.; Fan, Z.; Zhang, H.; Liu, M.; Wang, Z.; Han, J.; *Effect of HPMCAS on recrystallization inhibition of nimodipine*

- solid dispersions prepared by hot-melt extrusion and dissolution enhancement of nimodipine tablets, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, 172, 118.
92. Fule, R.; Paithankar, V.; Amin, P. J. I. J. O. P.; *Hot melt extrusion based solid solution approach: Exploring polymer comparison, physicochemical characterization and in-vivo evaluation*, **2016**, 499, 280.
93. Prasad, E.; Islam, M. T.; Goodwin, D. J.; Megarry, A. J.; Halbert, G. W.; Florence, A. J.; Robertson, J. J. a. M.; *Development of a hot-melt extrusion (HME) process to produce drug loaded Affinisol™ 15LV filaments for fused filament fabrication (FFF) 3D printing*, **2019**, 29, 100776.
94. Maniruzzaman, M.; Boateng, J. S.; Snowden, M. J.; Douroumis, D. J. I. P.; *A review of hot-melt extrusion: process technology to pharmaceutical products*, **2012**, 2012.
95. Tahir, F.; Islam, M. T.; Mack, J.; Robertson, J.; Lovett, D. J. C.; Engineering, C.; *Process monitoring and fault detection on a hot-melt extrusion process using in-line Raman spectroscopy and a hybrid soft sensor*, **2019**, 125, 400.
96. Aho, J.; Boetker, J. P.; Baldursdottir, S.; Rantanen, J. J. I. J. O. P.; *Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms*, **2015**, 494, 623.
97. Kanaujia, P.; Poovizhi, P.; Ng, W.; Tan, R. J. P. T.; *Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs*, **2015**, 285, 2.
98. Evans, R. C.; Bochmann, E. S.; Kyeremateng, S. O.; Gryczke, A.; Wagner, K. G. J. E. J. O. P.; Biopharmaceutics; *Holistic QbD approach for hot-melt extrusion process design space evaluation: Linking materials science, experimentation and process modeling*, **2019**, 141, 149.

99. Wahl, P. R.; Treffer, D.; Mohr, S.; Roblegg, E.; Koscher, G.; Khinast, J. G.; *Inline monitoring and a PAT strategy for pharmaceutical hot melt extrusion, International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 455, 159.
100. Censi, R.; Gigliobianco, M. R.; Casadidio, C.; Di Martino, P. J. P.; *Hot melt extrusion: Highlighting physicochemical factors to be investigated while designing and optimizing a hot melt extrusion process*, **2018**, 10, 89.
101. Lionberger, R. A.; Lee, S. L.; Lee, L.; Raw, A.; Lawrence, X. Y.; *Quality by design: concepts for ANDAs, The AAPS journal* **2008**, 10, 268.
102. Crowley, M. M.; Zhang, F.; Repka, M. A.; Thumma, S.; Upadhye, S. B.; Kumar Battu, S.; Mcginity, J. W.; Martin, C. J. D. D.; Pharmacy, I.; *Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: part I*, **2007**, 33, 909.
103. Hiremath, S. N.; Bhirud, C. H. J. J. O. T. U. M. S.; *Development and validation of a stability indicating HPLC method for the simultaneous analysis of lopinavir and ritonavir in fixed-dose combination tablets*, **2015**, 10, 271.
104. Mahajan, M.; Rajput, S. J. D. D. S.; *Development of mesoporous silica nanoparticles of ritonavir with enhanced bioavailability potential: formulation optimization, in-vitro and in-vivo evaluation*, **2018**, 22, 23.
105. Kumar, K. V.; Sudhakar, M.; Reddy, Y. P.; Malleshwari, P.; Hafeez, S. J. I. J. P. R. R.; *RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of lopinavir and ritonavir in dosage form and in plasma*, **2014**, 3, 1.
106. Koppala, S.; Panigrahi, B.; Raju, S. V.; Padmaja Reddy, K.; Ranga Reddy, V.; Anireddy, J. S.; *Development and validation of a simple, sensitive, selective and stability-indicating RP-UPLC method for the quantitative determination of ritonavir and its related compounds*, **2015**, 53, 662.
107. Bauer, J.; Spanton, S.; Henry, R.; Quick, J.; Dziki, W.; Porter, W.; Morris, J.; *Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism, Pharmaceutical research* **2001**, 18, 859.

108. Tiwari, R. N.; Bonde, C. G.; *LC, LC-MS/TOF and MSn studies for the separation, identification and characterization of degradation products of ritonavir*, **2011**, 3, 1674.
109. Garren, K. W.; Rahim, S.; Marsh, K.; Morris, J. B. J. J. O. P. S.; *Bioavailability of generic ritonavir and lopinavir/ritonavir tablet products in a dog model*, **2010**, 99, 626.
110. Zhao, Y.; Xie, X.; Zhao, Y.; Gao, Y.; Cai, C.; Zhang, Q.; Ding, Z.; Fan, Z.; Zhang, H.; Liu, M.; Han, J.; *Effect of plasticizers on manufacturing ritonavir/copovidone solid dispersions via hot-melt extrusion: Preformulation, physicochemical characterization, and pharmacokinetics in rats*, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2019**, 127, 60.
111. Kaushik, R.; O'donnell, K. P. J. T. W. P.; *Physical, chemical, and performance assessment of amorphous solid dispersions of ritonavir prepared by hot melt extrusion*.
112. Kaushik, R.; O'donnell, K.; Singh, G.; *Impact of extrusion process parameters on drug recovery and dissolution performance of solid dispersions of ritonavir and AFFINISOL™ HPMC HME*, **2016**.
113. Desai, S.; Disouza, J.; Musle, K.; Avinash, H. J. I. J. P. P. S.; *Solubility enhancement of ritonavir by hot melt extrusion*, **2016**, 8, 309.
114. Highlights of prescribing information. Initial U.S. Approval: 2014, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/206619lbl.pdf, acessado em junho de 2022.
115. Kanzer, J.; Hupfeld, S.; Vasskog, T.; Tho, I.; Hölig, P.; Mägerlein, M.; Fricker, G.; Brandl, M. J. J. O. P.; Analysis, B.; *In situ formation of nanoparticles upon dispersion of melt extrudate formulations in aqueous medium assessed by asymmetrical flow field-flow fractionation*, **2010**, 53, 359.

116. Klein, C. E.; Chiu, Y. L.; Awni, W.; Zhu, T.; Heuser, R. S.; Doan, T.; Breitenbach, J.; Morris, J. B.; Brun, S. C.; Hanna, G. J.; *The tablet formulation of lopinavir/ritonavir provides similar bioavailability to the soft-gelatin capsule formulation with less pharmacokinetic variability and diminished food effect, Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **2007**, *44*, 401.
117. Kariduraganavar, M. Y.; Kittur, A. A.; Kamble, R. R., *Polymer synthesis and processing*; Elsevier, 2014, pp. 1-31.
118. Teodorescu, M.; Bercea, M. J. P.-P. T.; Engineering; *Poly (vinylpyrrolidone)—a versatile polymer for biomedical and beyond medical applications*, **2015**, *54*, 923.
119. Polymer properties database, <http://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/PVP.html>, acessado em junho de 2022.
120. Dornelas, C. B.; Resende, D. K.; Tavares, M. I. B.; Gomes, A. S.; Cabral, L. M.; *Preparação e avaliação reacional de nanocompósitos de PVP K-30 - montmorilonita (natural e organicamente modificada) por difração de raios X, Polymers (Basel)*, *18*, 187.
121. Kirsh, Y. E., *Water soluble poly-N-vinylamides: synthesis and physicochemical properties*, John Wiley & Sons, 1998.
122. Dürig, T.; Karan, K., *Binders in wet granulation*; Elsevier, 2019, pp. 317-349.
123. Additives, E. P. O. F.; Journal, N. S. a. T. F. J. E.; *Scientific opinion on the safety of polyvinylpyrrolidone-vinyl acetate copolymer for the proposed uses as a food additive*, **2010**, *8*, 1948.
124. Chan, S.-Y.; Chung, Y.-Y.; Cheah, X.-Z.; Tan, E. Y.-L.; Quah, J. J. a. J. O. P. S.; *The characterization and dissolution performances of spray dried solid dispersion of ketoprofen in hydrophilic carriers*, **2015**, *10*, 372.

125. Technical information. Kollidon VA 64, <https://www.stobec.com/DATA/PRODUIT/2289~v~fiche-technique.pdf>, acessado em junho de 2022.
126. Kadajji, V. G.; Betageri, G. V. J. P.; *Water soluble polymers for pharmaceutical applications*, **2011**, 3, 1972.
127. Da Silva Júnior, W. F.; De Oliveira Pinheiro, J. G.; Moreira, C. D.; De Souza, F. J.; De Lima, Á. A., *Alternative technologies to improve solubility and stability of poorly water-soluble drugs*; Elsevier, 2017, pp. 281-305.
128. Nandgaonkar, A.; Krause, W.; Lucia, L., *Fabrication of cellulosic composite scaffolds for cartilage tissue engineering*; Elsevier, 2016, pp. 187-212.
129. Kaur, G.; Grewal, J.; Jyoti, K.; Jain, U. K.; Chandra, R.; Madan, J., *Oral controlled and sustained drug delivery systems: concepts, advances, preclinical, and clinical status*; Elsevier, 2018, pp. 567-626.
130. Ishikawa, T.; Watanabe, Y.; Takayama, K.; Endo, H.; Matsumoto, M. J. I. J. O. P.; *Effect of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) on the release profiles and bioavailability of a poorly water-soluble drug from tablets prepared using macrogol and HPMC*, **2000**, 202, 173.
131. Quinten, T.; De Beer, T.; Remon, J.; Vervaet, C. J. I. M. P., Design; Nova, A. N. Y.; *Overview of injection molding as a manufacturing technique for pharmaceutical application*, **2011**, 1.
132. Al-Tabakha, M. M. J. J. O. P.; Sciences, P.; *HPMC capsules: current status and future prospects*, **2010**, 13, 428.
133. Joshi, S.; Chen, B., Swelling, dissolution and disintegration of HPMC in aqueous media, 2009.
134. Ma, D.; Djemai, A.; Gendron, C. M.; Xi, H.; Smith, M.; Kogan, J.; Li, L. J. D. D.; Pharmacy, I.; *Development of a HPMC-based controlled release formulation with hot melt extrusion (HME)*, **2013**, 39, 1070.

135. Huang, S.; O'donnell, K. P.; Keen, J. M.; Rickard, M. A.; McGinity, J. W.; Williams, R. O.; *A new extrudable form of hypromellose: AFFINISOL™ HPMC HME*, *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, 106.
136. Gupta, S. S.; Meena, A.; Parikh, T.; Serajuddin, A. T. M.; *Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion, I: polyvinylpyrrolidone and related polymers*, *J. Excip. Food Chem.* **2014**, *32*.
137. Newman, A., *Pharmaceutical amorphous solid dispersions*, John Wiley & Sons, 2015.
138. Sarode, A. L.; Obara, S.; Tanno, F. K.; Sandhu, H.; Iyer, R.; Shah, N.; *Stability assessment of hypromellose acetate succinate (HPMCAS) NF for application in hot melt extrusion (HME)*, *Carbohydrate Polymers* **2014**, *101*, 146.
139. Tarcha, P. J., *Polymers for controlled drug delivery*, CRC press, 1990.
140. Al-Obaidi, H.; Buckton, G. J. a. P.; *Evaluation of griseofulvin binary and ternary solid dispersions with HPMCAS*, **2009**, *10*, 1172.
141. Repka, M. A.; Langley, N.; Dinunzio, J., *Melt extrusion: materials, technology and drug product design*, Springer Science & Business Media, 2013.
142. Templeton, A. C.; Byrn, S. R.; Haskell, R. J.; Prisinzano, T. E., *Discovering and developing molecules with optimal drug-like properties*; Springer New York, 1st ed., 2015, pp. 345–381.
143. Siritwannakij, N.; Heimbach, T.; Serajuddin, A. T. M.; *Aqueous dissolution and dispersion behavior of polyvinylpyrrolidone vinyl acetate-based amorphous solid dispersion of ritonavir prepared by hot-melt extrusion with and without added surfactants*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**.
144. Narala, S.; Ampati, R.; Nanam, R.; *Solubility enhancement of ritonavir: co-cristalization* *J. Pharm. Res.* **2019**, *8*, 630.

145. Dhore, P. W.; Dave, V. S.; Saoji, S. D.; Bobde, Y. S.; Mack, C.; Raut, N. A.; *Enhancement of the aqueous solubility and permeability of a poorly water soluble drug ritonavir via lyophilized milk-based solid dispersions, Pharmaceutical Development and Technology* **2017**, 22, 90.
146. Riekes, M. K.; Kuminek, G.; Rauber, G. S.; De Campos, C. E. M.; Bortoluzzi, A. J.; Stulzer, H. K.; *HPMC as a potential enhancer of nimodipine biopharmaceutical properties via ball-milled solid dispersions, Carbohydrate Polymers* **2014**, 99, 474.
147. Oh, C. M.; Heng, P. W.; Chan, L. W.; *Influence of hydroxypropyl methylcellulose on metronidazole crystallinity in spray-congealed polyethylene glycol microparticles and its impact with various additives on metronidazole release, AAPS PharmSciTech* **2015**, 16, 1357.
148. Rahma, A.; Munir, M. M.; Khairurrijal; Prasetyo, A.; Suendo, V.; Rachmawati, H.; *Intermolecular interactions and the release pattern of electrospun curcumin-polyvinyl(pyrrolidone) fiber, Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2016**, 39, 163.
149. Baganizi, D. R.; Nyairo, E.; Duncan, S. A.; Singh, S. R.; Dennis, V. A.; *Interleukin-10 conjugation to carboxylated PVP-coated silver nanoparticles for improved stability and therapeutic efficacy, Nanomaterials (Basel)* **2017**, 7, 165.
150. Rao, R. N.; Ramachandra, B.; Vali, R. M.; Raju, S. S.; *LC-MS/MS studies of ritonavir and its forced degradation products, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, 53, 833.
151. Dong, Z.; Choi, D. S.; *Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate: potential drug-exipient incompatibility, AAPS PharmSciTech* **2008**, 9, 991.
152. Peng, T.; She, Y.; Zhu, C.; Shi, Y.; Huang, Y.; Niu, B.; Bai, X.; Pan, X.; Wu, C.; *Influence of polymers on the physical and chemical stability of*

- spray-dried amorphous solid dispersion: dipyridamole degradation induced by enteric polymers, AAPS PharmSciTech* **2018**, 19, 2620.
153. Huang, S.; O'donnell, K. P.; Delpon De Vaux, S. M.; O'brien, J.; Stutzman, J.; Williams, R. O.; *Processing thermally labile drugs by hot-melt extrusion: the lesson with gliclazide, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, 119, 56.

Apêndice 1

TABELA 28 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental do SOF realizado sem a presença de luz UV.

Matriz X (17x11)											
b0	b1	b2	b3	b11	b22	b33	b12	b13	b23	b123	y (%)
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	2,37
1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	3,83
1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	1,20
1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	2,40
1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	3,12
1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	5,42
1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	6,48
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7,85
1	-1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	0	21,61
1	1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	0	1,19
1	0	-1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	2,06
1	0	1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	4,83
1	0	0	-1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0,52
1	0	0	1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	27,28
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,07
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,22
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,75

Apêndice 2

TABELA 29 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental do SOF realizado na presença de luz UV.

Matriz X (10x6)						
b0	b1	b2	b11	b22	b12	y (%)
1	-1	-1	1	1	1	1,57
1	1	-1	1	1	-1	0,00
1	-1	1	1	1	-1	3,35
1	1	1	1	1	1	0,00
1	-1,63	0	2,66	0	0	27,36
1	1,63	0	2,66	0	0	0,00
1	0	-1,63	0	2,66	0	0,00
1	0	1,63	0	2,66	0	0,00
1	0	0	0	0	0	0,00
1	0	0	0	0	0	0,00

Apêndice 3

TABELA 30 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental da NTZ realizado sem a presença de luz UV.

Matriz X											
b0	b1	b2	b3	b11	b22	b33	b12	b13	b23	b123	y (%)
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	1,41
1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	2,16
1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	5,62
1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	4,99
1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	1,75
1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	9,68
1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	5,78
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16,29
1	-1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	0	7,08
1	1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	0	13,60
1	0	-1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	3,29
1	0	1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	0	10,23
1	0	0	-1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	3,65
1	0	0	1,63	0	0	2,66	0	0	0	0	43,03
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,58
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,65
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,78

Apêndice 4

TABELA 31 – Matriz X dos coeficientes e do vetor y (respostas) para o planejamento experimental da NTZ realizado na presença de luz UV.

Matriz X (10x6)						
b0	b1	b2	b11	b22	b12	y (%)
1	-1	-1	1	1	1	3,19
1	1	-1	1	1	-1	0,00
1	-1	1	1	1	-1	0,00
1	1	1	1	1	1	6,39
1	-1,63	0	2,66	0	0	2,21
1	1,63	0	2,66	0	0	9,97
1	0	-1,63	0	2,66	0	2,39
1	0	1,63	0	2,66	0	4,25
1	0	0	0	0	0	3,01
1	0	0	0	0	0	3,27

Apêndice 5

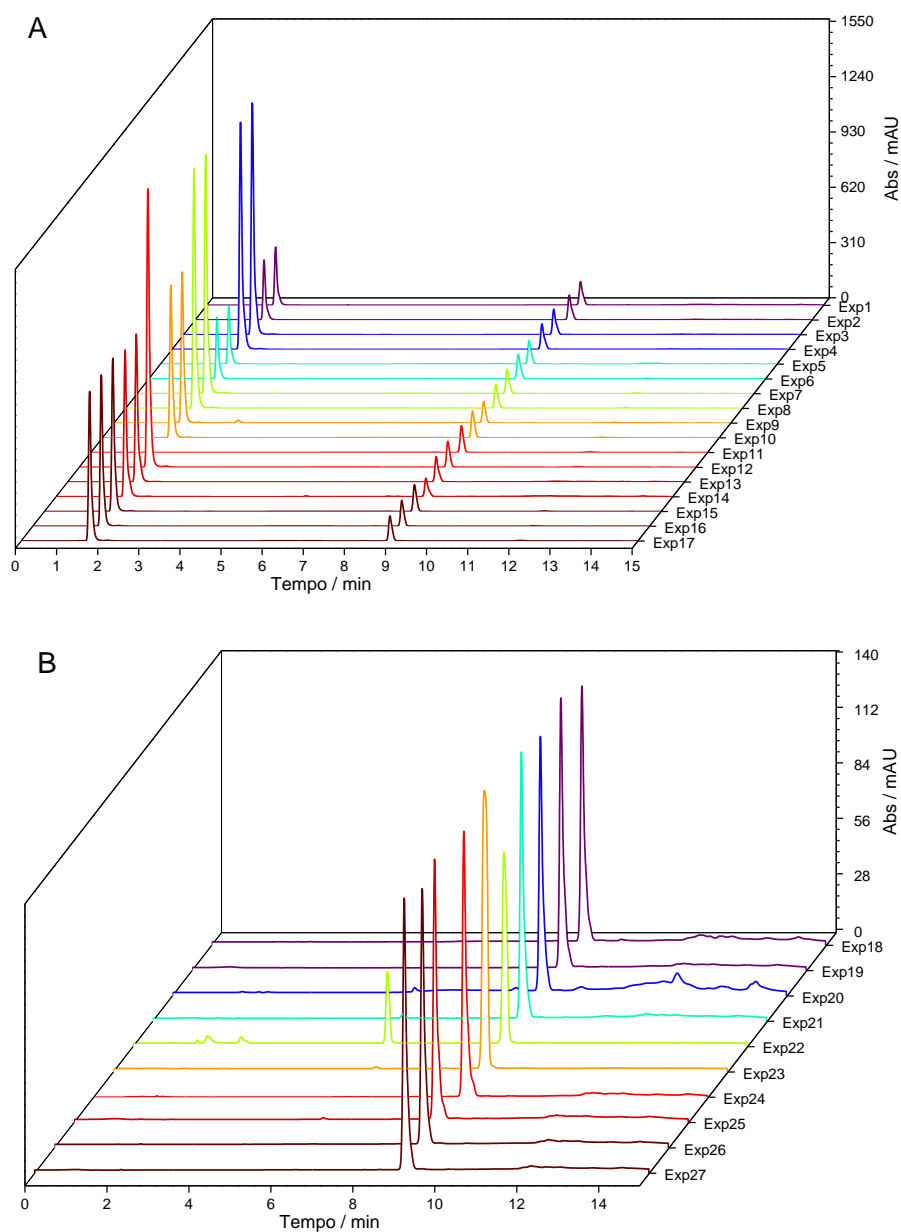


FIGURA 90 – Perfis cromatográficos na diferentes condições de degradação do planejamento experimental para o SOF. A) Experimentos 1-17. B) Experimentos 18-27.

Apêndice 6

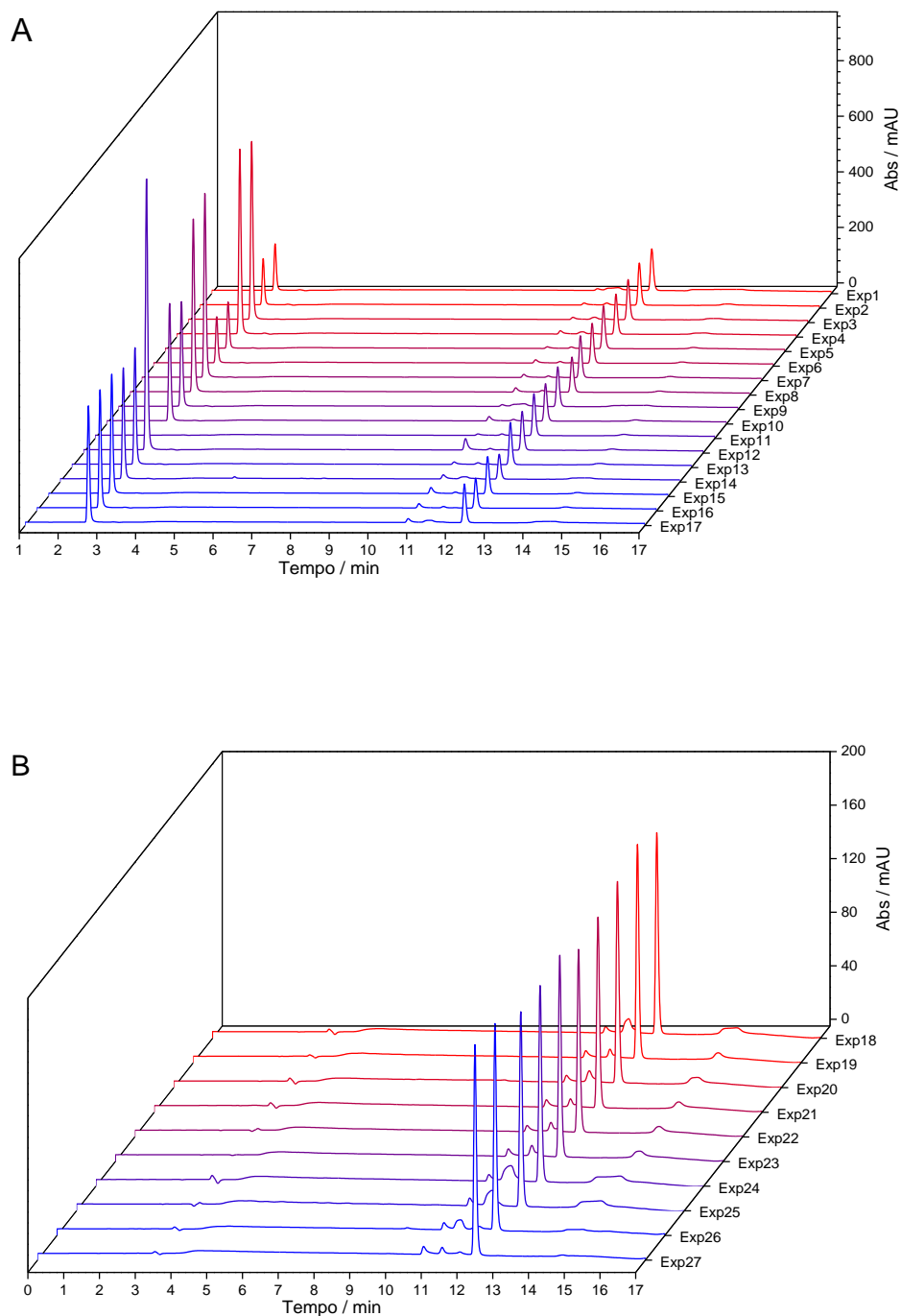


FIGURA 91 – Perfis cromatográficos na diferentes condições de degradação do planejamento experimental para a NTZ. A) Experimentos 1-17. B) Experimentos 18-27.