

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Matheus Wagner Lago

**Cápsulas de Tipranavir: Validação de método indicativo de  
estabilidade por eletroforese capilar de zona e identificação de  
produtos de oxidação**

Santa Maria, RS  
2017

**Matheus Wagner Lago**

**CÁPSULAS DE TIPRANAVIR: VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Inês Horn Adams

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lago, Matheus Wagner

Cápsulas de Tipranavir: Validação de método indicativo de estabilidade por eletroforese capilar de zona e identificação de produtos de oxidação / Matheus Wagner  
Lago.- 2017.

74 p.; 30 cm

Orientadora: Andréa Inês Horn Adams

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Tipranavir 2. Estabilidade 3. Eletroforese capilar de zona 4. Oxidação 5. Produtos de degradação I. Adams, Andréa Inês Horn II. Título.

**Matheus Wagner Lago**

**CÁPSULAS DE TIPRANAVIR: VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 24 de agosto de 2017:**

---

**Andréa Inês Horn Adams, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Cristiane Franco Codevilla, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Marcelo Donadel Malesuik, Dr. (Unipampa)**

Santa Maria, RS  
2017

## DEDICATÓRIA

*Dedico a minha família e a todos que contribuíram em minha jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e ao Laboratório de Avaliação Biofarmacêutica e Controle de Qualidade (LABCQ) pela possibilidade de execução desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa I. H. Adams, por ter me orientado durante o mestrado, pela disponibilidade e contribuição para meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paola de A. Mello, do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA), pela colaboração e possibilidade de utilização do espectrômetro de massas de alta resolução.

Ao Prof. Dr. Thiago Belarmino pelo apoio e colaboração quanto a purificação do fármaco e elucidação estrutural a partir dos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho e ao Henrique Faccin do Laboratório De Análises Químicas (LACHEM) pela colaboração nesse trabalho.

À farmacêutica Cláudia Sala Andrade, do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) pela ajuda na obtenção de cápsulas de tipranavir.

Ao Laboratório Farmoquímico Cristália, que através do farmacêutico Dr. Roberto Debom Moreira, concedeu a substância química de referência do tipranavir, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) de Santa Maria/RS, pelas análises em espectrofotometria na região do IV.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que ao transmitirem seus conhecimentos se tornando corresponsáveis por minha formação profissional e pessoal.

À Ana P. Christ, colega de laboratório que me passou os conhecimentos sobre eletroforese capilar necessários para realização desse trabalho e à Mariane Lago Friedrich, IC e colega de laboratório por toda ajuda e empenho na realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro necessário para realização desse estudo.

Aos meus pais, Eliseu Lago e Vera Lucia Wagner Lago por todo apoio e constante suporte que me possibilitaram concluir mais uma etapa da minha vida.

A todos os demais que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*Se eu vi mais longe foi por estar em pé  
sobre os ombros de gigantes.*

(Isaac Newton)



## RESUMO

### CÁPSULAS DE TIPRANAVIR: VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO

AUTOR: Matheus Wagner Lago

ORIENTADORA: Andréa Inês Horn Adams

O tipranavir (TPV) é um dos mais novos fármacos da classe dos inibidores de protease, indicado para pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana que apresentam falha terapêutica a outros antirretrovirais dessa classe. É disponibilizado como cápsula mole de 250 mg e solução oral de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Embora seja comercializado desde 2005, ainda são inexistentes em farmacopeias métodos analíticos para análise do fármaco em matéria-prima e formulações, assim como estudos sobre sua estabilidade. Face ao exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar método quantitativo por eletroforese capilar de zona para a análise do TPV em cápsulas e identificar possíveis produtos de degradação, obtidos nos estudos de degradação forçada. A substância química de referência foi caracterizada por espectrofotometria na região do infravermelho, por espectrofotometria na região do ultravioleta e por espectrometria de massas de alta resolução. Adicionalmente, realizou-se a identificação de uma impureza evidenciada na matéria-prima por espectrometria de massas de alta resolução, tendo sido constatado que a impureza consiste em um produto decorrente da oxidação do TPV. O método de doseamento desenvolvido atendeu os requisitos vigentes, tendo apresentado linearidade na faixa de 20 a 200 µg mL<sup>-1</sup>, exatidão (percentual de recuperação de 100,50% ± 1,57%, n=9), precisão (DPR entre-dias = 1,59%, n=12), e seletividade, sugerida pela pureza dos picos do analito nos estudos de degradação forçada. A robustez foi avaliada por ensaio fatorial (2<sup>3</sup>), e os resultados indicaram que o método é robusto frente a pequenas modificações na voltagem, temperatura e concentração do tampão. Pelo estudo de degradação forçada evidenciou-se que a oxidação é a rota de degradação mais rápida do TPV. Desse modo, determinou-se a cinética de degradação em meio oxidante, e identificou-se o produto de degradação majoritário nessa condição. Face aos resultados, cuidados na escolha de adjuvantes e embalagens são relevantes para evitar a oxidação do fármaco.

**Palavras-chave:** Tipranavir; estabilidade; eletroforese capilar de zona; oxidação; produtos de degradação.

## ABSTRACT

### TIPRANAVIR CAPSULES: VALIDATION OF A STABILITY INDICATING CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD AND IDENTIFICATION OF OXIDATION PRODUCTS

AUTHOR: Matheus Wagner Lago

ADVISOR: Andréa Inês Horn Adams

Tipranavir (TPV) is one of the newest drugs of the protease inhibitors class, which is indicated to patients with human immunodeficiency virus, who present therapeutic failure to other antiretrovirals of this class. It is available as a 250 mg capsule and 100 mg.mL<sup>-1</sup> oral solution. Although commercially available since 2005, are not yet available in pharmacopoeias analytical methods for drug analysis in raw materials and formulations, as well as studies on its stability. The objective of this study was to develop and validate a quantitative capillary zone electrophoresis method for the analysis of TPV in capsules and to identify possible degradation products obtained by forced degradation studies. The reference substance was characterized by infrared spectrophotometry, ultraviolet spectrophotometry and high resolution mass spectrometry. Additionally, an impurity evidenced in the active pharmaceutical ingredient was identified by high resolution mass spectrometry and consisted of a product related to the oxidation of the TPV. The method developed met the current requirements, presenting linearity in the range of 20 to 200 µg mL<sup>-1</sup>, accuracy (recovery percentage of 100.50% ± 1.57%, n = 9), precision (interday RSD = 1.59%, n = 12), and specificity, which was evidenced by the peak purity in forced degradation studies. Robustness was assessed by 2<sup>3</sup> factorial design factorial and the results indicated that the method is robust even with small modifications in voltage, temperature and buffer concentration. By the forced degradation study, it was evidenced that the oxidation is the faster route of TPV degradation. Thus, the kinetics of degradation in oxidizing medium was determined, and the major degradation product in that condition was identified. In view of the results, care in the choice of excipients and packages is relevant to avoid oxidation of the drug.

**Keywords:** Tipranavir; stability; CZE method; oxidation; degradation products.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 3.1 -	Ciclo de vida e replicação do HIV.....	19
Figura 3.2 -	Estrutura química do TPV.....	21
Figura 3.3 -	Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.....	28

### CAPÍTULO 1

Figura 4.1 -	Espectro de absorção na região do UV para o TPV em meio orgânico, ácido e básico.....	33
Figura 4.2 -	Espectro de absorção na região do IV para o TPV SQR.....	34
Figura 4.3 -	Espectro de massas de alta resolução do TPV.....	36

### CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Chemical structure of tipranavir.....	40
Figura 2 -	Results for the optimization of method parameters.....	49
Figura 3 -	Electropherograms obtained during forced degradation studies....	51
Figura 4 -	Pareto chart representing the effects produced by single factors and their interactions on the TPV assay.....	53
Figura 5 -	High resolution mass spectrum of DP1 ions.....	55
Figura 6 -	6 Proposed chemical structure of DP1 and fragmentation pattern .	56
Figura 7 -	Full-scan obtained from isolated impurity of TPV standard.....	57

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 3.1 - Parâmetros avaliados para a validação de métodos analíticos, de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.....	26
---	----

### CAPÍTULO 1

Tabela 4.1 - Atribuição para as bandas de absorção na região do infravermelho para o TPV SQR.....	35
---	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Stress conditions used for forced degradation test and residual content of TPV at each condition.....	50
Tabela 2 - Results from the recovery study for the CZE method.....	52
Tabela 3 - Results for the repeatability and intermediate precision of the CZE method.....	52
Tabela 4 - Data obtained from oxidative degradation kinetic study.....	54
Tabela 5 - Data obtained from HRMS analysis.....	58

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 3.1 - Resumo dos métodos cromatográficos para o doseamento do tipranavir disponíveis na literatura.....	24
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGE	Eletrólito de Corrida
CAS	Chemical Abstracts Service
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
C <sub>max</sub>	Concentração Plasmática Máxima
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodos
DP1	Produto de Degradação 1
DP2	Produto de Degradação 2
DPR	Desvio Padrão Relativo
EOF	Fluxo Eletrosmótico
ESI	Eletrospray
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
ICH	International Conference on Harmonisation
IMP	Impureza
IP	Inibidor de Protease
IS	Padrão Interno
IV	Infravermelho
k	Constante cinética de degradação
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS/MS	Espectrometria de Massas
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	Detector de Arranjo de Fotodiodos
PI	Inibidor de Protease
Q-TOF	Quadrupolo-Tempo de Voo
r	Coeficiente de Correlação de Pearson
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RH	Umidade Relativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	Desvio Padrão Relativo
SD	Desvio Padrão
SEDDS	Sistemas auto-emulsionáveis de entrega de fármacos
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SQR	Substância Química de Referência
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TPV	Tipranavir
UPLC	Cromatografia a Líquido de Ultra Performance
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVC	Ultravioleta C

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) .....	18
3.2 TIPRANAVIR .....	20
3.2.1 Aspectos gerais.....	20
3.2.2 Características físico-químicas.....	21
3.2.3 Mecanismo de ação .....	22
3.2.4 Farmacocinética .....	22
3.2.5 Reações adversas.....	23
3.2.6 Métodos analíticos quantitativos para o tipranavir.....	23
3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	25
3.4 ELETROFORESE CAPILAR .....	26
3.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE .....	28
<b>4 CAPÍTULO 1 - ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA DE TIPRANAVIR</b> .....	<b>31</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	31
4.2 DESCRIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	31
4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA DE TIPRANAVIR .....	32
4.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	32
4.3.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) .....	33
4.3.3 Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).....	35
4.4 CONCLUSÕES .....	37
4.5 REFERÊNCIAS.....	37
<b>5 CAPÍTULO 2 - TIPRANAVIR: CZE STABILITY-INDICATING METHOD FOR SOFT CAPSULES AND IDENTIFICATION OF OXIDATION PRODUCTS BY Q-TOF</b> .....	<b>39</b>
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>



## 1 INTRODUÇÃO

---

A síndrome da imunodeficiência adquirida, abreviada pela sigla SIDA ou ainda AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) na língua inglesa, é uma doença que debilita o sistema imunológico sendo causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GIUSEPPINA; RUGGIERI, 2010; LANGE; ANANWORANICH, 2014). O HIV é um retrovírus, com genoma ácido ribonucleico (RNA), da família *Retroviridae* (retrovírus) e subfamília *Lentiviridae* (GIUSEPPINA; RUGGIERI, 2010). Este vírus tem como alvo principal os linfócitos T CD4+, fazendo com que haja uma diminuição da resposta imune, devido a uma alteração do DNA desta célula. Assim, o HIV assume o maquinário celular e se multiplica aumentando a carga viral do paciente e causando continuidade da infecção (GIUSEPPINA; RUGGIERI, 2010).

A terapia antirretroviral tem como objetivo reduzir a carga viral no paciente, determinada pela quantidade de RNA viral presente em seu sangue, e para esse fim é comum o tratamento com uma combinação de fármacos (GREENE et al., 2008). O tratamento com vários fármacos é denominado terapia antirretroviral altamente ativa, do inglês Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), sendo conhecida no Brasil por coquetel anti-HIV. A HAART só se tornou possível com a descoberta dos fármacos da classe dos inibidores de protease, que são a base desse tratamento (WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010).

O tipranavir (TPV) é um fármaco pertencente à classe dos inibidores de protease e faz parte da terapia antirretroviral altamente ativa. Esse fármaco está disponível nas formas de cápsula mole de 250 mg e solução oral de 100 mg mL<sup>-1</sup> (Elodius®, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), sendo indicado para pacientes entre 2 e 18 anos de idade ou adultos que apresentam falha terapêutica em relação a outros antirretrovirais inibidores de protease. O fármaco deve ser armazenado obrigatoriamente em geladeira e após aberto pode ser mantido à uma temperatura abaixo de 30°C por no máximo 60 dias. A dose para adultos é de 500 mg (duas cápsulas de 250 mg), coadministrado com 200 mg de ritonavir, duas vezes ao dia e para pacientes pediátricos acima de 2 anos de idade a dose de TPV deve ser ajustada para 14 mg Kg<sup>-1</sup> de peso corporal juntamente com ritonavir na dose de 6 mg Kg<sup>-1</sup> de peso corporal (ELODIUS, 2009; WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010). A combinação com uma dose baixa de ritonavir tem como vantagens a capacidade de minimizar a variabilidade interpacientes e reduzir a quantidade de cápsulas de TPV

administradas, pois o TPV induz sua própria metabolização pelo citocromo P450 e o ritonavir, por ser um inibidor do citocromo P450, diminui a metabolização do TPV (GATHE et al., 2006; WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010).

Embora o TPV seja comercializado desde 2005, ainda são inexistentes, em farmacopeias, métodos analíticos para doseamento e identificação desse fármaco tanto na matéria-prima quanto em cápsulas moles e solução oral. Os estudos que tratam da determinação quantitativa do TPV são, praticamente na sua totalidade, voltados à análise em matrizes biológicas. Adicionalmente, não são relatados estudos de estabilidade sobre o TPV, os quais vêm recebendo mais destaque dos órgãos regulatórios, pela exigência de notificação, identificação e/ou quantificação dos produtos de degradação obtidos nos estudos de degradação forçada (BRASIL, 2015).

Face ao exposto, este trabalho visa o estudo e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por eletroforese capilar de zona para o controle de qualidade de cápsulas de tipranavir, bem como a realização de estudos de estabilidade, com vistas à identificação do(s) produto(s) de degradação majoritário(s). A escolha da eletroforese capilar de zona como método de doseamento a ser desenvolvido se justifica pela ampla aplicação, boa eficiência e baixo consumo de amostras e reagentes. Além disso, apresenta alta capacidade de resolução na análise de amostras complexas, como as geradas nos estudos de estabilidade, que também são foco desse trabalho.

O desenvolvimento de métodos analíticos para o doseamento de cápsulas moles de tipranavir irá possibilitar ações de farmacovigilância, no que tange ao monitoramento da qualidade do medicamento disponível no mercado. Adicionalmente, os estudos de estabilidade irão fornecer dados sobre a estabilidade intrínseca da molécula, os quais são muito relevantes na fase de desenvolvimento de novas formulações, que poderão vir a ser introduzidas com o fim da proteção da patente.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar método quantitativo por eletroforese capilar para análise do tipranavir em cápsulas moles, e identificar o(s) produto(s) de degradação majoritário(s), obtido(s) nos estudos de degradação forçada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a matéria-prima do tipranavir por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta, espectrofotometria na região do infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução;
- Identificar impureza orgânica presente na matéria-prima por espectrometria de massas de alta resolução (Q-TOF).
- Desenvolver e validar método de quantificação por eletroforese capilar de zona, indicativo de estabilidade, para cápsulas de tipranavir;
- Realizar estudos de degradação forçada, a fim de identificar as condições que propiciam a degradação do tipranavir;
- Identificar o(s) produto(s) de degradação majoritário(s), oriundos(s) dos estudos de degradação forçada, por espectrometria de massas de alta resolução (Q-TOF);

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

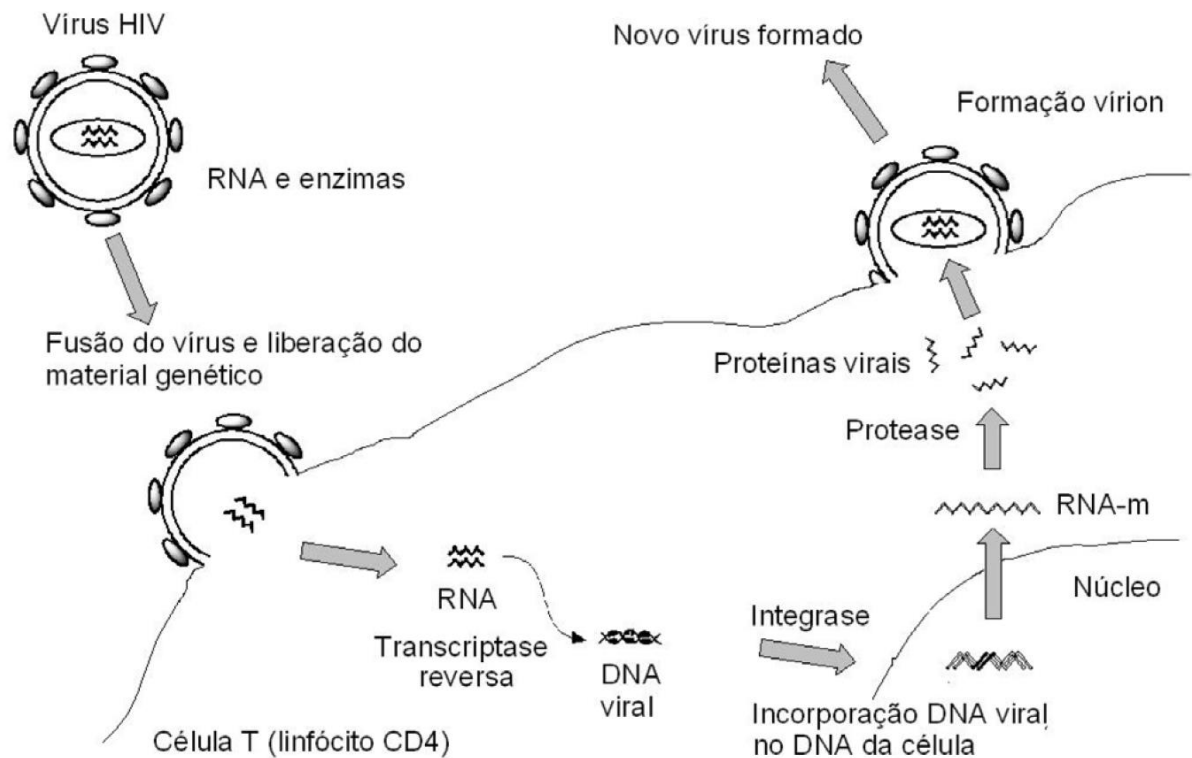
---

#### 3.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

Os primeiros casos de AIDS foram identificados no início da década de oitenta e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, em 2013, cerca de 35 milhões de pessoas viviam com HIV/AIDS no mundo (OMS, 2014). No Brasil tem sido registrada uma média de 41,1 mil novos casos de HIV por ano no período de 2011 a 2016 (BRASIL, 2016). A prevalência da infecção pelo HIV e taxas de incidência variam, sendo que os países mais afetados são aqueles em desenvolvimento (POLEJACK; SEIDL, 2010). A doença é causada predominantemente pelo HIV tipo 1, mas também pode ser causada pelo tipo 2, que é menos comum, e acomete principalmente a região da África Subsaariana (LANGE; ANANWORANICH, 2014).

A entrada do HIV nos linfócitos, representada na Figura 1, é iniciada por uma interação de alta afinidade entre uma glicoproteína do vírus, chamada de gp120, e os receptores CD4 da superfície celular, causando a ativação de correceptores que são necessários para que o vírus se funda à membrana celular e libere seu material genético e enzimas no interior da célula do hospedeiro. Após a fusão do vírus com a célula, a enzima transcriptase reversa do vírus converte o material genético do HIV de RNA para DNA, que é então integrado ao DNA próprio da célula por meio da enzima integrase. A célula infectada começa então a transcrever seu DNA em RNA mensageiro que será traduzido em partículas virais precursoras, Gag e Gag-Pol, que deverão ser clivadas pela enzima protease do HIV formando as enzimas protease, transcriptase reversa (p51), RNase H (p15) e integrase, que juntamente com o RNA viral formarão um novo vírion que dará continuidade à infecção de outras células (CUNICO; GOMES; VELLASCO, 2008; GIUSEPPINA; RUGGIERI, 2010; LV; CHU; WANG, 2015).

Figura 3.1 - Ciclo de vida e replicação do vírus HIV



Fonte: (CUNICO et al., 2008).

Os fármacos antirretrovirais surgiram na década de 1980, sendo que sua ação consiste em apenas frear a replicação do vírus no organismo. Esses medicamentos não possuem a capacidade de eliminar por completo o vírus, mas diminuem sua multiplicação impedindo assim o enfraquecimento do sistema imunológico e diminuindo a capacidade de disseminação da doença (ZOLOPA, 2010).

Estão aprovados, para uso clínico, seis diferentes classes de antirretrovirais, a maioria com finalidade de bloquear o ciclo replicativo do HIV. São elas: inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores de protease (IP), inibidores de fusão, inibidores de integrase e antagonistas de correceptores (GREENE et al., 2008).

Em 1995 foi aprovado o primeiro fármaco pertencente à classe dos IP, o saquinavir, o que tornou possível a combinação de múltiplos medicamentos de diferentes classes para o tratamento da infecção pelo HIV. Esse tipo de tratamento

tornou-se conhecido como terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010).

A HAART tornou-se um padrão para o tratamento da infecção do HIV. Nesse contexto, os antirretrovirais pertencentes à classe dos IP, como o TPV, juntamente com os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa e com os inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa, vêm sendo utilizados como componentes importantes dos regimes de HAART ao longo dos últimos anos (VERGANI; RUSCONI, 2011).

## 3.2 TIPRANAVIR

### 3.2.1 Aspectos gerais

Quando os primeiros relatos sobre o HIV surgiram, em 1981, não existiam fármacos antirretrovirais que pudessem frear a replicação desse vírus. O curto tempo entre o descobrimento da doença e a aprovação de um fármaco específico para seu tratamento foi sem precedentes, com a aprovação da zidovudina, um inibidor da transcriptase reversa (LANGE; ANANWORANICH, 2014; MITSUYA et al., 1985), no ano de 1987. Mesmo apresentando excelentes resultados iniciais, logo foi detectado o surgimento de resistência do vírus em relação à zidovudina (LARDER; DARBY; RICHMAN, 1989).

O TPV foi o primeiro IP desenvolvido especificamente para o controle de infecções por HIV resistente a outros inibidores de protease, sendo uma molécula não peptídica, pequena e flexível.

A estrutura dos primeiros IP tinha como foco a ligação às cadeias específicas de aminoácidos que são parte da enzima protease, e por isso, pequenas mudanças nessas cadeias tornavam o HIV resistente a esses IP, além de causarem o surgimento de resistência cruzada entre vários fármacos dessa classe (TEMESGEN; FEINBERG, 2007). A rapidez com a qual o HIV adquire resistência a antirretrovirais se explica pela ineficiência de seu processo de replicação, pois as enzimas virais envolvidas nesse processo fazem muitos erros enquanto copiam o material genético viral causando sempre inúmeras mutações (BEAN, 2005). Inibidores de protease não peptídicos contendo estruturas como ureia cíclica ou então sulfonamida, como o TPV (THAISRIVONGS et al., 1996), podem se ligar ao sítio ativo da enzima com menos

ligações de hidrogênio resultando em uma maior flexibilidade e na habilidade do fármaco de se ligar ao sítio ativo mesmo que alguns aminoácidos do mesmo sejam trocados devido a mutações (LARDER et al., 2000).

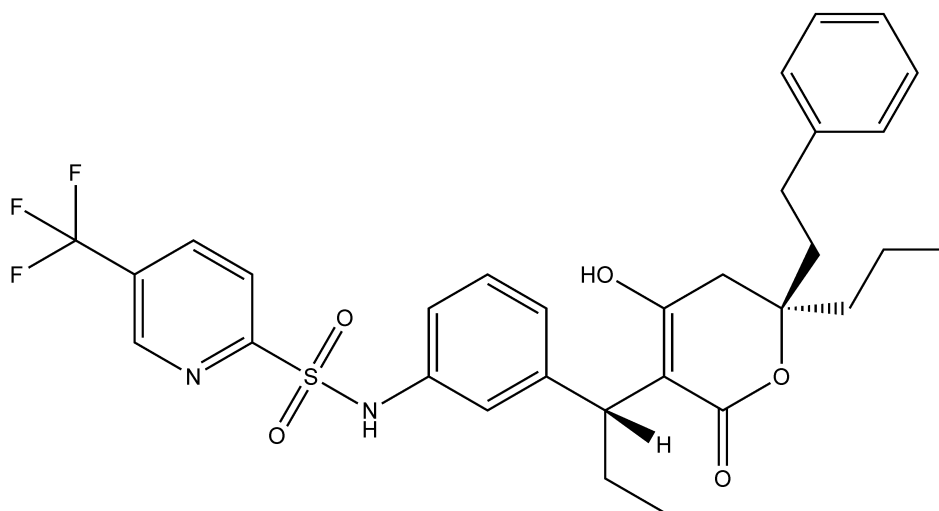
### 3.2.2 Características físico-químicas

Quimicamente, o TPV, cuja estrutura está representada na figura 2, é uma diidropirona contendo sulfonamida que possui como alvo a enzima viral protease. A fórmula molecular do TPV é  $C_{31}H_{33}F_3N_2O_5S$  e seu peso molecular é de 602,66 daltons (DRUGBANK, 2015).

O TPV é um ácido fraco com pKa de 5,5 e possui uma baixa solubilidade, cerca de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  em pH 2 e 17  $\mu\text{g/mL}$  em pH 7,5, sendo altamente lipofílico ( $\log P = 6,0$ ). O TPV é solúvel em vários solventes orgânicos polares, tensoativos e lipídeos (CHEN et al., 2009).

O TPV em cápsulas encontra-se dissolvido ou disperso em um sistema autoemulsionante, o que consiste em estratégia usada para aumentar a velocidade de dissolução e consequentemente a biodisponibilidade. O veículo é composto por etanol, propilenoglicol e mono e diglicerídeos de cadeia média e cremophor EL, um excipiente usado em formulações de vários outros fármacos insolúveis, como por exemplo, o paclitaxel (GELDERBLOM et al., 2001).

Figura 3.2 - Estrutura química do TPV



Fonte: Autor.

### 3.2.3 Mecanismo de ação

O TPV age inibindo a enzima protease do HIV, que é responsável pela clivagem das poliproteínas gag e gag-pol, as quais são precursoras dos componentes de um novo vírion. De maneira geral, os IP mimetizam um substrato intermediário que possui grande afinidade pelo sítio catalítico. O fármaco se liga ao sítio ativo da enzima por meio de ligações de hidrogênio, e uma característica particular, que aumenta a estabilidade do complexo inibidor-protease, é a capacidade de se ligar diretamente aos resíduos de isoleucina na posição 50 de cada uma das 2 subunidades da enzima protease. Outros IP necessitam de uma molécula de água que age como uma ponte para se ligar a esses 2 resíduos, o que os torna menos efetivos e mais suscetíveis a resistência, o que pode levar à falha terapêutica (CUNICO; GOMES; VELLASCO, 2008; LV; CHU; WANG, 2015).

### 3.2.4 Farmacocinética

O TPV deve ser administrado em doses de 500 mg (2 cápsulas de 250 mg), juntamente com 200 mg de ritonavir, duas vezes ao dia (MACGREGOR et al., 2004; WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010). O TPV é absorvido no intestino e atinge sua concentração plasmática máxima (C<sub>max</sub>) de 2 a 3 horas após administração, sendo o C<sub>max</sub> de 13,06 µg/mL, quando administrado sem o ritonavir, e 78,41 µg/mL, quando administrado com o ritonavir. Após absorvido, o TPV se apresenta extensamente ligado a proteínas plasmáticas (>99,95%). A concentração plasmática atinge o equilíbrio após sete dias de tratamento com a dose recomendada (MACGREGOR et al., 2004).

A diferença de concentração plasmática máxima entre a administração de TPV com e sem ritonavir pode ser explicada pelo fato do fármaco ser metabolizado por uma isoenzima do complexo P450 chamada de CYP3A4, cuja atividade varia em cada indivíduo. Além de sofrer metabolismo pré-sistêmico, o TPV induz um aumento na atividade dessa isoenzima, o que leva a uma extensa metabolização do fármaco. Para contornar esse problema é administrado 200 mg de ritonavir, que tem a capacidade de inibir a CYP3A4. Dessa forma, a partir da dose de 500 mg de TPV é possível atingir concentrações plasmáticas mais altas, evitando que sejam administradas doses subterapêuticas, que poderiam originar falha terapêutica e desenvolvimento de



resistência por parte do HIV (MACGREGOR et al., 2004; TEMESGEN; FEINBERG, 2007).

A meia-vida do TPV é de aproximadamente 5 horas quando administrado com o ritonavir (MACGREGOR et al., 2004) e sua eliminação é majoritariamente pelas fezes, com apenas 4,4% sendo eliminado pela urina (ELODIUS, 2009).

É importante salientar que a dose pediátrica deve ser baseada no peso corporal ou no tamanho da criança, para que não exceda a dose adulta. O TPV deve ser administrado com alimentos, para aumentar sua biodisponibilidade, e não é recomendado para crianças com menos de dois anos de idade e nem em pacientes que nunca foram tratados com outros IP (RIBERA et al., 2011; WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010).

### **3.2.5 Reações adversas**

A maioria dos efeitos adversos do TPV ocorrem em nível de trato gastrointestinal e alterações metabólicas, tais como, alteração do perfil lipídico e também na função hepática (TEMESGEN; FEINBERG, 2007; VERGANI; RUSCONI, 2011). Os principais efeitos adversos são diarreia, náusea, dores abdominais, cefaleia e tontura. Em um estudo realizado por MacGregor e colaboradores (2004) foi avaliado o efeito do fármaco em 113 voluntários saudáveis, sendo que 90,3% dos voluntários reportaram desordens gastrointestinais (MACGREGOR et al., 2004).

### **3.2.6 Métodos analíticos quantitativos para o tipranavir**

Os primeiros métodos analíticos para o doseamento de fármacos comumente têm como base os estudos de farmacocinética. No quadro 3.1 estão expostos os métodos analíticos cromatográficos disponíveis para o TPV, os quais, na sua maioria, foram realizados em matrizes biológicas.

No que tange à quantificação em matéria-prima e formulações, além de método por HPLC (SATYANARAYANA; MADHAVI, 2012a), esses mesmos autores validaram cinco métodos espectrofotométricos para o doseamento de TPV na matéria prima e em cápsulas, sem a necessidade de separação do fármaco e seus excipientes. Os cinco métodos espectrofotométricos envolvem reações com: (i) nitroprussiato de sódio; (ii) ácido cítrico e anidrido acético; (iii) tiocianato de cobalto; (iv) hidrazida

isonicotínica; (v) tropeolina-OOO. Todos os métodos possuem detecção na região do visível entre 480 nm e 680 nm (SATYANARAYANA; MADHAVI, 2012b). Nenhum método indicativo de estabilidade ou por eletroforese capilar foi encontrado na literatura existente.

Quadro 3.1 - Resumo dos métodos cromatográficos para o doseamento do TPV disponíveis na literatura.

(continua)

Aplicação	Método - Detecção	Coluna	Fase móvel	Autores
Plasma	UPLC-MS/MS	Waters Acquity UPLC HSS T3 150 mm x 2,1 mm, 1,8 µm	Gradiente com: Solução A – ácido fórmico 0,05% em água Solução B – ácido fórmico 0,05% em ACN	SIMIELE et al., 2017
Plasma	HPLC - UV (260 nm)	Waters XBridge C-18 150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm	Gradiente com: Solução A – ACN Solução B – Acetato de sódio 50 mM, pH 4,5	CHARBE et al., 2016
Plasma	UPLC – MS/MS	Waters Acquity UPLC HSS T3 50 mm x 2,1 mm, 1,8 µm	Gradiente com: Solução A – ácido fórmico 0,1% em água Solução B – ácido fórmico 0,1% em ACN	DJERADA et al., 2013
Matéria-prima e cápsulas	HPLC – UV (277 nm)	Zodiac C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	MeOH:água:TEA (50:25:25 v/v/v)	SATYANARAYAN A; MADHAVI, 2012a
Plasma	HPLC-MS	Waters Atlantis T3 C-18 150 mm x 2,1 mm, 3 µm	Gradiente com: Solução A – ácido fórmico 0,05% em água Solução B – ácido fórmico 0,05% em ACN	D'AVOLIO et al., 2011
Plasma	HPLC-MS/MS	Phenomenex Luna Fenil-Hexil 50 mm x 2 mm, 5 µm	Acetato de amônio 10mM:0,1% ácido acético em MeOH:água (97:3 v/v)	MARTIN et al., 2009
Plasma	HPLC - UV (255 nm)	Phenomenex C18	ACN:fosfato de potássio 67 mM	LANGMANN et al., 2008
Plasma	HPLC - UV (260 nm)	Phenomenex C18 150 mm x 4,6 mm, 5 µm	Gradiente com: Solução A – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM + ácido orto-fosfórico, pH 3,5 Solução B - ACN	D'AVOLIO et al., 2007

Quadro 3.1 - Resumo dos métodos cromatográficos para o doseamento do TPV disponíveis na literatura.

(conclusão)				
Quantificação simultânea de fármacos antirretrovirais	HPLC - UV (260 nm)	Waters Symmetry C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	Gradiente com: Solução A – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM, pH 5,65 Solução B - ACN	REBIERE et al., 2007
Plasma	HPLC – UV (205 nm)	Waters Symmetry C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	ACN:MeOH:perclorato de tetrametilamônio 0,025 mM + 0,2% TFA em água (21:53:26 v/v/v)	DAILLY et al., 2006
Plasma	HPLC – UV (260 nm)	Cluzeau plus Satisfaction C8 250 mm x 3 mm, 5 µm	Acetato, pH 5,0:MeOH:ACN (35:30:35 v/v/v)	GIRAUD et al., 2006
Plasma	HPLC - UV (210 nm)	Zorbax C18 150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm	Gradiente com: Solução A – MeOH / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM em água, pH 4,5 (15:85) Solução B - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM em água, pH 4,5:ACN:MeOH (25:60:15) em 0,075 TFA	REZK et al., 2006
Plasma	HPLC – MS/MS	Chrompack Inertsil ODS3 50 mm x 2 mm, 5 µm	Gradiente com: Solução A – MeOH : acetato de amônio em água, pH 5,0 (35:65 v/v) Solução B - MeOH	CROMMENTUYN et al., 2004

MeOH: metanol; ACN: acetonitrila; TEA: trietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de potássio monobásico

### 3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A finalidade da validação de um método analítico é garantir que qualquer mensuração futura do analito em uma amostra desconhecida resulte em valores confiáveis refletindo o teor real desde analito presente na amostra analisada (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007). A validação apropriada de métodos analíticos tem se tornado uma parte essencial no desenvolvimento e caracterização de fármacos (SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010). No que tange à quantificação, os métodos analíticos aplicados a fármacos devem permitir uma análise completa do produto, contemplando aspectos como o doseamento da substância ativa, a determinação dos níveis de impurezas e produtos de degradação, além de verificar a estabilidade da substância ativa na formulação (ICH, 2003; ICH, 2005; WATSON, 2005).

A RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 que trata da validação de métodos analíticos e traz os parâmetros (Tabela 3.1) que devem ser avaliados na validação de métodos (BRASIL, 2017).

Tabela 3.1 - Parâmetros avaliados para a validação de métodos analíticos, de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
Seletividade	Habilidade de detectar o analito em meio a outros compostos, como produtos de degradação, impurezas, diluentes e componentes da matriz. É avaliada pela pureza do sinal do analito, em meio a produtos de degradação formados durante os estudos de degradação forçada ou impurezas.
Precisão	Expressão da proximidade dos resultados obtidos através de amostragens múltiplas de uma mesma amostra. É avaliada em níveis de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão é demonstrada pela dispersão dos resultados avaliando-se o desvio padrão relativo (DPR) entre o conjunto de resultados.
Exatidão	Expressa o quão próximo está o valor obtido através de um método de quantificação e a quantidade real do analito presente na amostra. Para produtos acabados, pode ser realizada pelo teste de recuperação, em que quantidades conhecidas do padrão são adicionadas aos excipientes do medicamento, ou quando indisponíveis, pela adição de quantidades conhecidas do padrão a uma solução do produto acabado.
Linearidade	Avalia a capacidade de um método em gerar resultados proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado. É estabelecida pela construção de curvas analíticas e avaliação dos coeficientes de correlação (r) e determinação (R <sup>2</sup> )
Limite de detecção	É a menor quantidade do analito em uma amostra que o método pode identificar mesmo que não seja possível quantificar o analito. Pode ser determinado através do método visual (razão entre sinal e ruído maior ou igual 2:1) ou através dos parâmetros obtidos da curva de calibração.
Limite de quantificação	É a menor quantidade do analito em uma amostra que o método pode quantificar com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser determinado através do método visual (razão entre sinal e ruído maior ou igual 10:1) ou através dos parâmetros obtidos da curva de calibração.
Robustez	Demonstra a confiabilidade da análise frente a pequenas variações intencionais no método. Pode ser avaliada por meio de um experimento fatorial onde o efeito das variações aplicadas é avaliado.

### 3.4 ELETROFORESE CAPILAR

Atualmente, a eletroforese capilar é a técnica de separação de mais rápida expansão na análise farmacêutica, sendo comparável à cromatografia a líquido de alta eficiência em termos de aplicabilidade. A eletroforese capilar é considerada uma

"técnica limpa", com consumo ínfimo de solventes e, por consequência, redução de gastos e menor produção de resíduos químicos. Além disso, são suas características a alta seletividade, consumíveis de baixo custo e análises rápidas (BARDEN et al., 2013; RIZVI; DO; MAHMOUD, 2011; WATSON, 2005).

Na eletroforese capilar, a separação dos analitos baseia-se na migração de compostos iônicos ou ionizáveis, em um capilar preenchido por um eletrólito, pela ação de um campo elétrico, ou ainda, na migração de compostos neutros que possam interagir com substâncias que apresentam velocidade de migração diferente do fluxo eletrosmótico (DA SILVA et al., 2007).

Um dos motivos para que as técnicas de eletroforese capilar tenham sofrido um rápido avanço é a simplicidade instrumental e principalmente a ampla variedade de mecanismos de separação que podem ser efetuados em um único capilar (TAVARES, 1997). Como métodos de separação, tem-se: eletroforese capilar de zona ou em solução livre; cromatografia eletrocinética micelar ou cromatografia capilar eletrocinética micelar; eletroforese capilar em gel; eletrocromatografia capilar; isotacoforese e focalização isoelétrica capilar (DA SILVA et al., 2007; TAVARES, 1995, 1997).

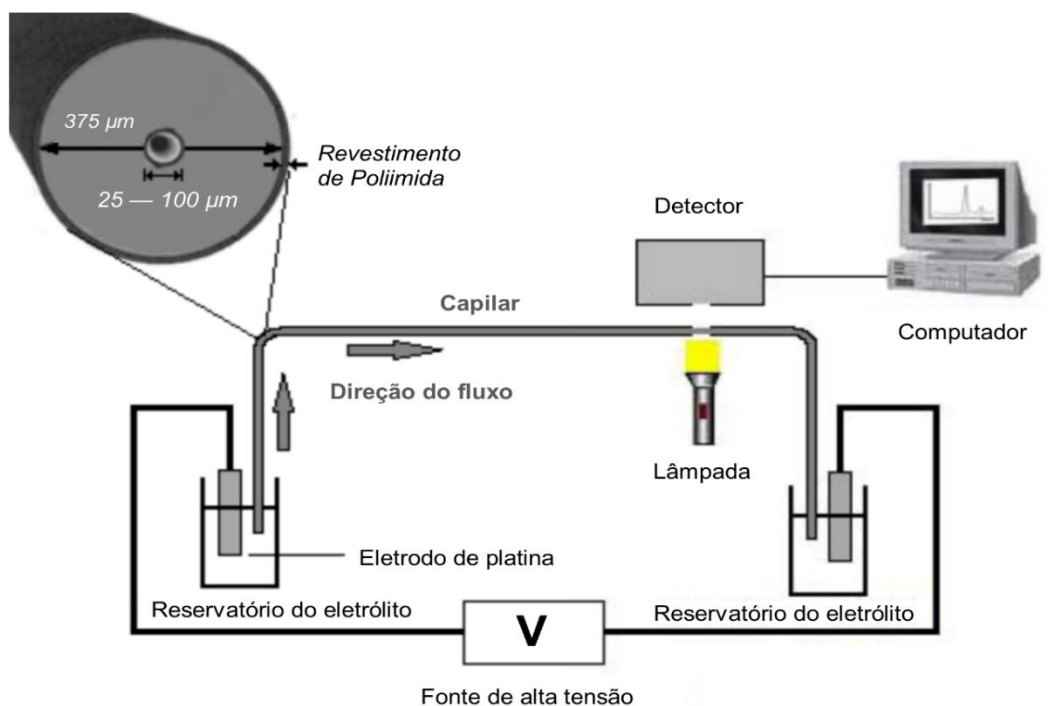
Na eletroforese capilar de zona (CZE) a separação das espécies iônicas ocorre devido a dois fenômenos chamados fluxo eletrosmótico (EOF) e fluxo eletroforético, que ocorrem quando um capilar preenchido por uma solução de eletrólito recebe uma diferença de potencial aplicada entre suas extremidades. A eletroforese capilar de zona pode ser usada na separação de inúmeras amostras, desde que os analitos estejam ionizados no pH escolhido para o eletrólito de corrida, o qual conduz a corrente elétrica e fornece capacidade tamponante (DA SILVA et al., 2007; TAVARES, 1997).

A amostra contendo o analito é introduzida no capilar como uma banda de pequena espessura. Sob a influência do campo elétrico, as espécies iônicas da amostra e do tampão migram para o eletrodo correspondente, isto é, cátions em direção ao cátodo e ânions em direção ao ânodo. O capilar utilizado na CZE é feito de sílica fundida, e apresenta em seu interior grupos silanóis, que são desprotonados em valores de  $\text{pH} > 2$ , deixando a parede interna do capilar com uma carga negativa, que atrai contra íons positivos provenientes do eletrólito de corrida, formando uma dupla camada elétrica. Essa dupla camada possui uma camada compacta (grupos silanóis desprotonados) e outra difusa (contra íons positivos). Cria-se, então, uma diferença

de potencial muito próxima da parede do capilar que é conhecida como potencial zeta ( $\xi$ ), sendo este potencial dependente da carga da superfície na parede do capilar (KUHN; HOFFSTETTER- KUHN, 1993; TAVARES, 1995).

Quando o campo elétrico é aplicado nas extremidades do capilar, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa. Com isto, os íons arrastam moléculas de água formando um fluxo eletrosmótico que é direcionado para o cátodo enquanto a parede do capilar permanecer negativa. Já o fluxo eletroforético é atribuído ao analito migrando ao eletrodo com carga contrária à sua. Entretanto, se este é composto de espécies iônicas de diferentes cargas, cada espécie migrará para o eletrodo correspondente sendo o fluxo eletroforético resultante dependente da velocidade de cada íon e do fluxo eletrosmótico. Neste caso, como os cátions migram no mesmo sentido do fluxo eletrosmótico, isto é, em direção ao cátodo, estes chegarão mais rapidamente ao detector, enquanto que os ânions migram mais lentamente, pois são atraídos pelo anodo. No entanto, todas as espécies presentes do analito serão direcionadas para o sistema pelo fluxo eletrosmótico, pois este possui uma velocidade maior que a dos analitos (DA SILVA et al., 2007).

Figura 3.3 - Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar



Fonte: (AGUIAR, 2013)

### 3.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Existem vários fatores capazes de afetar a estabilidade de um fármaco, como a possibilidade de interação entre componentes ativos e inativos da formulação, o processo de produção, a forma farmacêutica empregada, a embalagem e as condições ambientais durante o transporte, estocagem, e a duração do tempo entre a produção e distribuição do medicamento (VADAS, 2000). Os produtos de degradação de fármacos podem levar a diminuição da potência do mesmo, ou à criação de substâncias tóxicas que irão colocar em risco a saúde dos usuários dos medicamentos (YOSHIKA; STELLA, 2002). Admite-se que, para novas substâncias, informações sobre a estabilidade e métodos empregados para o controle de qualidade são usualmente mantidos em sigilo pelos detentores da patente do fármaco. No entanto, enquanto aguarda-se a publicação destes estudos, a qualidade do produto depende da idoneidade do laboratório produtor e dos órgãos responsáveis pela liberação do registro do medicamento (BAKSHI; SINGH, 2002).

A *Internacional Conference on Harmonisation* (ICH, 2003) preconiza a realização dos seguintes estudos de estabilidade para novos fármacos e medicamentos: (i) estabilidade de longa duração, que irá verificar a estabilidade do produto acondicionado na sua embalagem e em um ambiente com características controladas de temperatura e umidade por um tempo equivalente à sua validade; (ii) estabilidade acelerada, que tem duração de 6 meses, sendo que seus resultados serão utilizados para prever o prazo de validade do fármaco em condições normais. A estabilidade acelerada é avaliada ao submeter o fármaco a condições de armazenamento (temperatura e umidade) que aceleram sua degradação, acarretando em mudanças físicas e químicas; (iii) testes de degradação forçada, que colocam o fármaco em condições ainda mais severas que as do estudo de estabilidade acelerada e visam estabelecer a estabilidade intrínseca ao fármaco. Condições avaliadas em testes de degradação forçada comumente abrangem a exposição do fármaco a meio ácido e alcalino, meio oxidativo, exposição à radiação ultravioleta e exposição a altas temperaturas e umidade (ICH, 2003; SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010).

Nesse contexto, estudos de estabilidade intrínseca são usados tanto para determinar a seletividade dos métodos analíticos quanto para orientar o desenvolvimento de formulações, uma vez que podem indicar susceptibilidade do fármaco em formar subprodutos (ICH, 2005; BAKSHI; SINGH, 2002). Além dos fatores

intrínsecos à estrutura molecular, outros como mudanças de pH, força iônica, constante dielétrica, tampões, aditivos, excipientes, contaminação microbiana, fatores ambientais como temperatura, umidade e luz podem afetar a estabilidade da forma farmacêutica (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

No que tange à legislação brasileira, a RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005) prevê a realização dos estudos de estabilidade de longa duração, acelerado e acompanhamento, em condições semelhantes às estabelecidas pelo ICH para países da zona climática IV (países de clima quente e úmido). Mais recentemente, foi aprovada a RDC 53/2015 que apresenta os parâmetros para a notificação, identificação e quantificação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos e para o estudo do perfil de degradação. Segundo essa normativa, os estudos de degradação forçada devem promover uma degradação de pelo menos 10%, evitando-se a degradação completa do fármaco, o que poderia comprometer os resultados obtidos (BRASIL, 2015).

Publicações indicam a instabilidade de outros fármacos da classe dos inibidores de protease, como o ritonavir (VENUGOPAL; VIJAYA; MADHAVI, 2014) e o darunavir (RAO et al., 2014), instáveis em meio ácido e alcalino. Muitos fármacos são congêneres de moléculas existentes, e sendo assim, a degradação química pode se assemelhar ao comportamento já reportado para outros fármacos da classe. Esse é o caso das penicilinas, cuja maioria segue o mesmo padrão de degradação do anel beta-lactâmico (BAKSHI; SINGH, 2002). Mas no caso dos fármacos citados, os quais não apresentam semelhança estrutural, comportamentos diversos podem ser esperados.

Busacca et al, (2005), relataram a ocorrência de degradação do TPV durante estudos de estabilidade de longa duração e a formação de um produto de degradação proveniente da oxidação do TPV. Esse produto foi sintetizado e analisado por técnicas de RMN para elucidação de sua estrutura química (BUSACCA, et al., 2005).

Nesse contexto, se faz necessário o uso de métodos sensíveis e específicos, capazes de quantificar o fármaco de modo inequívoco em meio a impurezas, ainda que essas estejam presentes em baixas concentrações.



## **4 CAPITULO 1 - ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA DE TIPRANAVIR**

### 4.1 INTRODUÇÃO

Os métodos de identificação qualitativa de fármacos constituem uma etapa importante no controle de qualidade de medicamentos e matérias-primas para assegurar a identidade do produto sob análise e o não cumprimento dos requerimentos de um ensaio de identificação pode significar erro de rotulagem do material (FB 5, 2010). São exemplos de testes usados nas farmacopeias como provas de identificação: espectrofotometria no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta e visível, reações de grupos funcionais, cromatografia em camada delgada, cromatografia de alta eficiência, assim como a polarimetria, no caso de diferenciação de enantiômeros. Usualmente, é apresentada na monografia a ordem de referência dos testes de identificação. Quando não constar a ordem, todos os testes de identificação devem ser realizados (FB 5, 2010).

Alguns ensaios de identificação podem ser considerados conclusivos como: espectrofotometria no infravermelho; espectrofotometria com absorção específica e cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrofotometria, os quais devem ser realizados em complemento ao ensaio do contra-íon, quando aplicável (FB 5, 2010).

Tendo em vista que não há monografia farmacopeica para o TPV, esta etapa teve por objetivo caracterizar a matéria prima que será utilizada como substância química de referência do TPV pela análise de seus espectros de absorção na região do infravermelho e ultravioleta, e pela espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).

### 4.2 DESCRIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada nesse trabalho como substância química de referência (SQR), produzida pela ChemScene (New Jersey, EUA, 99,59%) foi gentilmente cedida pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (Itapira, São Paulo).

### 4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA MATÉRIA-PRIMA DE TIPRANAVIR

#### 4.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Embora tenha algumas limitações, como a necessidade da presença de grupamento cromóforo na molécula em análise e a baixa seletividade, a espectrofotometria na região do UV tem ampla aplicação em metodologias qualitativas e quantitativas (WATSON, 2005). Diversas monografias incluem espectros de absorção no ultravioleta como prova de identificação. Nestes casos, há especificação da extensão da varredura, solvente, concentração da solução e espessura da cubeta. Alguns fármacos requerem o uso de padrões de referência, sendo que as leituras de padrão e amostra são efetuadas simultaneamente e em condições idênticas (FB 5, 2010).

A análise dos espectros na região do UV de uma molécula pode revelar a existência de deslocamento batocrômico, que consiste em deslocamento da banda de absorção na região do UV para um  $\lambda$  maior, ou um deslocamento para  $\lambda$  menor (deslocamento hipsocrômico). Além do deslocamento para um  $\lambda$  diferente, a intensidade da banda também pode aumentar (efeito hipercrômico) ou diminuir (efeito hipocrômico) (WATSON, 2005).

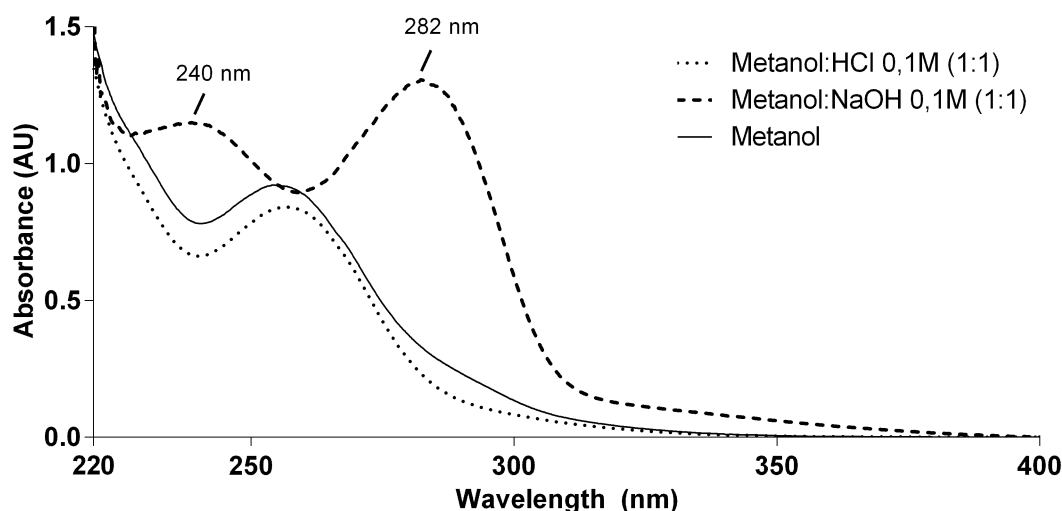
A fim de avaliar a existência de deslocamentos e mudanças na intensidade de absorção em decorrência do solvente, as soluções avaliadas pela espectrofotometria na região do UV foram obtidas através da diluição de uma solução estoque da matéria-prima ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em 3 diferentes diluentes: (i) metanol; (ii) mistura de HCl 0,1 M e metanol na proporção 1:1; (iii) mistura de NaOH 0,1 M e metanol na proporção 1:1. Todas as diluições finais resultaram em uma solução contendo TPV na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O espectro de absorção na região do UV foi obtido na faixa de 220 - 400 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico. O software UVProbe V 2.42 foi utilizado para aquisição dos dados e controle do instrumento.

No espectro na região do UV do TPV (Figura 4.1) pode ser observado que quando dissolvido em metanol apenas um comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em 254 nm é evidenciado, e quando o TPV está em meio ácido o  $\lambda_{\text{max}}$  passa a 257 nm e possui intensidade ligeiramente inferior. Isso é, verificou-se um

deslocamento batocrômico, que ocorre quando o pico de absorção se desloca para um  $\lambda$  maior, e um efeito hipocrômico, relativo à diminuição da intensidade do pico. O espectro obtido em meio alcalino mostra dois valores de  $\lambda_{\max}$ , 240 nm e 282 nm, com efeito hiperacrômico. Sugere-se que essa mudança ocorra em meio alcalino pela ionização da molécula, uma vez que o TPV é um ácido fraco com pKa de 5,5. Em decorrência da ionização da função amida ligada ao anel aromático, o grupo cromóforo é estendido e a energia necessária para absorção no UV é diminuída, ocasionando o deslocamento para comprimento de onda menor, de mais baixa energia (WATSON, 2005).

Figura 4.1: Espectros de absorção na região do UV para o TPV em meio orgânico, ácido e básico.



Fonte: Autor

#### 4.3.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

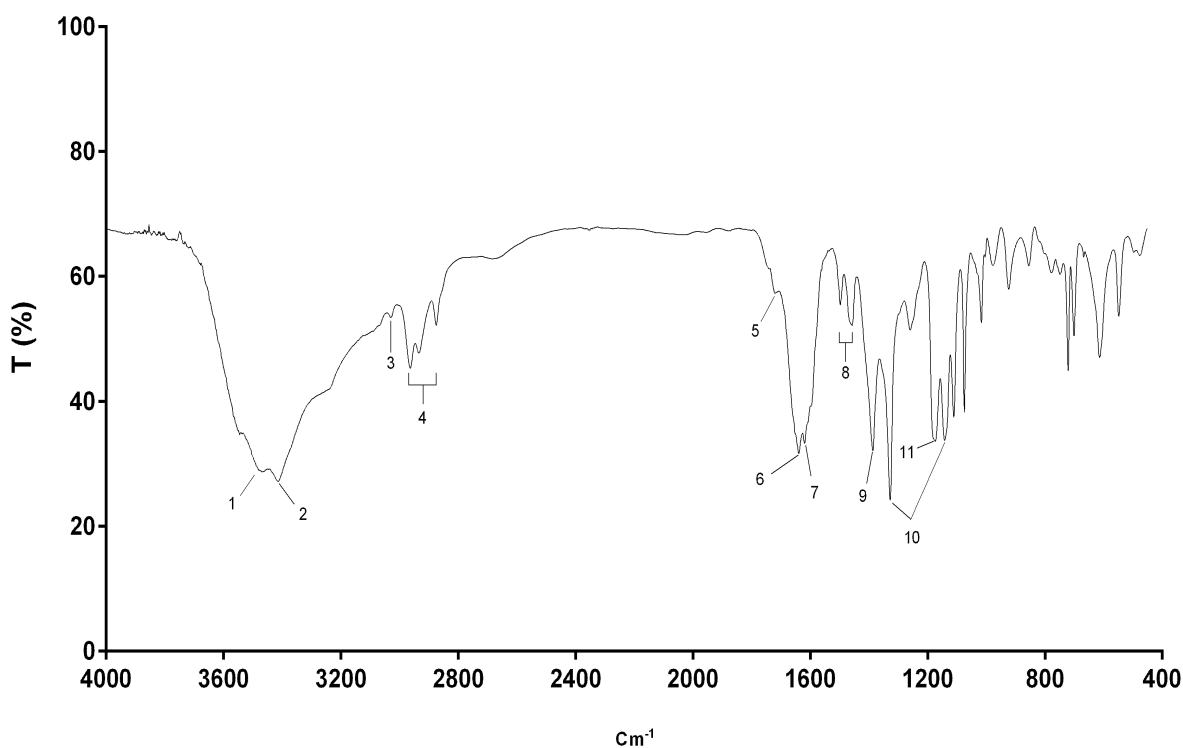
A região do espectro eletromagnético entre a luz visível e as micro-ondas corresponde à radiação no infravermelho (IV). A espectrofotometria na região do IV é uma técnica muito utilizada na identificação de compostos, pois cada molécula apresenta um espectro de IV característico devido a maneira com que seus grupos funcionais absorvem a radiação IV independente da estrutura geral da molécula (SILVERSTEIN, WEBSTER, KJEMLE, 2005; WATSON, 1999). Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante) a região compreendida entre 4000 a 400

$\text{cm}^{-1}$  (infravermelho médio) é a mais empregada para fins de identificação (FB 5, 2010).

O espectro na região do IV para a SQR do TPV foi obtido em espectrofotômetro FTIR, marca Perkin Elmer, modelo Spectrum One. A SQR foi dessecada por 7 dias e a preparação da SQR para a análise foi realizada pelo método da pastilha de KBr, no qual 1,5 mg da SQR foram dispersos em 150 mg de brometo de potássio, seguido de compressão.

Não havendo relatos do espectro de IV do TPV na literatura para fins de comparação, foram considerados a região de absorção, o formato e a intensidade das bandas do espectro. O espectro de IV do TPV SQR está disposto na figura 4.2 e no quadro 4.1 estão destacadas as principais bandas de absorção.

Figura 4.2 Espectro de absorção na região do infravermelho para TPV substância química de referência.



Fonte: Autor

Tabela 4.1 - Atribuição para as bandas de absorção na região do infravermelho para o TPV SQR (NAKANISHI, 1962; SILVERSTEIN, WEBSTER, KJEMLE, 2005).

Banda	Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
1	3467	Deformação axial O-H
2	3413	Deformação axial N-H
3	3029	C-H aromático
4	2963, 2933 e 2874	Deformação axial C-H sp <sup>3</sup>
5	1719	Deformação axial C=O
6	1638	Deformação axial C=C de alceno
7	1618	Deformação axial N-H
8	1497 e 1456	Deformação axial C=C aromático
9	1386	Deformação angular O-H
10	1327 e 1141	Deformação angular SO <sub>2</sub>
11	1173	Deformação angular de C-O de éster

#### 4.3.3 Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

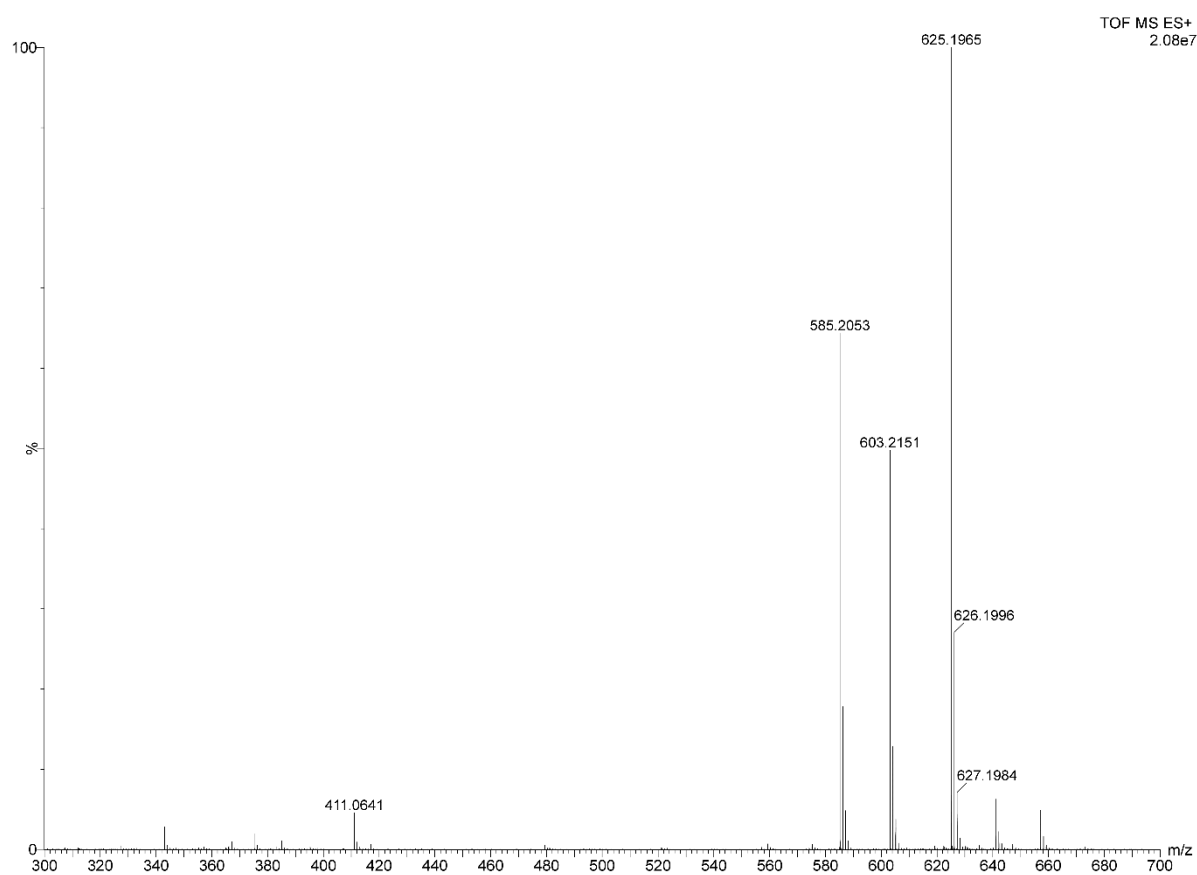
A espectrometria de massas de alta resolução fornece informações sobre o peso molecular exato de uma molécula e a partir dessa informação pode-se inferir quais são seus elementos constituintes, podendo também ser utilizado em conjunto com um sistema cromatográfico para quantificação de analitos com uma alta sensibilidade. A HRMS também pode ser utilizada para obter o padrão de fragmentação da molécula, provendo assim algumas informações estruturais (WATSON, 2005).

Para as análises de HRMS foi utilizado espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo e tempo de voo, modelo XEVO G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA). A amostra foi diluída em mistura de acetonitrila e água (1:1) com 0,1% de ácido fórmico, seguida de infusão direta na probe de eletrospray (ESI) no modo positivo (ESI+). O controle e a aquisição dos dados foram feitos usando o software MassLynx V 4.1. Uma alça de amostragem de 250 µL foi carregada com a amostra. A vazão da infusão foi de 20 µL min<sup>-1</sup> e as condições de ionização estão descritas a seguir: tensão do capilar: 2,0 kV; tensão do cone de amostragem: 30 V; tensão do cone de extração: 4 V; temperatura da fonte: 150°C; temperatura de dessolvatação: 400°C; vazão de N<sub>2</sub> no cone de amostragem: 10 L h<sup>-1</sup>; vazão de N<sub>2</sub> da dessolvatação: 400 L h<sup>-1</sup>; faixa de massa monitorada: 50 a 1000 Da.

No espectro de massas da matéria-prima (Figura 4.3) pode ser observado o íon molecular do TPV [M+H]<sup>+</sup> com *m/z* 603,2151 e dois importantes fragmentos com *m/z* 585,2053 e *m/z* 411,0641. Além do aduto com o próton, há a formação de um aduto

do TPV com o sódio resultando no pico de  $m/z$  625,1965. Padrão de fragmentação semelhante já foi relatado na literatura (CROMMENTUYN et al., 2004; HEINE et al., 2007; MARZINKE et al., 2014). O conjunto desses dados permitiu a identificação da matéria-prima, que passou a ser usada como substância química de referência (SQR) para todos os demais ensaios.

Figura 4.3 - Espectro de massas de alta resolução do TPV



Fonte: Autor

#### 4.4 CONCLUSÕES

O espectro na região do UV mostrou que o TPV apresenta diferentes padrões de absorção dependentes do pH do meio, característica que pode auxiliar na sua identificação. O espectro na região do IV mostrou-se compatível com as atribuições inerentes aos grupos funcionais da molécula e a presença do pico do íon molecular associado ao padrão de fragmentação anteriormente reportado na literatura possibilitou a confirmação da matéria prima como sendo o TPV.

O conjunto dos resultados das análises qualitativas possibilitou a identificação do TPV na matéria-prima, tornando-a apropriada para uso nas análises subsequentes como padrão analítico.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

FB 5. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Vol. 1, 2010.

CROMMENTUYN, K. M. L. et al. Simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitors atazanavir and tipranavir in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n. 2, p. 359–367, 2004.

DA SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, 2007.

HEINE, R. TER et al. Fast and simultaneous determination of darunavir and eleven other antiretroviral drugs for therapeutic drug monitoring: method development and validation for the determination of all currently approved HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse tr. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 15, p. 2505–2514, 15 ago. 2007.

MARZINKE, M. A. et al. The development and validation of a method using high-resolution mass spectrometry (HRMS) for the qualitative detection of antiretroviral agents in human blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, p. 157–168, 2014.

NAKANISHI, K. **Infrared Absorption Spectroscopy -Practical-**. Nankodo Company Limited, Tokyo, 1962. 233 p.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

SILVERSTIEN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification Of Organic Compounds**. 7. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2005.



**Tipranavir: Capillary Zone Electrophoresis Stability-Indicating Method for Capsules and Identification of Oxidation Products by Q-TOF**

Matheus Wagner Lago<sup>1</sup>, Andréa Inês Horn Adams<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Brasil.

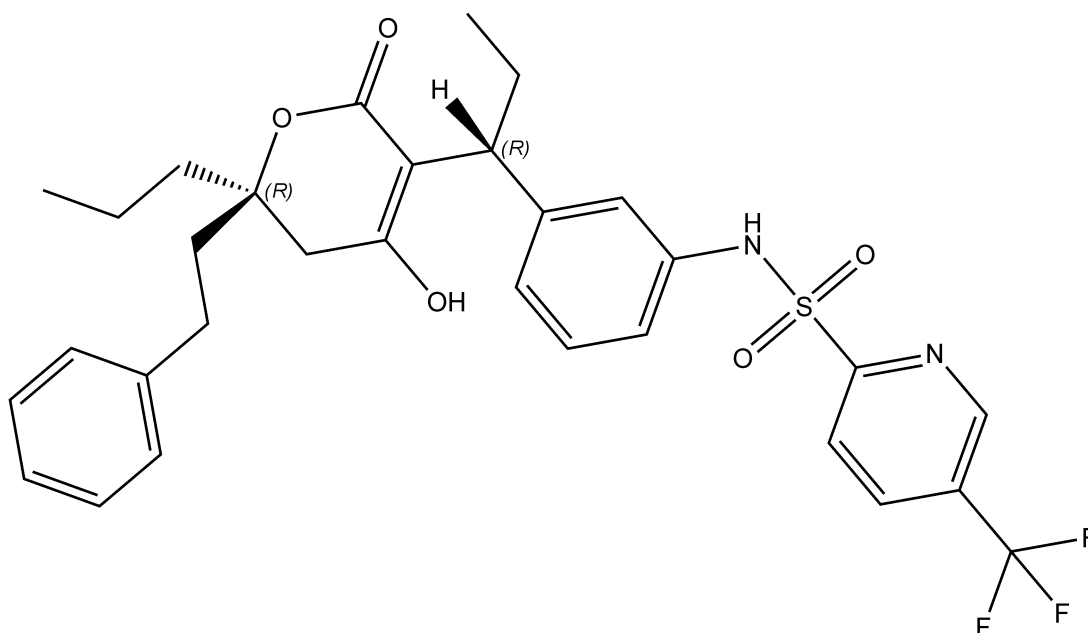
**ABSTRACT**

Tipranavir (TPV) is one of the latest developed protease inhibitor (PI) specially recommended to treatment-experienced patients who are resistant to other PI drugs. In this work, a CZE stability-indicating method to assay TPV capsules was developed and validated and two organic impurities were identified by HRMS. The optimized analytical conditions were: background electrolyte composed of sodium borate 50 mM, pH 9.0 and 5% of methanol; voltage of +28 kV; hydrodynamic injection of 5 s (100 mBar), detection wavelength 240 nm, at 25 °C. The separation was achieved in a fused silica capillary with 50 µm x 40 cm (inner diameter x effective length), using furosemide as internal standard. All the validation parameters were fulfilled and the method was specific, even in the presence of degradation products and impurities. Oxidation was indicated as the main degradation pathway among the ones evaluated in this study (acidic, alkaline, thermal, photolytic and oxidative) and it showed a second order degradation kinetic, in the conditions used in this study. The main oxidation product and an organic impurity detected in the standard were characterized by Q-TOF, and both of them correspond to oxidation products of TPV.

**Keywords:** Tipranavir; stability; degradation products; oxidation; capillary zone electrophoresis.

## 1 INTRODUCTION

Tipranavir (TPV) (Figure 1, CAS 174484-41-4) is a drug from the protease inhibitors (PI) class, administered with ritonavir in combination therapy to treat HIV infection [1–5]. TPV inhibits competitively the protease enzyme, which is responsible for the maturing of the viral particle, preventing the enzyme from bonding to its substrates [6,7]. Differing from other protease inhibitors, there is no need for a water molecule to mediate the bond between the drug and the enzyme, making TPV highly effective and less susceptible to viral resistance [6,7]. Thus, TPV is specially recommended to treatment-experienced patients who are resistant to other PIs [4,5].



**Fig 1.** Chemical structure of tipranavir

Tipranavir has been available for treatment since 2005 and is commercialized in two oral dosage forms: a solution containing 100 mg mL<sup>-1</sup> and a capsule containing 250 mg in a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS), to improve its bioavailability [8]. It is used in a ritonavir combined therapy twice daily [2,9].

So far, no methods to assay tipranavir as bulk or drug product (soft capsule or oral solution) have been reported in compendial monographs. In literature we found some UPLC methods to assay tipranavir in plasma, using MS detection [10,11], and other HPLC methods using MS detection [12–14] or UV detection [15–21]. There is one LC-method to assay the drug in soft capsules, but it is not a stability-indicating method [22].

About the tipranavir degradation products and impurities, Busacca et al. (2005) reported the existence of trace impurities in soft capsules after long term storage stability tests (12-24 months, 30 °C/70% RH). By techniques of NMR and high resolution mass spectrometry (HRMS), the analysis of these trace impurities suggested the presence of a product originated from the reaction between the oxidized form of tipranavir with TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane), which is an excipient of the soft capsules [8].

Different factors can affect the stability of a drug, like the interaction with excipients, manufacturing process, the packaging and storage conditions [23]. The generation of degradation products may reduce the effectiveness of a drug as well as produce toxic substances which can adversely affect the patients [23].

Several methods are available for monitoring impurities in drug products. As stated by ICH guidelines, they should be able to determine the analyte in the presence of other components such as impurities, degradation products and excipients [24]. In this context, the excellent separation efficiency turns the capillary electrophoresis techniques [25] appropriate to assay degraded samples. In the capillary zone electrophoresis (CZE) technique, the substances present in a sample are separated due to their different mass to charge ratio, that will affect their ionic mobility through the background electrolyte solution inside of the capillary when an electric field is applied [26]. As advantages of this technique can be cited the lower consumption of samples and solvents, the high selectivity, low cost of consumables and quick analyses [27–29]. In view of the minimum use of organic solvents and minimal waste generation, CZE can be considered less harmful to the environment when compared to liquid chromatography [27].

In this study, we described the development of a stability-indicating CZE method to quantify tipranavir in soft capsules, and the identification of two substances by HRMS technique: an impurity observed in the active pharmaceutical ingredient (API) and the degradation product obtained by oxidation, which was indicated as the main degradation route of tipranavir by forced degradation study.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Chemicals

Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brazil) kindly donated TPV standard (assigned purity 99.59%, ChemScene, USA). Furosemide (assigned purity 99.8%, Fagron, Brazil) was used as internal standard (IS). Elodius® (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany, batch 1321227E) soft capsules containing 250 mg of TPV were obtained from a local hospital. Boric acid was purchased from Spectrum Quality Products Inc. (New Jersey, USA), hydrochloric acid and hydrogen peroxide from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil), sodium hydroxide from Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brazil), cupric chloride from Merck (Darmstadt, Germany), HPLC grade methanol from Tedia Company (Fairfield, USA), HPLC grade acetonitrile from J.T. Baker Chemicals (Pennsylvania, USA). MS grade acetonitrile was obtained from LiChrosolv Merck (Darmstadt, Germany) and MS grade formic acid from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Milli-Q Gradient System, Millipore Corp., USA) and was used for all analyses.

### 2.2 Instrumentation and analytical conditions

An Agilent 7100<sup>3D</sup> CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a photodiode array (PDA) was used to assay TPV in soft capsules. The CE ChemStation B.04.03 software was used for data acquisition, data handling and instrument control. Analytical runs were carried out on a 48.5 cm uncoated fused silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) with 50  $\mu\text{m}$  x 40 cm (inner diameter x effective length), thermostated at 25 °C. The detection was made at 240 nm. The conditioning of a new capillary was comprised of flushing NaOH 1.0 mol L<sup>-1</sup> for 30 min and then ultrapure water for 15 min. On every working day, before running the first sample, the capillary was flushed with NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> for 15 min, followed by ultrapure water for 15 min and then background electrolyte (BGE) for another 15 min. Before each run, the capillary was preconditioned by flushing NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> for 4 min, followed by ultrapure water for 3 min and then BGE for 3 min. Injections were performed in hydrodynamic mode for 5 seconds at 100 mbar and 28 kV were

constantly applied during the analytical run (current about 16  $\mu\text{A}$ ). BGE solutions at the inlet and outlet vials were replenished with a fresh solution after three injections. All analytical solutions and BGE were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter (Sartorius Stedim Biotech, Germany) before analysis.

A Shimadzu LC System (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, SIL-20A auto injector, LC-20AT pump, DGU-20AT degasser and SPD-M20A PDA detector was used for the isolation of the impurity detected in the standard. The chromatographic conditions established were semi-preparative Luna Phenomenex (Phenomenex, USA) C18 column (250 x 10 mm i.d., particle size 10  $\mu\text{m}$ ), mobile phase composed by methanol, acetonitrile and acidified water, pH 3.5 (45:40:15 v/v/v), flow rate of 2  $\text{mL min}^{-1}$ , detection at 254 nm and injection volume of 100  $\mu\text{L}$ .

High resolution mass spectrometry (HRMS) was carried out on full-scan mode and MS/MS mode was used to obtain the fragments of the selected ion. HRMS analysis were carried out on a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (XEVO G2 Q-TOF, Waters, Milford, USA). The samples were diluted on a mixture of ultrapure water and acetonitrile (1:1) with 0.1% of formic acid and analyzed by direct infusion into the electrospray probe in positive ion mode (ESI<sup>+</sup>). The MassLynx V 4.1 software was used for instrument control and data acquisition and the mass spectrums were monitored in the range of 50-1000 Da. A sampling loop of 250  $\mu\text{L}$  was loaded with each sample and the infusion flow was set at 20  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Ionization conditions were the following: capillary voltage of 2.00 kV, cone voltage of 30 V, extractor cone voltage of 4.00 kV, source temperature at 150  $^{\circ}\text{C}$ , desolvation temperature at 400  $^{\circ}\text{C}$ , cone gas flow rate of 10  $\text{L h}^{-1}$  and desolvation gas flow rate of 400  $\text{L h}^{-1}$ .

## 2.3 Preparation of solutions

### 2.3.1 Background electrolyte solution (BGE)

The BGE was composed by sodium borate 50 mM and 5% of methanol, which was prepared by dissolving 0.3091 g of boric acid with 80 mL of ultrapure water, followed by pH adjustment to 9.0 with 1  $\text{mol L}^{-1}$  NaOH prior to the addition of 5 mL of methanol. This solution was then quantitatively transferred to a 100 mL volumetric flask and the volume was completed with ultrapure water.

### 2.3.2 Standard and sample solutions

TPV stock standard solution was prepared weighing 25 mg of TPV standard into a 50 mL volumetric flask followed by dilution with methanol (final concentration 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Furosemide stock solution was prepared by dissolving 12.5 mg of furosemide standard into a 50 mL volumetric flask with methanol to obtain a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solution.

To prepare the stock sample solution, the content of five soft capsules of Elodius<sup>®</sup> was quantitatively transferred to a 100 mL volumetric flask. The empty capsules were carefully rinsed with 80 mL of methanol and the volume was made up to 100 mL with the same solvent, resulting in a concentration of 12.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ . This solution was stored under refrigeration and in the day of the assay, a solution containing 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was prepared by dilution with methanol.

The standard and sample working solutions were prepared by the mixture of 1 mL of IS solution (furosemide at 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and 1 mL of TPV solution (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and then diluting with BGE into a 5 mL volumetric flask. The final concentration of TPV in both reference and sample solutions were 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and the final concentration of the IS was 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 2.4 System suitability

To ensure the reproducibility of the system, performance and quality throughout the assay development, the system suitability test was carried out by injecting six replicates of a standard solution in the usual concentration, as described by USP [30]. The evaluated parameters were theoretical plates, peak symmetry, TPV/IS area ratio and migration time.

## 2.5 Method validation

### 2.5.1 Specificity and forced degradation studies

To stability-indicating capability of the method was evaluated by submitting a sample solution of Elodius<sup>®</sup> (5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) to forced degradation conditions using oxidative, basic, acidic, photolytic and thermal conditions. To promote acidic and

alkaline hydrolysis, 2 mL of TPV sample solutions were mixed with 2 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl or 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH and remained during 10 days at room temperature, under light protection. At the end of degradation treatment, the mixtures were neutralized as necessary with 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH or 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl, respectively. For the oxidative degradation, 2 mL of the TPV sample solution were mixed with 2 mL of 3% hydrogen peroxide, and stayed for 8 hours, protected from light and at room temperature. Photolytic degradation was carried out on a photostability chamber exposing the sample to UVA or UVC light, by the exposure of 1 mL of TPV sample solution contained in a covered disposable plastic cell by 15 hours. For thermal degradation, 2 mL of TPV sample solution were exposed to heat (40 °C) for 72 hours in a sealed glass container inside an oven. At the end of all the degradation treatments, the solutions were diluted to 500 µg mL<sup>-1</sup> with methanol and then diluted to the final concentration of 100 µg mL<sup>-1</sup> with the BGE solution, as described in section 2.3.2. The stability-indicating power of the method was suggested by the peak purity of TPV in the degraded samples using the PDA detector.

#### 2.5.2 Linearity and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ)

In order to determine the linearity of the CZE method, three independent analytical curves containing 5 concentrations of TPV standard in the range of 20 µg mL<sup>-1</sup> to 200 µg mL<sup>-1</sup> and a fixed concentration of IS (50 µg mL<sup>-1</sup>) were constructed. The standard curves were obtained by plotting the ratio area (TPV peak area/IS peak area) against TPV concentration. The method of least square regression and analysis of variance was used to access the linearity of the CZE method ( $\alpha=0.05$ ).

The values for the LOD and LOQ were calculated according to the following equations:  $LOD= 3.3(\sigma/ \alpha)$  and  $LOQ= 10(\sigma/ \alpha)$ , where  $\sigma$  is the standard deviation of the y-axis intercept and  $\alpha$  corresponds to the mean slope, all obtained from three independent regression lines [24]. The values were expressed as concentration (µg mL<sup>-1</sup>). Solutions of the standard containing the concentration of LOD calculated by the equation were prepared and analyzed, aiming to confirm the ability of the method to detect that low concentration.

### 2.5.3 Accuracy

The accuracy of the CZE method was determined through a recovery study, where known amounts of TPV standard were added to the sample solution of fixed concentration ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in order to obtain solutions with 70, 100 and 130% of the method concentration ( $70, 100$  and  $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively). Each solution was prepared in triplicate and the results were expressed as the mean recovery of the TPV standard, expressed as a percentage of the theoretical concentration [24]. Recovery values in the range of  $100 \pm 2\%$  of the target value were considered acceptable [31].

### 2.5.4 Precision

Repeatability and intermediate precision analyses were conducted to evaluate the precision of the method. Repeatability was accessed by analyzing six independent sample solutions, prepared as mentioned at section 2.3.2, in the same day by a single analyst. Intermediate precision was evaluated by analyzing two sets of 6 samples solutions at  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , which were prepared by different analysts in two days. The results were expressed as relative standard deviation (RSD).

### 2.5.5 Robustness

Method robustness was evaluated via a full  $2^3$  factorial design containing 11 experiments, three of them in the optimized condition. Intentional changes were made in two levels (high and low), in three relevant quantitative electrophoretic factors: voltage (27 and 29 kV, optimal 28 kV), capillary temperature (24 and 26 °C, optimal 25 °C) and sodium borate concentration ( $48$  and  $52 \text{ mmol L}^{-1}$ , optimal  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ). The response evaluated was the TPV content in the capsules, calculated by the comparison with the standard solution in each experiment. All experiments were performed in randomized order to minimize the effects of uncontrolled factors that may introduce bias into the response. The design of the experiment and the results evaluation were processed by Minitab 14 statistical software (Minitab State College, PA, USA).



## 2.6 Degradation kinetic of TPV in oxidative medium and isolation of TPV impurity

Degradation kinetics in oxidative medium was evaluated by adding 1 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to each of six aliquots of 1 mL of TPV standard solution at 2500 µg mL<sup>-1</sup>. The mixtures were maintained at room temperature and after 1, 2, 4, 6, 8 and 10 hours of exposure, the solutions were diluted to 500 µg mL<sup>-1</sup>, according section 2.3.2. The solutions (n=3/time) were analyzed by the CZE method and the TPV residual content was determined. The kinetic of the degradation reaction was determined by the graphic method, plotting concentration *versus* time, log of concentration *versus* time and reciprocal of concentration *versus* time (zero-order, first-order and second-order process, respectively). The best fit to model, indicated by regression coefficient (*r*), suggested the reaction order. Parameters such as degradation rate constant (*k*) and *t*<sub>90</sub> (time to decrease the drug content to 90%) were calculated [23].

HRMS analysis [32] were conducted in order to characterize possible degradation products obtained from oxidation in a standard TPV solution oxidized with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by 8 hours (prepared as described in section 2.5.1).

TPV impurity was isolated from the standard solution, using the semi-preparative LC conditions, described at section 2.2. The fraction of the impurity was collected manually, analyzed by the CZE method in order to check its purity and then it was identified by HRMS [33].

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Method optimization

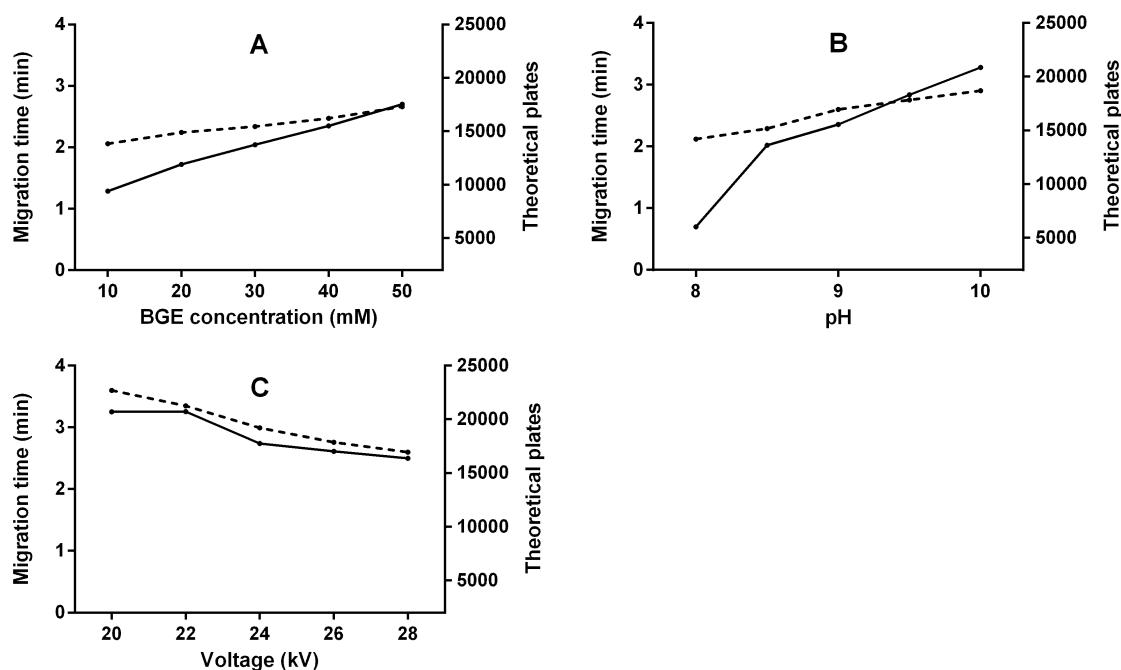
Method optimization was performed to ensure that suitable values of migration time, peak symmetry, efficiency and resolution would be reached. The influence of BGE concentration and pH value, as well as the voltage over these analytical characteristics were evaluated. To start, the injection was set to 100 mbar for 5 seconds and the first parameter tested was the BGE composition. Since TPV is a weak acid with a pK<sub>a</sub> value of 5.5 [34], a buffer with pH value higher than this value should be used to ensure the ionization of the molecule, which is one of the requirements for the development of a CZE method. For this purpose two buffers were tested, sodium

phosphate and sodium borate. The sodium phosphate buffer produced a wide peak with long migration time and high current, which could affect the assay reproducibility due to the Joule heating [35]. In opposite, the sodium borate buffer produced peaks with excellent characteristics and low current values. Concentrations in the range of 10 to 50 mmol L<sup>-1</sup> were tested and it was found that the theoretical plates increased proportionally with the concentration, with low current values (16 µA) with a slight increase in migration time (Figure 2A). Thus, the concentration of borate buffer was fixed at 50 mmol L<sup>-1</sup> considering its positive effect on the efficiency. Methanol, in the concentration of 5%, was added to improve resolution between peaks.

Preliminary tests indicated that pH values inferior to 8.0 generated peaks with inappropriate symmetry. Thus, we evaluated the effect of pH values in the range of 8.0 to 10.0 (Figure 2B) and at pH 9.0 appropriate efficiency and low current values were obtained. At pH values > 9.0 the current increased considerably, impairing the reproducibility of the assay.

Voltage was the last parameter set and its greatest impact was on the migration time, where higher voltages reduced the run time, as expected (Figure 2C). Thus, the voltage applied was set to +28 kV, which produced the lowest run time with no significant effect on the method efficiency. The optimized conditions were: BGE composed of sodium borate 50 mM, pH 9.0 and 5% methanol; voltage of +28 kV; hydrodynamic injection of 5 s (100 mBar), detection wavelength 240 nm, at 25 °C. With these conditions, symmetry values of 1.1 and resolution between IS and TPV of 1.87 were obtained. The migration times for the TPV and IS were 3.2 min and 2.9 min, respectively.

TPV has two wavelengths of maximum absorbance, at 240 nm and 282 nm and the chosen wavelength (240 nm) was a compromise between the optimal absorbance of TPV and its degradation products.



**Fig. 2.** Results for the optimization of method parameters: A: background electrolyte solution; B: pH; and, C: voltage. Conditions for individual optimization were: A: Voltage 28 kV and pH 9.00; B: BGE concentration 50 mmol L<sup>-1</sup> and voltage 28 kV; C: BGE concentration 50 mM and pH= 9.00. (—): theoretical plates; (---): migration time.

### 3.2 System suitability

System suitability analysis performed during routine under the developed method consisted of six replicate injections of a standard solution at 100 µg mL<sup>-1</sup> and the following analytical parameters were obtained: theoretical plates, 24.011 ± 389.58 (RSD 1.62%); peak symmetry, 1.06 ± 0.01 (RSD 0.92%); peak area ratio, 0.892 ± 0.01 (RSD 1.50%); TPV migration time, 3.2 ± 0.02 (RSD 0.50%) and resolution between TPV and IS, 2.36 ± 0.03 (RSD 1,07%). The verified parameters indicated the suitability of the CE system for the analysis intended (RSD < 2%).

### 3.3 Method validation

#### 3.3.1 Specificity and forced degradation studies

To establish the stability-indicating capacity of the method, forced degradation studies were realized. Electropherograms obtained from these tests are represented in Fig 3 and a summary of the conditions and quantitative results is presented at Table 1.

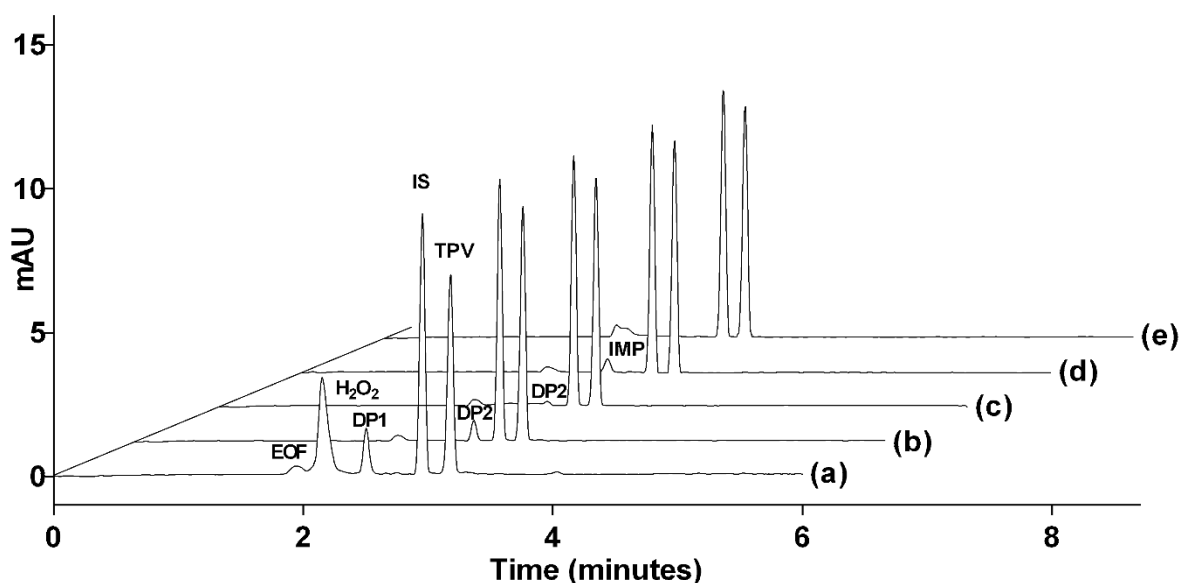
**Table 1.** Stress conditions used for forced degradation test and residual content of TPV at each condition

Stress condition	Exposition time	TPV residual content (%) $\pm$ SD*
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , room temperature	8 h	87.85 $\pm$ 0.7
0.1 mol L <sup>-1</sup> NaOH, room temperature	10 days	90.67 $\pm$ 0.9
0.1 mol L <sup>-1</sup> HCl, room temperature	10 days	94.21 $\pm$ 0.5
UVC (254 nm)	15 h	99.73 $\pm$ 0.4
UVA (365 nm)	15 h	99.48 $\pm$ 0.6
Temperature of 40°C	72 h	99.25 $\pm$ 0.6

\*n=2 for each condition

The oxidative stress with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 8 hours resulted in a reduction of 12.15% in the TPV content. According to Alsante et al. [36], the oxidation with hydrogen peroxide is a good methodology to show any primary degradation products that would be formed during long term stability studies. A new peak relative to the oxidative degradation product (DP1) could be observed at 2.43 min (Figure 3a). The exposition to 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH or 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl, for 10 days, promoted a slightly decrease on TPV content: 9.33% and 5.79%, respectively, with the occurrence of a new peak, corresponding to a hydrolysis degradation product (DP2) at 2.66 min for both alkaline (Figure 3b) and acid (Figure 3c) hydrolysis. Samples exposed to photolytic and thermal stress showed no significant decrease in TPV content and did not present new detectable peaks (electropherograms not showed). These set of results indicated that

the main pathway for TPV degradation might be through oxidation. An unexpected peak (IMP) was observed in the standard electropherogram at 2.43 min (Figure 3d), and was posteriorly identified by HRMS (section 3.4). The quantity of the impurity was determined as a percentage of the TPV peak [37], which is the usual method prescribed by the pharmacopoeias, and the purity of the standard was recalculated. In all degradation conditions, the analyte peaks had a purity higher than 99.9%, which suggested that there was no comigration and the method was specific.



**Fig. 3.** Electropherograms obtained during forced degradation studies. **(a)** Oxidative degradation with oxygen peroxide; **(b)** alkaline hydrolysis; **(c)** acidic hydrolysis; **(d)** TPV standard; **(e)** TPV sample solution without degradation. DP1: degradation product 1; DP2: degradation product 2; IMP: TPV impurity.

### 3.3.2 Linearity and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ)

Preliminary linearity studies indicated that the LOQ of this method was around  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , which was then used as the lower concentration of the definitive analytical curve. The data obtained from plotting the area ratio between TPV and the IS versus the drug concentration confirmed the linearity in the range of 20 to  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The correlation equation obtained for the linear model was  $y = (0,0068 \pm 0,0002)x + (0,0015 \pm 0,0031)$ ,  $r = 0,9999$ . To verify the good fitting of the method, an analyses of variance (ANOVA) was performed and there was no linear deviation ( $F_{\text{calculated}} = 0.6327 < F_{\text{critical}} = 3.71$ ,  $\alpha=0.05$ ) and significant regression ( $F_{\text{calculated}} = 14,484 > F_{\text{critical}} = 4.96$ ,  $\alpha=0.05$ ).

The calculated LOD was  $5.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , which was experimentally tested by injecting TPV at this concentration, with satisfactory result.

### 3.3.3 Accuracy

The accuracy of the method was assessed by calculating the recovery percentage of TPV standard added to TPV samples in three concentration levels, corresponding to 70%, 100% and 130% of the assay concentration. The mean recovery was  $100.50\% \pm 1.57$  demonstrating the accuracy of the method (Table 2).

**Table 2.** Results from the recovery study for the CZE method

Standard solution ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Recovery (%) <sup>a</sup>	RSD (%) <sup>a</sup>	Mean recovery (%) <sup>b</sup>
Added	Found			
20	20.2	$101.1 \pm 1.5$	1.5	$100.5 \pm 1.6$
50	49.4	$98.8 \pm 0.7$	0.7	
80	81.3	$101.6 \pm 0.5$	0.5	

<sup>a</sup>mean of three replicates  $\pm$  SD

<sup>b</sup>mean of all recovery levels  $\pm$  SD (n=9)

### 3.3.4 Precision

The precision was evaluated in terms of repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). The repeatability (n=6) was evaluated as the RSD of six independent samples. The intermediate precision was assessed by the analyses of other six different samples by a different analyst. Both repeatability and intermediate precision levels showed low RSD values (<2%), confirming the good precision of the method. These results are summarized in Table 3.

**Table 3.** Results for the repeatability and intermediate precision of the CZE method

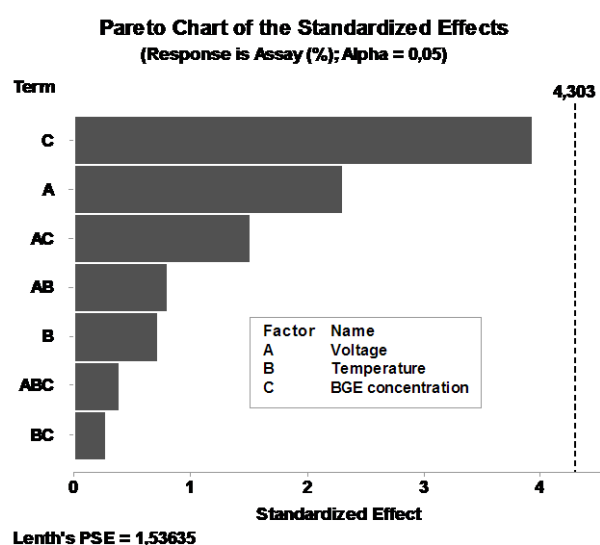
Day	Intra-day			Inter-day		
	n	Assay (%) <sup>a</sup>	RSD (%) <sup>a</sup>	n	Assay (%) <sup>b</sup>	RSD (%) <sup>b</sup>
1	6	103.6 ± 1.6	1.5	12	103.0 ± 1.6	1.6
2	6	102.5 ± 1.7	1.6			

<sup>a</sup> mean of 6 replicates ± SD

<sup>b</sup> mean of 12 replicates ± SD

### 3.3.5 Robustness

Method robustness was studied by a full factorial design, where the effect of changes in some analytical factors and their combinations over the method response (TPV content) was evaluated, and the result was illustrated by a Pareto chart (Figure 4). In Pareto chart, the length of the bars is determined by the absolute value of the effect divided by pseudo-standard error defined by Lenth (Lenth's PSE) [38]. The parameters evaluated were voltage, capillary temperature and buffer concentration, which correspond to the codes A, B and C, respectively (Figure 4). The interaction between two or three factors is represented by the combination of the respective codes. A vertical line drawn in the chart represents the critical *t*-value ( $\alpha = 0.05$ ) and one bar smaller than the critical *t*-value indicates the absence of significance of the considered factor. Therefore, the changes made in the factors studied did not modify the analytical response, indicating the method robustness.



**Fig. 4** Pareto chart representing the effects produced by single factors and their interactions on the TPV assay

### 3.4 Degradation kinetic of TPV in oxidative medium

Chemical and physical degradation of pharmaceutical forms and drugs may change their pharmacological effects, resulting in altered therapeutic effects as well as toxicological consequences. Therefore, understanding the factors that change the stability of pharmaceuticals and identifying ways to guarantee their stability are important [23]. During the forced degradation test, we observed that oxidation was the main degradation route of TPV and for better understanding its characteristics, a degradation kinetic study was performed. Thus, the decrease of TPV concentration in oxidative media (30% hydrogen peroxide) over time was monitored by the CZE method developed and the degradation kinetics was calculated using the graphic method [23]. Evaluation of the correlation coefficients indicated that the degradation process of TPV in oxidative media is described by second-order kinetics, under the experimental conditions of the study (Table 4). A second-order reaction has a rate proportional to the concentration of the square of a single reactant or the product of the concentration of two reactants [23]. From the slope of the straight line, it was possible to determine the second-order rate constant ( $k = 0.0012 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ ) and then, the  $t_{90}$  (time for 10% decomposition), 55 minutes.

**Table 4.** Data obtained from oxidative degradation kinetic study

Time of reaction (hours)	TPV residual content (%) <sup>a</sup>	Kinetic study
0	100.00 ± 0.04	Zero: $y = -5.1199x + 92.8580$ , $r = 0.9752$
1	87.43 ± 1.57	First: $y = -0.0327x + 1.9762$ , $r = 0.9927$
2	77.99 ± 0.05	Second: $y = 0.0012x + 0.0102$ , $r = 0.9977$
4	69.52 ± 0.45	
6	58.19 ± 1.11	
8	52.48 ± 0.62	
10	45.65 ± 0.22	

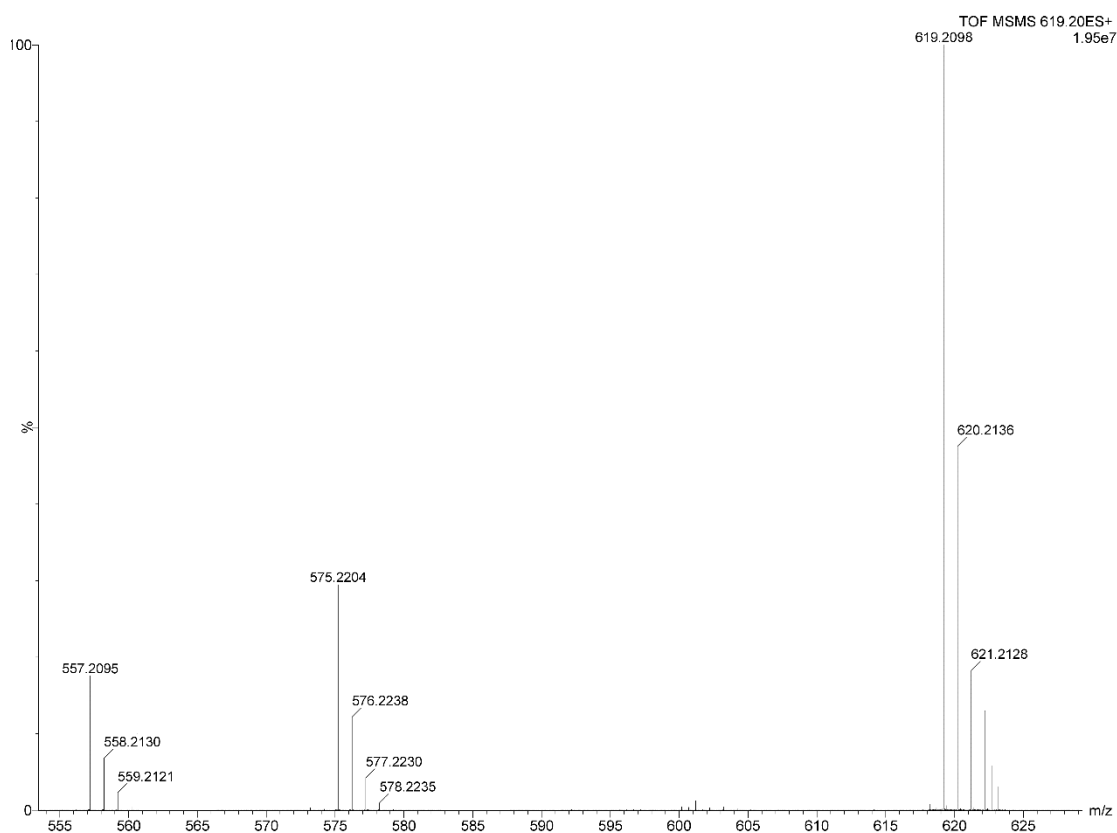
<sup>a</sup>mean of 3 replicates ± SD



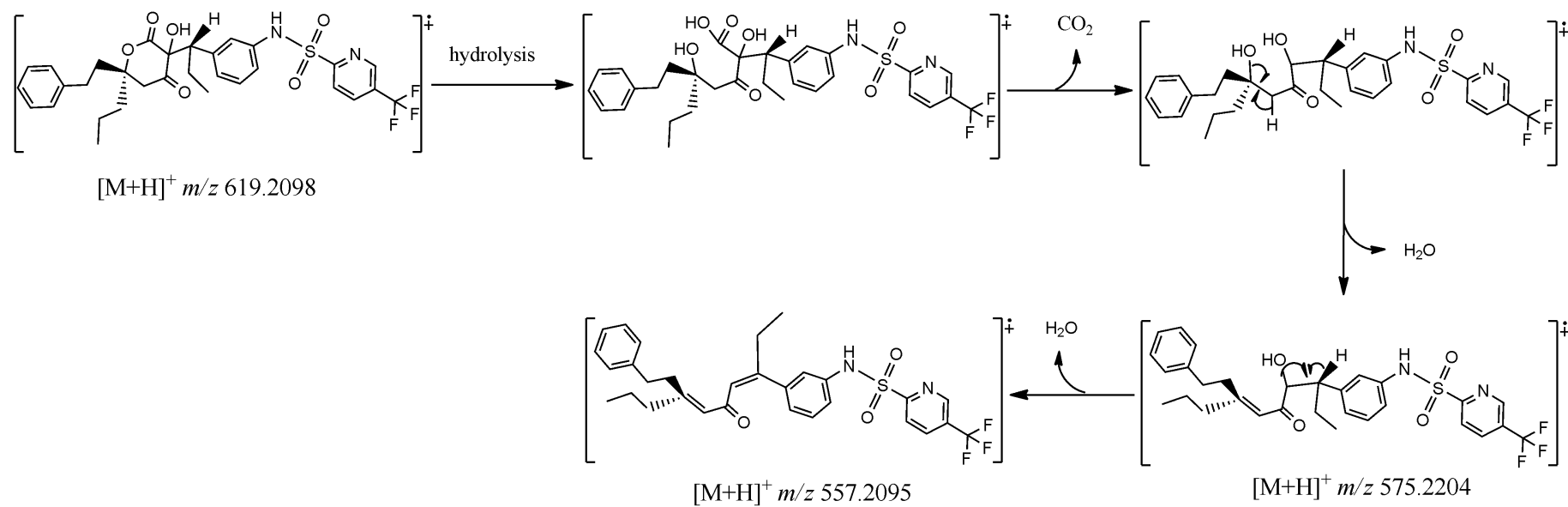
### 3.5 Identification of TPV degradation product and standard impurity by HRMS

Prior to the HRMS analysis of the organic impurities, a full scan analysis of TPV was carried out. The full scan mass spectrum of TPV showed the protonated form as the molecular ion of  $m/z$  603.2151 and two characteristic fragments of  $m/z$  585.2053 and  $m/z$  411.0641 (data not shown) which were already reported in the literature [14,39] and confirmed the identity of TPV standard.

The solution subjected to oxidative degradation was analyzed and the mass spectrum for the DP1 was obtained (Figure 5), showing a molecular ion with  $m/z$  619.2098. Fragmentation of the ion  $m/z$  619.2098 produced two main daughter ions of  $m/z$  575.2204, relative to the loss of a  $\text{CO}_2$  molecule, and  $m/z$  557.2095, relative to a subsequent loss of a water molecule. The probable structure of DP1, the structures of the daughter ions and a proposed fragmentation scheme for these ions are shown in Figure 6.

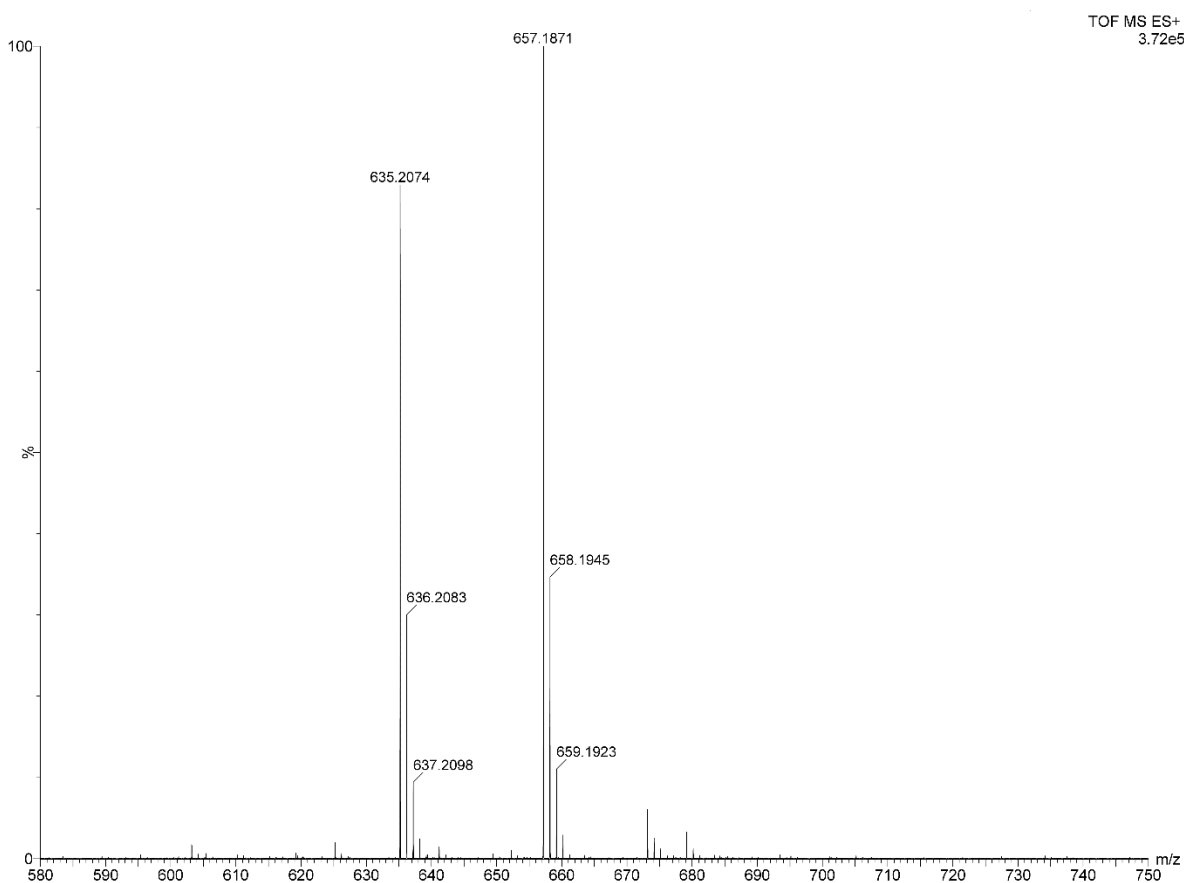


**Fig. 5.** High resolution mass spectrum of DP1 ions.



**Fig.6** Proposed chemical structure of DP1 and fragmentation pattern.

From the full-scan of the impurity isolated by semipreparative-LC from the standard solution, denominated IMP, a peak with  $m/z$  635.2074 was observed (Figure 7). The difference of +32 Da between TPV and IMP is compatible with the insertion of two oxygen atoms in the TPV molecule, i.e., TPV dioxide ( $C_{31}H_{33}F_3N_2O_7S$ ), not reported before in the literature. The peak with  $m/z$  657.1871 was assigned as an adduct of IMP with  $Na^+$ . Table 5 presents the summarized data of HRMS identification of TPV, PD1 and IMP. The values of mass accuracy were around 5 ppm which are acceptable for a Q-TOF mass spectrometer when proposing a molecular formula [40], and reinforces the proposed structures.



**Fig. 7.** Full-scan obtained from isolated impurity of TPV standard.

**Table 5.** Data obtained from HRMS analysis

<b>Molecular Formula</b>	<b>Compound</b>	<b>HRMS (calc.) [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>HRMS (obs.) [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Mass accuracy (ppm)</b>
C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	TPV	603.2141	603.2151	1.66
C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	PD1	619.2090	619.2098	1.29
C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	IMP	635.2039	635.2074	5.51

#### 4. CONCLUSION

To our best knowledge, the proposed CZE method is the first stability-indicating one aiming to assay TPV soft capsules. The method was specific, linear, precise, accurate, robust, simple, fast and environmentally friendly, and can be used in quality control analysis as well as in stability studies.

The forced degradation study indicated that oxidation is the most common degradation route of TPV, and based on Q-TOF fragmentation data, two TPV oxidation products were identified. Their structures suggest that multiple oxidation processes might occur, therefore caution to avoid this reaction during production process and storage should be taken.

## 5 REFERENCES

- [1] B.P. Giuseppina, A.M. Ruggieri, Molecular aspects of tumor cell migration and invasion, *Ann Ist Super Sanità.* 46 (2010) 66–80. doi:10.4415/ANN.
- [2] A.M.J. Wensing, N.M. van Maarseveen, M. Nijhuis, Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance, *Antiviral Res.* 85 (2010) 59–74. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.003.
- [3] T.R. MacGregor, J.P. Sabo, S.H. Norris, P. Johnson, L. Galitz, S. McCallister, Pharmacokinetic characterization of different dose combinations of coadministered tipranavir and ritonavir in healthy volunteers., *HIV Clin. Trials.* 5 (2004) 371–82. doi:10.1310/RRX7-49ME-27V7-MWWV.
- [4] Z. Temesgen, J. Feinberg, Tipranavir: A New Option for the Treatment of Drug-Resistant HIV Infection, *Clin. Infect. Dis.* 45 (2007) 761–769. doi:10.1086/520847.
- [5] J.J. Eron, HIV-1 Protease Inhibitors, *Clin. Infect. Dis.* 30 (2000) 160–170. doi:10.1086/313853.
- [6] W. Cunico, C.R.B. Gomes, W.T. Vellasco, HIV - Recentes avanços na pesquisa de fármacos, *Quim. Nova.* 31 (2008) 2111–2117. doi:10.1590/S0100-40422008000800035.
- [7] Z. Lv, Y. Chu, Y. Wang, HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity, *HIV/AIDS - Res. Palliat. Care.* 7 (2015) 95–104. doi:10.2147/HIV.S79956.
- [8] C.A. Busacca, S. Campbell, A. Saha, J.C. Lorenz, K. Grozinger, P.J. Jones, N. Grinberg, S. Shen, H. Lee, F. Qiu, A. Granger, Z. Yuabova, D. Norwood, C.H. Senanayake, Structure elucidation and total synthesis of a unique group of trace impurities in Tipranavir drug product, *Magn. Reson. Chem.* 43 (2005) 1032–1039. doi:10.1002/mrc.1672.
- [9] J. Gathe, D. a Cooper, C. Farthing, D. Jayaweera, D. Norris, G. Pierone, C.R. Steinhart, B. Trottier, S.L. Walmsley, C. Workman, G. Mukwaya, V. Kohlbrenner, C. Dohnanyi, S. McCallister, D. Mayers, Efficacy of the protease inhibitors tipranavir plus ritonavir in treatment-experienced patients: 24-week analysis from the RESIST-1 trial., *Clin. Infect. Dis.* 43 (2006) 1337–46. doi:10.1086/508353.
- [10] M. Simiele, A. Ariaudo, A. De Nicolò, F. Favata, M. Ferrante, C. Carcieri, S.

- Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio, UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of three new antiretroviral drugs, dolutegravir, elvitegravir and rilpivirine, and other thirteen antiretroviral agents plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 223–230. doi:10.1016/j.jpba.2017.02.002.
- [11] Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet, A. Robinet, H. Marty, C. Gozalo, D. Lamiable, H. Millart, Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 86 (2013) 100–111. doi:10.1016/j.jpba.2013.08.002.
- [12] A. D'Avolio, M. Simiele, M. Siccardi, L. Baietto, M. Sciandra, V. Oddone, F.R. Stefani, S. Agati, J. Cusato, S. Bonora, G. Di Perri, A HPLC-MS method for the simultaneous quantification of fourteen antiretroviral agents in peripheral blood mononuclear cell of HIV infected patients optimized using medium corpuscular volume evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 779–788. doi:10.1016/j.jpba.2010.10.011.
- [13] J. Martin, G. Deslandes, E. Dailly, C. Renaud, V. Reliquet, F. Raffi, P. Jolliet, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 3072–3082. doi:10.1016/j.jchromb.2009.07.031.
- [14] K.M.L. Crommentuyn, H. Rosing, M.J.X. Hillebrand, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, Simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitors atazanavir and tipranavir in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 804 (2004) 359–367. doi:10.1016/j.jchromb.2004.01.041.
- [15] N. Charbe, S. Baldelli, V. Cozzi, S. Castoldi, D. Cattaneo, E. Clementi, Development of an HPLC-UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 396–403. doi:10.1016/j.jpha.2016.05.008.
- [16] P. Langmann, W. Heinz, H. Klinker, D. Schirmer, C. Guhl, M. Leyh, R. Winzer,

- High performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 protease inhibitor tipranavir in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy., *Eur. J. Med. Res.* 13 (2008) 52–58.
- [17] A. D'Avolio, M. Sciandra, M. Siccardi, L. Baietto, D.G. de Requena, S. Bonora, G. Di Perri, A simple and sensitive assay for determining plasma tipranavir concentration in the clinical setting by new HPLC method, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 848 (2007) 374–378. doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.030.
- [18] H. Rebiere, B. Mazel, C. Civade, P.A. Bonnet, Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 376–383. doi:10.1016/j.jchromb.2006.12.007.
- [19] E. Dailly, V. Reliquet, C. Victorri-Vigneau, F. Raffi, P. Jolliet, A simple high performance liquid chromatography assay for monitoring plasma concentrations of tipranavir in HIV infected patients, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 832 (2006) 317–320. doi:10.1016/j.jchromb.2006.02.004.
- [20] E. Giraud, E. Rey, J.-M. Tréluyer, G. Pons, V. Jullien, Quantification of tipranavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830 (2006) 86–90. doi:10.1016/j.jchromb.2005.10.024.
- [21] N.L. Rezk, R.D. Crutchley, R.F. Yeh, A.D.M. Kashuba, Full validation of an analytical method for the HIV-protease inhibitor atazanavir in combination with 8 other antiretroviral agents and its applicability to therapeutic drug monitoring., *Ther Drug Monit.* 28 (2006) 517–525. doi:10.1097/00007691-200608000-00006.
- [22] P.V.V. Satyanarayana, A.S. Madhavi, A Novel RP-HPLC Method for the Quantification of Tipranavir In Formulations, *Int. J. Adv. PHARMACY, Biol. Chem.* 1 (2012) 516–521.
- [23] S. Yoshioka, V.J. Stella, *Stability of Drugs and Dosage Forms*, 2002.
- [24] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), in: *Int. Conf. Harmon. Geneva, 1994*, (accessed 03.05.17).

- [25] E. Dominguez-Vega, T. De Vijlder, E.P. Romijn, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as a highly selective tool for the compositional and site-specific assessment of multiple peptide-deamidation, *Anal. Chim. Acta.* 982 (2017) 122–130. doi:10.1016/j.aca.2017.06.021.
- [26] J.A.F. Da Silva, W.K.T. Coltro, E. Carrilho, M.F.M. Tavares, Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares, *Quim. Nova.* 30 (2007) 740–744. doi:10.1590/S0100-40422007000300040.
- [27] S.A.A. Rizvi, D.P.S. Do, A. Mahmoud, Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC), *Eur. J. Chem.* 2 (2011) 276–281. doi:10.5155/eurjchem.2.2.276.
- [28] A.T. Barden, B.L. Piccoli, N.M. Volpato, M. Steppe, A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets, *Anal. Methods.* 5 (2013) 5701–5708. doi:10.1039/c3ay41051j.
- [29] G.D. Watson, *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, in: *Pharm. Anal. A Textb. Pharm. Students Pharm. Chem.*, 2nd ed., Churchill Livingstone, 2005: pp. 49–71.
- [30] US Pharmacopeia XXXIV, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2016.
- [31] G.A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatographic methods for the pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between the requirements of the US Food and Drug Administration, and the US Pharmacopeia and the International Con, *J. Chromatogr. A.* 987 (2003) 57–66.
- [32] F. Xiao, S.A. Golovko, M.Y. Golovko, Identification of novel non-ionic, cationic, zwitterionic, and anionic polyfluoroalkyl substances using UPLC–TOF–MS E high-resolution parent ion search, *Anal. Chim. Acta.* 988 (2017) 41–49. doi:10.1016/j.aca.2017.08.016.
- [33] N.R. Wingert, N.O. dos Santos, M.A.G. Nunes, P. Gomes, E.I. Müller, É.M.M. Flores, M. Steppe, Characterization of three main degradation products from novel oral anticoagulant rivaroxaban under stress conditions by UPLC-Q-TOF-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123 (2016) 10–15. doi:10.1016/j.jpba.2016.01.053.
- [34] S. Chen, M.S. Dudhedia, Z. Wang, R.T. Darrington, T. Tamblyn, J.A. Smoliga, P.J. Jones, S.L. Krill, Drug-excipient complexation in lipid based delivery



- systems: An investigation of the tipranavir-1,3-dioctanolyglycerol complex, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1732–1743. doi:10.1002/jps.21542.
- [35] M.F.M. Tavares, Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Quim. Nova.* 20 (1997) 493–511. doi:10.1590/S0100-40421997000500010.
- [36] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 29–37. doi:10.1016/j.addr.2006.10.006.
- [37] S. Görög, Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 852–862. doi:10.1007/s00216-003-2140-6.
- [38] R. V. Lenth, Quick and easy analysis of unreplicated factorials, *Technometrics.* 31 (1989) 469–473.
- [39] R. ter Heine, C.G. Alderden-Los, H. Rosing, M.J.X. Hillebrand, E.C.M. van Gorp, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, Fast and simultaneous determination of darunavir and eleven other antiretroviral drugs for therapeutic drug monitoring: method development and validation for the determination of all currently approved HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse tr, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2505–2514. doi:10.1002/rcm.3119.
- [40] M.P. Balogh, Debating Resolution and Mass Accuracy in Mass Spectrometry When considering accurate mass and greater resolution , which mass spectrometer provides, *Spectroscopy.* 19 (2004) 34–40.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

---

A análise de produtos farmacêuticos envolve a realização de testes físicos, químicos e muitas vezes microbiológicos. Com todo o investimento financeiro realizado na área do controle de qualidade e dada sua importância para a segurança e qualidade dos medicamentos, é de grande relevância que sejam desenvolvidos e disponibilizados métodos analíticos confiáveis (WATSON, 2005).

No ano de 2019 ocorrerá o término da vigência da última patente do TPV (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY, 1998) e dessa forma, outros laboratórios farmacêuticos poderão produzir medicamentos que contenham esse fármaco. Sendo assim, torna-se muito relevante o estudo de métodos analíticos e estudos de estabilidade, que possam amparar o desenvolvimento de novas formulações.

Com exceção de dois métodos não indicativos de estabilidade voltados à análise do TPV em formulações ou como matéria-prima, os métodos analíticos disponíveis na literatura, até o momento, são métodos cromatográficos, ou espectrofotométricos, voltados ao doseamento de TPV em matrizes biológicas.

Em relação à matéria-prima, nesse estudo o fármaco foi analisado pelas técnicas de espectrofotometria no IV, no UV e espectrometria de massas, sendo a identidade definitivamente confirmada pela última técnica, uma vez que não há espectros de UV ou IV já reportados, para comparação.

Além dessas técnicas, a matéria-prima foi submetida à RMN de  $H^1$  e de  $C^{13}$ . Como resultado, os espectros obtidos mostraram muitos sinais além dos esperados, o que foi atribuído à presença de uma impureza, que vinha sendo evidenciada nos eletroferogramas das soluções padrão, e que estava ausente nas soluções da amostra. Decidiu-se então purificar a matéria-prima, a fim de obter espectros de RMN do TPV sem interferentes.

As primeiras tentativas de purificação foram realizadas por cromatografia preparativa em coluna de sílica, utilizando hexano e acetato de etila na proporção 73:27 (v/v) como fase móvel. Testes prévios foram realizados onde hexano, acetato de etila e diclorometano foram utilizados em misturas binárias, sendo que a única fase móvel que mostrou resultados positivos foi a mistura entre hexano e acetato de etila. Sem resultados satisfatórios para separação por cromatografia preparativa, partiu-se então para a separação por cromatografia preparativa em camada delgada (CCD), utilizando a mesma fase móvel mencionada anteriormente. No entanto, após analisar

as frações oriundas da CCD preparativa pelo método de CZE, constatou-se que ambas as metodologias aplicadas não possuíam eficiência de separação suficiente para a purificação do TPV.

A partir desses resultados ficou evidente a necessidade de uma técnica com maior eficiência de separação. Para esse fim foi utilizado um método de CLAE em coluna semipreparativa, descrito no item 2.2 – Capítulo 2, que possibilitou o isolamento da impureza orgânica e do TPV. As frações relativas a cada substância foram coletadas, e para a fração contendo o TPV os solventes orgânicos foram removidos em evaporador rotatório a 60°C, e por fim, a água foi removida por liofilização. Análises dessa fração por CZE, imediatamente após sua coleta, indicaram que o método cromatográfico era adequado para a separação, pois a fração estava pura. No entanto, a análise após a evaporação dos solventes e liofilização indicou que o TPV havia sido perdido durante o processo de secagem. Novas separações foram realizadas pelo mesmo método cromatográfico, seguidas de evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório, porém em temperatura mais baixa (45°C). Além disso, em vez da liofilização, realizou-se extração líquido-líquido com acetato de etila, visto que o TPV é solúvel nesse solvente, seguida de evaporação do solvente, em evaporador rotatório a 45°C. O produto final desse processo foi analisado pelo método de CZE sendo evidenciado apenas o pico relativo ao TPV, o que sugeria a pureza do produto obtido e sua adequabilidade para o fim proposto. A fração contendo a impureza não foi levada à secura, pois devido à baixa quantidade, as possibilidades de perda durante o processo eram muito elevadas. Sendo assim, essa fração foi mantida em estado líquido, na fase móvel, e reservada para análise por espectrometria de massas.

Foram realizadas novas análises de RMN do TPV isolado, diluído em diferentes solventes deuterados, sendo eles clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e dimetilsulfóxido (DMSO). O mesmo padrão de sinais excessivos, evidenciado para o TPV sem purificação, foi observado. A hipótese inicial foi a existência de confômeros, pois a molécula de TPV possui ligações rotacionáveis que poderiam “travar” em confômeros durante a análise. Para testar essa hipótese, foram realizadas medidas em diferentes temperaturas (-30°C a 80°C), pois baixas temperaturas iriam estabilizar a estrutura em apenas um confômero, e por outro lado, altas temperaturas iriam impossibilitar o “travamento” mantendo a molécula em movimento. Ao fim, em todas as condições testadas o espectro de RMN mostrou-se confuso e com mais sinais do

que foi previsto, com resultados inconclusivos, o que impossibilitou a obtenção de espectros de RMN do TPV.

Paralelamente à qualificação da matéria-prima, foi desenvolvido o método para análise quantitativa das cápsulas de TPV, por CZE. Para possibilitar a análise, o pH do eletrólito de corrida deveria ser alcalino para garantir a ionização do fármaco, característica imprescindível dessa técnica. Desse modo, foram realizadas análises usando como eletrólito tampão fosfato de sódio com diferentes valores de pH (8, 9 e 10), de soluções com concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e sendo a injeção da amostra em pressão de 50 mBar, por 5 segundos. Essas condições produziram picos largos e de baixa intensidade. Substituiu-se o tampão fosfato por tampão borato de sódio, e desde as primeiras tentativas, na concentração de 20 mM e pH 9,0 foram obtidos picos com boa simetria, porém com baixa intensidade. A fim de aumentar a intensidade do pico do pico do TPV, foram modificadas a concentração da solução ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as condições da injeção (100 mBar por 5 segundos), e picos adequados foram obtidos.

As demais condições do método, como temperatura, voltagem e comprimento de onda de detecção foram otimizadas. Nas análises iniciais usou-se ciprofloxacino como padrão interno, o qual veio a ser substituído pela furosemida, pois durante os estudos de degradação forçada foi observado que um produto de degradação possuía o mesmo tempo de migração que o ciprofloxacino. Como a furosemida apresentava tempo de migração muito próximo ao do TPV, foi adicionado metanol ao eletrólito de corrida, a fim de aumentar a resolução entre os picos, o que gerou resultados satisfatórios. Como resultado o eletrólito de corrida foi modificado para uma mistura de borato de sódio 50 mM, pH 9,0 e metanol, na proporção 95:5 (v/v), sendo que as demais condições foram mantidas.

Com as condições ideais já estabelecidas, deu-se seguimento à validação do método. Durante os testes de seletividade foram identificados dois produtos de degradação, um proveniente de degradação oxidativa (PD1) e outro proveniente das hidrólises alcalina e ácida (PD2). Através do DAD foi avaliada a pureza dos picos do TPV e do padrão interno ( $>0,999$ ) em todas as condições, o que atestou a seletividade do método. O método mostrou-se linear nas concentrações de 20 a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preciso (DPR 1,59%) e exato ( $100,50 \pm 1,57\%$ ). A robustez foi avaliada por um fatorial  $2^3$  completo com três pontos centrais, tendo sido avaliados os fatores voltagem, temperatura do capilar e concentração do eletrólito. O parâmetro analítico avaliado foi

o teor de TPV, frente às modificações de cada fator. O método por CZE proposto provou ser específico, linear, preciso, exato e robusto.

Uma vez que as condições usadas no método de CZE possibilitaram a separação da impureza orgânica presente na SQR, o teor da impureza na SQR foi expresso como percentual do componente principal, que é a técnica usual em farmacopeias (GOROG, 2003). Por conseguinte, o teor de TPV na SQR foi corrigido, obtendo-se o valor de 91,63%, que foi usado em todas as análises realizadas. Considerando que a absorvidade do TPV e da impureza são semelhantes no comprimento de onda usado, atribui-se pouco erro a essa estimativa (GOROG, 2003).

Nos testes de degradação forçada não foi observada a ocorrência de degradação fotolítica ou térmica. As demais degradações foram efetivas e acompanhadas do surgimento de produtos de degradação após exposição do fármaco aos meios oxidante, ácido e básico. Em contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% o TPV degradou cerca de 12% em apenas 8 horas, e foi observada a formação de um produto de degradação, com tempo de migração de cerca de 2,43 minutos, denominado PD1. Nas condições de hidrólise ácida e básica, foram necessários 10 dias para produzir nível de degradação similar, tendo sido evidenciado produto de degradação com tempo de migração de 2,66 minutos, em ambas as condições (PD2). Sendo a oxidação a rota de degradação mais rápida, o produto de degradação PD1 foi selecionado para ser identificado por espectrometria de massas (Q-TOF), tendo sido evidenciado íon [M+H<sup>+</sup>] de *m/z* 619,2098, compatível com a massa do TPV adicionada de um átomo de oxigênio. A mesma substância foi reportada por Busacca e colaboradores, quando o TPV foi oxidado pelo oxigênio atmosférico em um sistema de refluxo com etanol (BUSACCA et al., 2005).

A impureza orgânica presente no padrão, previamente isolada por CLAE semipreparativa, foi também analisada por espectrometria de massas, onde foi evidenciado íon de *m/z* 635.2074, compatível com a massa do dióxido de TPV, até então não reportado. As análises realizadas ao longo dos meses de trabalho evidenciaram que houve uma proporção constante do pico da impureza em relação ao pico do TPV, o que demonstra que essa impureza foi formada durante algum processo anterior à chegada no laboratório de pesquisa. O conjunto de resultados aponta para a susceptibilidade do TPV à oxidação, portanto medidas preventivas para evitar a oxidação do fármaco, como a escolha de adjuvantes e embalagens, são relevantes para aumentar a estabilidade desse fármaco e suas preparações.

## 7 CONCLUSÃO

---

A análise dos espectros na região do UV e IV, e a espectrometria de massas permitiram caracterizar a SQR e fornecer dados até então indisponíveis na literatura. Foi possível atestar que o método indicativo de estabilidade por CZE para quantificação de cápsulas de tipranavir, desenvolvido nesse trabalho, foi seletivo, exato, preciso, robusto e linear na faixa estudada. Através dos estudos de degradação forçada foi observado que o tipranavir degrada rapidamente em condições oxidativas. Então, realizou-se a identificação da estrutura do produto de degradação por oxidação através de espectrometria de massas de alta resolução, chegando a uma molécula correspondente ao tipranavir acrescido de um átomo de oxigênio.

A impureza encontrada na SQR foi isolada e identificada por espectrometria de massas, e corresponde ao dióxido de tipranavir. O conjunto de resultados obtidos, sugere a instabilidade do tipranavir frente a condições oxidativas.

## 8 REFERÊNCIAS

---

- AGUIAR, F. A. **Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina.** 2013. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2013
- BAKSHI, M.; SINGH, S. **Development of validated stability-indicating assay methods - Critical review** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002.
- BARDEN, A. T. et al. A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets. *Analytical Methods*, v. 5, n. 20, p. 5701–5708, 2013.
- BEAN, P. New Drug Targets for HIV on JSTOR. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, n. Suppl 1, p. S96–S100, 2005.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE Nº 1, de 29 de julho de 2005. **Determina a publicação do “Guia par a realização de Estudos de Estabilidade”**. D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder executivo, 29 de julho de 2005
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 45, de 9 de agosto de 2012. **“Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos”**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de agosto de 2012.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 53 de 04 de dezembro de 2015. **Estabelece 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, e dá outras providências.** 2015
- BRASIL. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico de Aids 2016.** Disponível em <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/boletim-epidemiologico-de-aids-2016/> . Acesso em 13 de fevereiro de 2017.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da outras providências.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 25 de julho de 2017.
- DRUGBANK. Tipranavir. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00932>. Acesso em 20 de agosto de 2016.
- BUSACCA, C. A. et al. Structure elucidation and total synthesis of a unique group of

trace impurities in Tipranavir drug product. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 1032–1039, 2005.

CHARBE, N. et al. Development of an HPLC-UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 6, p. 396–403, 2016.

CHEN, S. et al. Drug-excipient complexation in lipid based delivery systems: An investigation of the tipranavir-1,3-dioctanolyglycerol complex. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 5, p. 1732–1743, maio 2009.

CROMMENTUYN, K. M. L. et al. Simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitors atazanavir and tipranavir in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n. 2, p. 359–367, 2004.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO, W. T. HIV - Recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 2111–2117, 2008.

D'AVOLIO, A. et al. A simple and sensitive assay for determining plasma tipranavir concentration in the clinical setting by new HPLC method. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 848, n. 2, p. 374–378, 2007.

D'AVOLIO, A. et al. A HPLC-MS method for the simultaneous quantification of fourteen antiretroviral agents in peripheral blood mononuclear cell of HIV infected patients optimized using medium corpuscular volume evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 779–788, 2011.

DA SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, 2007.

DAILLY, E. et al. A simple high performance liquid chromatography assay for monitoring plasma concentrations of tipranavir in HIV infected patients. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 832, n. 2, p. 317–320, 2006.

DJERADA, Z. et al. Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 100–111, 2013.

ELODIUS: cápsulas. Responsável técnico Laura M. S. Ramos. Itapecerica da Serra: Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda, 2009. Bula de remédio.

GATHE, J. et al. Efficacy of the protease inhibitors tipranavir plus ritonavir in treatment-experienced patients: 24-week analysis from the RESIST-1 trial. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society**



of **America**, v. 43, n. 10, p. 1337–46, 2006.

GELDERBLOM, H. et al. Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 13, p. 1590–1598, 2001.

GIRAUD, E. et al. Quantification of tipranavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 830, n. 1, p. 86–90, 2006.

GIUSEPPINA, B. P.; RUGGIERI, A. M. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. **Ann Ist Super Sanità**, v. 46, n. 1, p. 66–80, 2010.

GREENE, W. C. et al. Novel targets for HIV therapy. **Antiviral Research**, v. 80, n. 3, p. 251–265, 2008.

GONZÁLEZ, G. A.; HERRADOR, A. M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007.

GÖRÖG, S. Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 5, p. 852–862, 2003.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: **Stability Testing of New Drug Substances and Products - Q1A (R2)** 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: **Guideline on Validation of Analytical Procedure – Q2 (R1)**, 2005.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S.; **Capillary Electrophoresis: Principles and Practice**. Springer-Verlag: Berlin, 1993. 375 p.

LANGE, J. M. A.; ANANWORANICH, J. The discovery and development of antiretroviral agents. **Antiviral Therapy**, v. 19, p. 5–14, 2014.

LANGMANN, P. et al. High performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 protease inhibitor tipranavir in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy. **European journal of medical research**, v. 13, n. 2, p. 52–58, 25 fev. 2008.

LARDER, B. A et al. Tipranavir inhibits broadly protease inhibitor-resistant HIV-1 clinical samples. **AIDS (London, England)**, v. 14, n. 13, p. 1943–1948, 8 set. 2000.

LARDER, B. A.; DARBY, G.; RICHMAN, D. D. HIV with reduced sensitivity to Zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. **Science**, v. 234, p. 1731–1734, 1989.

LV, Z.; CHU, Y.; WANG, Y. HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 7, p. 95–104, 2015.

MACGREGOR, T. R. et al. Pharmacokinetic characterization of different dose combinations of coadministered tipranavir and ritonavir in healthy volunteers. **HIV clinical trials**, v. 5, n. 6, p. 371–82, 2004.

MARTIN, J. et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 27, p. 3072–3082, 2009.

MITSUYA, H. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. 20, p. 7096–7100, 1985.

OMS – Organização Mundial da Saúde. HIV reporting: **Global update on the health sector response to HIV, 2014**, July 2014.

PHARMACIA & UPJOHN COMPANY. Ping Gao; Walter Morozowich. **Pharmaceutical composition for acidic lipophilic compounds in a form of a self-emulsifying formulation**. US n. 6,231,887 Bl. 27 jul. 1998: 15 mai. 2001. 27 jan. 2019.

POLEJACK, L.; SEIDL, E. Monitoramento e avaliação da adesão ao tratamento antirretroviral para HIV/aids: desafios e possibilidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. Sup 1, p. 1201–1208, 2010.

RAO, R. N. et al. LC-MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Darunavir: An anti-HIV drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 28–33, 2014.

REBIERE, H. et al. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, n. 1–2, p. 376–383, 2007.

REZK, N. L. et al. Full validation of an analytical method for the HIV-protease inhibitor atazanavir in combination with 8 other antiretroviral agents and its applicability to therapeutic drug monitoring. **Ther Drug Monit**, v. 28, n. 4, p. 517–525, 2006.

RIBERA, E. et al. Características de los fármacos antirretrovirales. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 5, p. 362–391, 2011.

RIZVI, S. A. A.; DO, D. P. S.; MAHMOUD, A. Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). **European Journal of Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 276–281,

2011.

SATYANARAYANA, P. V. V.; MADHAVI, A. S. A Novel RP-HPLC Method for the Quantification of Tipranavir In Formulations. **International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 516–521, 2012a.

SATYANARAYANA, P. V. V.; MADHAVI, A. S. New Spectrophotometric Methods for the Quantitative Estimation of Tipranavir in Formulations. **International Journal of Science and technology**, v. 2, n. 1, p. 48–54, 2012b.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. **Chromatographia**, v. 72, n. 1, p. 1–6, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ªed. Rio de Janeiro, LTC, 2005.

SIMIELE, M. et al. UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of three new antiretroviral drugs, dolutegravir, elvitegravir and rilpivirine, and other thirteen antiretroviral agents plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, p. 223–230, 2017.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1995.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TEMESGEN, Z.; FEINBERG, J. Tipranavir: A New Option for the Treatment of Drug-Resistant HIV Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 6, p. 761–769, 2007.

THAISRIVONGS, S. et al. Structure-Based Design of HIV Protease Inhibitors: Sulfonamide-Containing 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as Non-Peptidic Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 22, p. 4349–4353, jan. 1996.

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A. R. **Remington's: The science and practice of pharmacy**. 20 ed. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2000. p. 986-994.

VENUGOPAL, N.; VIJAYA, B. R. A.; MADHAVI, G. Development and validation of a systematic UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of three phenol impurities in ritonavir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 90, p. 127–133, 2014.

VERGANI, B.; RUSCONI, S. Tipranavir in the protease inhibitors arena. **Drugs in R and D**, v. 11, n. 4, p. 291–293, 2011.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis**. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WENSING, A. M. J.; VAN MAARSEVEEN, N. M.; NIJHUIS, M. Fifteen years of HIV

Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. **Antiviral Research**, v. 85, n. 1, p. 59–74, 2010.

YOSHIKA, S.; STELLA V.J.; **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.

ZOLOPA, A. R. The evolution of HIV treatment guidelines: Current state-of-the-art of ART. **Antiviral Research**, v. 85, n. 1, p. 241–244, 2010.