

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALLAN MICHAEL JUNKERT

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE  
ESTABILIDADE DO DASABUVIR POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA (CLAE-DAD) E  
INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

CURITIBA

2019

ALLAN MICHAEL JUNKERT

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE  
ESTABILIDADE DO DASABUVIR POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA (CLAE-DAD) E  
INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em **Ciências Farmacêuticas**, Setor de ciências da saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2019

Junkert, Allan Michael

Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade do Dasabuvir por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e investigação dos produtos de degradação [recurso eletrônico] / Allan Michael Junkert – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

1. Hepatite C. 2. Antivirais. 3. Dasabuvir. 4. Estabilidade de medicamentos. 5. Cromatografia líquida de alta pressão. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1901

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ALLAN MICHAEL JUNKERT** intitulada: **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA (CLAE-DAD) E INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2019.

ROBERTO PONTAROLO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

Avaliador Externo (PUC)

ANGELA CRISTINA LEAL BADARÓ TRINDADE

Avaliador Externo (UFPR)

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que participaram dessa conquista cheia de altos e baixos, provando que tudo é possível quando se está bem acompanhado.

Aos meus pais Walter Michael Junkert e Eliane Regina Junkert, defensores do meu sucesso ainda a ser alcançado. Pelo amor, carinho e nunca deixar faltar nada. Agradeço por apoiarem minhas escolhas e pela demonstração de orgulho até de pequenas conquistas.

Ao meu irmão Anderson Michael Junkert por acreditar em mim e sempre estar lá para me apoiar.

À Mariana Yukari Noguti, confidente e ouvinte árdua de minhas ideias e ambições, disposta a me animar em momentos de tristeza e rir comigo em momentos de felicidade.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo pela oportunidade de me provar, acreditando no meu potencial mesmo sendo de outra universidade. Orientador que me abriu os olhos para diversos assuntos, me fazendo crescer pessoalmente e profissionalmente.

Aos meus colegas e amigos do CEB, Raquel, Reginaldo, Victor, Alexandre, Beatriz, Flávia, Rebeca, Camilla, participando diariamente da vida laboratorial e auxiliando na tomada de decisão para o melhor rumo do meu projeto. Em especial quero agradecer à Mariana Fachi, pela bondade e o conhecimento infinito compartilhado; e ao Breno Marson, meu grande mentor científico que me auxiliou em todo o caminho com sua vasta experiência. Aos citados agradeço não só pelo suporte, mas também pela amizade criada no decorrer desses dois anos.

Aos amigos Victor, Rebeca, Fernanda, Melissa, Mariana Atherino e Alcindo que compartilharam das risadas, lágrimas e álcool, sabendo o quão árduo é o caminho de um pós-graduando.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e a CAPES pela oportunidade de me implementar e me aproximar de meu objetivo;

Aos professores da UFPR e de todas universidades que desempenham um papel importante na formação de diversas gerações de profissionais;

Ao grande professor Eikichi Onizuka que me ensinou que os professores são eternos alunos;

Ao percolado de pseudoalcalóide da *Coffea arabica* por me auxiliar nos momentos em que não conseguia ficar de pé.

**Muito obrigado!**

## RESUMO

**Introdução:** Dasabuvir (DBV) é um fármaco utilizado no tratamento da hepatite C. Sua ação deve-se a inibição da NS5B polimerase, enzima responsável pela replicação viral. A eficácia e segurança de um medicamento está diretamente relacionada com a sua estabilidade. A perda da estabilidade pode levar a subdose além de ocasionar o aparecimento de produtos de degradação (PD), que podem ser tóxicos para o paciente. Por esse motivo os estudos de estabilidade são determinantes na avaliação da qualidade de um medicamento. Um método indicativo de estabilidade para um medicamento é um método capaz de identificar e quantificar o fármaco na presença de seus PD na forma farmacêutica. O objetivo deste estudo foi obter o perfil de degradação do DBV, assim como desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade e a elucidação estrutural dos produtos de degradação detectados. **Método:** DBV foi submetido a condições de estresse ácida, alcalina, oxidativa, fotolítica e termal a fim de obter seu perfil de degradação. O método cromatográfico foi desenvolvido em cromatógrafo à líquido de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD). Diferentes condições cromatográficas foram testadas tais como: composição e pH da fase móvel, fluxo, temperatura e comprimento de onda de detecção, com intuito de otimizar a separação do DBV na presença dos PD. O método otimizado foi validado de acordo com a RDC 166/17 (ANVISA). A possível estrutura dos PD foi determinada com base nas análises por CLUE-qTOF. **Resultados:** DBV mostrou-se sensível à degradação ácida e alcalina. Ao todo, seis PD foram detectados. A condição cromatográfica adequada para a separação e quantificação do analito foi obtida utilizando uma coluna Symmetry® C18 (4,6x75 mm, 3,5 µm); como fase móvel, ácido fórmico 0,1%:acetonitrila (55:45, v/v) ; em fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e detecção de 244 nm. Com base no perfil de fragmentação e massa exata obtidos nos experimentos da espectrometria de massas, duas estruturas foram propostas para os produtos de degradação alcalina: [3-terc-butil-5-(6-metanosulfonamidonaftaleno-2-il)-4-metoxifenil]uréia e N-[6-(5-amino-3-terc-butil-2-metoxifenil)naftaleno-2-il]metano sulfonamida. **Conclusões:** O método indicativo de estabilidade para o DBV desenvolvido e validado mostrou-se adequado para a quantificação do fármaco na presença de seus produtos de degradação, sendo possível até então propor estruturas para dois produtos de degradação.

**Palavras-chave:** Hepatite C, antivirais, dasabuvir, estabilidade de medicamentos, cromatografia líquida de alta pressão.

## ABSTRACT

**Introduction:** Dasabuvir (DBV) is a drug used on the treatment of the hepatitis C virus infection, acting on the inhibition of NS5B polymerase, enzyme responsible for viral replication. Efficacy and safety of a medicine is directly related with the maintenance of its stability. Besides of subtherapeutical dose, the loss of stability causes the appearance of degradation products (DP), which may imply in toxicity to the patient, making the stability studies crucial to evaluate the quality of the medicine. This study proposes to obtain the degradation profile of DBV, developing and validating a stability-indicating method to monitorate DBV among its degradation products and impurities, elucidating the degradation structures. **Methods:** DBV underwent stress degradation conditions, such as acidic, alkaline, oxidative, photolytic and thermal to obtain its degradation profile. The chromatographic development was performed using a HPLC-DAD system (Agilent, 1100 series). Different chromatographic conditions were tested, such as: mobile phase composition and pH, flow, temperature, wavelength detection, aiming to achieve the separation of DBV in the presence of DPs. The method was validated accordingly RDC 166/17 (ANVISA). The structural elucidation of DPs was performed using a UPLC-QToF-MS system (Waters, Acquity H-class). **Results:** DBV has shown to be sensitive to acidic and alkaline medium, in total six degradation products were detected. The optimal separation was achieved using Symmetry<sup>®</sup> C18 (4.6x75mm, 3.5 $\mu$ m) column. Formic acid 0.1%:Acetonitrile (55:45, v/v) as mobile phase, at flow of 1 ml/min and 244 nm wavelength detection. Based on the fragmentation profile and exact mass, result of MS analysis, it was possible to propose two degradation structures from alkaline medium: [3-tert-butyl-5-(6-methanesulfonamidonaphthalen-2-yl)-4-methoxyphenyl]urea and N-[6-(5-amino-3-tert-butyl-2-methoxyphenyl)naphthalen-2-yl]methanesulfonamide. **Conclusion:** The stability-indicating method for DBV was developed and validated, showing to be suitable for the determination of the drug among its degradation products, being possible until now to propose two new degradation structures.

**Keywords:** Hepatitis C, antiviral, dasabuvir, drug stability, high pressure liquid chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO VHC E PROTEÍNAS ASSOCIADAS.....	23
FIGURA 2 – ESTRUTURA DO DASABUVIR .....	27
FIGURA 3 – CONCEITO DE ESTABILIDADE PREDITIVA.....	32
FIGURA 4 – ÍONS TOTAIS E PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR NO MODO POSITIVO.....	48
FIGURA 5 – ÍONS TOTAIS E PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR NO MODO NEGATIVO .....	49
FIGURA 6 – CROMATOGRAMA DO DASABUVIR OBTIDO PELO MÉTODO DESCRITO NA LITERATURA* .....	50
FIGURA 7 – OTIMIZAÇÃO DA PROPORÇÃO DA FASE MÓVEL DO PRÉ-MÉTODO .....	51
FIGURA 8 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO DBV .....	52
FIGURA 9 – PRÉ-MÉTODO OTIMIZADO DO DASABUVIR .....	52
FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM DIFERENTES CONDIÇÕES EM 48 HORAS.....	54
FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM SOLUÇÃO E SÓLIDO EM DIFERENTES CONDIÇÕES ATÉ SETE DIAS.....	55
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ÁCIDO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS.....	56
FIGURA 13 – ÁREA MÉDIA DOS PICOS CROMATROGRÁFICOS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ÁCIDO NO PERÍODO DE SETE DIAS .....	57
FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS.....	58
FIGURA 15 – ÁREA MÉDIA DOS PICOS CROMATROGRÁFICOS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO NO PERÍODO DE SETE DIAS .....	58

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO DASABUVIR E ESPECTROGRAMA RELATIVO AO TEMPO DE RETENÇÃO 2,137 MINUTOS OBTIDO POR CLUE-QTOF .....	59
FIGURA 17 – ESTRUTURAS DOS PRODUTOS DA FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR .....	61
FIGURA 18 – CROMATOGRAMAS OBTIDO POR CLUE-QTOF CONTENDO PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ÁCIDA E ALCALINA.....	62
FIGURA 19 – ESPECTROGRAMAS DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ÁCIDO.....	63
FIGURA 20 – ESPECTROGRAMAS DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO .....	65
FIGURA 21 – MECANISMO DE REAÇÃO PROPOSTA PARA A FORMAÇÃO DO PDB1.....	67
FIGURA 22 – MECANISMO DE REAÇÃO DO PDB2 .....	67
FIGURA 23 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DO PDB1 A PARTIR DO PDB2.....	68
FIGURA 24 – CROMATOGRAMAS DAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO ÁCIDA E ALCALINA DO DASABUVIR.....	69
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA COM AS RESOLUÇÕES DA MISTURA DO DASABUVIR E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	70
FIGURA 26 – INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO DA FASE MÓVEL NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	71
FIGURA 27 – INFLUÊNCIA DO FLUXO DA FASE MÓVEL NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	72
FIGURA 28 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	73
FIGURA 29 – INFLUÊNCIA DO PH DA FASE MÓVEL NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	74
FIGURA 30 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO PDa1 .....	77
FIGURA 31 – PUREZA DE PICO DO DASABUVIR E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	78
FIGURA 32 – RESÍDUO VERSUS NÚMERO DA OBSERVAÇÃO .....	80
FIGURA 33 – QUANTIL-QUANTIL (Q-Q) PLOT RESIDUAL.....	80

FIGURA 34 – RESÍDUO PADRONIZADO VERSUS VALOR DA REGRESSÃO AJUSTADO .....	81
FIGURA 35 – GRÁFICO DA REGRESSÃO LINEAR DO DASABUVIR .....	83
FIGURA 36 – PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DO TEMPO DE RETENÇÃO .....	86
FIGURA 37 – DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DO TEMPO DE RETENÇÃO .....	87
FIGURA 38 – PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DO TEOR.....	87
FIGURA 39 – DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DO TEOR.....	88
FIGURA 40 – PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 1 .....	88
FIGURA 41 – DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 1.....	89
FIGURA 42 – PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 2 .....	89
FIGURA 43 – DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 2.....	90

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – FUNÇÃO DOS GENES DO VHC.....	23
QUADRO 2 – PRINCIPAIS GRUPOS DE MEDICAMENTOS AAD PARA TRATAMENTO DE HEPATITE C .....	25
QUADRO 3 – POSSÍVEIS TRATAMENTOS DA HEPATITE C .....	26
QUADRO 4 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DASABUVIR.....	28
QUADRO 5 – LIMITES DE NOTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	32
QUADRO 6 – MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO DASABUVIR.....	35
QUADRO 7 – PARÂMETROS A SEREM CONSIDERADOS NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	37
QUADRO 8 – DESCRIÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DASABUVIR .	38
QUADRO 9 – COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA....	41
QUADRO 10 – TEMPO DE COLETA DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO .....	42
QUADRO 11 – PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO DASABUVIR.....	46
QUADRO 12 – PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ .....	47
QUADRO 13 – ÁREA DO PICO DO DBV EM DIFERENTES CONDIÇÕES EM 48 HORAS .....	54
QUADRO 14 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE .....	75
QUADRO 16 – PUREZA DE PICO DO DBV E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO .....	76
QUADRO 17 – SUMÁRIO DA ROBUSTEZ.....	90

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR .....	60
TABELA 2 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR DA CONDIÇÃO ALCALINA.....	66
TABELA 3 – PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO .....	66
TABELA 4 – RESOLUÇÃO DE PICOS CROMATOGRÁFICOS COM A MUDANÇA DA FASE MÓVEL .....	71
TABELA 5 – RESOLUÇÃO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS COM A MUDANÇA DO FLUXO DA FASE MÓVEL .....	72
TABELA 6 – RESOLUÇÕES DO PICO COM AS MUDANÇAS DA TEMPERATURA .....	73
TABELA 7 – RESOLUÇÃO DOS PICOS COM AS MUDANÇAS DE PH .....	74
TABELA 8 – PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DE SISTEMA CROMATOGRÁFICO .....	75
TABELA 9 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DASABUVIR.....	79
TABELA 10 – RESUMO DA ANÁLISE RESIDUAL .....	79
TABELA 11 – ESTATÍSTICA DOS RESÍDUOS.....	80
TABELA 12 – REGRESSÃO LINEAR DO DASABUVIR .....	82
TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA REGRESSÃO DO DASABUVIR .....	82
TABELA 14 – EXATIDÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	83
TABELA 15 – REPETITIVIDADE DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	84
TABELA 16 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR .....	84
TABELA 17 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DASABUVIR.....	85
TABELA 18 – PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL PARA A ROBUSTEZ DO DBV ..	85

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAD –	Agente Antiviral de Ação Direta
AASLD –	Associação Americana de Estudos em Doenças Hepáticas ( <i>para American Association for the Study in Liver Diseases</i> )
ACN –	Acetonitrila
ANOVA –	Análise de variância
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AU –	Unidade de absorvância (mAU para mil partes)
CAS –	Número do registro de identificação química ( <i>para Chemical Abstract Service</i> )
CLAE –	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE –	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DAC –	Daclatasvir
DAD –	Detector de arranjo de diôdo
DBV –	Dasabuvir
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DP –	Desvio padrão
DPR –	Desvio padrão relativo
EASL –	Associação Européia de Estudos Hepáticos ( <i>para European Association for the Study of the Liver</i> )
ELB –	Elbasvir
EM –	Espectrometria de massas
EMA –	Agência Europeia de Medicamentos ( <i>para European Medicines Agency</i> )
EMC –	Compêndio eletrônico de medicamentos ( <i>para Eletronic Medicines Compendium</i> )
ESI –	Ionização por eletrospray ( <i>para Electrospray ionization</i> )
FDA –	Agência dos Estados Unidos de Administração de Medicamentos e Alimentícios ( <i>para American Agency of Food and Drug Administration</i> ).
FE –	Fase estacionária
FM –	Fase móvel
Fr –	Fator de retenção
GRA –	Grazoprevir
IC –	Inclinação da curva

ICH –	Conferência Internacional de Harmonização ( <i>para The International Council of Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> )
ID –	Identificação
IFA –	Insumo farmacêutico ativo
IFN –	Interferon (PEG-IFN para interferon peguilhado)
IUPAC –	União Internacional de Química Pura e Aplicada ( <i>para International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
k' –	Fator de retenção ( <i>para system suitability</i> )
LED –	Ledipasvir
LD –	Limite de detecção
LQ –	Limite de quantificação
MeOH –	Metanol
m/z –	Razão massa/carga
n –	Pratos teóricos ( <i>para eficiência da coluna</i> )
NS3A –	Proteína não estrutural 3A do VHC ( <i>para non-structural 3A</i> )
NS4A –	Proteína não estrutural 4A do VHC ( <i>para non-structural 4A</i> )
NS5B –	Proteína não estrutural 5B do VHC ( <i>para non-structural 5B</i> )
NS5A –	Proteína não estrutural 3A do VHC ( <i>para non-structural 3A</i> )
OMS –	Organização Mundial da Saúde
PA –	Para análises
PCDT –	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PD –	Produto de degradação
ppm –	Parte por milhão
PrOD –	Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir e Dasabuvir
PTFE –	Membrana de politetrafluoretileno
PVDF –	Membrana de fluoreto de polivinilideno ( <i>para polyvinylidene fluoride</i> )
Qs –	Quantidade suficiente
qTOF –	Detector do tipo quadrupolo acoplado à tempo de voo ( <i>para quadrupole time of flight</i> )
RBV –	Ribavirina
RE –	Resolução (legislação)
RENAME –	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RDC –	Resolução da Diretoria Colegiada

Rs –	Resolução (cromatografia)
SMV –	Simeprevir
SOF –	Sofobusvir
T –	Fator caudal (para <i>tailing</i> )
TIC –	Contagem de íons totais (para <i>Total Ion Count</i> )
Tr –	Tempo de retenção
UR –	Umidade relativa
VHC –	Vírus da hepatite C
v/v –	Volume/volume
μ –	Micro
® –	Marca registrada
Δ –	Varição

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1. JUSTIFICATIVA	20
1.2. OBJETIVOS	21
1.2.1. Objetivo geral	21
1.2.2. Objetivos específicos	21
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>22</b>
2.1. HEPATITE C	22
2.1.1. Tratamentos para hepatite C	24
2.1.2. Dasabuvir	26
2.2. ESTUDOS DE ESTABILIDADE	28
2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	33
2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A ANÁLISE DO DBV	34
2.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
3.1. INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO	38
3.1.1. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DO IFA	38
3.2. REAGENTES E MATERIAL	38
3.3. EQUIPAMENTOS E SOFTWARES	39
3.4. DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-MÉTODO	40
3.5. ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO	40
3.6. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR E INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	42
3.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-DAD	43
3.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	44
3.8.1. Adequação de sistema	44
3.8.2. Seletividade	44
3.8.3. Linearidade e faixa de trabalho	45
3.8.4. Exatidão	46
3.8.5. Precisão	46
3.8.6. Limite de detecção e quantificação	47
3.8.7. Robustez	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>48</b>
4.1. IDENTIFICAÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO	48

4.2.	DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-MÉTODO .....	49
4.3.	ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO .....	53
4.3.1.	Ensaios de degradação preliminares.....	53
4.3.2.	Degradação em meio ácido .....	56
4.3.3.	Degradação em meio alcalino .....	57
4.4.	PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR E INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO .....	59
4.5.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR POR CLAE-DAD .....	68
4.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE .....	75
4.6.1.	Adequação de sistema .....	75
4.6.2.	Seletividade .....	76
4.6.3.	Linearidade e faixa de trabalho.....	78
4.6.4.	Exatidão.....	83
4.6.5.	Precisão.....	83
4.6.6.	Limites de detecção e quantificação .....	84
4.6.7.	Robustez.....	85
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença hepática causada pelo vírus de RNA da família *Flaviviridae*, gênero *hepacivirus*, podendo gerar uma infecção aguda geralmente assintomática. Caso a enfermidade não seja tratada adequadamente pode levar ao desenvolvimento da fase crônica, que possui maiores índices de letalidade em relação à fase aguda. Estima-se que cerca de 2,5% da população mundial já entrou em contato com o vírus e sabe-se que suas complicações levam à morte cerca de 399 mil pessoas anualmente (OMS, 2016a).

O vírus pode apresentar-se com diferentes genótipos, que vão de 1 a 7, sendo o primeiro comumente dividido em subtipo (1a) e (1b). O genótipo 1 é o mais frequente com 45% do total de casos de hepatite C, seguido do genótipo 3 com 22% (GOWER et al., 2014; MANNS et al., 2017). Atualmente os tratamentos utilizados variam de acordo com o genótipo e as diretrizes que o país adota, que envolvem principalmente o uso de antivirais de ação direta (AAD) de segunda geração (AASLD, 2016; BRASIL, 2018; EASL, 2014; OMS, 2016a). Dentre os medicamentos utilizados para o tratamento da hepatite C, o dasabuvir vem se mostrando promissor em terapia combinada com paritaprevir, ritonavir e ombitasvir (FERREIRA et al., 2016, 2017; MANTRY; PATHAK, 2015).

O dasabuvir é um antiviral de ação direta reconhecido pelas diretrizes para o tratamento do genótipo 1 da hepatite C em associação com ombitasvir, ritonavir e paritaprevir, sendo o único fármaco não-nucleosídeo seletivo da polimerase NS5B aprovado para uso. Sua síntese foi descrita por Gao e colaboradores (2011), enquanto sua aprovação para uso nos Estados Unidos e Europa foi obtida em 2014, comercializados pelos nomes de Exviera® (2014) e Viekira Pak® (2015), produzidos pela AbbVie (ABBVIE, 2014, 2015).

A qualidade de um medicamento está associada à sua eficácia e segurança, que está diretamente relacionada com a manutenção da sua estabilidade. A instabilidade de um medicamento pode implicar na perda da eficácia, pela diminuição do teor do fármaco e levar a formação de produtos de degradação (PD), os quais podem ser tóxicos ao paciente. Por esses motivos os estudos de estabilidade são fundamentais na avaliação da qualidade de medicamentos (BRASIL, 2005, 2012, 2015a). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em concordância com o

Comitê Internacional de Harmonização (ICH), reforçam a importância dos estudos de estabilidade publicando a RDC 53/2015, regulando a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação (PD) (BRASIL, 2015a).

Uma das maneiras de se realizar o monitoramento da estabilidade de um composto é pela utilização de um método indicativo de estabilidade, que por definição é uma ferramenta capaz de mensurar com exatidão e seletividade o teor do insumo farmacêutico ativo (IFA) na presença de seus produtos de degradação (BRASIL, 2015b).

### 1.1. JUSTIFICATIVA

O dasabuvir é uma molécula recente para o tratamento da hepatite C. Até o momento não foram encontrados estudos sobre seus PD, nem de método indicativo de estabilidade publicados. Conhecer seu perfil de degradação e possíveis PD, bem como desenvolver um método que seja capaz de separar e quantificar o dasabuvir na presença de seus PD é relevante uma vez que são ferramentas para garantir a qualidade e segurança do medicamento.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para o dasabuvir na presença dos produtos de degradação para matéria-prima.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Conhecer o perfil de degradação do dasabuvir.
- Desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade para a quantificação do dasabuvir na presença de seus possíveis produtos de degradação e impurezas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).
- Validar o método indicativo de estabilidade de acordo com normas nacionais e internacionais vigentes.
- Elucidar a estrutura dos possíveis produtos de degradação do dasabuvir.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. HEPATITE C

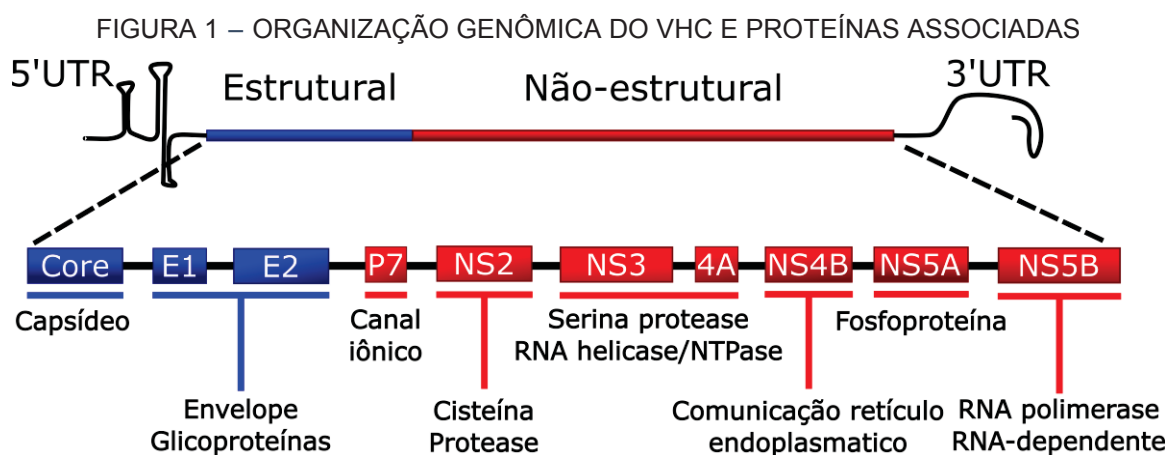
A hepatite C é uma doença viral que acomete o fígado causada pelo vírus de RNA: *Flaviviridae hepacivirus*. O vírus é capaz de gerar tanto uma infecção aguda quanto crônica, variando de uma doença que pode durar por algumas semanas ou até uma vida inteira (PENIN et al., 2004). Atualmente há entre 184 milhões de pessoas mundialmente (estima-se 2,5% da população mundial) que expressam anti-VHC em sua circulação sanguínea e cerca de 80 milhões possuem a forma crônica da doença expressa. A hepatite C leva a morte anual de 399 mil pessoas devido complicações hepáticas (GOWER et al., 2014; OMS, 2016a).

A infecção aguda por VHC geralmente é assintomática e é raramente associada com risco de morte. Cerca de 15% a 45% dos infectados durante esta fase atingem a redução significativa da carga viral em até 6 meses, sem a utilização de tratamentos farmacológicos, porém, de 55 a 85% podem desenvolver a forma crônica da doença, que é mais agressiva e aumenta o risco para complicações hepáticas, como por exemplo fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepato-celular (MANNS et al., 2017).

Análises filogenéticas em diversas partes do mundo levaram a caracterização de sete principais genótipos e cada um deles possui um subtipo que é descrito por uma letra minúscula (por exemplo 1a, 1b, e assim em diante), sendo que, o tipo e subtipo do vírus determina a progressão da doença e possível resposta aos tratamentos disponíveis. Globalmente o genótipo mais prevalente é o tipo 1, contabilizando 46% de todas as infecções por VHC (onde o subtipo 1b é o mais prevalente com 22% da representação total), seguido do genótipo 3 com 22% (GOWER et al., 2014; MANNS et al., 2017).

A transmissão da hepatite C pode ocorrer através de relação sexual de risco, sem uso de preservativo, do compartilhamento de seringas (geralmente utilização de drogas ilícitas), de transfusão de sangue contendo o vírus e em casos mais raros a transmissão vertical, da mãe para o feto. A presença de uma comorbidade imunocomprometedora como o HIV é um importante facilitador da transmissão (AASLD, 2016; BRASIL, 2015c; EASL, 2014).

O VHC possui tropismo por hepatócitos, onde realiza sua replicação. O ancoramento é facilitado pela interação das glicoproteínas E1 e E2 constituintes do envelope viral com a membrana do hepatócito, liberando o RNA para o meio citosólico. A fita de RNA do VHC ao ser traduzido pelos ribossomos do retículo endoplasmático, gera um peptídeo com cerca de 3000 aminoácidos que serão clivados em 10 produtos diferentes importantes para a replicação viral, mostrados na Figura 1 e Quadro 1. Uma vez que a célula é preenchida pelo VHC, ela se rompe, liberando o material viral para posterior infecção de novas células (BARTENSCHLAGER; COSSET; LOHMANN, 2010; MANNS et al., 2017).



FONTE: POORDAD, DIETERICH, (2012); UPRICHARD, (2010).

QUADRO 1 – FUNÇÃO DOS GENES DO VHC

Gene	Função
Core	Capsídeo
E1/E2	Glicoproteínas estruturais que viabilizam entrada viral no hepatócito
P7	Canal iônico
NS2/NS3	Montagem e liberação das proteínas traduzidas
NS4A	Cofator para o funcionamento da NS3
NS4B	Comunicação do lúmen do retículo endoplasmático com o meio citosólico
NS5A	Sinalizador de diversas rotas, mais notável pela manutenção da NS5B
NS5B	RNA polimerase

FONTE: Adaptado de BARTENSCHLAGER, COSSET, LOHMANN, (2010); POORDAD, DIETERICH, (2012).

### 2.1.1. Tratamentos para hepatite C

Interferons (IFN) foram os primeiros medicamentos utilizados nos tratamentos para hepatite C, sendo substituídos pelos interferons peguilados (PEG-IFN) que surgiram com o propósito de aumentar a meia-vida e conseqüentemente, reduzir a frequência de administrações. O PEG-IFN mostrou-se eficiente para a diminuição da carga viral, porém, ineficiente para combater o vírus genótipo 1. Em 1998 os interferons começaram a ser administrados com ribavirina, um análogo da guanossina, tendo sucesso de tratamento em cerca de 40-50% para genótipos do tipo 1 e 4, e 45%-90% para genótipos 2 e 3. Porém o tratamento com ribavirina apresentava muitos efeitos adversos, o que levou a sua descontinuação (FERREIRA et al., 2016; MANNS et al., 2017; SULKOWSKI, 2008).

Com o advento de ferramentas capazes de elucidar o mecanismo de replicação do VHC, iniciou-se a busca por informações sobre a replicação viral e seus produtos proteicos, abrindo a possibilidade para novos candidatos a fármacos direcionados ao tratamento da hepatite C (LOHMANN, 1999). E com os alvos genômicos bem descritos, uma nova classe de medicamentos para VHC surgiu, denominados agentes antivirais de ação direta (AADs).

Os medicamentos com base em PEG-IFN foram utilizados até a aprovação da primeira geração de agentes antivirais de ação direta (AAD) telaprevir e boceprevir em 2011 (incivek e victrelis, respectivamente), que são inibidores das proteases NS3/NS4A. Sua utilização no tratamento promoveu uma melhora de 45% para 65% no sucesso dos tratamentos para o genótipo 1 do VHC (JACOBSON et al., 2011; POORDAD et al., 2011).

Com o tempo surgiram os AADs de segunda geração para suprir a necessidade de tratamento para os outros genótipos e subtipos da VHC (Quadro 2). Em ordem cronológica foram aprovados simeprevir e sofosbuvir em 2013, que em conjunto são eficazes para o tratamento dos genótipos 1 e 4; ledipasvir aprovado em 2014, que é utilizado em substituição ao simeprevir, sendo eficaz contra genótipo tipo 1, 4, 5 e 6. Em 2015 foi aprovado o uso combinado de ombitasvir, paritaprevir, ritonavir e dasabuvir. Esta combinação é eficaz no tratamento do genótipo 1 e 4. Daclatasvir, aprovado em 2015, foi eficaz contra genótipo 1 e 4. De 2016 em diante foram aprovados diversos AADs (grazoprevir, elbasvir, velpatasvir, asunaprevir) e alguns se

encontram em estudos clínicos (danoprevir, beclabuvir, glecaprevir, pibrentasvir, voxilaprevir), mostrando a rápida evolução dos antivirais estudados para o tratamento da hepatite C e a busca por medicamentos que possuam eficácia contra subtipos da doença e que tenham menos efeitos adversos (FERREIRA et al., 2017; MANNS et al., 2017; OMS, 2016a).

QUADRO 2 – PRINCIPAIS GRUPOS DE MEDICAMENTOS AAD PARA TRATAMENTO DE HEPATITE C

<b>Grupo</b>	<b>Alvo</b>	<b>Fármacos</b>
<b>Inibidores de proteases</b>	NS3/NS4A	Paritaprevir, Simeprevir, Asunaprevir, Grazoprevir
<b>Inibidores de polimerases (Nucleosídeo)</b>	NS5B	Sofosbuvir
<b>Inibidores de polimerases (Não-Nucleosídeo)</b>	NS5B	Dasabuvir
<b>Inibidores do complexo de replicação</b>	NS5A	Ombitasvir, Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir, Velpatasvir.

FONTE: Adaptado de MANNS et al., (2017); PHCN, (2017).

Há discussão entre os tratamentos recomendados e alternativos para a hepatite C. A implementação de um protocolo de tratamento varia de acordo com a região, levando-se em conta o genótipo mais frequente daquele local e as políticas de obtenção e distribuição do medicamento, por se tratar de medicamentos de alto custo. A maioria dos tratamentos aprovados possui eficiência para reduzir a carga viral para o genótipo específico, então cabe ao governo e ao profissional da saúde prescrever o tratamento mais adequado de acordo com a disponibilidade, intolerância ao fármaco e possíveis interações medicamentosas que possa ocorrer (BRASIL, 2018; OMS, 2016a)

O dasabuvir é um medicamento para uso em terapia combinada com ombitasvir, paritaprevir e ritonavir. Estes medicamentos foram incluídos na relação nacional de medicamentos essenciais de 2017 (RENAME) e no protocolo clínico e diretriz terapêutica (PCDT) para o tratamento da hepatite C para o genótipo tipo 1 (BRASIL, 2017a, 2018) (Quadro 3). Isto indica a importância destes fármacos no arsenal terapêutico contra o VHC.

QUADRO 3 – POSSÍVEIS TRATAMENTOS DA HEPATITE C

Órgão	Genótipo	Tratamento
<b>BRASIL (2018) PCDT</b>	1	SOF + SMV/DAC ± RBV ou <b>PrOD</b>
	2	IFN + RBV ou SOF ± RBV
	3	SOF + DAC ± RBV
	4	DAC + IFN ± RBV
	5	SOF + DAC
	6	SOF + DAC
<b>OMS (2016)</b>	1	SOF + DAC/SMV/LED ou <b>PrOD</b>
	2	SOF + RBV/DAC
	3	SOF + DAC/RBV
	4	SOF + DAC/LED ou PrO + RBV
	5	SOF + LED/IFN ou SOF + IFN + RBV
	6	SOF + LED/IFN ou SOF + IFN + RBV
<b>AASLD (2016)</b>	1	ELB + GRA ou <b>PrOD</b> ou SOF + LED/SMV/DAC
	2	SOF + DAC ou SOF + RBV
	3	SOF + DAC ou SOF + IFN + RBV
	4	PrO + RBV ou ELB + GRA ou SOF + LED
	5	SOF + LED
	6	SOF + LED
<b>EASL (2014)</b>	1	IFN + RBV ou <b>PrOD</b> ou SOF + LED/SMV/DAC
	2	IFN + RBV ou SOF + RBV/DAC
	3	IFN + RBV ou SOF + DAC
	4	IFN + RBV ou PrO + RBV ou SOF + LED/SMV/DAC
	5	IFN + RBV ou SOF + LED/DAC
	6	IFN + RBV ou SOF + LED/DAC

FONTE: Adaptado de AASLD, (2016); BRASIL, (2018a); EASL, (2014); OMS, (2016a)

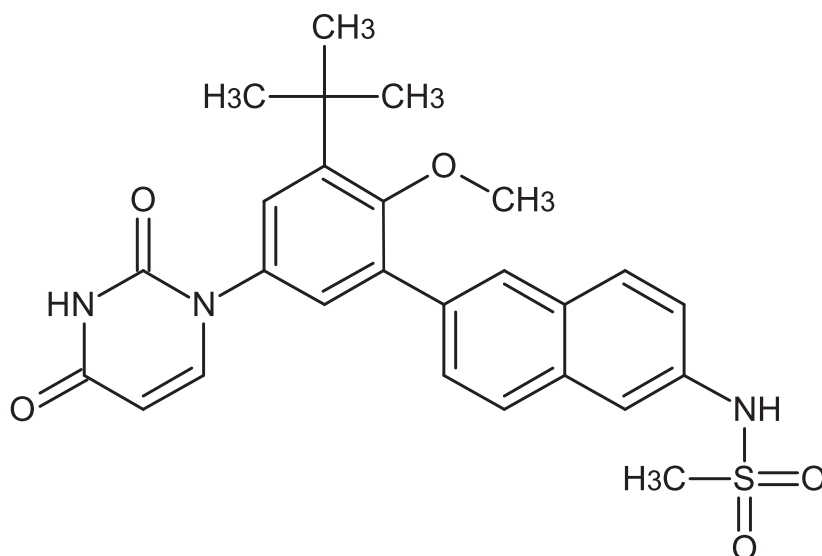
NOTA: Todos os tratamentos têm duração de 12 semanas. Em caso de paciente cirrótico, a duração aumenta para 24 semanas e dose de RBV aumenta para 500 mg.

LEGENDA: PCDT Protocolo Clínico e Diretriz Terapêutica Brasileira, OMS Organização Mundial da Saúde, AASLD Associação Americana de Estudos em Doenças Hepáticas, EASL Associação Europeia de Estudos Hepáticos, IFN Interferon (peguilado), RBV Ribavirina, SOF Sofobusvir, LED Ledipasvir, SMV Simeprevir, DAC Daclatasvir, PrOD Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir/Dasabuvir, PrO Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir, ELB Elbasvir, GRA Grazoprevir.

### 2.1.2. Dasabuvir

O Dasabuvir (DBV), antes chamado de ABT-333, pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como fenilnaftalenos. É inibidor não-nucleotídeo do NS5B, uma RNA polimerase. Foi inicialmente sintetizado em 2011 pela Bristol-Myers Squibb (GAO et al., 2011) e possui o registro do CAS 1132935-63-7, sendo quimicamente denominada N-{6-[3-tercbutil-5-(2,4-dioxo-3,4-di-hidropiridin-1(2H)-il)-2-metoxifenil]naftalen-2-il}metanosulfonamida, com peso molecular de 493,5813 g/mol (LAW et al., 2014). Na Figura 2, está mostrada a sua estrutura química.

FIGURA 2 – ESTRUTURA DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019)

A ação do dasabuvir é pela inibição do RNA polimerase NS5B e em conjunto com ombitasvir, um inibidor da NS5A (fosfoproteína sinalizadora), paritaprevir, inibidor da NS3 e NS4A (serinas-proteases) e ritonavir, um inibidor de proteases e outras enzimas, são eficazes para a redução da carga viral do VHC do genótipo tipo 1 (AASLD, 2016; BRASIL, 2018; EASL, 2014; OMS, 2016a).

O primeiro medicamento contendo o dasabuvir comercializado foi o Exviera<sup>®</sup> (dasabuvir 250 mg), sendo descontinuado para abrir espaço para a comercialização do Viekira Pak<sup>®</sup> (dasabuvir 250 mg e ombitasvir 12,5 mg + paritaprevir 75 mg + ritonavir 50 mg) e Viekira XR<sup>®</sup> (dasabuvir 200 mg + ombitasvir 8,33 mg + paritaprevir 50 mg + ritonavir 33,33 mg), produzidos pela AbbVie desde 2014 e 2015, respectivamente. No Brasil, apenas o Viekira Pak<sup>®</sup> é comercializado. A embalagem comercial deste medicamento contém dois comprimidos revestidos, um contendo o fármaco único (dasabuvir) e outro contendo a associação de ombitasvir, paritaprevir e ritonavir (ABBVIE, 2014, 2015; EMA, 2015). Atualmente o dasabuvir encontra-se na fase IV do estudo clínico (farmacovigilância), que tem como objetivo o acompanhamento e notificação dos efeitos adversos encontrados durante a farmacoterapia. As principais propriedades físico-químicas do dasabuvir estão apresentadas no Quadro 4 (LAW et al., 2014).

QUADRO 4 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DASABUVIR

Propriedade	Valor
Solubilidade em DMSO	43 mg.mL <sup>-1</sup>
Solubilidade em DMF	30 mg.mL <sup>-1</sup>
Solubilidade em H <sub>2</sub> O	0,000799 mg.mL <sup>-1</sup>
logP (ALOGPS)	4,7
logS	-5,8
logP (ChemAxon)	3,42
pKa (Ácido mais forte)	9,09 e 8,2
pKa (Base forte ionizada)	-4,8
Aceptor de Hidrogênio	5
Doador de Hidrogênio	2
Área de Superfície Polar	104,81 Å <sup>2</sup>
Ligações Rotacionáveis	5
Refratividade	134,04 m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>
Polarizabilidade	53,19 Å <sup>3</sup>
Número de Anéis	4
λ máx	254,8 nm

FONTE: LAW et al., (2014).

## 2.2. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Um estudo de estabilidade é um conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade do insumo ou do produto farmacêutico, visando definir seu prazo de validade e período de utilização e reanálise, embalagem e condições de armazenamento (BRASIL, 2005, 2012; EMA, 2004; ICH, 2003).

A estabilidade é definida como a extensão na qual o produto retém, dentro de limites especificados, e durante seu período de estocagem e uso, as mesmas propriedades e características que ele possuía quando foi fabricado (FDA, 2003). As propriedades e características podem ser alteradas por fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Em função das propriedades ou características que se alteram, a estabilidade pode ser classificada como física, química, microbiológica, terapêutica e toxicológica (BRASIL, 2012; ICH, 2003; MIRCO; ROCHA, 2015).

Avaliar a estabilidade do fármaco ou do medicamento é importante, pois quando estas se alteram podem ter impacto na pureza, potência e segurança do produto ou do IFA. Estas alterações podem implicar em efeitos adversos e

subdose, capazes de comprometer a eficácia do tratamento (ICH, 2006a, 2006b; JANZEN; SELENT-STIER; MUAZZAM, 2016). Os estudos de estabilidade são exigidos para o registro do medicamento para a sua comercialização, quando são feitas alterações pós-registros na fórmulação e a inclusão de novas formas farmacêuticas.

As principais agências reguladoras e comitês de produtos para a saúde (BRASIL, 2012; EMA, 2004; FDA, 2003; ICH, 2003) tem elaborado normas e guias que definem protocolos para a realização de estudos de estabilidade para medicamentos e para IFA.

Os estudos de estabilidade para medicamentos, de acordo com a RE n°1 (2005) da ANVISA, são classificados em acelerado, de longa duração e de acompanhamento. Estudo acelerado é considerado um procedimento preditivo, com base em dados obtidos de produtos que são armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições em que o produto será disponibilizado no mercado, visando estabelecer prazo de validade provisório que deve ser confirmado por estudo de longa duração.

Os estudos acelerados podem ser aceitos provisoriamente para fazer o registro do medicamento. Estudo de longa duração são conduzidos em condições controladas e são validações dos experimentos em relação às características físicas, químicas e biológicas do medicamento, durante e depois do prazo de validade esperado. Com este estudo pode-se confirmar, reduzir ou ampliar o prazo de validade estabelecido com base no estudo acelerado (BRASIL, 2005).

Estudo de acompanhamento é realizado para verificar se o produto farmacêutico, de lotes sucessivos, mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração. Caso ocorra qualquer alteração no produto, deverá ser realizado novo estudo de estabilidade de longa duração. A cada 12 meses todos os testes do relatório de estudo de estabilidade deverão ser realizados (BRASIL, 2005).

Os estudos de estabilidade para o IFA, de acordo com a RDC 45 (2012) da ANVISA, tem por objetivo prever, determinar ou acompanhar a sua data de reteste ou seu prazo de validade. Estes também são classificados em estudo acelerado, de longa duração e de acompanhamento, que diferem basicamente nas condições em que são conduzidos como por exemplo temperatura, umidade e tempo. Para o IFA também

se recomenda testes de degradação forçada que são testes realizados para avaliar a estabilidade intrínseca do IFA. A degradação forçada é executada sob condições mais severas do que as do estudo de estabilidade acelerado. Estes estudos ajudam a identificar seus prováveis produtos de degradação e o procedimento analítico adotado no estudo de estabilidade (BRASIL, 2012, 2015b).

Produtos de degradação, também conhecidos como substâncias relacionadas, são impurezas que em geral resultam de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento devido a ação do tempo e/ou ação de fatores externos (BRASIL, 2015a).

A temperatura é um dos fatores externos mais importantes envolvido na degradação de insumos e produtos farmacêuticos. Um aumento da temperatura pode favorecer reações químicas endotérmicas (MIRCO; ROCHA, 2015).

A aderência da água na superfície do produto farmacêutico pela alta umidade pode alterar seu estado físico e afetar sua reatividade, gerando uma condição que não aconteceria caso estivesse no estado sólido (MIRCO; ROCHA, 2015). Além de alterar a reatividade por solubilidade, pode favorecer a hidrólise que é o fator intrínseco mais comum, que se caracteriza pela quebra das ligações químicas por reação com a água. Dessa forma, determinada ligação da molécula fragmenta-se e tem suas ligações complementadas com os íons resultantes da água ( $H^+$  e  $OH^-$ ). Os grupos funcionais mais vulneráveis à hidrólise são: ésteres, ésteres cíclicos, amidas, amidas cíclicas, imidas, carbamatos, tioésteres, sulfamatos e acetais (PERUZZO; CANTO, 2006).

Dependendo do número de aceptores ou doadores de prótons, o pH possui forte influência no comportamento químico da molécula ao ionizar (por protonação ou desprotonação) certos grupos funcionais. Ao mudar tal característica molecular, certas condições podem ser atendidas para a ocorrência de uma catálise química. Geralmente a mudança de pH de um produto acabado pode ocorrer indiretamente após uma reação química vertente de outro fator de estabilidade ou por efeito de degradação microbiológica (BLESSY et al., 2014).

A interferência da luz pode desencadear degradações como redução e oxidação. Intensidade da luz em determinado comprimento de onda sobre os produtos farmacêuticos pode afetar a velocidade de reação. Esse processo abrange normalmente os radicais livres (elétrons desemparelhados formados pela quebra homolítica da ligação química), que dão início ao rompimento das ligações químicas

de uma molécula, formando radical propagador, sendo estabilizado quando de encontro com outro radical livre (MIRCO; ROCHA, 2015).

A oxidação envolve o mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos. Aminas, sulfetos e fenóis são susceptíveis à transferência oxidativa, gerando n-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxidos. Grupos funcionais com hidrogênio lábil como por exemplo carbono benzílico, carbono alílico, carbono terciário, são susceptíveis à oxidação para formar peróxidos, hidróxido ou cetonas (BLESSY et al., 2014).

Estes fatores externos são os que, em geral são manipulados para se obter a degradação forçada. A RDC N° 53 (2015) e o guia N° 4 de 2015 da ANVISA aborda de forma mais específica como conduzir um estudo de degradação forçada, cujo objetivo é obter o perfil de degradação do IFA, a identificação e qualificação dos produtos de degradação e também evidências para a obtenção de um método indicativo de estabilidade. Esta resolução também estabelece limites para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares (BRASIL, 2015a, 2015b).

Os limites dos produtos de degradação são expressos como porcentagem do IFA, ou da dose de administração total diária (ATD). Limite de notificação é o valor limite acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado nos estudos de estabilidade. Limite de Identificação é o valor limite acima do qual um produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada. Limite de qualificação é o valor limite acima do qual um produto de degradação deverá ser avaliado quanto a sua segurança biológica. As ações de acordo com os limites estão apresentadas no Quadro 5.

QUADRO 5 – LIMITES DE NOTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

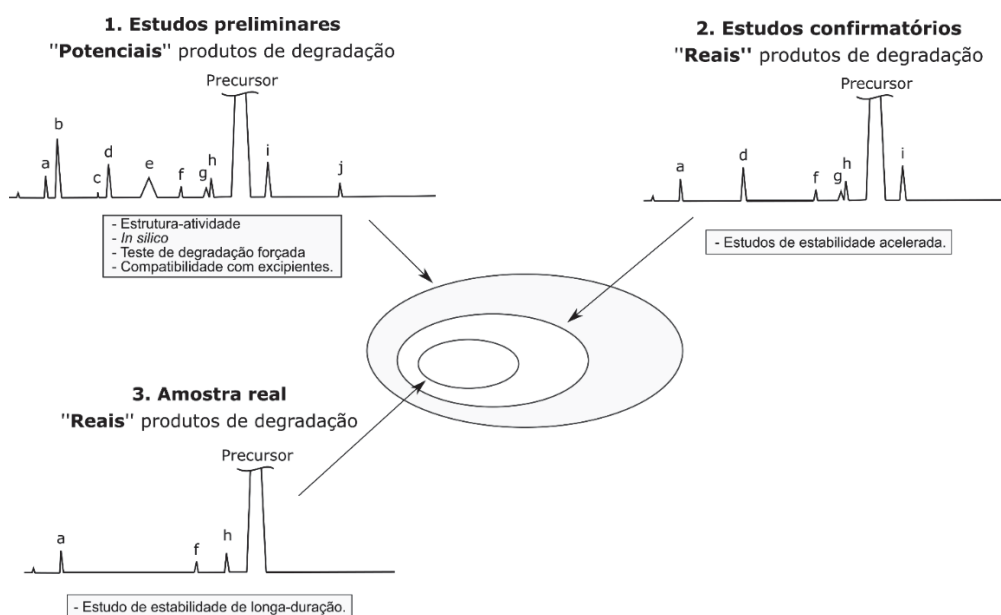
	Dose máxima diária	Limites
Limites de notificação	≤1 g	0,1%
	>1 g	0,05%
Limites de identificação	<1 mg	1,0% ou 5 µg ATD, o que for menor
	1 mg - 10 mg	0,5% ou 20 µg ATD, o que for menor 0,2%
	>10 mg - 2 g	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
	>2 g	0,1%
Limites de qualificação	<10 mg	1,0% ou 50 µg ATD, o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

FONTE: BRASIL, (2015a)

LEGENDA: ATD - administração total diária.

O conjunto de produtos de degradação observados no IFA ou no medicamento é definido como perfil e depende das condições a que se expõe o produto. O perfil obtido na degradação forçada pode não ser igual ao obtido no estudo de estabilidade, seja qualitativamente e/ou quantitativamente. Por esse motivo os estudos de degradação forçada são realizados em diversas condições, visando gerar todos os potenciais PD, que em geral são mais numerosos que os encontrados nos estudos de estabilidade (BRASIL, 2015b). A relação entre o perfil dos produtos de degradação real e potencial está exemplificada na Figura 3.

FIGURA 3 – CONCEITO DE ESTABILIDADE PREDITIVA



FONTE: BRASIL, (2015b).

Conhecer os produtos de degradação de um fármaco é fundamental para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, que conceitualmente, é um procedimento analítico validado capaz de medir com exatidão e precisão o teor da substância ativa (tanto no IFA quanto no medicamento), livre de interferentes como por exemplo impureza, excipientes e/ou PD (FDA, 2015).

As técnicas mais utilizadas para a análise de impurezas e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade em medicamentos são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). Diversos detectores já foram reportados na literatura, os mais comuns são a detecção por UV-vis e a espectrometria de massas, sendo os menos reportados a fluorescência, índice de refração e espalhamento de luz. Para a identificação dos produtos de degradação, a espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear de alta frequência são as técnicas mais utilizadas (BLESSY et al., 2014; JAIN; BASNIWAL, 2013; SMITH, MICHAEL B.; MARCH, 2006).

### 2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As atividades analíticas acerca de impurezas contidas em medicamentos constituem uma importante parte da análise farmacêutica moderna e as diversas técnicas de separação e detecção de compostos orgânicos, tem apresentado avanços, permitindo análises mais rápidas e processos analíticos mais simples (JAIN; BASNIWAL, 2013).

A cromatografia líquida tem sido a técnica de escolha mais frequente de separação de compostos orgânicos (JAIN; BASNIWAL, 2013), tendo em vista que os parâmetros cromatográficos podem ser otimizados para atender a proposição da análise. Em caso de uma separação ineficiente, os seguintes parâmetros podem ser alterados: a fase móvel (fluxo, composição, aditivos e pH), coluna cromatográfica (fase estacionária, tamanho da partícula, comprimento e diâmetro), temperatura, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Cromatografia é um processo físico-químico de separação, onde os compostos a serem separados entram em contato com duas fases: a estacionária e a móvel. Na cromatografia líquida, a fase estacionária é sólida, porosa e possui uma superfície com diferentes componentes capazes de interagir com o analito, enquanto

a fase móvel é uma mistura de um ou mais solventes que são eluidos através da fase estacionária com intuito de separar os analitos, gerando um equilíbrio de partição (FDA, 2017; IUPAC, 2012)

Os tipos de interações que ocorrem entre o analito e a fase estacionária e móvel são dependentes do tamanho das moléculas a serem eluidas - que geram um arraste mais lento, portanto retenção maior – e também da polaridade dos analitos, que polaridades diferentes possuem afinidades diferentes com a fase estacionária ou fase móvel empregada no método. Essas diferenças de afinidades geram diferentes equilíbrios de partição e quanto maior o número de vezes que o analito migra de uma fase para outra, maior é a interação e retenção do mesmo, podendo distinguir os analitos entre si (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Um exemplo de fase estacionária é a coluna C18, onde as partículas possuem em sua superfície a sílica substituída com diversas cadeias de 18 carbonos. A fase móvel é líquida, podendo ser uma mistura de mais de um solvente e é bombeada através da coluna cromatográfica recheada com a fase estacionária em um fluxo unidirecional (IUPAC, 2012).

#### 2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A ANÁLISE DO DBV

Os métodos de análise do DBV encontrados na literatura estão listados no Quadro 6. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é a técnica predominante nas diferentes matrizes onde foi analisado.

Os métodos encontrados na literatura para identificação e quantificação do DBV e foram desenvolvidos para a quantificação em diversas matrizes. Embora estes estudos utilizem métodos cromatográficos para a determinação do DBV em conjunto com outros fármacos (AL-ZOMAN; MAHER; AL-SUBAIE, 2017; ARIAUDO et al., 2016; OCQUE et al., 2017; POLEPALLY et al., 2016), nenhum foi aplicado para avaliar a estabilidade, nem para detectar o perfil de degradação do DBV.

QUADRO 6 – MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO DASABUVIR

	<b>CLAE</b>	<b>CLUE</b>	<b>CLAE</b>	<b>CLUE</b>
<b>Referência</b>	(AL-ZOMAN et al., 2017)	(ARIAUDO et al., 2016)	(POLEPALLY et al., 2016)	(OCQUE et al., 2017)
<b>Coluna</b>	C18 (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm)	BEH-C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm)	SB-C18 (2,1 mm x 50 mm, 3,5µm)	BEH-C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm)
<b>Fase móvel</b>	10 mM Tampão fosfato (pH 7) e ACN (35:65 v/v) - Isocrático	5 mM Acetato de amônio (pH 9,5) e ACN - Gradiente	ACN com água 40:60 e ACN com água 70:30 (0,1% Ác. Fórmico) - Gradiente	Água, ACN e ácido fórmico 95:5:0,1 - Gradiente
<b>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	1,0	0,4	-	0,3
<b>Deteção</b>	DAD – 254 nm	EM/EM IES -	EM/EM IES +	EM/EM IES +
<b>Temperatura (°C)</b>	25	50	-	45
<b>Matriz</b>	Medicamento	Plasma	Plasma	Aspirado hepático

O trabalho de Al-Zoman e colaboradores (2017) foi o único encontrado na literatura, durante a busca bibliográfica, que trata da determinação do DBV na forma farmacêutica comprimido. O método por eles desenvolvido permite, na mesma corrida, determinar também o ombitasvir, paritaprevir, ritonavir, antivirais que fazem parte da terapia combinada para VHC. Apesar de ser uma terapia combinada, o dasabuvir não está associado na mesma forma farmacêutica com os demais fármacos. O método de Al-Zoman e colaboradores é o método cujo propósito mais se aproxima da proposta deste estudo, uma vez que se trata de uma determinação em medicamento, por CLAE em modo isocrático e detecção por DAD.

O método de Ariaudo e colaboradores (2016) permite a quantificação dos antivirais de ação direta simeprevir, daclatasvir, ledipasvir, sofobusvir, GS-331007, dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir e ritonavir em plasma humano. A técnica de separação é por CLUE, sendo a determinação realizada através da quantificação da transição de massas dos analitos pelo espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo.

Polepally e colaboradores (2016) estudaram a interação fármaco-fármaco, do omeprazol com antivirais de ação direta para o VHC (paritaprevir/ritonavir e ombitasvir com e sem dasabuvir), em um estudo farmacocinético. A técnica analítica utilizada foi CLAE-EM/EM (espectrômetro de massas sequencial), porém faltam informações técnicas relevantes acerca do método empregado, talvez pelo enfoque ser o estudo farmacocinético.

O método desenvolvido por Ocque e colaboradores (2017) é um método por CLUE-EM/EM e visa a determinação de fármacos antivirais de ação direta em aspirado hepático, cujo objetivo é analisar o dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir, ritonavir e os produtos do metabolismo dos fármacos (três do dasabuvir, um do ombitasvir, paritaprevir e ritonavir).

Os estudo de Polepally e colaboradores (2016), Ariaudo e colaboradores (2016) e de Ocque e colaboradores (2017) fornecem as transições de massas para a quantificação do dasabuvir 494,0 → 359,0 Da (OCQUE et al., 2017; POLEPALLY et al., 2016) para o modo positivo e 492,1 → 476,8 Da (ARIAUDO et al., 2016) para o modo negativo, podendo ser útil para a confirmação da identidade do dasabuvir.

## 2.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

O objetivo de qualquer mensuração analítica é obter uma informação confiável, consistente e precisa sobre uma amostra. A validação de método analítico tem um papel importante de fornecer evidência científica que o método é adequado ao propósito. Além de ser uma exigência das agências reguladoras, é uma parte fundamental para o cumprimento das boas práticas laboratoriais, sejam elas para a indústria ou qualquer estabelecimento que utilize de ferramentas analíticas (BRASIL, 2017b; HUBER, 2010).

A realização da validação analítica é importante quando se desenvolve e implanta um método na rotina laboratorial, quando métodos já estabelecidos na rotina de análises são revisados, quando da transferência de método para outro laboratório e quando qualquer parâmetro ou condição analítica for alterada (BRASIL, 2017b).

A validação analítica é descrita em diversos guias de agências regulatórias e comitês, incluindo Eurachem (EURACHEM, 2014), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 2000), Associação Oficial de Químicos Analistas (AOAC, 2002), Agência dos Estados Unidos de Administração de Medicamentos e Alimentos (FDA, 2015), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2016), Farmacopéia Americana (USP, 2018), Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH, 2005), Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016b) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017b), servindo de base para diversas indústrias, estabelecimentos analíticos e publicações.

Os parâmetros necessários para validação de um método dependem do propósito da análise, como mostrados no Quadro 7.

QUADRO 7 – PARÂMETROS A SEREM CONSIDERADOS NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Parâmetros avaliados	Identificação	Teste de impurezas		-Teor -Dissolução -Uniformidade -Potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão	Não	Sim	Não	Sim
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Robustez	-	-	-	-
Limite de detecção	Não	Não	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

FONTE: (BRASIL, 2017b)

A seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado durante a validação analítica, uma vez este parâmetro é capaz de comprometer todo o processo de validação. Se o método proposto não é capaz de distinguir o analito de interesse, a validação deve ser descontinuada. A linearidade em conjunto com o intervalo é a faixa na qual os dados podem ser analisados sem haver o comprometimento da exatidão e precisão, estes importantes para ensaios de quantificação. Os valores da regressão linear obtidos durante os experimentos são uma das maneiras da determinação do limite de detecção e quantificação, que por definição são os valores de concentração mínima necessária para detectar e quantificar o analito em questão (BRASIL, 2017b).

A robustez é um parâmetro que pode ser determinado durante e antes da validação analítica, uma vez que as variações ocorridas no método podem ser detectadas no decorrer do desenvolvimento do método analítico. A robustez não é um parâmetro reprobatório e se trata de um indicativo de quais parâmetros devem ser seguidos para que o método seja reproduzível e confiável (BRASIL, 2017b).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO

O padrão de dasabuvir foi obtido na Nanjing Kaimubo Pharmatech Company Co., Ltda (Nanjing, China), com as características listadas no Quadro 8.

QUADRO 8 – DESCRIÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DASABUVIR

<b>Massa molar (Da)</b>	493,5747
<b>Massa monoisotópica (Da)</b>	493,1671
<b>Teor (%)</b>	97,8
<b>Lote</b>	201856
<b>Data de fabricação</b>	15/05/2018

##### 3.1.1. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DO IFA

A identidade do DBV foi confirmada utilizando o espectrômetro de massas (triplo quadrupolo) por infusão direta. Os parâmetros da fonte de ionização para o modo positivo e negativo foram configurados para voltagem capilar de  $\pm 4,5$  kV, fluxo do gás dessecador de  $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , fluxo do gás nebulizador de  $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , potencial desagregador de  $\pm 40$  V, potencial de entrada de  $\pm 3,5$  V, energia de colisão 50 V e potencial de saída de 4 V.

A amostra foi preparada utilizando uma mistura de DMSO e água contendo 0,1% de ácido fórmico (AFO) para concentração de  $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

A identidade pode ser confirmada através da transição de massas específica  $494,0 \rightarrow 359,0$  Da (OCQUE et al., 2017; POLEPALLY et al., 2016) para o modo positivo e  $492,1 \rightarrow 476,8$  Da (ARIAUDO et al., 2016) no modo negativo.

#### 3.2. REAGENTES E MATERIAL

Todos os reagentes utilizados tinham grau de pureza analítica adequado as necessidades. Acetonitrila e metanol (grau CLAE) da marca Tedia (Ohio, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A., peróxido de hidrogênio 30% Labsynth (São Paulo, Brasil), hidróxido de amônio 28-30% J.T.Baker (Pensilvânia, EUA). Fosfato monopotássico P.A., ácido fórmico 98% Merck (Milford, EUA). A água ultra purificada foi obtida no sistema de purificação Milli-Q® Gradient A10 – Millipore (Milford, EUA).

As colunas cromatográficas utilizadas foram a Waters Symmetry® C18 (4,6x75 mm, 3,5 µm) do lote 0194300831 e Waters (Massachusetts, EUA) Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100 mm, 1,7 µm) do lote 0246342391

### 3.3. EQUIPAMENTOS E SOFTWARES

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de dióxido (CLAE-DAD), marca Agilent (Califórnia, EUA) série 1100. Degasser G1379A, QuatPump G1311A, ALSTherm G1330B, ColCom G1329A e DAD G1315B;

- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (CLUE), marca Waters (Massachusetts, EUA) Acquity H Class, acoplado ao espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo com tempo de voo (CLUE-QToF) Xevo G2-S;

- Espectrômetro de massas acoplado a fonte de ionização por eletrospray com analisadores do tipo triplo quadrupolo SCIEX (Toronto, Canada) API 3200;

- Balança analítica Mettler Toledo (Columbus, EUA), modelo Excellence Plus XP 205;

- Chemstation versão B.04.03[16], Copyright© Agilent Technologies, Inc. (Califórnia, EUA), 2001-2010;

- MassLynx versão 4.1., Copyright© Waters, Inc. (Massachusetts, EUA), 1994-2015;

- Statistica versão 10, Copyright© Statsoft, Inc. (Oklahoma, EUA) 1984-2011;

- Prisma versão 6.01, Copyright© GraphPad Software, Inc. (Califórnia, EUA) 1992-2012;

- Minitab versão 17.1.0, Copyright© LEAD Technologies, Inc. (Carolina do Norte, EUA), 1991-2004;

- ChemsSketch versão C50E41, Copyright© ACD/Labs, Inc. (Toronto, Canadá), 1994-2018;

- MarvinSketch versão 18.25.0, Copyright© ChemAxon, Inc. (Budapeste, Hungria), 1998-2018.

- Inkscape versão 0.97.4, Copyright© Free Software Foundation, Inc (Massachusetts, EUA) 2007-2019.

### 3.4. DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-MÉTODO

Para o monitoramento dos ensaios de degradação forçada do DBV, foi necessário desenvolver um método cromatográfico, este nomeado pré-método. O método de partida empregado foi o descrito por Al-Zoman e colaboradores (2017) que além da determinação do DBV compreendia outros fármacos (ombitasvir, paritaprevir e ritonavir), que fazem parte da terapia combinada para o tratamento da hepatite C.

O método proposto por Al-Zoman e colaboradores (2017) por CLAE-DAD utilizou coluna Symmetry® C18 (4,6x75 mm, 3,5 µm), como fase móvel uma mistura de água e ACN na proporção 35:65 (v/v), fluxo de eluição de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção de 10 µL e temperatura foi de 25°C, sendo os analitos monitorados pelo DAD nas faixas de 190 a 400 nm. A concentração do DBV na análise realizada foi de 15 µg.mL<sup>-1</sup> inicialmente.

O cromatograma obtido na análise realizada com este método foi avaliado quanto sua eficiência de separação, intensidade do pico e adequabilidade da retenção do DBV para que os possíveis PD pudessem ser discriminados durante os ensaios de degradação. Para a otimização deste método, foram modificados parâmetros como fluxo, pH e composição da fase móvel, temperatura da coluna, adição de tampão e/ou aditivos e diferentes colunas cromatográficas. Este pré-método otimizado serviu de base para o desenvolvimento do método-indicativo de estabilidade.

### 3.5. ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO

Os ensaios de degradação para a obtenção do perfil e dos possíveis produtos de degradação do DBV foram realizados conforme o guia da ANVISA nº 04/2015 – “Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos”, RDC 53/2015 ANVISA – “Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação” e o guia internacional da ICH Q1A – “Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products” (BRASIL, 2015b, 2015a; ICH, 2003).

DBV foi submetido a condições de estresse ácido, alcalino, oxidativo, fotolítico, termal úmido e termal seco, sendo monitorado para o aparecimento de possíveis PD. Os ensaios de degradação do DBV foram realizados em solução

(hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação e termal úmido) e na forma sólida (fotolítica e termal seco).

Para os testes de degradação forçada em solução, as amostras foram preparadas dissolvendo-se o DBV em DMSO, e em seguida adicionado o agente degradante (ácido, base, oxidante ou água). As misturas das soluções do DBV em DMSO e agente degradante foram feitas na proporção de 1:1, de forma a obter uma solução de concentração final igual a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DBV, 1M de HCl ou 1M de NaOH ou 10% de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou com adição de água (DMSO +  $\text{H}_2\text{O}$ ). Os ensaios de degradação forçada na forma sólida (luz e calor), foram conduzidos em amostras de 1 mg do fármaco. As condições iniciais aplicadas e os volumes de reagentes acrescentados estão descritos no Quadro 9.

QUADRO 9 – COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Condição	DMSO ( $\mu\text{L}$ )	Aditivo	Volume do aditivo	Conc. Final Aditivo	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>Ácido</b>	500	HCl 2 M	500 $\mu\text{L}$	1 M	80
<b>Base</b>	500	NaOH 2M	500 $\mu\text{L}$	1 M	80
<b>Calor seco</b>	-	-	-	-	80
<b>Calor úmido</b>	500	$\text{H}_2\text{O}$	500 $\mu\text{L}$	-	80
<b>Fotolítico</b>	-	-	-	-	Amb.
<b>Oxidativo</b>	500	$\text{H}_2\text{O}_2$ 20%	500 $\mu\text{L}$	10%	Amb.

FONTE: O autor (2019).

NOTA: DBV na solução degradante suficiente para atingir  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e 1 mg em sólido.


LEGENDA: HCl – ácido clorídrico, NaOH – hidróxido de sódio,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – peróxido de hidrogênio;

O teor de DBV e a presença de PD foram determinados por CLAE-DAD no tempo zero, segundo e sétimo dia de degradação. Esta etapa foi considerada como ensaio preliminar. Os cromatogramas das amostras nestes tempos foram comparados. O DBV foi considerado como resistente frente à condição de estresse, quando não se observou o aparecimento de novos picos na análise cromatográfica e nem houve diminuição da área do DBV.

No caso de o fármaco mostrar-se sensível à determinada condição de estresse, o ensaio foi repetido e o monitoramento cromatográfico foi diário para avaliar se o PD era primário ou advindo de uma reação secundária. Os tempos em que ocorreram as análises neste período de monitoramento estão resumidas no Quadro 10.

Todos os ensaios de degradação foram realizados em replicatas em dias diferentes para confirmar se os PD eram reais ou artefatos.

QUADRO 10 – TEMPO DE COLETA DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO

Ensaio preliminar		Quando sensível 	Ensaio de monitoramento
Coleta	Tempo (dias)		Tempo (dias)*
T0	0		0
T1	-		1
T2	2		2
T3	-		3
T4	-		4
T5	-		-
T6	-		-
T7	7		7

Fonte: O autor (2019).

NOTA: \*O tempo de monitoramento foi interrompido quando produtos de degradação secundários forem detectados.

Para a análise por CLAE-DAD as amostras das diferentes condições de degradação em solução foram preparadas diluindo-se inicialmente em ACN (1:1) e em seguida com fase móvel, para se obter uma solução de concentração  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que após filtradas em PTFE  $0,22 \mu\text{m}$ , foram cromatografadas.

A degradação fotolítica foi conduzida em uma câmara contendo uma lâmpada fluorescente branca fria e uma lâmpada fluorescente ultravioleta com emissão de radiação na faixa de 320 a 400 nm, conforme recomendam as diretrizes para fotodegradação de IFAs (ICH, 1996).

Para a análise por CLAE-DAD, as amostras de degradação no estado sólido foram dissolvidas em DMSO para se obter solução de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Esta solução foi diluída com ACN (1:1) e em seguida com a fase móvel, para se obter solução de concentração  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que após filtradas em PTFE  $0,22 \mu\text{m}$  foram cromatografadas.

Para poder monitorar a formação de PD (aparecimento de novos picos nos cromatogramas) e/ou alteração na intensidade do pico de DBV, um pré-método por CLAE-DAD foi desenvolvido. Este foi a base para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.

### 3.6. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR E INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Uma vez detectados os PD gerados nos ensaios de degradação forçada na análise de CLAE-DAD, a respectiva amostra foi analisada por CLUE-QToF.

O preparo de amostra, tanto para solução de DBV controle quanto para amostra contendo PD, foi visando o preparo da concentração de DBV de 1000 ng.mL<sup>-1</sup>, sendo filtrada em filtro PTFE 0,22 µm antes de ser cromatografada.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100mm, 1,7µm). A fase móvel foi de AFO 0,1% e ACN na proporção de 55:45 (v/v) com fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 3 µL.

Parâmetros do espectrômetro de massas e da fonte de ionização foram otimizados visando a maior quantidade de íons do DBV para sua detecção, sendo configurado a voltagem do capilar -3000 V, *sampling cone* 40000 V, temperatura da fonte 150°C, *source offset* 80 V, temperatura de dessolvatação 350°C, fluxo do gás do cone 50 L.h<sup>-1</sup>, fluxo do gás de dessolvatação 400 L.h<sup>-1</sup>. O modo de aquisição utilizado foi através do MS<sup>e</sup>, que consiste na observação tanto dos íons precursores quanto íons produtos durante 10 minutos e no intervalo de 100 a 600 Da. Os analitos foram detectados no modo negativo.

A investigação dos PD baseou-se na massa exata do íon precursores com erro ppm inferior a 5 e no perfil de fragmentação de forma comparativa ao do DBV. As estruturas dos PD e as estruturas de fragmentação do DBV com suas massas monoisotópicas foram desenhadas utilizando o software ChemSketch®.

### 3.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR POR CLAE-DAD

A solução contendo DBV e os PD obtidos das diferentes condições de estresse em que o DBV foi sensível à degradação (ácida e alcalina) foi utilizada para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. As soluções de degradação foram misturadas após a neutralização com o ácido e base correspondente. Nesta fase os ensaios conduzidos foram qualitativos visando adequar a seletividade, buscando uma resolução dos picos (> 1,5). Para a otimização deste método, foram modificados parâmetros cromatográficos como fluxo, pH e composição da fase móvel, temperatura da coluna.

### 3.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Após o desenvolvimento e a otimização do método (adequada resolução dos picos cromatográficos na mistura do DBV e seus PD), o mesmo foi validado conforme a RDC 166, de 25 de julho de 2017, sobre validação de métodos analíticos, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os seguintes parâmetros foram avaliados: adequação de sistema, seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2017b).

#### 3.8.1. Adequação de sistema

A partir da condição que gerou cromatogramas com adequada resolução do DBV e seus PD, os parâmetros de adequação de sistema (adquiridos através do ChemStation®), foram tempo de retenção ( $T_r$ ), pratos teóricos ( $n$ ), fator de capacidade ( $k'$ ), fator caudal ( $T$ ) e resolução ( $R_s$ ) foram calculados e tabelados. Esses parâmetros não compõem a validação analítica, porém são estimadores cromatográficos caso todas as variáveis e parâmetros cromatográficos sejam respeitados.

#### 3.8.2. Seletividade

A seletividade do método foi determinada utilizando amostras das condições de degradação forçada, contendo a mistura do DBV com seus PD (ácido e alcalina). Uma amostra contendo apenas o diluente (fase móvel e DMSO) para visualizar a possível presença de um pico cromatográfico no tempo de retenção que não seja da amostra contendo DBV e seus PD. A seletividade foi avaliada pela resolução dos picos cromatográficos ( $> 1,5$ ) e a ferramenta para determinação da pureza de picos fornecidas pelo ChemStation®. O método foi considerado seletivo quando observado uma similaridade do perfil do espectro de absorção do sinal referente ao analito (DBV e PD) superior a 99% nas faixas de 200 a 400 nm, indicando que não há sobreposição de sinais de analitos diferentes.

### 3.8.3. Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade do método foi avaliada utilizando oito diferentes concentrações variando de 10 a 140% de concentração de trabalho. As soluções correspondendo aos oito níveis de concentração e como foram preparadas são mostradas no Quadro 11. As análises foram feitas em triplicata.

Os valores médios encontrados foram plotados em um gráfico da concentração da amostra (eixo x) pela área da resposta (eixo y) para verificar a linearidade do método nas concentrações testadas. Tratamentos estatísticos foram realizados para a verificação da linearidade:

- Correlação de Pearson ( $R^2$ ) para verificar se as duas variáveis se relacionam de maneira linear;
- Teste de Breusch-Pagan para avaliar homocedasticidade dos dados no intervalo da curva de calibração;
- Teste de Ryan-Joiner para verificação da normalidade residual;
- Teste de Durbin-Watson para a identificação a possível auto correlação residual;
- Teste do  $t$  de Student para o coeficiente angular (b) para verificar se o valor obtido é diferente de zero;
- Teste do  $t$  de Student para o intercepto (a) para verificar se o valor obtido é diferente de zero;
- Teste F de análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância do modelo da regressão linear;

Foram considerados como critério de aceitação a correlação de Pearson superior à 0,98, normalidade residual, ausência de auto correlação expressiva dos resíduos, homocedasticidade dos dados no intervalo, coeficiente angular diferente de zero, intercepto semelhante à zero e significância do modelo de regressão linear.

QUADRO 11 – PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO DASABUVIR

Nível	Concentração final ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )*	Volume da SI ( $\mu\text{L}$ )	Volume de FM ( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )
1	9,78	10	490	500
2	19,56	20	480	
3	39,12	40	460	
4	58,68	60	440	
5	78,24	80	420	
6	97,8	100	400	
7	117,36	120	380	
8	136,92	140	360	

FONTE: O autor (2019)

NOTA: \*As concentrações tabeladas estão ajustadas de acordo com o laudo do IFA, considerando 97,8% de pureza.

LEGENDA: FM – fase móvel AFO 0,1%/ACN 55:45 (v/v); SI – solução intermediária de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do DBV;

#### 3.8.4. Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio do grau de concordância obtida no método em relação a um valor aceito como verdadeiro. Foram preparadas triplicatas do DBV nas concentrações de 10, 100 e 140  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , avaliando quanto a concordância das massas observadas em relação à massa pesada. O critério de aceitação da exatidão é de 98%, sendo o desvio padrão relativo (DPR) das replicatas inferior à 2%.

#### 3.8.5. Precisão

A precisão foi avaliada quanto a repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi determinada através da análise do DPR em seis réplicas do ponto central da curva de calibração (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) utilizando o mesmo equipamento, mesmo analista e no mesmo dia. A precisão intermediária foi determinada comparando-se o resultado das análises de seis réplicas do ponto central da curva de calibração, realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes.

O critério de aceitação é de DPR inferior a 2% para repetitividade. A similaridade das réplicas em dias diferentes realizadas por analistas diferentes foi avaliada pelo teste F para comparação das variâncias e *t* de Student para a comparação das médias (BRASIL, 2017b).

### 3.8.6. Limite de detecção e quantificação

Os parâmetros limite de detecção e quantificação foram determinados baseando-se nos parâmetros da curva de calibração, sendo considerado o desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva.

### 3.8.7. Robustez

A robustez do método foi determinada utilizando o planejamento multifatorial para avaliar a relevância de cada parâmetro para o método de forma individual e sinérgica.

A amostra submetida aos ensaios de robustez foi a mistura do DBV em conjunto com seus PD, sendo avaliado as mudanças ocorridas no pico do DBV. Essa mesma amostra foi analisada em um conjunto de oito ensaios com combinações de diferentes parâmetros cromatográficos, sendo as variações dos parâmetros mostradas no Quadro 12. Os parâmetros monitorados foram tempo de retenção e teor do DBV, resolução 1 (DBV em relação ao pico anterior) e resolução 2 (pico posterior em relação ao DBV).

Os dados foram submetidos à plotagem de meia-normal (Daniel Plot) em conjunto com diagrama de Pareto para mostrar de forma ranqueada a robustez do método frente os parâmetros cromatográficos testados.

QUADRO 12 – PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

Parâmetros		Condições Normais		Variação	
		Parâmetro	ID	Parâmetro	ID
Concentração do ácido fórmico		0,1%	A	0,08%	a
Temperatura da coluna		25 °C	B	30 °C	b
Fluxo da fase móvel		1 ml.min <sup>-1</sup>	C	1,1 ml.min <sup>-1</sup>	c
Proporção da fase aquosa		55%	D	56%	d
Comprimento de onda		244	E	246	e
Réplica	Conc. AFO	Temperatura	Fluxo	Prop. Fase aquosa	Comp. de onda
1	<b>A</b>	b	c	d	e
2	a	<b>B</b>	c	d	<b>E</b>
3	a	b	<b>C</b>	<b>D</b>	e
4	a	b	c	<b>D</b>	<b>E</b>
5	<b>A</b>	b	<b>C</b>	d	<b>E</b>
6	<b>A</b>	<b>B</b>	c	<b>D</b>	e
7	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
8	a	<b>B</b>	<b>C</b>	d	e

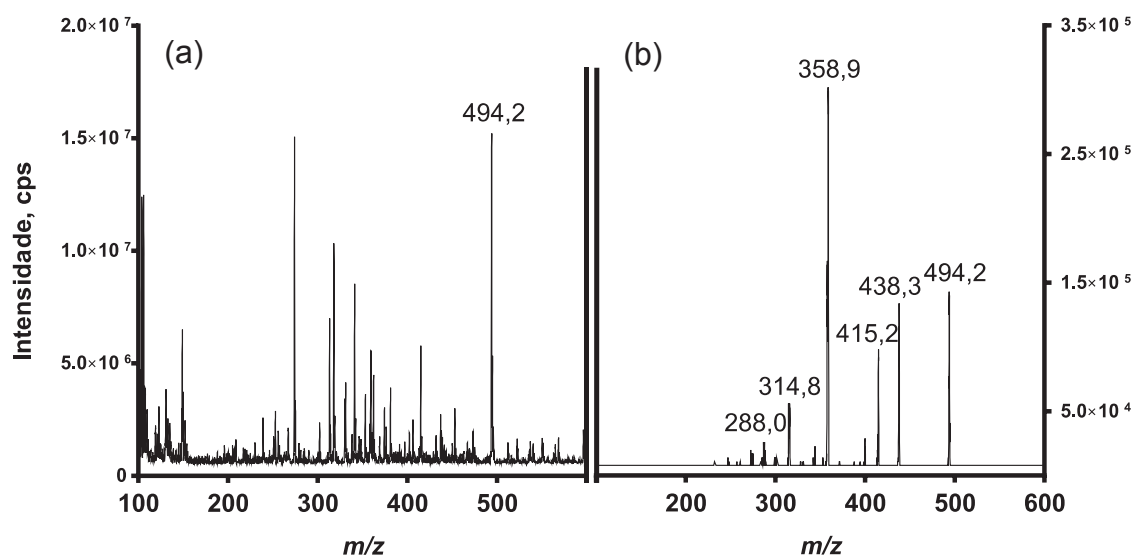
FONTE: O autor (2019).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. IDENTIFICAÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO

A identidade do DBV foi confirmada por espectrometria de massas, comparando com os resultados foram obtidos no perfil de fragmentação no modo positivo (Figura 4) e no modo negativo (Figura 5) com os dados da literatura. As transições de massas específicas do DBV  $494,0 \rightarrow 359,0$  Da (OCQUE et al., 2017; POLEPALLY et al., 2016) para o modo positivo e  $492,1 \rightarrow 476,8$  Da (ARIAUDO et al., 2016) para o modo negativo são evidências que a amostra corresponde ao DBV.

FIGURA 4 - ÍONS TOTAIS E PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR NO MODO POSITIVO

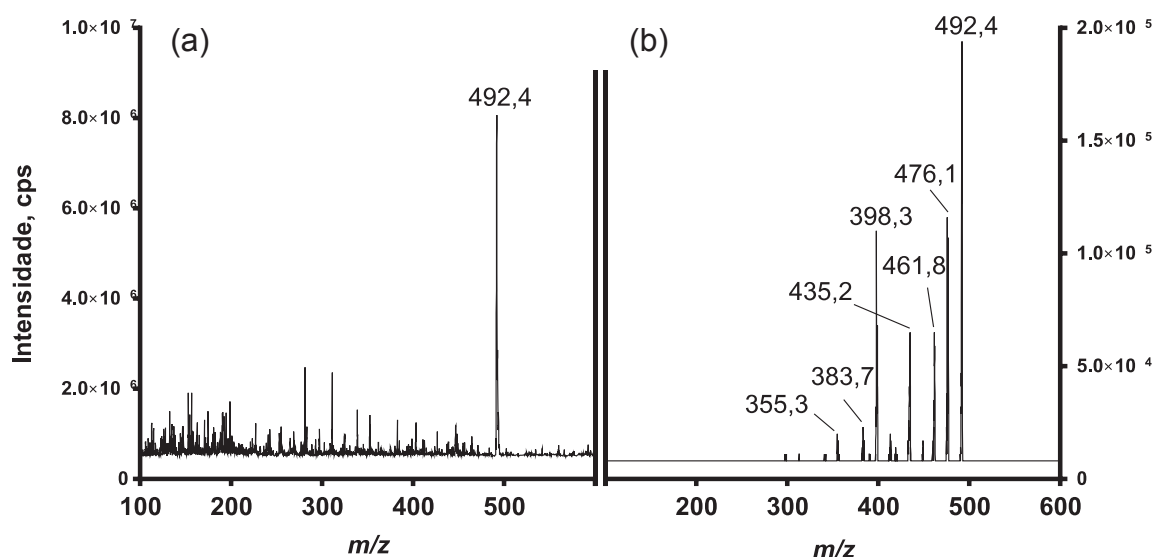


FONTE: O autor (2019).

NOTA: Espectrograma obtido no triplo-quadrupolo com ionização positiva por eletrospray – infusão direta. Íons totais (a) e perfil de fragmentação (b). Solução de DBV a  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

Observa-se que no perfil de fragmentação tanto no modo positivo quanto no modo negativo encontram-se as transições de massa específica ( $494,0 \rightarrow 359,0$  Da e  $492,1 \rightarrow 476,8$  Da, respectivamente), confirmando a identidade do DBV. A partir desses ensaios de identidade foi constatado que o DBV possui uma boa ionização tanto no modo positivo quanto no modo negativo, sendo critério do analista a escolha do modo de ionização.

FIGURA 5 – ÍONS TOTAIS E PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR NO MODO NEGATIVO



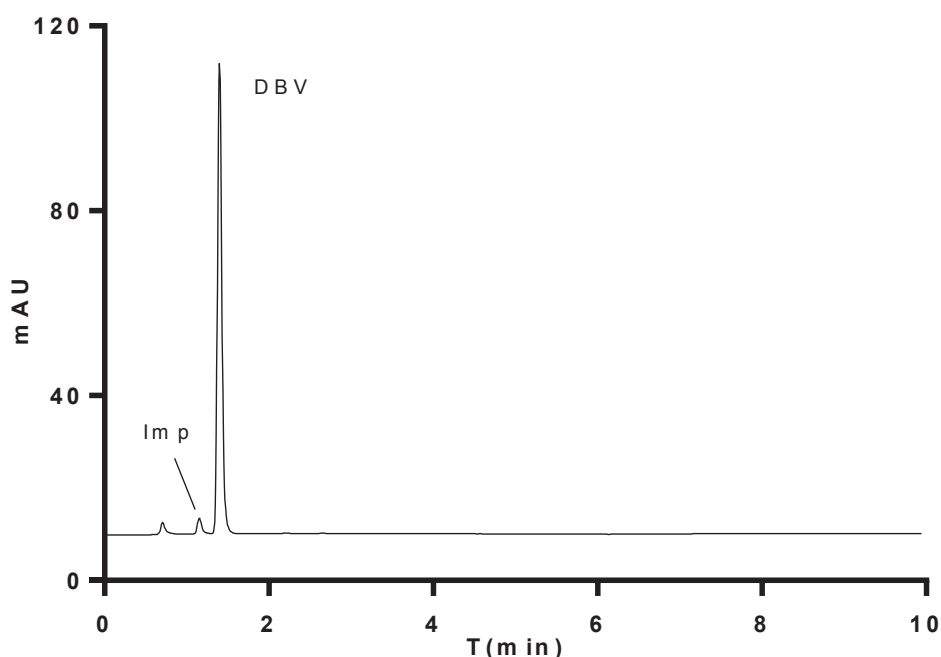
FONTE: O autor (2019).

NOTA: Espectrograma obtido no triplo-quadrupolo com ionização negativa por eletrospray – infusão direta. Íons totais (a) e perfil de fragmentação (b). Solução de DBV a 500 ng.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2. DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-MÉTODO

O presente estudo teve também como objetivo desenvolver um método indicativo de estabilidade para o DBV no IFA, capaz de quantificá-lo mesmo na presença de seus PD e impurezas. O método de partida foi o método cromatográfico desenvolvido por Al-Zoman e colaboradores (2017) cujo foco é a determinação do DBV e os demais fármacos que compõe a terapia combinada (ombitasvir, paritaprevir e ritonavir) em uma única corrida. O cromatograma de uma amostra contendo apenas o DBV (15 µg.mL<sup>-1</sup>) utilizando o método cromatográfico de Al-Zoman e colaboradores (2017) está mostrado na Figura 6. A intensidade do pico cromatográfico do DBV relativa à 15 µg.mL<sup>-1</sup> gerou um sinal baixo (101,8 mAU), e pouca retenção, eluindo próximo do volume morto.

FIGURA 6 – CROMATOGRAMA DO DASABUVIR OBTIDO PELO MÉTODO DESCRITO NA LITERATURA\*



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel  $\text{PO}_4$  10 mM pH 7:ACN 35:65, fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$  e comprimento de onda de detecção de 254 nm. Concentração de 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do DBV. \*(AL-ZOMAN; MAHER; AL-SUBAIE, 2017).

Embora o objetivo fosse chegar em um método indicativo de estabilidade, foi necessário primeiro adequar o método, para que possibilitasse o monitoramento da formação de produtos de degradação frente as diferentes as condições de degradação testadas. Para que, uma vez conhecidos os possíveis produtos de degradação, fosse possível desenvolver o método indicativo de estabilidade.

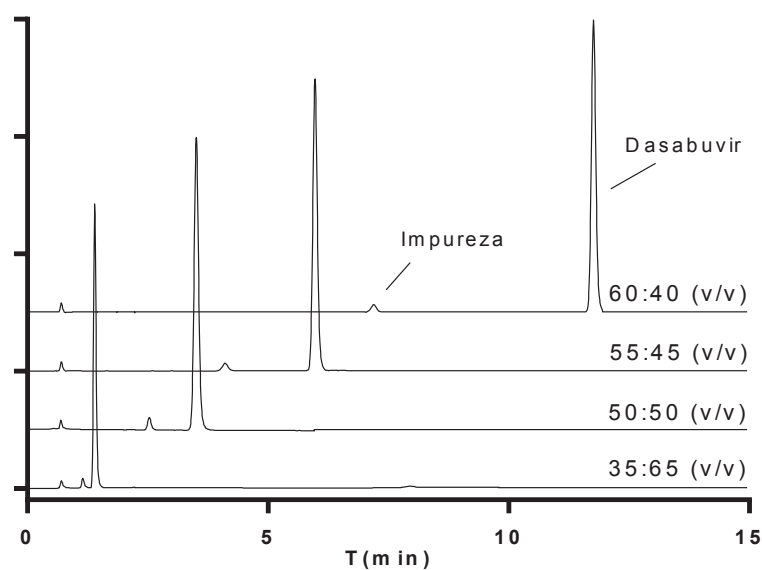
A concentração de análise foi aumentada para 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , por ser uma condição de degradação, foi necessário para que fosse possível quantificar o DBV e detectar os PD. Foram testadas também modificações na fase móvel: (a) sem adição do aditivo tampão fosfato pH 7 na fase aquosa, (b) adição de ácido fórmico (AFO) 0,1% na fase aquosa pH 2,6.

Com a fase móvel sem o aditivo tampão fosfato gerou-se um cromatograma com alteração da simetria do pico do DBV (fator caudal - 1,857). Com a substituição do tampão fosfato pH 7 pelo AFO 0,1% (pH 2,6) na fase aquosa, o cromatograma mostrou uma boa simetria no pico do DBV, justificado pelo seu  $\text{pK}_a$  (8,2 e 9,02) (fator caudal – tampão fosfato pH 7: 1,172 e AFO 0,1% pH 2,6: 1,168).

A fase móvel acidificada com AFO, foi considerada uma boa opção, uma vez que se trata de um preparo mais simples e também o fato que facilita a transposição deste método para análise por espectrometria de massas, pois o AFO, em geral, é utilizado como aditivo para auxiliar na ionização dos analitos durante as análises.

Também foram testadas diferentes proporções da solução aquosa de AFO em relação à acetonitrila. Esta otimização visou adequar o tempo de retenção para o monitoramento do DBV e seus PD. Os resultados deste teste são mostrados na Figura 7. A condição 55:45 (v/v), gerou um cromatograma com boa resolução dos picos e tempos de retenção adequados do DBV e sua impureza. A condição 60:40 (v/v) foi a que teve melhor separação, porém não foi escolhida por alongar o tempo de corrida, podendo aumentar a retenção de alguns PD.

FIGURA 7 - OTIMIZAÇÃO DA PROPORÇÃO DA FASE MÓVEL DO PRÉ-MÉTODO

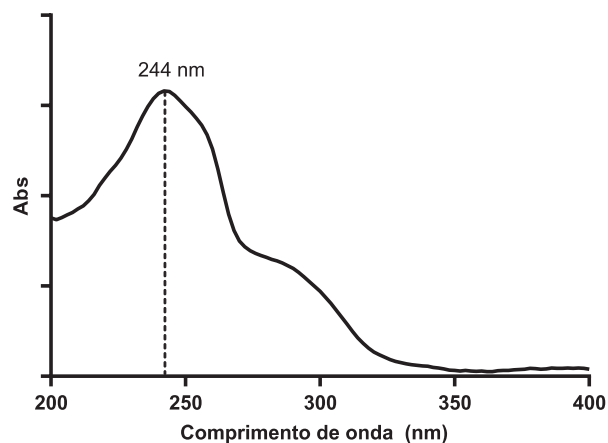


FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6; ACN, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10  $\mu$ L e comprimento de detecção de 254 nm. Concentração de 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do DBV.

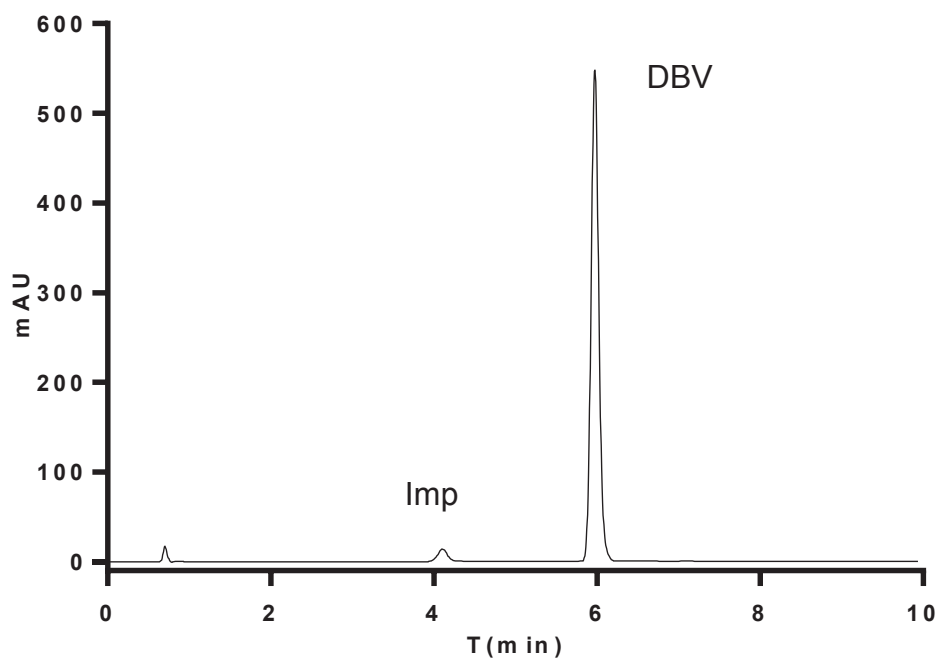
O comprimento de onda escolhido para a detecção do DBV foi de 244 nm, comprimento de onda onde o DBV apresentou absorção máxima (Figura 8), diferente do método de Al-Zoman que usa 254 nm, talvez por tratar-se de um método que realiza a determinação de mais de um analito na mesma corrida cromatográfica.

FIGURA 8 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO DBV



As modificações propostas, a resolução, os tempos de retenção e a intensidade dos sinais se mostraram adequados para o propósito do monitoramento dos PD nos ensaios de degradação (Figura 9). O método ficou definido como: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , temperatura da coluna de 25°C e comprimento de detecção de 244 nm.

FIGURA 9 - PRÉ-MÉTODO OTIMIZADO DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , temperatura da coluna de 25°C e comprimento de onda de detecção de 244 nm. Concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do DBV.

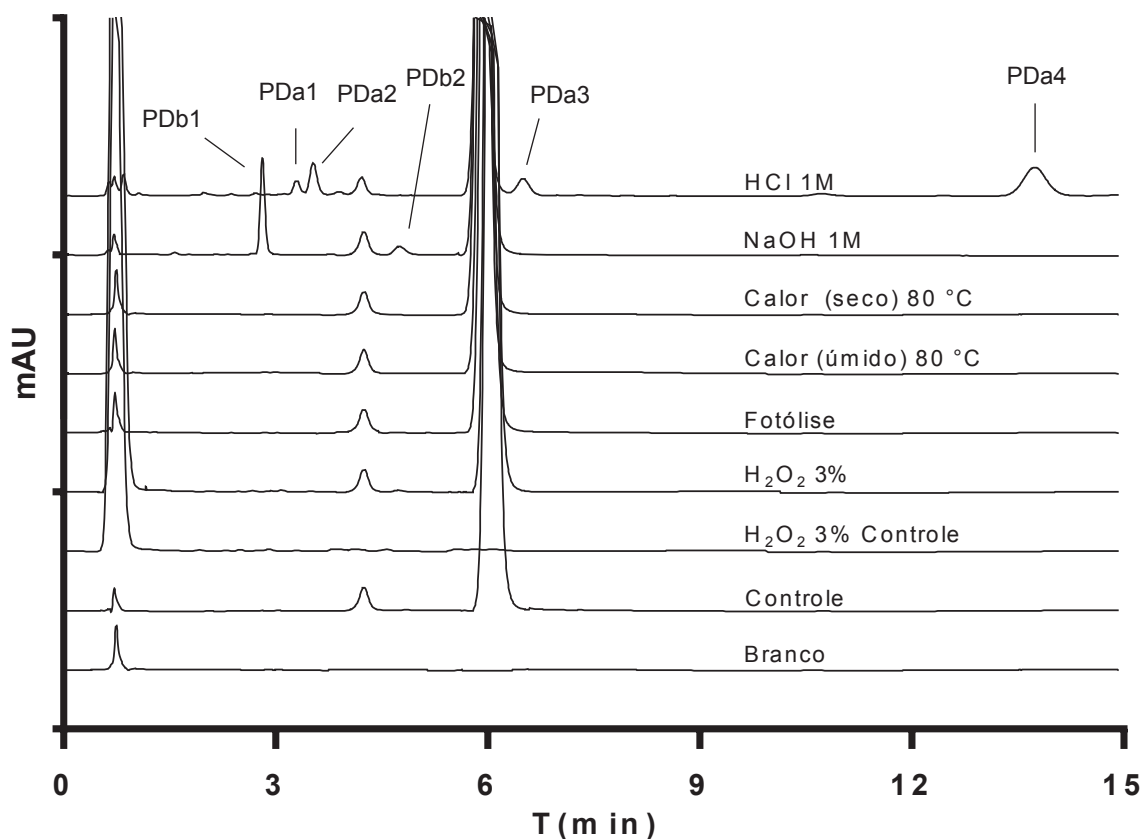
### 4.3. ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO

#### 4.3.1. Ensaio de degradação preliminares

Os ensaios de degradação preliminares foram realizados com intuito de verificar a sensibilidade do IFA frente às condições de estresse forçado para avaliar em quais condições o IFA é resistente e em quais ele é sensível à degradação.

Nos resultados destes ensaios (Figura 10 e Quadro 13) pode-se observar que a degradação em meio ácido e alcalino, em comparação ao controle, formou PD e houve redução na área do pico correspondente ao do DBV indicando que este é sensível à degradação nestas condições. No entanto, não houve diferença significativa na área do pico do DBV nas condições oxidativa, termal seca, termal úmida e fotolítica, até 48 h (dois dias), e não se observou no cromatograma o aparecimento de novos picos, indicando que o DBV se mostrou estável frente a estas condições durante esse período, em comparação com o controle.

FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM DIFERENTES CONDIÇÕES EM 48 HORAS



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Cromatograma obtido em Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna de 25 °C e comprimento de onda de detecção de 244 nm. Solução de DBV 1 mg.mL<sup>-1</sup>, nas condições: Ácida (solução de DBV em DMSO e HCl 1 M); alcalina (solução de DBV em DMSO e NaOH 1 M); oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, 25°C); termal úmida (solução de DBV em DMSO e H<sub>2</sub>O, 80°C), termal seca (1 mg DBV em estufa 80°C) e fotolítica (1 mg DBV em câmara fotolítica).

QUADRO 13 - ÁREA DO PICO DO DBV EM DIFERENTES CONDIÇÕES EM 48 HORAS

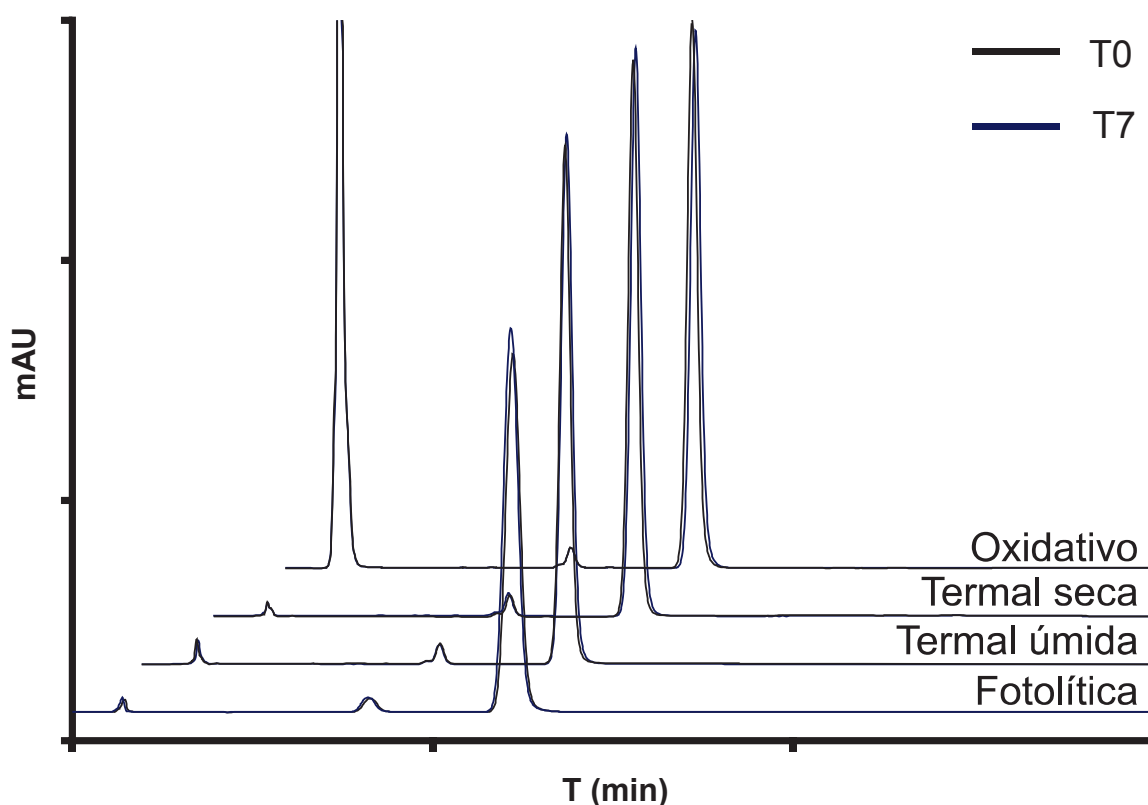
	Área A		Variação	Área B		Variação
	T0	T2		T0	T2	
<b>Ácida</b>	6050,23	2856,65	-3193,58	6223,98	2915,66	-3308,32
<b>Alcalina</b>	6148,30	3447,31	-2700,99	6476,11	3537,04	-2939,07
<b>Oxidativo</b>	6095,45	6009,71	-85,74	6279,66	6301,12	21,46
<b>Termal Seco</b>	6312,89	6353,2	40,31	5925,30	5898,45	26,85
<b>Termal úmida</b>	6235,64	6289,99	54,35	6103,47	6158,96	55,48
<b>Fotolítica</b>	5953,42	6191,56	238,14	6410,23	6357,21	53,02

FONTE: O autor (2019).

NOTA: T0 referente 0 hora; T2 referente 48 horas. Área A e Área B são referentes réplicas em diferentes dias.

Para as condições em que o DBV mostrou-se estável até 48 horas, este monitoramento foi avaliado até o sétimo dia (168 horas). Nos cromatogramas das análises correspondentes ao sétimo dia não se observou o aparecimento de PD, além de quase completa sobreposição dos cromatogramas obtidos no T0 e em T7, indicando que o DBV se mostrou estável frente as condições oxidativa, termal seca, termal úmida e fotolítica (Figura 11).

FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM SOLUÇÃO E SÓLIDO EM DIFERENTES CONDIÇÕES ATÉ SETE DIAS



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10  $\mu$ L, temperatura da coluna de 25°C e comprimento de detecção de 244 nm. Os cromatogramas plotados são relativos a área da réplica A em mAU.s.

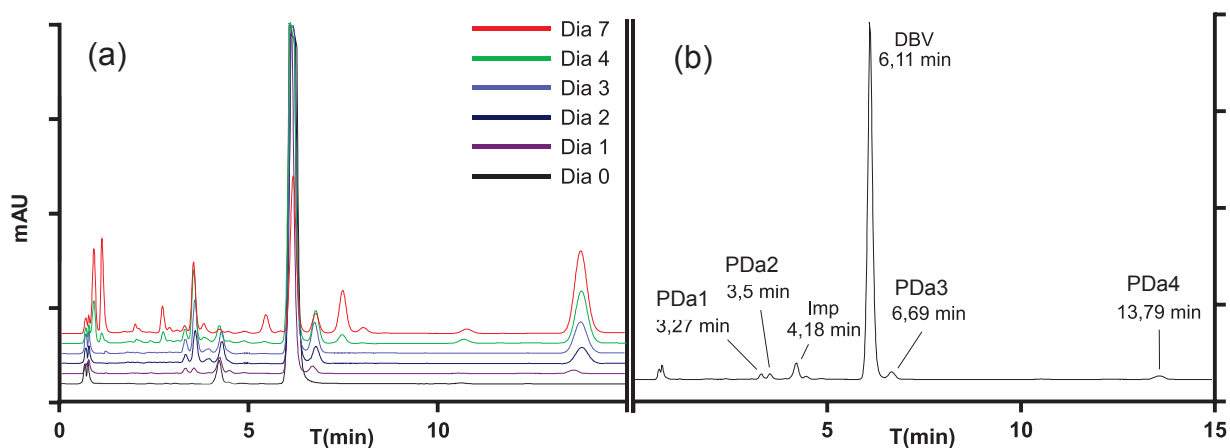
Para as condições ácida e alcalina em que o DBV se mostrou sensível, este experimento foi repetido, sendo avaliado diariamente por uma semana tanto a degradação em meio ácido quanto em meio básico.

#### 4.3.2. Degradação em meio ácido

Na degradação ácida, até o sétimo dia, detectou-se o aparecimento de 15 PD (Figura 12), porém é possível que apenas 4 dos 15 sejam produtos primários, os com tempo de retenção de 3,27; 3,5; 6,69 e 13,79 min, chamados de PDa1, PDa2, PDa3 e PDa4, isto porque uma exposição superior a três dias, leva ao aparecimento de produtos que podem ser produtos secundários, ou primários com velocidade de formação lenta.

Com as informações da área do DBV e dos PD (Figura 13), observou-se que PDa2 e PDa4 aumentam de área no decorrer do monitoramento, indicando que estão sendo formados continuamente, enquanto que PDa1 e PDa3 atingiram seu rendimento máximo pelo terceiro dia e depois diminuíram. Isto pode indicar que estes PD foram consumidos para formar produtos secundários, estes que surgem a partir do terceiro dia. A análise gráfica das áreas em função do tempo, mostrou que houve um decaimento na área do DBV ao longo do tempo coerente com a sua degradação.

FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ÁCIDO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS

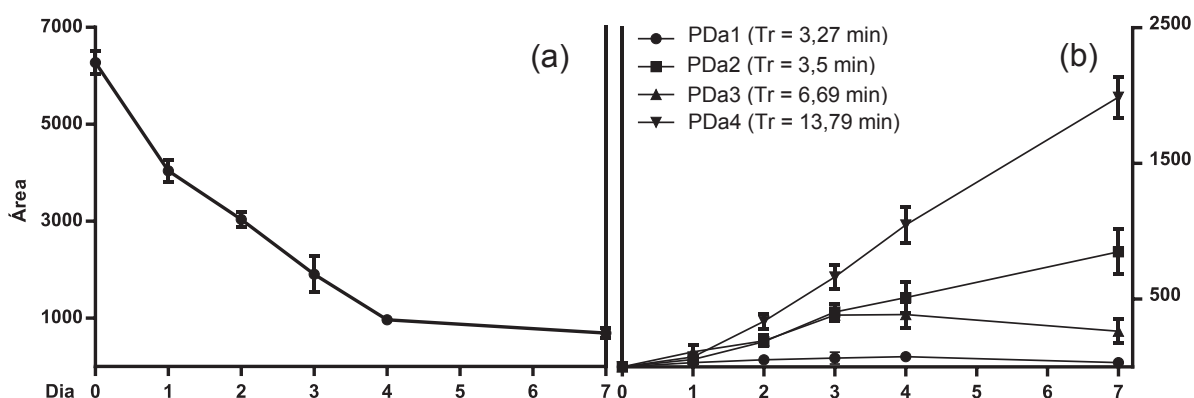


FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10  $\mu$ L e comprimento de detecção de 244 nm. Cromatograma do monitoramento (a) e cromatograma referente ao dia 1 de monitoramento (b).

Para a possível identificação dos PD e ensaios de desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, o DBV foi exposto ao ácido clorídrico 1M por no máximo dois dias, visando evitar a formação de produtos de reações secundárias, que poderiam interferir na análise de CLUE-QToF.

FIGURA 13 – ÁREA MÉDIA DOS PICOS CROMATROGRÁFICOS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ÁCIDO NO PERÍODO DE SETE DIAS



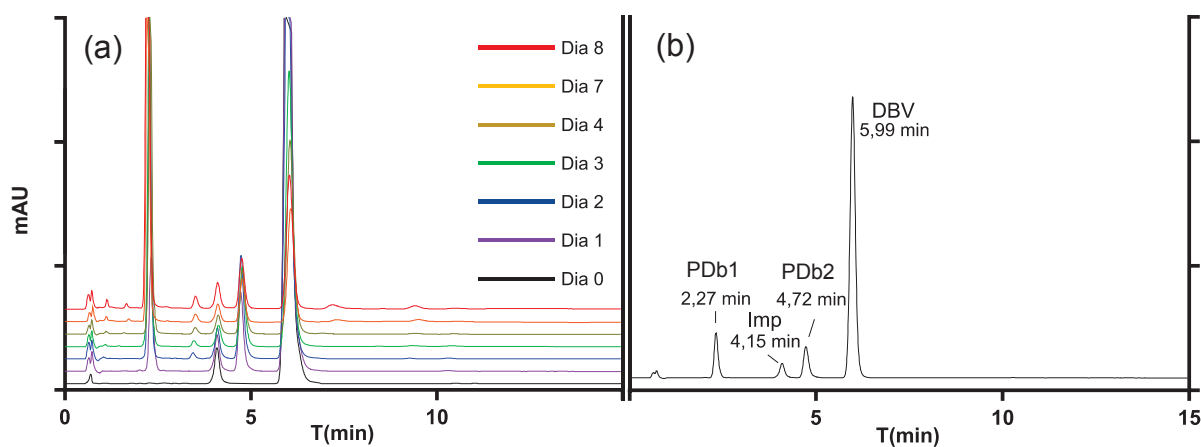
FONTE: O autor (2019).

Nota: Tr = tempo de retenção; decaimento da área do DBV (a) e aumento da área dos PD (b). Degradação em HCl 1 M. Pontos relativos área média das triplicatas de monitoramento.

#### 4.3.3. Degradação em meio alcalino

Na condição alcalina, até o sétimo dia, detectou-se sete PD (Figura 14), porém é possível que apenas 2 dos 7 sejam produtos primários, aqueles com tempo de retenção de 2,27 e 4,72 min, chamados de PDb1, PDb2, surgindo já nos dois primeiros dias de exposição e aumentando ao longo do tempo, enquanto que os demais são observados a partir do segundo dia, e mais lentamente, podendo ser produtos secundários. A partir das áreas dos picos do DBV e PD nos cromatogramas, em função do tempo (Figura 15) observou-se que há um decaimento na área do DBV com o tempo, em função da sua degradação e aumento de PDb1 que está sendo formado, porém o PDb2 não segue esta tendência. Após o segundo dia observou-se uma tendência de diminuição, o que é coerente com a ideia de que está reagindo e possivelmente contribuindo para o aparecimento de produtos secundários.

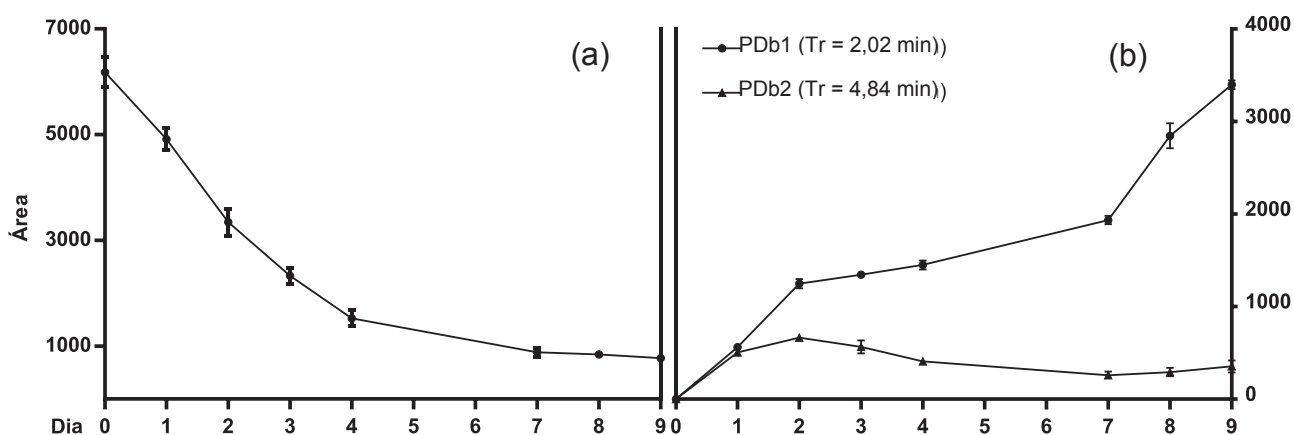
FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10  $\mu$ L e comprimento de onda de detecção de 244 nm. Cromatograma do monitoramento (a) e cromatograma referente ao dia 1 de monitoramento (b).

FIGURA 15 – ÁREA MÉDIA DOS PICOS CROMATROGRÁFICOS DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO NO PERÍODO DE SETE DIAS



FONTE: O autor (2019).

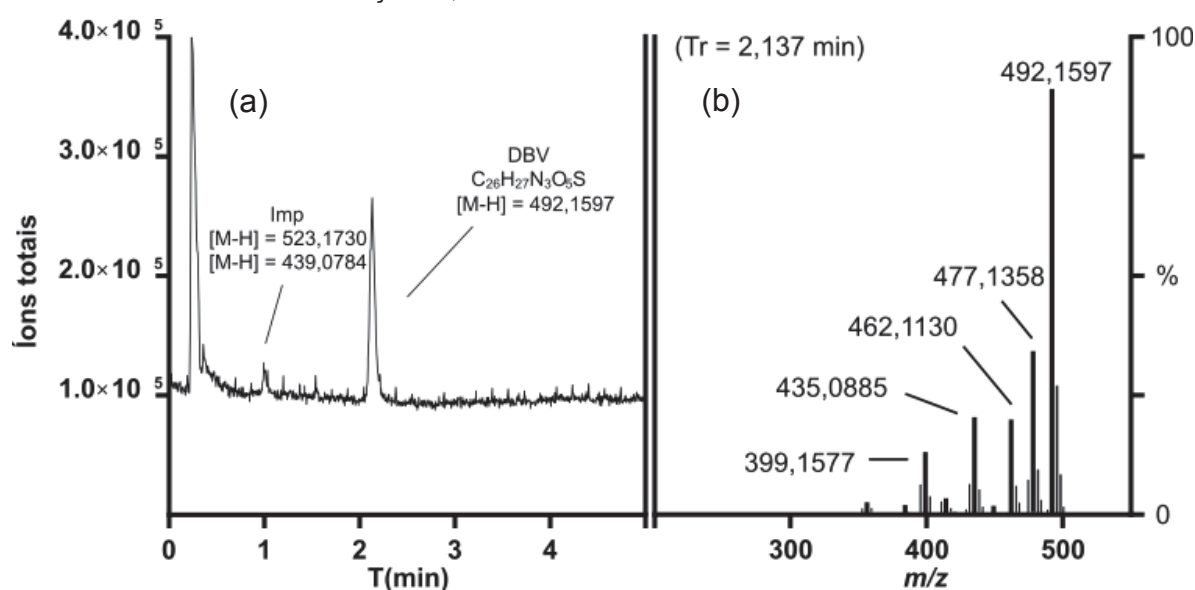
NOTA: Tr = tempo de retenção; decaimento da área do DBV (a) e aumento da área dos PD (b). Degradação em NaOH 1 M. Pontos relativos área média das triplicatas de monitoramento.

Para os ensaios de identificação dos PD em meio alcalino e para a otimização do método indicativo de estabilidade, o DBV foi exposto ao NaOH 1M por no máximo dois dias, visando evitar a formação de produtos de reações secundárias, que poderiam interferir na identificação pela espectrometria de massas.

#### 4.4. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR E INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

O perfil de fragmentação do DBV por CLUE-QToF foi obtido no modo negativo. O cromatograma e o espectrograma adquirido por MS<sup>e</sup> (modo de aquisição dos íons precursores e produtos em todos os tempos de retenção) no modo negativo mostrado na Figura 16.

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DO DASABUVIR E ESPECTROGRAMA RELATIVO AO TEMPO DE RETENÇÃO 2,137 MINUTOS OBTIDO POR CLUE-QTOF



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100 mm, 1,7  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1%:ACN – 55:45 (v/v) com fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 3  $\mu$ L com DBV na concentração de 1000 ng.mL<sup>-1</sup>. Cromatograma do DBV (a) e perfil de fragmentação do DBV (492,1597 Da) (b).

Todos os fragmentos do espectrograma obtidos possuíam isótopos com diferença de massa aproximadamente à 1  $m/z$ , importante para demonstrar que o analito possui apenas uma carga. Em conjunto com o perfil de fragmentação, foi possível propor o grupo funcional mais provável para a diferença de massas obtida. É importante ressaltar que o erro de massa (ppm) é comum para comparar a exatidão de massas do íon precursor e não para os íons produtos, uma vez que após o processo de colisão no QToF a exatidão de massas pode sofrer um desvio. O erro de massa foi tabelado para os íons produtos como parâmetro demonstrativo e como ferramenta para auxiliar no processo de investigação da perda molecular mais provável. O perfil de fragmentação do DBV está apresentado na Tabela 1.

A partir das perdas moleculares específicas, foi possível de forma comparativa sugerir quais grupos funcionais continuam inalterados e em qual porção da molécula a reação ocorreu durante os ensaios de degradação.

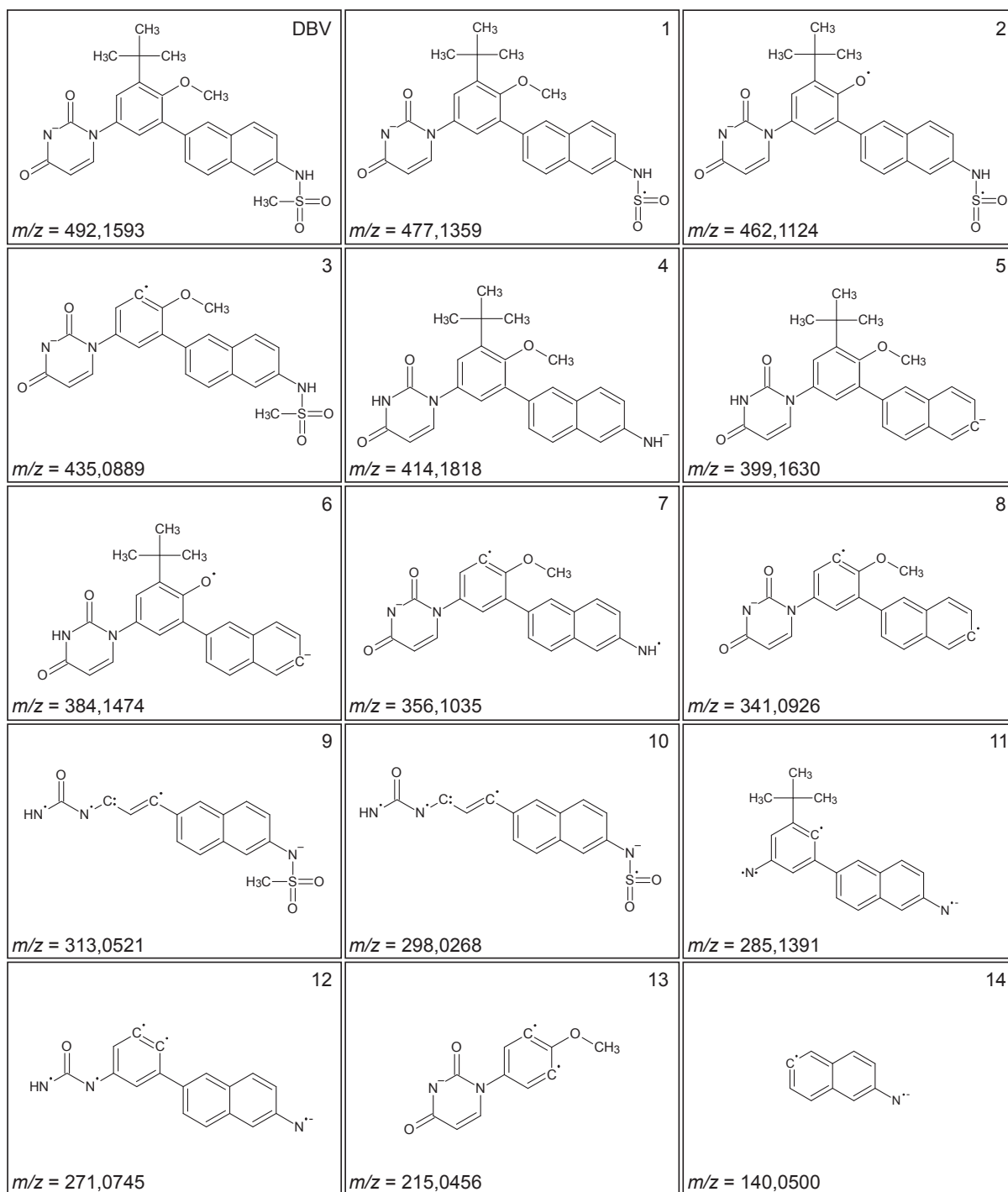
TABELA 1 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR

ID	Massa exata observada (m/z)	Massa exata teórica (m/z)	Erro de massa (ppm)	$\Delta$ massa	Perda molecular mais provável
<b>DBV</b>	492,1597	492,1593	-0,8127	-	[DBV-H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup>
<b>1</b>	<b>477,1358*</b>	477,1359	0,2095	15,0234	[DBV-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>2</b>	<b>462,1130*</b>	462,1124	-1,2983	30,0469	[DBV-2CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>3</b>	<b>435,0885*</b>	435,0889	0,9193	57,0704	[DBV-C3CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>4</b>	414,1804	414,1818	3,3801	77,9775	[DBV-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>5</b>	<b>399,1577*</b>	399,1630	13,27796	93,9884	[DBV-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>6</b>	384,1358	384,1474	30,1976	108,0119	[DBV-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>7</b>	356,1061	356,1035	-7,3011	136,0558	[DBV-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -C3CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>8</b>	341,1083	341,0926	-46,0264	151,0667	[DBV-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -C3CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>9</b>	313,0781	313,0521	-83,0464	179,1072	[DBV-C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O-C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
<b>10</b>	298,0543	298,0268	-92,2651	194,1325	[DBV-CH <sub>3</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O-C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
<b>11</b>	285,1037	285,1391	124,1653	207,0202	[DBV-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -OCH <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
<b>12</b>	271,0754	271,0745	-3,32011	221,0848	[DBV-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -OCH <sub>3</sub> -C3CH <sub>3</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
<b>13</b>	215,0642	215,0456	-86,4858	277,1137	[DBV-C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> S-C3CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>14</b>	140,0495	140,0500	3,5701	352,1093	[DBV-C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S] <sup>-</sup>

FONTE: O autor (2019).

NOTA: \*Massas mais intensas nos espectrogramas. As propostas de estruturas para o ID 1-14 são apresentadas na figura 17.

FIGURA 17 - ESTRUTURAS DOS PRODUTOS DA FRAGMENTAÇÃO DO DASABUVIR

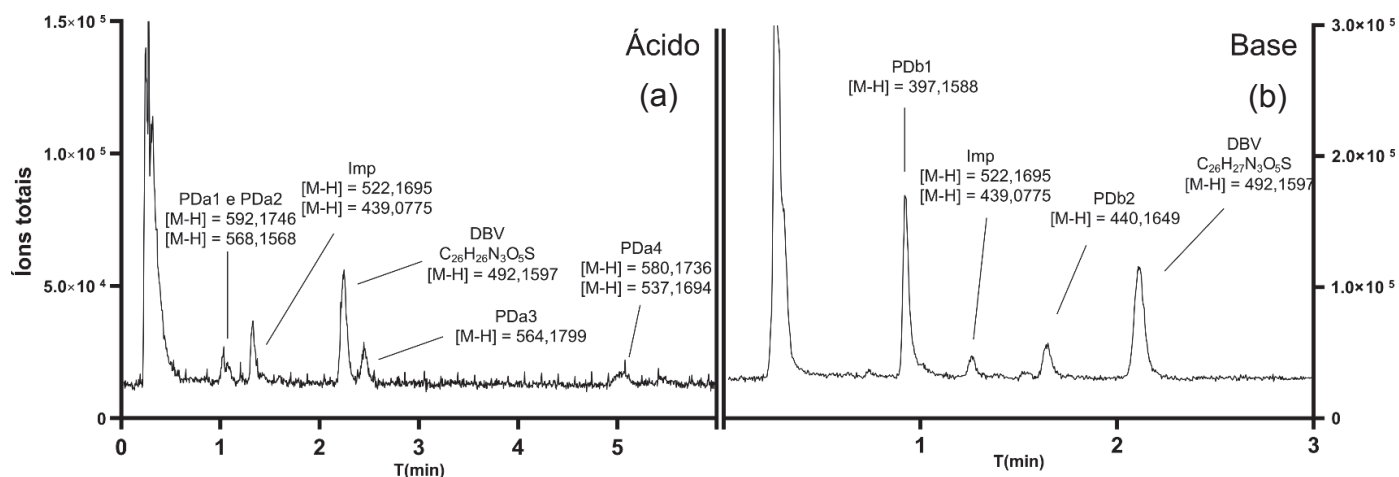


FONTE: O autor (2019).

Os produtos da degradação ácida e alcalina foram identificados de acordo com a condição do meio de degradação onde foram observados (a = ácido e b = alcalino) e o número corresponde a ordem de eluição no cromatograma (PDa1, PDa2, PDa3, PDa4 e PDb1, PDb2).

Ao analisar os resultados, foi possível verificar que no cromatograma da amostra alcalina, cada tempo de retenção correspondeu a uma única massa, porém na condição ácida foi observado que para alguns tempos de retenção há mais de uma massa (Figura 18).

FIGURA 18 - CROMATOGRAMAS OBTIDO POR CLUE-QTOF CONTENDO PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO ÁCIDA E ALCALINA

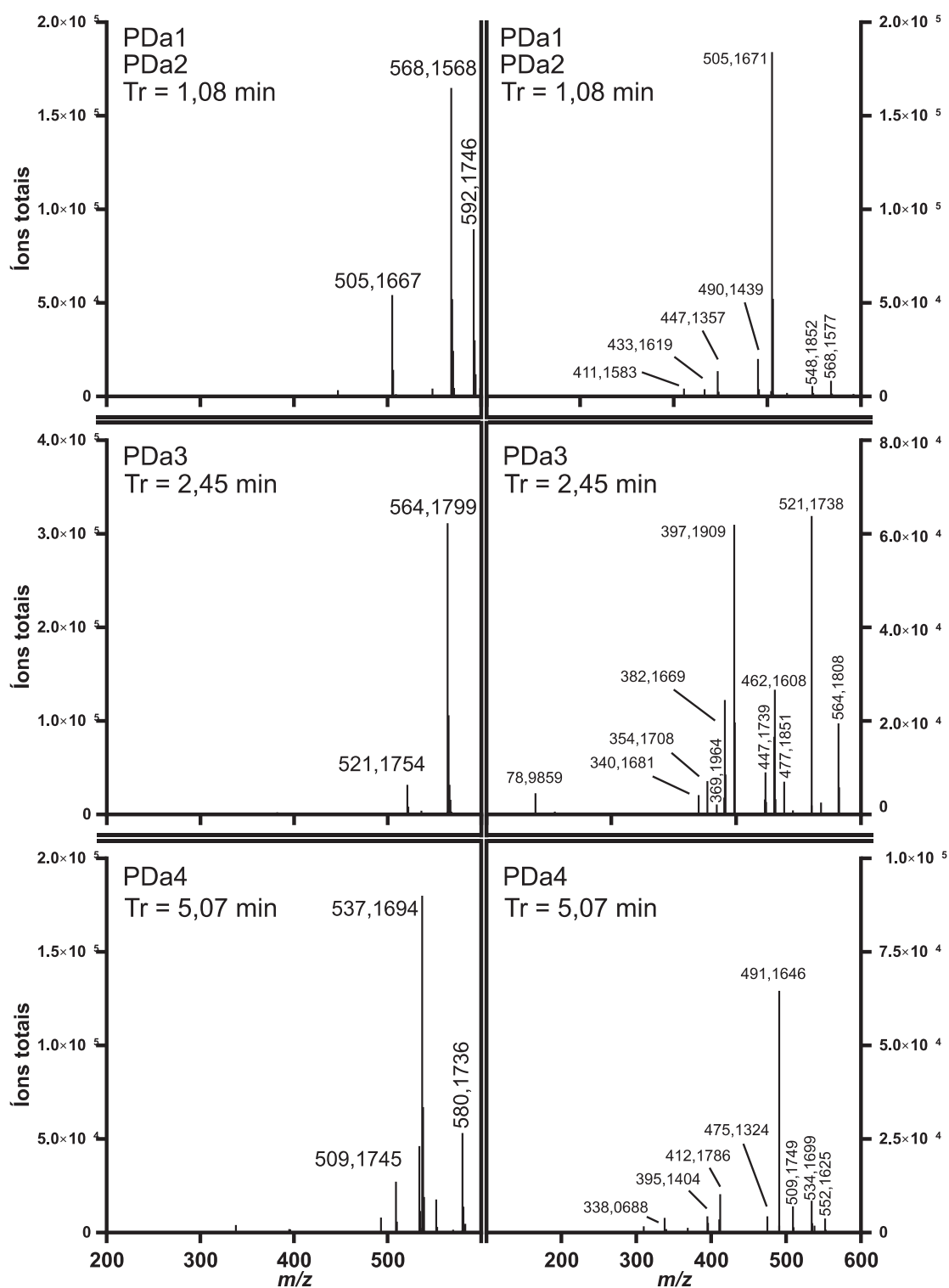


FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100mm, 1,7 $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1%:ACN – 55:45 (v/v) com fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 3  $\mu$ L. Íons precursores no modo negativo. Cromatograma contendo PD ácido (a) e PD alcalinos (b) relativo à análise da solução de degradação preparada a 1000 ng.mL<sup>-1</sup> de DBV.

No tempo de retenção de 1,08 min da condição ácida, três massas foram detectadas, de acordo com a Figura 19 contendo os espectrogramas dos PD, é possível propor como apenas dois produtos de degradação (PDa1 e PDa2), pelo fato que durante análise em CLAE-DAD, ambos possuíam tempos de retenção próximas. A massa relativa 505 Da no tempo de retenção 1,08 min foi considerada como íon produto e não precursor por aumentar a intensidade na alta energia, sendo um indicativo de que essa massa é vertente das outras duas listadas.

FIGURA 19 - ESPECTROGRAMAS DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ÁCIDO



FONTE: O autor (2019).

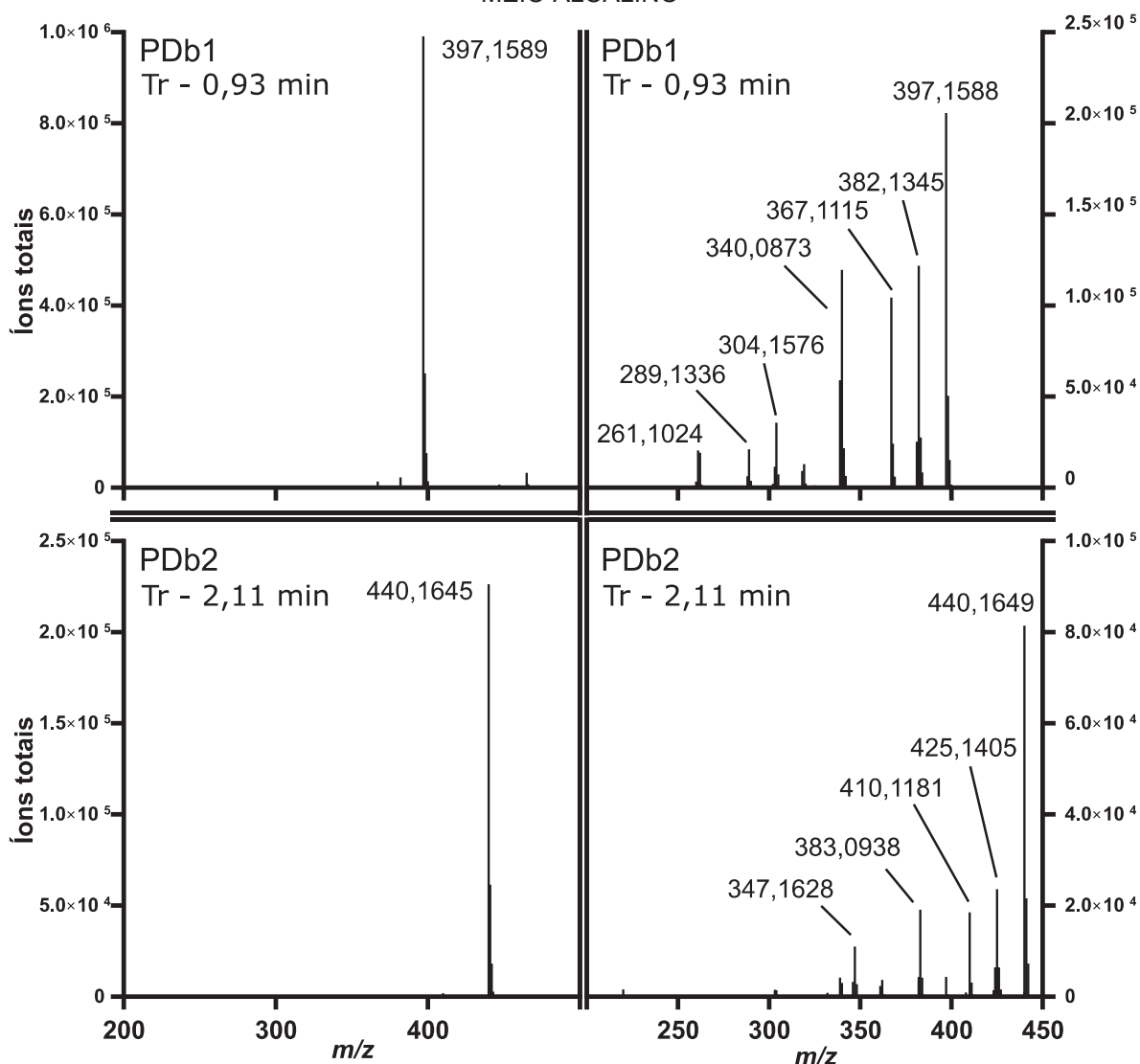
NOTA: Coluna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ); fase móvel AFO 0,1%:ACN – 55:45 (v/v) com fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 3  $\mu\text{L}$  com análise relativa à solução de degradação em 1000 ng.mL<sup>-1</sup> do DBV. Espectrogramas obtidos por CLUE-QToF no modo negativo. Espectrogramas da esquerda relativo baixa energia e direita relativo alta energia.

Ao analisar a perda ocorrida nos PD ácidos, é possível verificar que alguns fragmentos ainda são característicos ao do DBV, por exemplo no perfil do PDa3 onde há uma perda já descrita (43  $m/z$ ) da abertura do anel uracila e perdendo um grupamento amida (SHEN et al., 2016). Ainda há algumas massas características encontradas no DBV (477, 462, 397  $m/z$ ), podendo auxiliar na investigação estrutural de tais produtos. Somente essas informações não são suficientes para elencar a estrutura dos PD resultantes do meio ácido, uma vez que tais produtos possuem uma massa superior ao do DBV, abrindo possibilidades de investigação sobre qual tipo de reação ocorreu em meio ácido.

Para as estruturas de degradação ácida ainda há a necessidade de uma investigação acerca da existência de mais de um composto no mesmo tempo de retenção, que pode levar a equívoco na determinação do perfil de fragmentação dos PD. Para a resolução de tal problema, será realizada a espectrometria de massas sequencial (EM/EM) para a visualização dos íons produtos de um íon precursor específico, sendo possível verificar através da similaridade de fragmentação entre os diferentes íons precursores encontrados nessa retenção. Após a detecção da presença de um ou mais compostos no mesmo tempo de retenção, os parâmetros de fonte serão otimizados visando melhorar a ionização dos compostos confirmados após investigação no EM/EM.

Os perfis de fragmentação dos dois PD resultantes da condição alcalina (Figura 20 e Tabela 2) foram semelhantes ao perfil de fragmentação do DBV, onde é possível verificar que as fragmentações características dos grupamentos terc-butil, éter e metanosulfonamida, o que leva a concluir que esses grupamentos estão presentes na molécula dos produtos de degradação alcalinos, indicando que a transformação decorrente da degradação ocorreu no anel uracila.

FIGURA 20 - ESPECTROGRAMAS DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100 mm, 1,7  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1%:ACN – 55:45 (v/v) com fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 3  $\mu$ L com análise relativa à solução de degradação em 1000 ng.mL<sup>-1</sup> do DBV. Espectrogramas obtidos por CLUE-QToF no modo negativo. Espectrogramas da esquerda relativo baixa energia e direita relativo alta energia;

TABELA 2 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR DA CONDIÇÃO ALCALINA

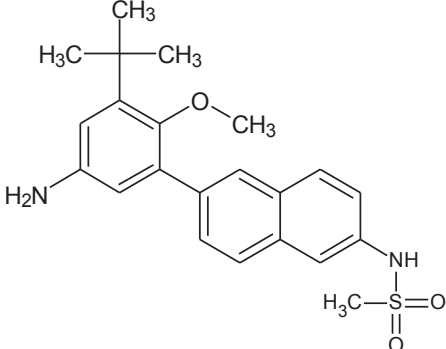
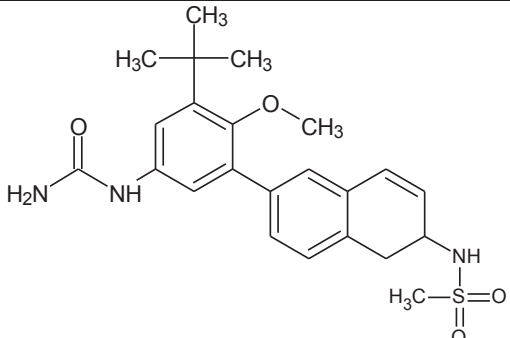
PDb1	$\Delta m/z$	Perda molecular mais provável
397,1587	-	-
<b>382,1350*</b>	15,0237	[PDb1-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>367,1114*</b>	30,0473	[PDb1-2CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>340,0872*</b>	57,0715	[PDb1-C <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
319,1807	77,978	[PDb1-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>304,1576*</b>	93,0011	[PDb1-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
289,1338	108,0249	[PDb1-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
261,1027	136,056	[PDb1-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -C <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
PDb2	$\Delta m/z$	
440,1649	-	-
<b>425,1404*</b>	15,0245	[PDb2-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>410,1181*</b>	30,0468	[PDb2-2CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>383,0938*</b>	57,0711	[PDb2-C <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
362,1876	77,9773	[PDb2-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>347,1628*</b>	93,0021	[PDb2-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
332,1398	108,0251	[PDb2-NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
304,1565	136,0084	[PDb2-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -C <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>

FONTE: O autor (2019).

NOTA: \**m/z* mais intensas

Com estas informações de fragmentação dos PD da degradação alcalina, foi possível elencar as seguintes estruturas com suas respectivas exatidões de massas com erro ppm, dispostas na Tabela 3.

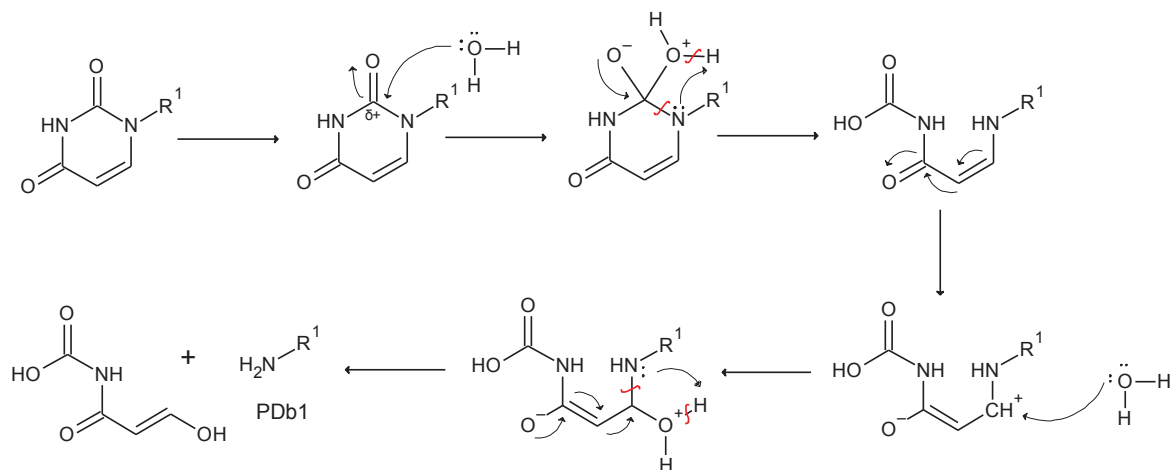
TABELA 3 - PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DASABUVIR EM MEIO ALCALINO

	<b>Massa exata observada (<i>m/z</i>)</b>	<b>Massa exata teórica (<i>m/z</i>)</b>	<b>Erro de massa (ppm)</b>
	398,1665	398,1664	0,2511
	<b>Nomenclatura IUPAC</b>		
N-[6-(5-amino-3-terc-butil-2-metoxifenil)naftaleno-2-il]metano sulfonamida			
<b>PDb1</b>	<b>PD</b>	<b>Reação</b>	
	Alcalino	Hidrólise	
	<b>Massa exata observada (<i>m/z</i>)</b>	<b>Massa exata teórica (<i>m/z</i>)</b>	<b>Erro de massa (ppm)</b>
	441,1727	441,1722	1,1333
	<b>Nomenclatura IUPAC</b>		
[3-terc-butil-5-(6-metano sulfonamidonaftaleno-2-il)-4-metoxifenil]uréia			
<b>PDb2</b>	<b>PD</b>	<b>Reação</b>	
	Alcalino	Hidrólise	

FONTE: O autor (2019).

Sugere-se que as reações que ocorreram tratam-se de hidrólise, reação característica desta condição de degradação. Os possíveis mecanismos de formação do PDb1 e PDb2 está mostrado nas Figuras 21 e 22.

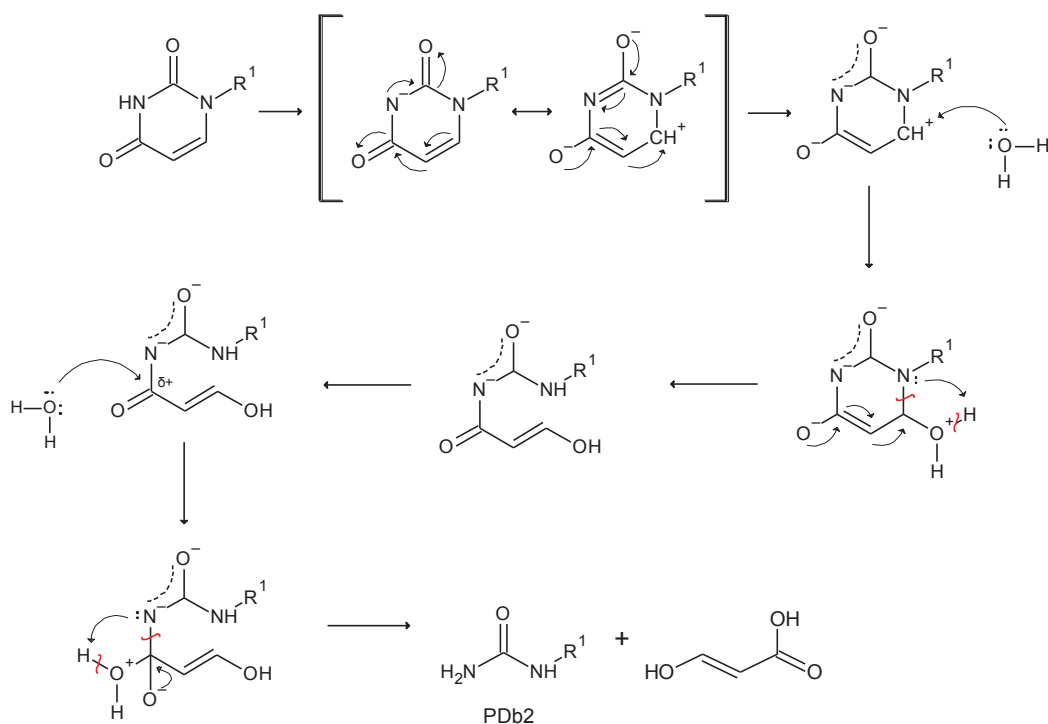
FIGURA 21 - MECANISMO DE REAÇÃO PROPOSTA PARA A FORMAÇÃO DO PDB1



FONTE: O autor (2019).

Ao final da reação foi possível gerar a estrutura do PDb1 em conjunto com o ácido [(2E)-3-hidroxi-prop-2-enoil] carbâmico ( $m/z = 130,0140$ ) que não foi detectado pelo espectrômetro de massas.

FIGURA 22 - MECANISMO DE REAÇÃO DO PDB2

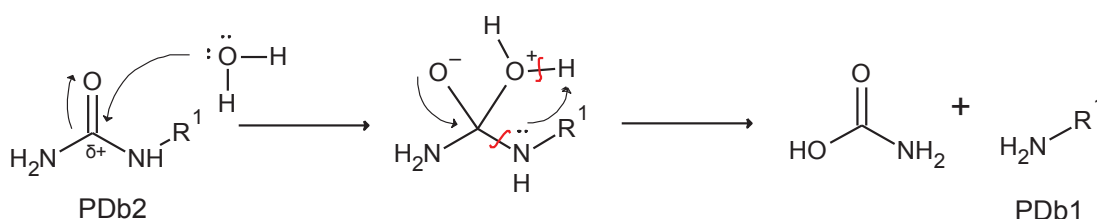


FONTE: O autor (2019).

Por mais que ocorram duas hidrólises para a geração do PDb1 e PDb2, o produto intermediário (a primeira abertura do anel por hidrólise,  $m/z = 510,1699$ ) não foi detectada em nenhuma das análises.

Ainda é possível propor que a partir do PDb2, é possível gerar o PDb1 através de hidrólise caso seja exposto mais tempo nessa condição. Esse mecanismo (Figura 23) justifica o fato do PDb2 ser consumido no decorrer do monitoramento, enquanto a área do PDb1 cresce continuamente.

FIGURA 23 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DO PDB1 A PARTIR DO PDB2

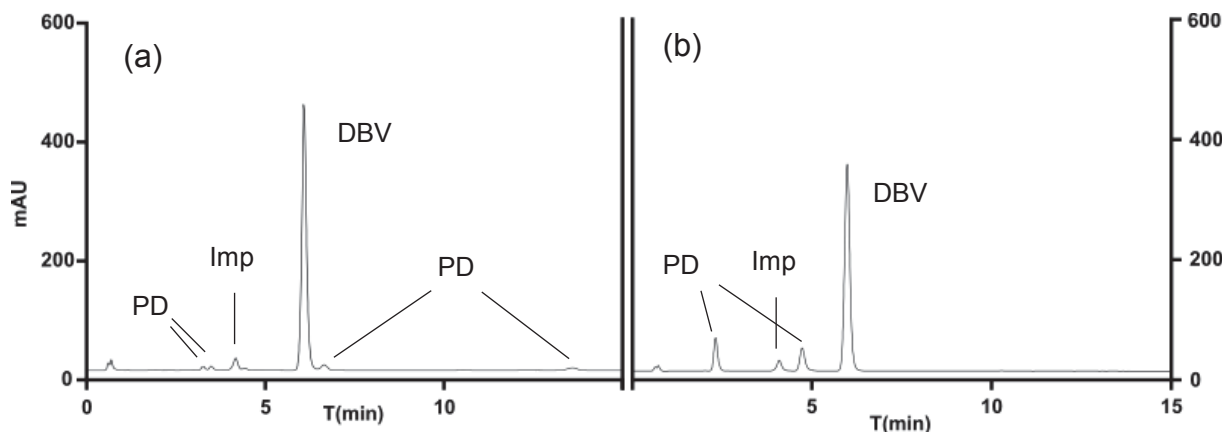


FONTE: O autor (2019).

#### 4.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR POR CLAE-DAD

Conhecidos os produtos de degradação forçada ácida e alcalina do DBV, o próximo passo foi testar se o método otimizado seria capaz de analisar a mistura dos mesmos com boa resolução e sem coeluição. Os cromatogramas das condições de degradação ácida e alcalina isolados estão mostrados na Figura 24.

FIGURA 24 - CROMATOGRAMAS DAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO ÁCIDA E ALCALINA DO DASÁBUVIR



FONTE: O autor (2019).

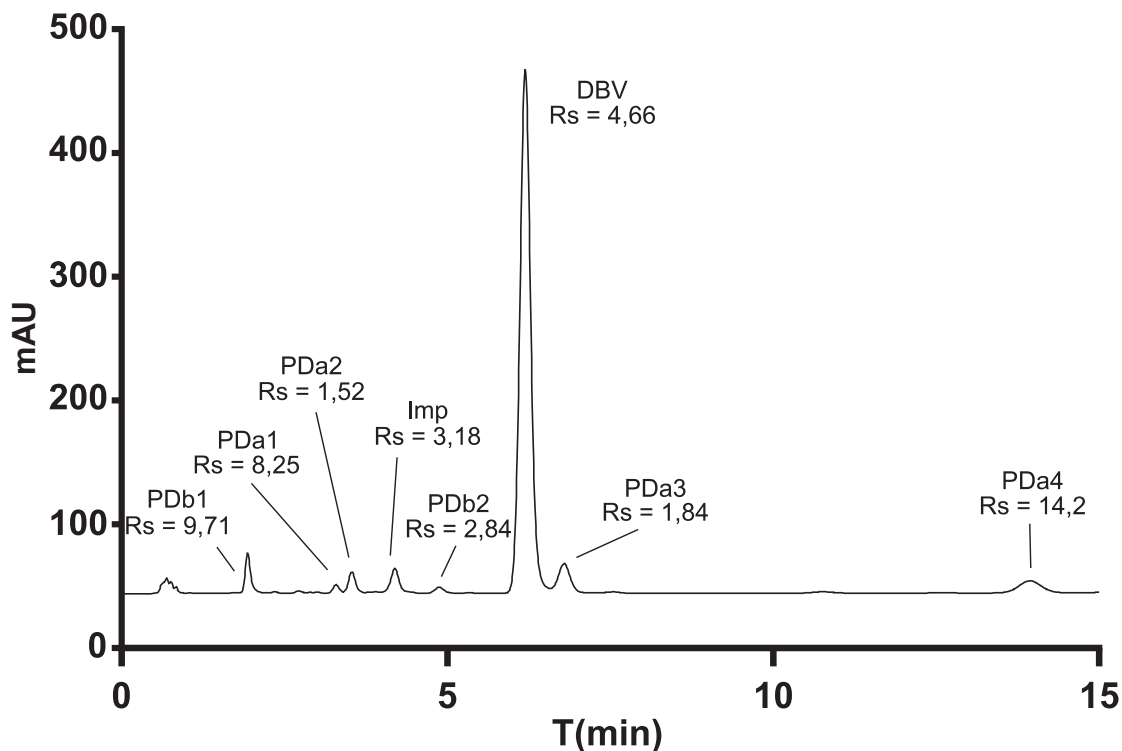
NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , temperatura da coluna de 25°C e comprimento de onda de detecção 244 nm. Cromatograma da solução de degradação ácida (a) e solução de degradação alcalina (b) relativa à 1 dia e 2 dias de degradação, respectivamente.

Nas soluções da degradação ácida e alcalina contendo os PD e o DBV, quando foram misturadas sem neutralização, ocorreu cristalização, interferindo na detecção dos analitos. Para a neutralização das amostras de degradação contendo os PD, foi então realizado a evaporação das amostras utilizando a centrivap com intuito de evaporar o ácido e a base contida na amostra. Após a confirmação da reprodutibilidade dos PD resultantes da degradação alcalina, o hidróxido de sódio foi substituído por hidróxido de amônio para a posterior evaporação, uma vez que o aquele não é volátil.

As soluções de degradação ácida e alcalina foram preparadas e degradadas na concentração do DBV de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A mistura das soluções em partes iguais após a degradação resultou na concentração de 89,49  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do DBV (área de 5755,3 mAu\*s) após o preparo de amostra. A mistura das soluções de degradação ácida e alcalina após a evaporação da amostra está mostrado na Figura 25.

O sinal do DBV em meio seus PD sofreu uma mudança no tempo de retenção de 5,99 para 6,4 minutos, assim como o PD<sub>b1</sub> (2,3 min para 1,9 min), porém mantendo a pureza de pico e a resolução acima dos valores preconizados (>99% e 1,5, respectivamente).

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA COM AS RESOLUÇÕES DA MISTURA DO DASABUVIR E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO



FONTE: O autor (2019).

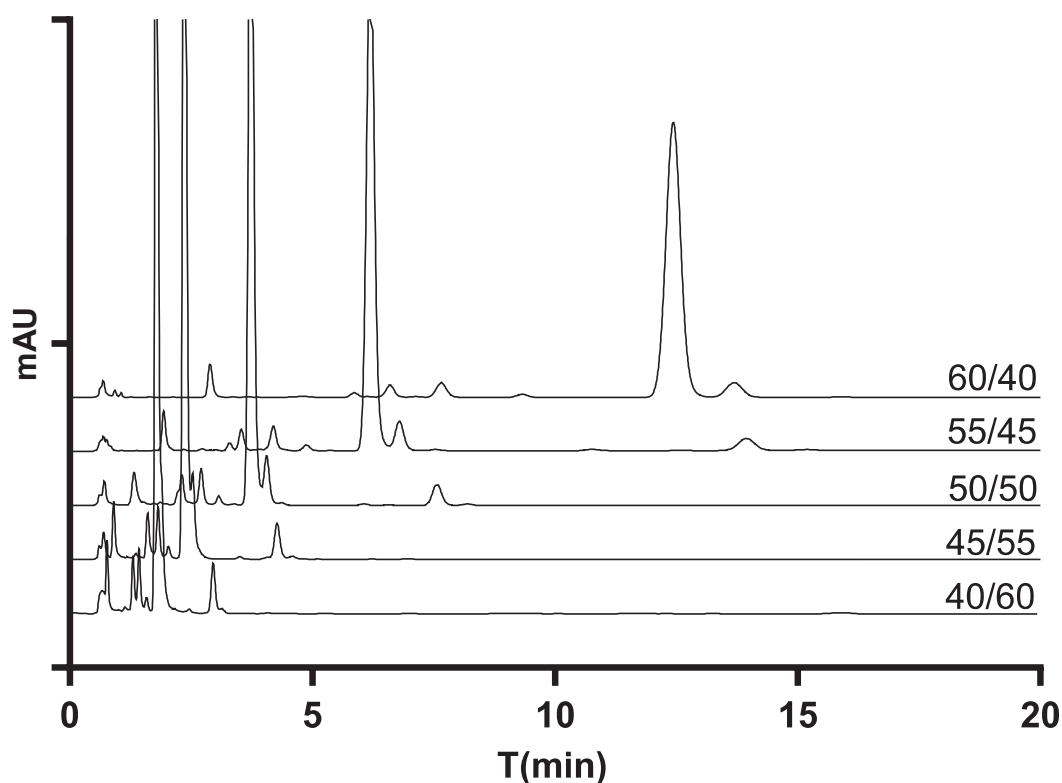
NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna de 25°C e comprimento de detecção de 244 nm.

LEGENDA: Rs – resolução.

Foi possível observar todos os seis PD produzidos durante os ensaios de degradação e com boa resolução. A partir deste método, os diferentes parâmetros cromatográficos (fluxo, temperatura, pH e proporção da fase móvel) foram testados a fim de se investigar um método mais adequado do que o proposto. Foram utilizados como critérios de seleção o tempo de corrida do método e as mudanças na resolução dos picos.

Com a mudança da proporção da fase móvel (Figura 26 e Tabela 4), as condições com fase orgânica superior à 50% geraram uma baixa resolução dos analitos, enquanto inferior à 40% faz com que o PDa4 fosse eluído com tempo de retenção superior aos 20 minutos, o que inviabilizaria o método.

FIGURA 26 – INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO DA FASE MÓVEL NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10  $\mu$ L, temperatura da coluna de 25°C e comprimento de onda de detecção 244 nm. Proporções demonstradas em A%/B%.

TABELA 4 – RESOLUÇÃO DE PICOS CROMATOGRÁFICOS COM A MUDANÇA DA FASE MÓVEL

	40/60	45/55	50/50	55/45*	60/40
<b>PDb1</b>	-	1,90	4,20	9,71	15,89
<b>PDa1</b>	3,82	6,21	5,80	8,25	13,05
<b>PDa2</b>	-	-	-	1,52	2,43
<b>Imp</b>	1,59	1,77	2,47	3,18	2,88
<b>PDb2</b>	1,22	1,80	2,19	2,84	3,91
<b>DBV</b>	1,50	2,62	3,71	4,66	6,03
<b>PDa3</b>	-	1,11	1,54	1,84	2,05
<b>PDa4</b>	8,53	9,22	11,96	14,2	-

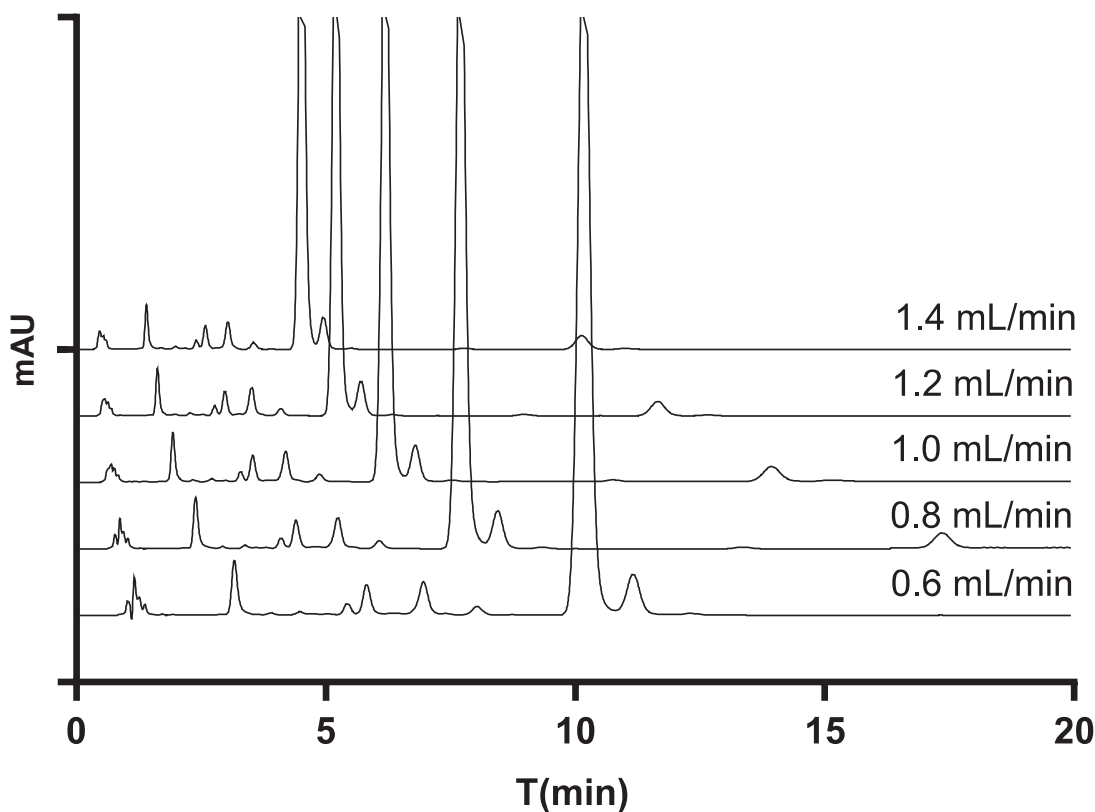
FONTE: O autor (2019).

NOTA: \* condição inicial

Nas diferentes condições de fluxo da fase móvel testadas (Figura 27 e Tabela 5), os fluxos 0,6 e 0,8 mL.min<sup>-1</sup> forneceram resoluções superiores ao da proposta de 1 mL.min<sup>-1</sup>, porém uma das resoluções (PDa2) foi inferior à 1,5. O aumento até 1 mL.min<sup>-1</sup> fez com que o perfil do PDa2 melhorasse, acima desse fluxo o mesmo

analito passa a ser coeluído, justificando a diminuição da resolução. Portanto, mantém-se a escolha de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

FIGURA 27 – INFLUÊNCIA DO FLUXO DA FASE MÓVEL NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna de 25°C e comprimento de detecção de 244 nm.

TABELA 5 – RESOLUÇÃO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS COM A MUDANÇA DO FLUXO DA FASE MÓVEL

	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	0,8 mL.min <sup>-1</sup>	1 mL.min <sup>-1</sup>	1,2 mL.min <sup>-1</sup>	1,4 mL.min <sup>-1</sup>
<b>PDb1</b>	11,44	9,99	9,71	9,16	8,20
<b>PDa1</b>	9,66	9,02	8,25	8,03	7,71
<b>PDa2</b>	1,32	1,36	1,52	1,24	1,22
<b>Imp</b>	3,59	3,24	3,18	2,80	2,73
<b>PDb2</b>	2,96	2,85	2,84	2,73	2,68
<b>DBV</b>	5,14	4,97	4,66	4,60	4,34
<b>PDa3</b>	2,03	1,94	1,84	1,78	1,72
<b>PDa4</b>	-	12,56	14,2	13,98	13,48

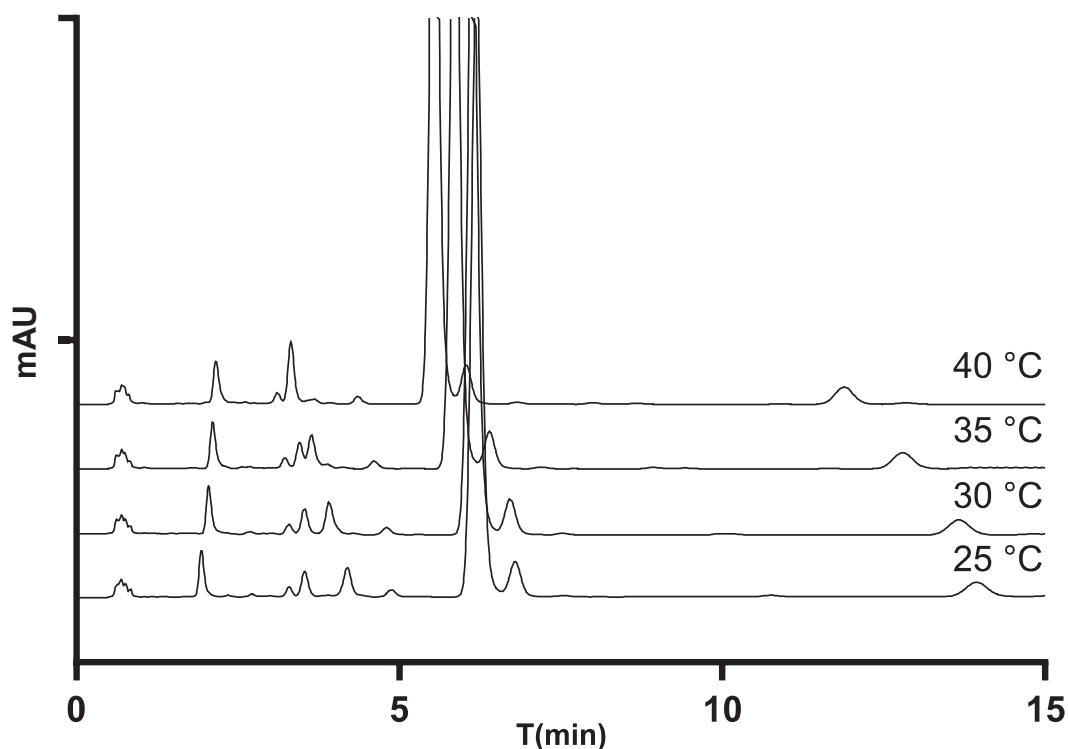
FONTE: O autor (2019).

NOTA: \*condição inicial.

Nos testes utilizando diferentes temperatura da coluna, verificou-se que houve um aumento discreto na resolução do DBV com o aumento da temperatura do método (Figura 28 e Tabela 6), porém ocorreu uma diminuição desse parâmetro para alguns

analitos, destacando-se a impureza. Como a mudança não é expressiva, preconiza-se continuar utilizando a temperatura de 25 °C.

FIGURA 28 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm); fase móvel AFO 0,1% pH 2,6:ACN 55:45, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de detecção 244 nm.

TABELA 6 – RESOLUÇÕES DO PICO COM AS MUDANÇAS DA TEMPERATURA

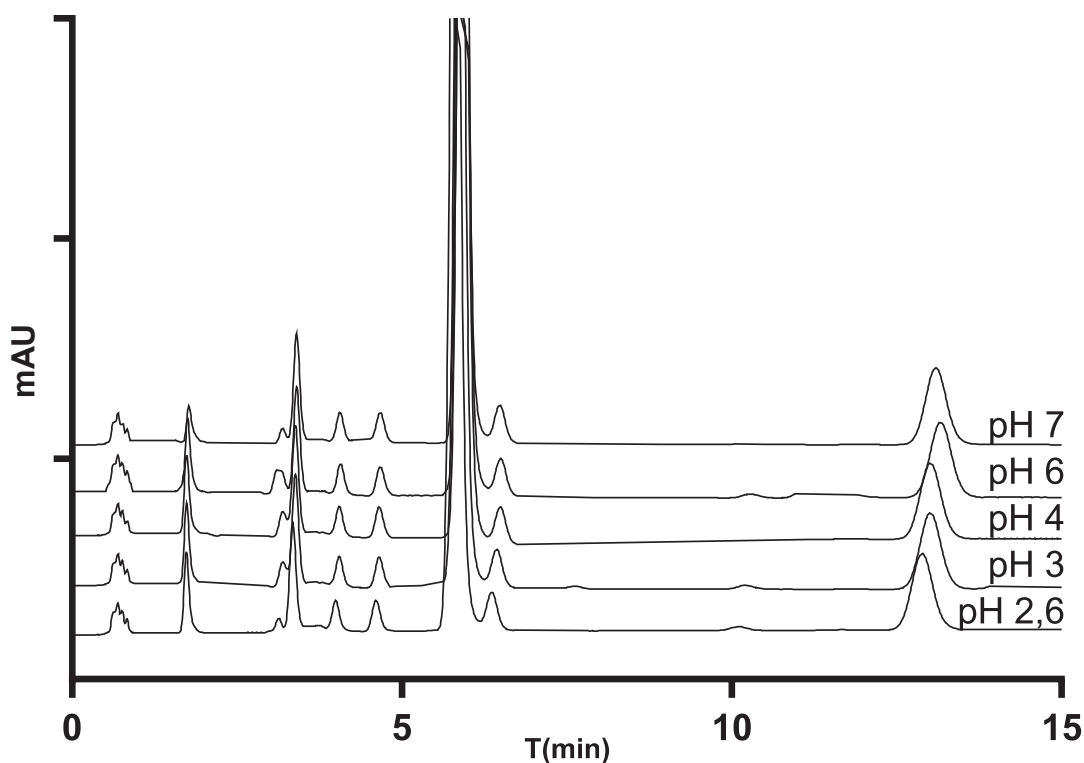
	25 °C*	30 °C	35 °C	40 °C
PDb1	9,71	10,77	10,77	10,59
PDa1	8,25	7,69	6,81	5,67
PDa2	1,52	1,34	1,27	1,19
Imp	3,18	1,85	0,92	-
PDb2	2,84	3,81	4,27	5,08
DBV	4,66	5,00	4,74	4,77
PDa3	1,84	1,62	1,76	1,72
PDa4	14,2	14,71	13,88	13,62

FONTE: O autor (2019).

NOTA: \*condição inicial.

Os resultados obtidos com os diferentes pH da fase aquosa (Figura 29 e Tabela 7), indicaram que não houve diferenças expressivas entre as diferentes condições, justificando o uso de 0,1% de AFO como aditivo.

FIGURA 29 – INFLUÊNCIA DO PH DA FASE MÓVEL NO CROMATOGRAMA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Coluna Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm); fase móvel H<sub>2</sub>O:ACN 55:45, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna de 25°C e comprimento de onda de detecção 244 nm.

TABELA 7 – RESOLUÇÃO DOS PICOS COM AS MUDANÇAS DE PH

	pH 2,6*	pH 3	pH 4	pH 6	pH 7
<b>PDb1</b>	9,71	9,59	9,86	9,72	9,58
<b>PDa1</b>	8,25	8,16	8,24	8,12	8,39
<b>PDa2</b>	1,52	0,92	1,23	1,18	1,17
<b>Imp</b>	3,18	3,31	3,47	3,43	3,36
<b>PDb2</b>	2,84	2,73	2,67	2,74	2,72
<b>DBV</b>	4,66	4,74	4,75	4,82	4,69
<b>PDa3</b>	1,84	1,85	1,86	1,88	1,84
<b>PDa4</b>	14,2	14,17	14,16	14,29	14,00

FONTE: O autor (2019).

NOTA: \*condição inicial.

Ao final dos ensaios de otimização pode-se verificar que o método desenvolvido foi capaz de alcançar uma resolução satisfatória dos sinais cromatográficos. As condições cromatográficas do método otimizado estão sumarizadas no Quadro 14.

QUADRO 14 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

<b>Fase estacionária</b>	Symmetry® C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm)
<b>Tipo de eluição</b>	Isocrática
<b>Fase Móvel</b>	55:45 (v/v)
<b>Fase aquosa</b>	AFO 0,1% (pH 2,6)
<b>Fase orgânica</b>	ACN
<b>Fluxo</b>	1 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Volume de injeção</b>	10 µL
<b>Comprimento de onda</b>	244 nm

FONTE: O autor (2019).

#### 4.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Após otimização do método de forma a permitir uma separação adequada do DBV e seus PD, o método foi validado de acordo com a RDC 166/17 da ANVISA. Foi verificada a adequação do sistema (system suitability) para a validação, e foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão, repetitividade, precisão intermediária e robustez.

##### 4.6.1. Adequação de sistema

A adequação de sistema do método desenvolvido foi avaliada utilizando a amostra contendo o DBV e seus PD. Os dados estão compilados no Tabela 8. O único parâmetro que possui critério de rejeição é a resolução (inferior 1,5).

TABELA 8 - PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DE SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Composto	Tr (min)	k'	T	Rs	Pratos teóricos
PDb1	2,0	1,92	1,28	9,71	2578
PDa1	3,4	3,96	1,06	8,25	5287
PDa2	3,6	4,25	1,22	1,52	5054
Imp	4,3	5,34	0,87	3,18	5882
PDb2	5,0	6,3	2,11	2,84	5678
DBV	6,4	8,34	1,07	4,66	6617
PDa3	7,0	9,21	1,02	1,84	6311
PDa4	14,4	20	1,33	14,2	7073

FONTE: O autor (2019).

NOTA: \*Os compostos estão dispostos de acordo com a ordem de eluição. Tempo morto da cromatografia = 0,685 min.

LEGENDA: Tr – Tempo de retenção; T – Fator caudal; Rs – Resolução.

#### 4.6.2. Seletividade

Em conjunto com os dados de resolução mostrados na Tabela 8, a avaliação da seletividade do método foi realizada com a aplicação da ferramenta do perfil de pureza de picos do software ChemStation®. As similaridades de espectro de absorção na extensão do pico cromatográfico dos compostos em conjunto com o número de aquisições estão dispostas no Quadro 15.

QUADRO 15 - PUREZA DE PICO DO DBV E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Comp.	Pureza (%)	Número de aquisições
<b>DBV</b>	99,97	64
<b>PDb1</b>	99,91	28
<b>PDa1</b>	-	-
<b>PDa2</b>	99,99	8
<b>PDb2</b>	99,96	37
<b>PDa3</b>	99,99	24
<b>PDa4</b>	99,92	83

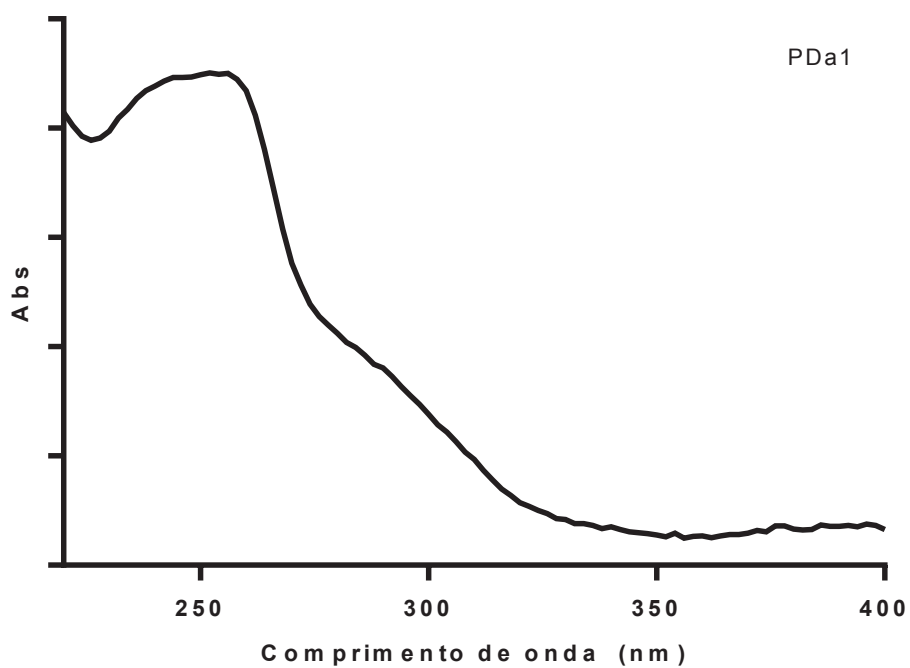
FONTE: O autor (2019).

Pelo fato do pico cromatográfico correspondente ao PDa1 não permitir a utilização da ferramenta de pureza de pico - por não possuir extensão e intensidade suficiente para a coleta da informação do espectro de absorção - o espectro do PDa1 será mostrado isoladamente na Figura 30.

A partir da ferramenta de pureza de pico, foi possível concluir que o método foi seletivo para os analitos supracitados com um limiar superior à 99%.

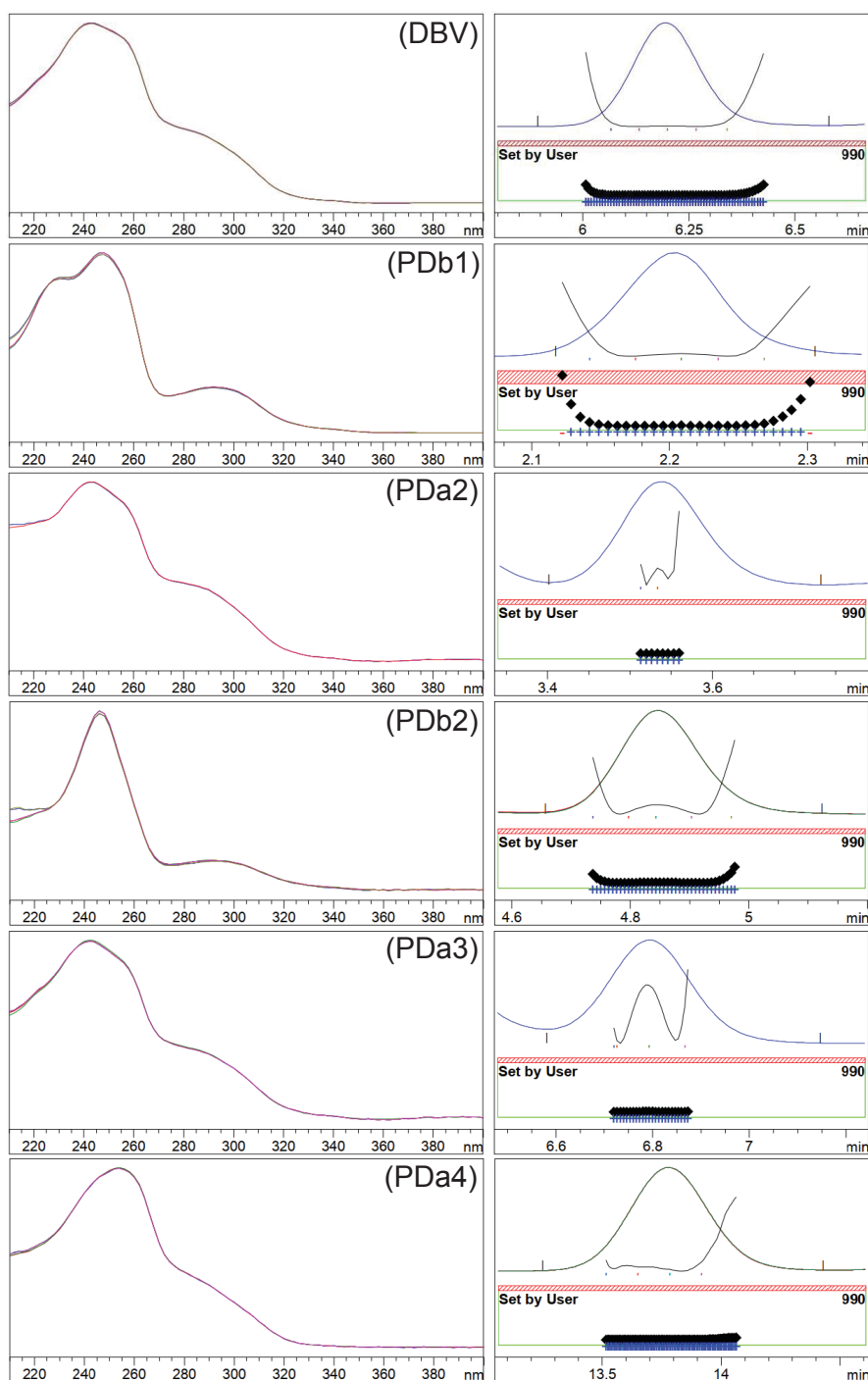
Como demonstrado na Figura 31, foi possível observar que cada um dos PD possui um espectro de absorção característico nas faixas de 200 a 400 nm, que difere do DBV e entre si. A única exceção é o PDa3 que compartilha de similaridade de espectro de absorção com o DBV, havendo a possibilidade de que a reação ocorrida não ter afetado o grupo cromóforo do DBV, o que implicaria na alteração do espectro de absorção.

FIGURA 30 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO PDa1



FONTE: O autor (2019).

FIGURA 31 - PUREZA DE PICO DO DASABUVIR E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO



FONTE: O autor (2019).

#### 4.6.3. Linearidade e faixa de trabalho

A curva de calibração do DBV foi realizada utilizando oito níveis de concentração (9,78 a 136,92  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em triplicatas. Os resultados das áreas obtidas estão dispostos na Tabela 9. Os dados foram analisados utilizando o Minitab® e o limiar de aceitabilidade para o teste de hipótese de 0,05 (p-valor).

TABELA 9 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DASABUVIR

Nível	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área A	Área B	Área C	Média	DPR
1	9,78	641,64	661,15	654,93	652,57	1,52
2	19,56	1279,67	1314,75	1196,54	1263,65	4,80
3	39,12	2541,14	2450,13	2500,56	2497,28	1,82
4	58,68	3766,35	3803,76	3734,70	3768,27	0,91
5	78,24	4999,86	5034,12	4995,14	5009,71	0,42
6	97,80	6342,79	6280,40	6258,14	6293,78	0,69
7	117,36	7554,39	7603,67	7519,66	7559,24	0,55
8	136,92	8779,92	8865,65	8785,45	8810,35	0,54

FONTE: O autor (2019).

Como pré-requisito para análise de regressão linear, foi necessário avaliar se os dados eram homocedásticos, que por definição é a variância semelhante em toda extensão da curva analítica. Ao realizar-se o Teste de Breusch Pagan foi obtido um p-valor (0,1323) maior que 0,05, rejeitando-se a hipótese alternativa (desigualdade das variâncias). Logo, temos um modelo homocedástico. A próxima avaliação realizada foi a análise residual (Tabela 10), onde foram plotados e testados quanto sua normalidade (teste de Ryan-Joiner), a interdependência dos resíduos (teste de Durbin-Watson) e verificação de outliers (demonstrados no gráfico de valores ajustado versus resíduos padronizados na Figura 33).

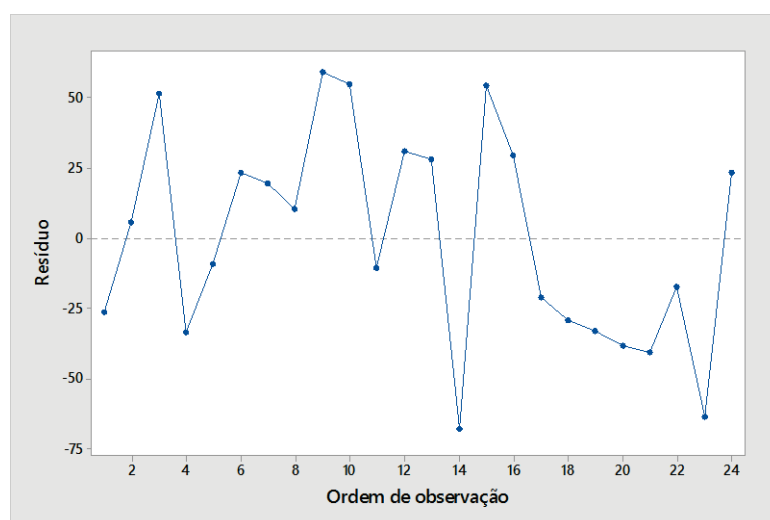
TABELA 10 - RESUMO DA ANÁLISE RESIDUAL

Ordem	Concentração	Resíduos	Resíduos Padronizados
1	136,92	-26,5089	-0,68561
2	136,92	59,2211	1,53168
3	136,92	-20,9789	-0,54258
4	117,36	5,65546	0,14628
5	117,36	54,9355	1,42082
6	117,36	-29,0745	-0,75196
7	97,8	51,7498	1,33844
8	97,8	-10,6402	-0,27519
9	97,8	-32,9002	-0,85091
10	78,24	-33,4859	-0,86606
11	78,24	30,7741	0,79593
12	78,24	-38,2059	-0,98813
13	58,68	-9,30152	-0,24057
14	58,68	28,1085	0,72698
15	58,68	-40,9515	-1,05915
16	39,12	23,1828	0,59958
17	39,12	-67,8272	-1,75425
18	39,12	-17,3972	-0,44995
19	19,56	19,4072	0,50194
20	19,56	54,4872	1,40923
21	19,56	-63,7228	-1,64809
22	9,78	10,2243	0,26444
23	9,78	29,7343	0,76903
24	9,78	23,5143	0,60816

FONTE: O autor (2019).

Através da análise visual (Figura 32), é possível indicar que os resíduos não demonstram uma dependência ou uma tendência baseada na sequência no qual as análises foram conduzidas. Por se tratar de uma afirmação subjetiva, a confirmação da interdependência dos resíduos pode ser demonstrada através da estatística de Durbin-Watson para detecção de autocorrelação residual em conjunto com a plotagem residual de quantil-quantil (Tabela 11 e Figura 33).

FIGURA 32 - RESÍDUO VERSUS NÚMERO DA OBSERVAÇÃO



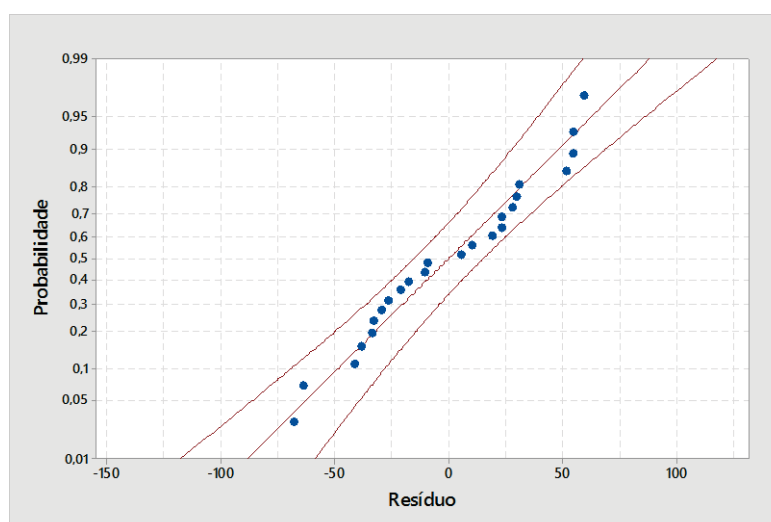
FONTE: O autor (2019).

TABELA 11 - ESTATÍSTICA DOS RESÍDUOS

Teste	Estatística	p-valor
Durbin-Watson	1,775	-
Ryan-Joiner	0,983	>0,100

FONTE: O autor (2019).

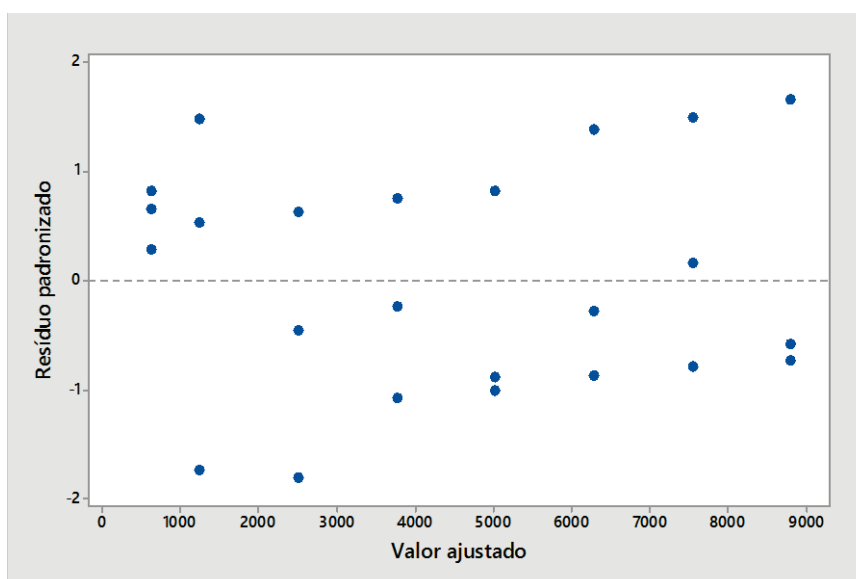
FIGURA 33 - QUANTIL-QUANTIL (Q-Q) PLOT RESIDUAL



O escore Durbin-Watson pode admitir valores entre 0 e 4. Os escores entre 1,5 e 2,5 significam que não há autocorrelação dos resíduos. Valores de escores entre 0 e 1,5 indicam uma autocorrelação positiva, enquanto entre 2,5 e 4 indicam autocorrelação negativa. Como mostrado na Tabela 11 a estatística de Durbin-Watson está dentro do intervalo que indica não haver autocorrelação entre os valores observados.

Como o p-valor ( $>0,1$ ) para o teste de Ryan-Joiner é maior que 0,05, rejeita-se a hipótese alternativa (distribuição não normal). Portanto os resíduos possuem um comportamento de distribuição normal. Após provar normalidade dos resíduos, os seus valores padronizados (Tabela 10) serão plotados em relação aos valores da regressão ajustados (Figura 34). Os dados padronizados que não estejam dentro do intervalo de -3 e 3 podem indicar a presença de outliers. Na análise em questão, nenhum dos pontos (resíduos padronizados), ficou fora deste intervalo, não apresentando outliers.

FIGURA 34 - RESÍDUO PADRONIZADO VERSUS VALOR DA REGRESSÃO AJUSTADO



FONTE: O autor (2019).

Ao atingir os pré-requisitos testados acima, foi possível gerar as informações da regressão linear (Tabela 12), sendo testados o coeficiente angular (t de Student), linear (t de Student), correlação de Pearson ( $R^2$ ) e variância (ANOVA).

TABELA 12 - REGRESSÃO LINEAR DO DASABUVIR

	<b>Valor</b>	<b>DP</b>	<b>t-valor</b>	<b>p-valor</b>
Coeficiente linear	1,72	14,79	0,17	0,866
Coeficiente angular	64,299	0,1806	350,58	0,000
R	0,9998	-	-	-
R <sup>2</sup>	0,9998	-	-	-

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: R – coeficiente de correlação; R<sup>2</sup> – coeficiente de correlação de Pearson

Com o teste do intercepto o p-valor (0,866), rejeita-se a hipótese alternativa (coeficiente linear diferente de zero). A partir do p-valor para o teste do coeficiente angular (0), rejeita-se a hipótese nula (coeficiente angular igual ao zero), provando que o coeficiente angular foi diferente de zero e o intercepto foi igual à zero.

A partir do coeficiente de correlação (R = 0,9998) foi possível afirmar que as variáveis testadas se relacionam proporcionalmente, enquanto o coeficiente de correlação de Pearson (R<sup>2</sup> = 0,9998), maior que 0,99, foi possível concluir que o modelo proposto consegue explicar com confiabilidade os dados.

De acordo com a análise de variância (Tabela 13) o p-valor (0) da regressão foi menor que 0,05 para o teste F, rejeita-se a hipótese nula (rejeita-se significância de modelo linear), portanto foi possível concluir que se trata de um modelo linear (Figura 35).

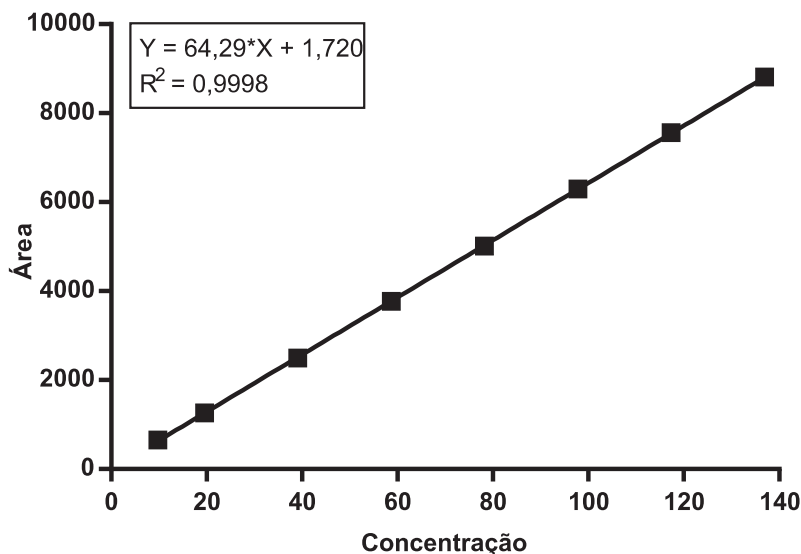
TABELA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA REGRESSÃO DO DASABUVIR

	<b>gl</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>Teste F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Regressão</b>	1	183735381	183735381	122904,21	0,000
<b>Resíduo</b>	22	32889	1495	0,35	0,902
<b>Total</b>	23	183768270	-	-	-

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: gl – grau de liberdade; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática

FIGURA 35 – GRÁFICO DA REGRESSÃO LINEAR DO DASABUVIR



FONTE: O autor (2019).

#### 4.6.4. Exatidão

A exatidão foi determinada analisando a concordância em triplicatas da concentração do nível alto, médio e baixo do intervalo da curva de calibração. Os resultados com a exatidão e os DPR estão dispostos na Tabela 14.

TABELA 14 - EXATIDÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR

Nível	Conc. ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )*	Área teórica	Área Observada	DPR (%)	Rec. (%)
<b>Alta</b>	139,52 $\pm$ 1,77	8971,46 $\pm$ 115,77	8896,69 $\pm$ 102,98	1,15	99,16
<b>Média</b>	101,77 $\pm$ 1,36	6544,98 $\pm$ 89,46	6601,81 $\pm$ 80,35	1,21	100,86
<b>Baixa</b>	12,44 $\pm$ 0,24	801,48 $\pm$ 17,22	796,36 $\pm$ 15,69	1,97	99,36

FONTE: O autor (2019).

NOTA: Informações dispostas em forma de média e desvio padrão; \*Concentração ajustada de acordo com a massa pesada

Foi possível verificar que o método proposto é capaz de recuperar o DBV com uma acurácia superior à 98% e com DPR inferior 2%. O método se mostrou exato dentro do intervalo da curva de calibração.

#### 4.6.5. Precisão

A precisão (repetitividade) do método foi realizada utilizando a determinação de seis réplicas da concentração do ponto central (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e avaliando o DPR e

teste t de Student para a comparação da precisão intermediária entre analista e em dias diferentes (Tabela 15).

TABELA 15 - REPETITIVIDADE DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR

Réplica	Pesagem (mg)	Teor observado (mg)	Concordância (%)	DPR (%)
1	0,96	0,9327	97,16	
2	1,05	1,0522	100,21	
3	1,09	1,0676	97,95	
4	0,98	0,9696	98,94	1,29
5	1,05	1,0158	96,75	
6	0,96	0,9370	97,61	

FONTE: O autor (2019).

NOTA: para a concordância com a área teórica, a pureza de 97,8% foi ajustada na pesagem.

Foi possível verificar que o desvio padrão relativo (1,29 %) está dentro do intervalo permitido (2%), logo o método foi considerado preciso.

Analistas e dias diferentes foram avaliados na precisão intermediária (Tabela 16). Considerando o p-valor (0,6522) do teste F para a comparação das variâncias, rejeita-se a hipótese alternativa (variâncias diferentes), logo variâncias semelhantes entre os dados, atendendo o pré-requisito para a análise de semelhança dos analistas através do teste t de Student. A partir do p-valor (0,6944) do teste t de Student, rejeita-se a hipótese alternativa (os dois grupos são diferentes), concluindo que a precisão intermediária entre os analistas foi semelhante.

TABELA 16 - PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DO DASABUVIR

Rép.	Pesagem analista 1 (mg)	Concordância (%)	Pesagem analista 2 (mg)	Concordância (%)	p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
1	0,96	97,16	1,02	99,01		
2	1,05	100,21	1,10	99,62		
3	1,09	97,95	0,98	96,08	0,6522	0,6944
4	0,98	98,94	0,98	103,51		
5	1,05	96,75	1,05	97,24		
6	0,96	97,61	1,00	100,21		

FONTE: O autor (2019).

NOTA: <sup>1</sup> – Teste F para comparação da variância; <sup>2</sup> – Teste t de Student para a comparação dos dois grupos

#### 4.6.6. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir dos parâmetros da curva (Tabela 17), onde levou-se em conta o desvio padrão do

intercepto das curvas e coeficiente angular obtidos da regressão linear. Para o LD o valor encontrado foi de  $0,8102 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e para o LQ  $2,4554 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

TABELA 17 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DASABUVIR

	A	B	C	Curva	DP
<b>IC</b>	64,12	65,54	64,21	<b>64,47</b>	0,52
<b>Intercepto</b>	19,61	4,42	-18,87		<b>15,83</b>

FONTE: O autor (2019).

LEGEndA: IC – inclinação da curva, DP – desvio padrão.

$$LD = \frac{3,3 \cdot DP_{(intercep.)}}{IC} = \frac{3,3 \cdot 15,83}{64,47} = \mathbf{0,8102 \mu\text{g.mL}^{-1}}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot DP_{(intercep.)}}{IC} = \frac{10 \cdot 15,83}{64,47} = \mathbf{2,4554 \mu\text{g.mL}^{-1}}$$

Considerando os valores de LD e LQ, foi possível afirmar que o método foi bastante sensível, indicando que a partir da técnica de absorção por DAD, é possível de detectar e quantificar quantidades pequenas do DBV.

#### 4.6.7. Robustez

A robustez foi determinada utilizando um planejamento multifatorial com intuito de diminuir o número de análises e avaliar os efeitos individuais e sinérgicos de cada parâmetro testado. As variáveis respostas monitoradas foram o tempo de retenção, o teor, a resolução 1 (DBV em relação ao pico anterior) e a resolução 2 (pico posterior em relação ao DBV). A análise multifatorial foi realizada utilizando Minitab®. A réplica número 7 foi considerada a base para as outras réplicas, uma vez que as condições aplicadas foram as mesmas do método proposto (Tabela 18).

TABELA 18 - PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL PARA A ROBUSTEZ DO DBV

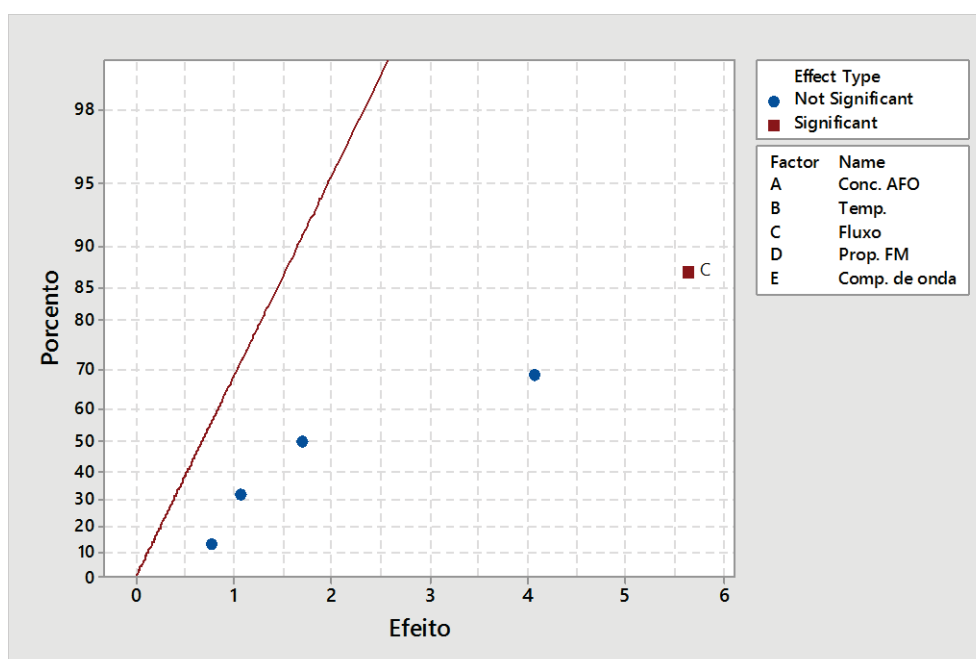
Rép.	Conc. AFO (%)	Temp. (°C)	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	Prop. ACN (%)	Comp. de onda (nm)	Tr (min)	Teor (%)	Rs. 1	Rs. 2
1	0,1	30	1,1	44	246	6,087	90,28	4,103	1,795
2	0,08	25	1,1	44	244	6,387	91,16	4,490	1,870
3	0,08	30	1	45	246	6,512	99,42	3,914	2,296
4	0,08	30	1,1	45	244	5,357	91,06	4,176	1,750
5	0,1	30	1	44	244	6,659	99,80	4,177	1,836
6	0,1	25	1,1	45	246	5,737	90,15	4,505	1,818
7	0,1	25	1	45	244	6,379	100	4,605	1,864
8	0,08	25	1	44	246	7,016	99,47	4,523	1,889

FONTE: O autor (2019).

A interpretação da plotagem de meia-normal se dá através do desvio dos pontos em relação à reta plotada. A análise visual somente é útil quando analisando parâmetros expressivos, porém pode levar à má interpretação quanto às variáveis discretas. Tal obstáculo é resolvido utilizando uma transformação matemática com o pseudo-erro padrão de Lenth como limite de aceitabilidade do desvio. O diagrama de Pareto transfere as informações da plotagem de meia-normal e organiza as variáveis de acordo com sua ordem de influência para o parâmetro, sendo o mesmo limite de aceitabilidade utilizado neste plotagem (linha vertical tracejada).

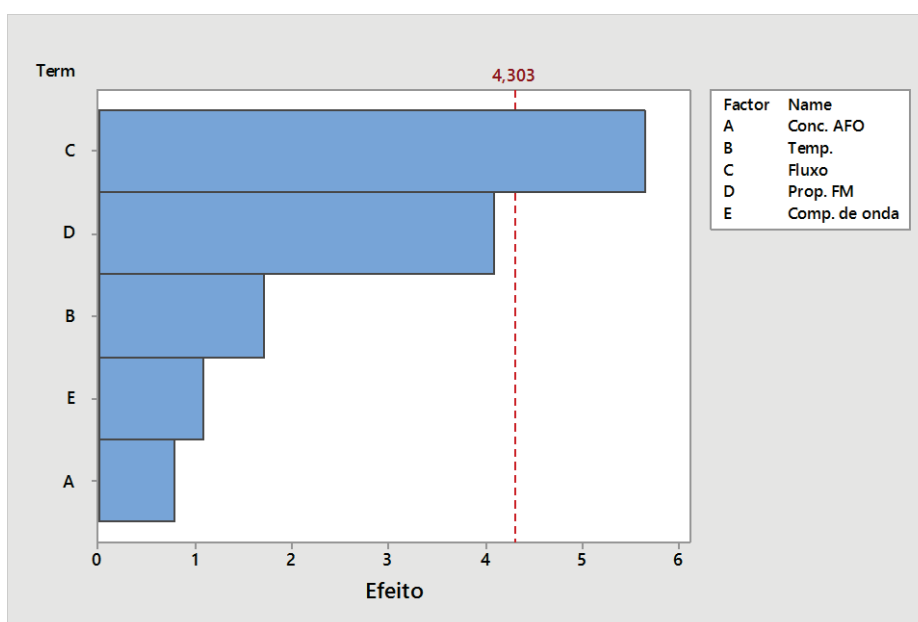
Para os testes de robustez visando alterações ocorridas no tempo de retenção (Figura 36 e Figura 37), foi verificado que apenas o fluxo foi significativo para variação no tempo de retenção.

FIGURA 36 - PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DO TEMPO DE RETENÇÃO



FONTE: O autor (2019).

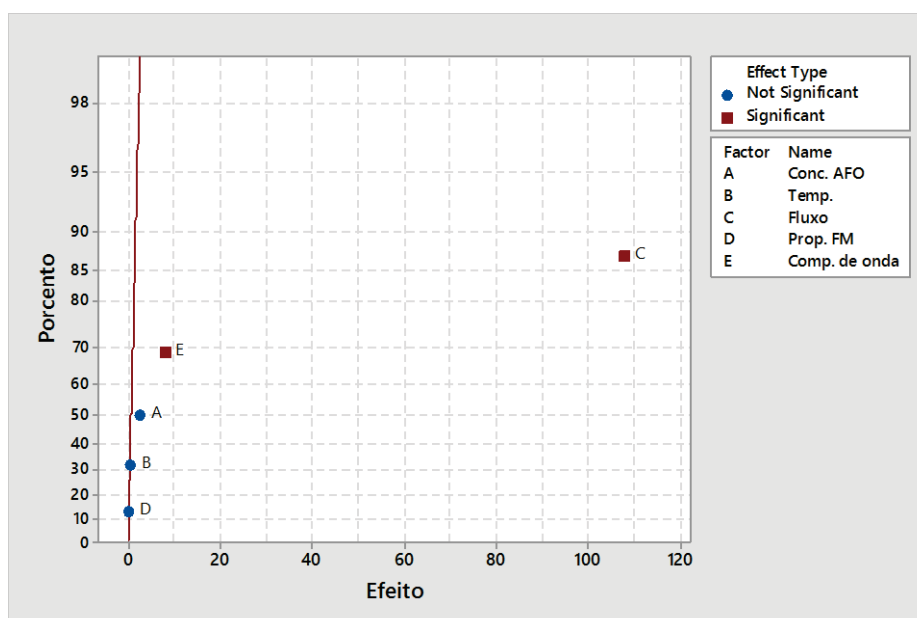
FIGURA 37 - DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DO TEMPO DE RETENÇÃO



FONTE: O autor (2019).

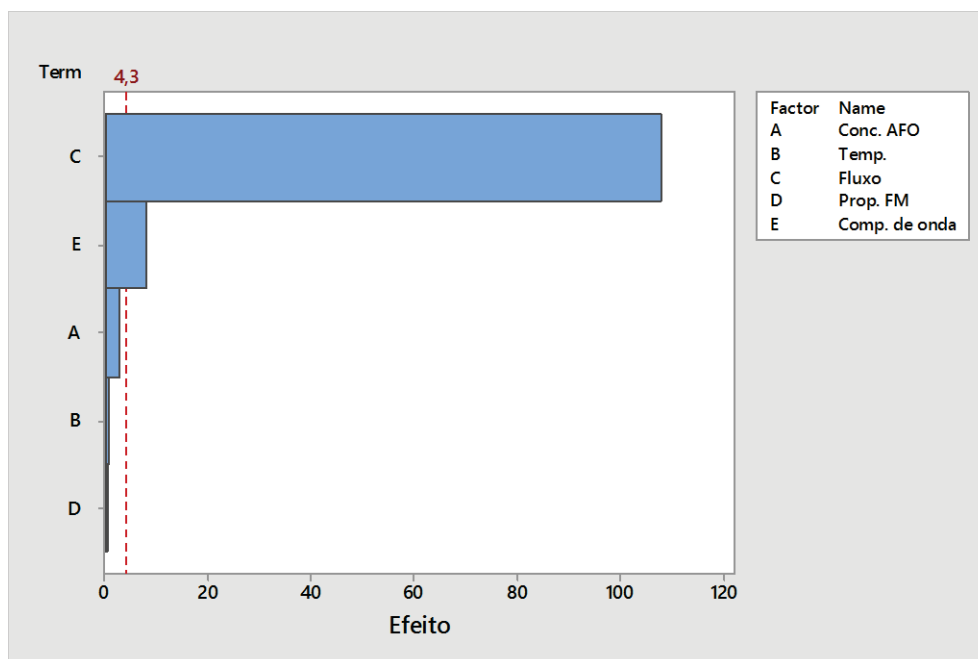
Para os experimentos avaliando as mudanças ocorridas no teor do DBV (Figura 38 e Figura 39), foram detectados que os parâmetros comprimento de onda e fluxo foram significantes para sua variação.

FIGURA 38 - PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DO TEOR



FONTE: O autor (2019).

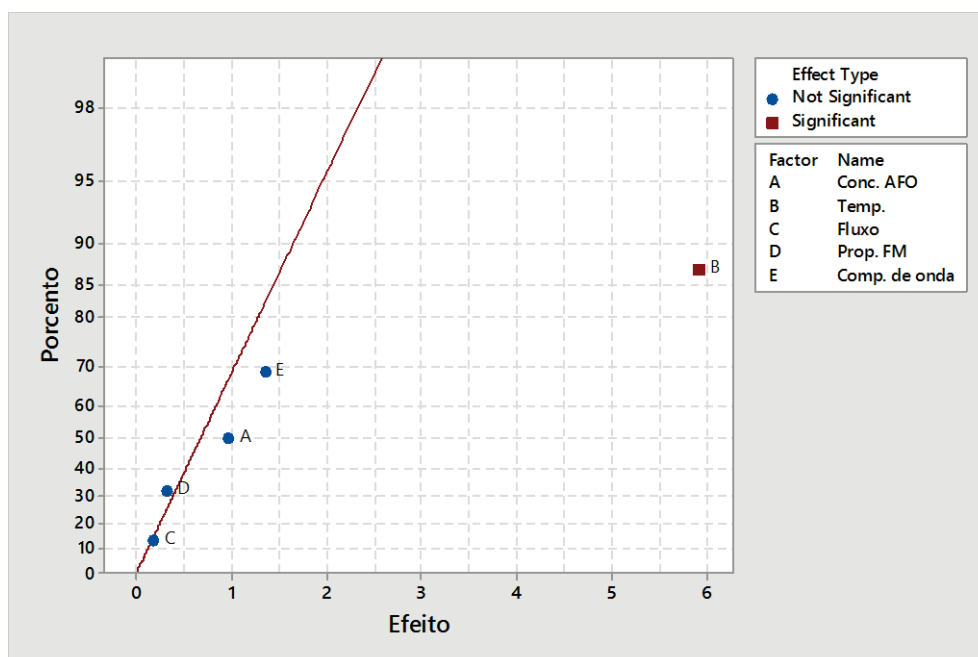
FIGURA 39 - DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DO TEOR



FONTE: O autor (2019).

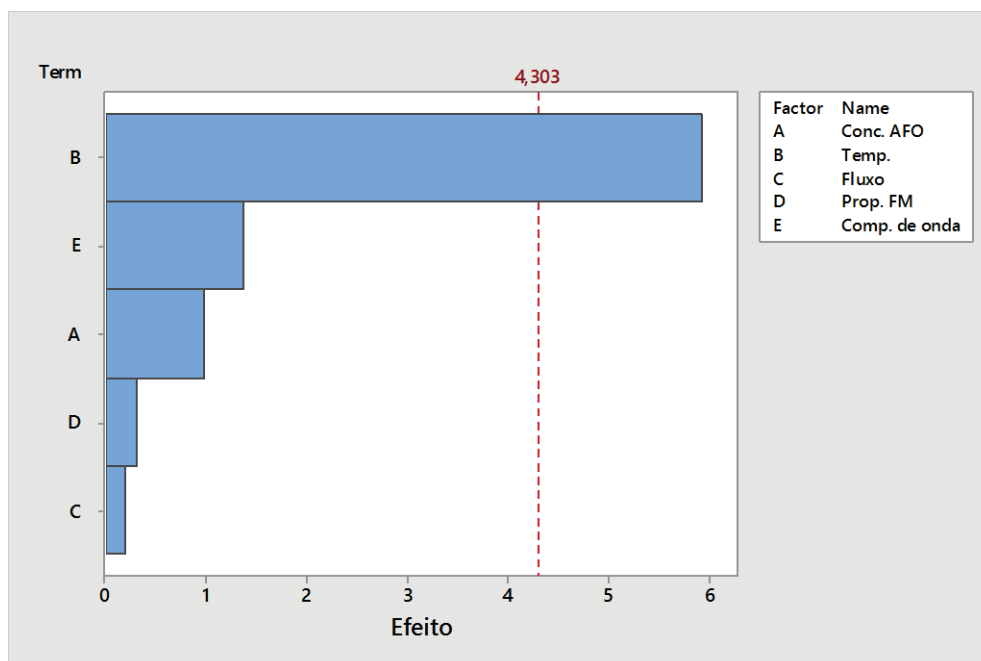
Foi possível verificar durante o processo de otimização do método, que a resolução do DBV e o pico anterior diminui à medida que a temperatura aumenta, sendo essa mudança considerada significativa quanto ao teste de robustez aplicado, justificando o resultado da robustez para a resolução 1 (Figura 40 e Figura 41).

FIGURA 40 - PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 1



FONTE: O autor (2019).

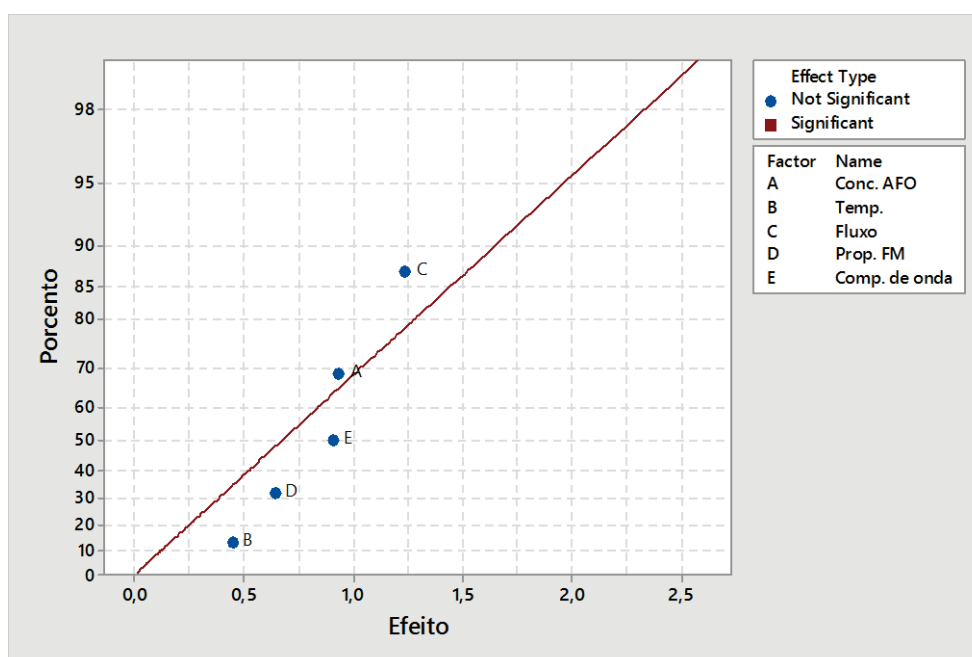
FIGURA 41 - DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 1



FONTE: O autor (2019).

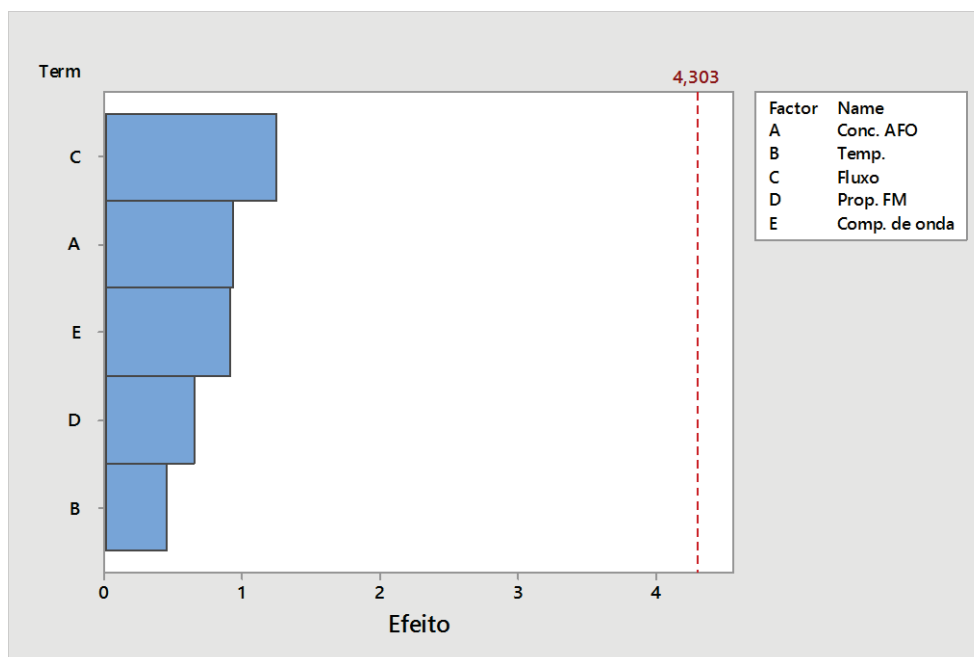
Quando observado a resolução entre o pico posterior em relação ao DBV, não houve mudanças significativas quanto a resolução ao realizar-se as alterações cromatográficas propostas (Figura 42 e Figura 43).

FIGURA 42 - PLOTAGEM DE MEIA-NORMAL PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 2



FONTE: O autor (2019).

FIGURA 43 - DIAGRAMA DE PARETO PARA ROBUSTEZ DA RESOLUÇÃO 2



FONTE: O autor (2019).

É importante ressaltar que a robustez não é um critério reprobatório e trata-se de um parâmetro instrutivo de quais parâmetros cromatográficos precisam ser respeitados para que haja confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

QUADRO 16 - SUMÁRIO DA ROBUSTEZ

Variável resposta	Robustez	Parâmetro
Tempo de retenção	Não	Fluxo
Teor	Não	Fluxo e comprimento de onda
Resolução 1	Não	Temperatura
Resolução 2	Sim	-

FONTE: O autor (2019).

## 5. CONCLUSÕES

Durante os ensaios de degradação forçada, o dasabuvir se mostrou sensível às reações hidrolíticas, tanto ácida quanto alcalina, e mostrou-se resistente às condições termiais, oxidativas e fotolíticas testadas. Das condições de degradação ácida e alcalina foram detectados seis produtos de degradação (PDa1, PDa2, PDa3, PDa4 e PDb1, PDb2).

O método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado para o teor do dasabuvir em presença de seus produtos de degradação e impureza mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato, isento de efeito matriz, dentro das condições metodológicas preconizadas neste trabalho.

Ao realizar-se a investigação dos produtos de degradação, foi possível propor estruturas para os produtos de degradação advindos da degradação alcalina (PDb1, PDb2) e também propor os possíveis mecanismos de reação que explicaria a sua formação, até então não relatada na literatura: [3-terc-butil-5-(6-metanosulfonamidonaftaleno-2-il)-4-metoxifenil]uréia e N-[6-(5-amino-3-terc-butil-2-metoxifenil)naftaleno-2-il]metano sulfonamida.

Com a inclusão em 2018 do dasabuvir (em forma de Viekira Pak®) na RENAME e PCDT como tratamento para hepatite C do genótipo 1, fez-se necessário o desenvolvimento de um método para o controle de qualidade da matéria-prima. Tal método é importante para a determinação do teor do princípio ativo e a detecção de produtos de degradação originados da instabilidade do IFA. Com o método proposto, além da quantificação do fármaco, a informação acerca do perfil de degradação pode ser útil para o controle de qualidade do medicamento, para o controle de processo de produção e auxiliar em outros estudos de estabilidade, tanto do IFA quanto para o medicamento contendo o dasabuvir.

As perspectivas futuras deste trabalho envolvem a investigação dos produtos de degradação ainda não identificados e o desenvolvimento de um método rápido por infravermelho (reflectância atenuada) para a detecção e quantificação desses produtos na formulação através da quimiometria.

## REFERÊNCIAS

AASLD. Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. **American Association for the Study of Liver Diseases**, p. 1–51, 2016.

ABBVIE. Viekira XR™ (dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir and ritonavir) extended-release tablets for oral use. **ABBVIE** North Chicago, IL. Disponível em: <[http://www.rxabbvie.com/pdf/viekiraxr\\_pi.pdf](http://www.rxabbvie.com/pdf/viekiraxr_pi.pdf)>. Acesso em: 11 dez. 2017.

ABBVIE. Bula Viekira Pak. **ABBVIE**, 2015.

AL-ZOMAN, N. Z.; MAHER, H. M.; AL-SUBAIE, A. Simultaneous determination of newly developed antiviral agents in pharmaceutical formulations by HPLC-DAD. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2017.

AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. **Associação Oficial de Químicos Analistas**, p. 1–38, 2002.

ARIAUDO, A. et al. A UHPLC-MS/MS method for the quantification of direct antiviral agents simeprevir, daclatasvir, ledipasvir, sofosbuvir/GS-331007, dasabuvir, ombitasvir and paritaprevir, together with ritonavir, in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 369–375, 2016.

BARTENSCHLAGER, R.; COSSET, F.-L.; LOHMANN, V. Hepatitis C virus replication cycle. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 583–585, 2010.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BRASIL. RESOLUÇÃO - RE N° 1, DE 29 DE JULHO DE 2005. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. v. 2005, 2005.

BRASIL. Resolução - RDC N° 45 , de 9 de agosto de 2012. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 1–8, 2012.

BRASIL. RDC 53, 4 de dezembro de 2015. **Agência Nacional de Vigilância**

**Sanitária**, p. 1–5, 2015a.

BRASIL. Guia N° 4/2015 - Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 1–22, 2015b.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretriz de Tratamento para Hepatite C. **Ministério da Saúde**, 2015c.

BRASIL. Pactuação da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME. **Ministério da Saúde**, 2017a.

BRASIL. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017,. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017b.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. 2018.

COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas - São Paulo: Da U, 2006.

EASL, (EUROPEAN ASSOCIATION OF STUDY OF THE LIVER). Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. **European Association of Study of the Liver**, v. 63, p. 199–236, 2014.

EMA. Stability testing of existing active substances and related finished products. CPMP, (Committee for proprietary medicinal products), **European Medicines Agency** n. June 2003, p. 1–18, 2004.

EMA. EMEA/H/C/003837 **European Medicines Agency**. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003837/human\\_med\\_001833.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003837/human_med_001833.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)>. Acesso em: 11 dez. 2017.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**, 2014.

FDA. INDs for Phase 2 and Phase 3 studies. Chemistry, manufacturing, and controls information. Guidance for Industry, **Food and Drug Administration**. n. May, p. 24pp,

2003.

FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry, **Food and Drug Administration**. n. July, p. 1–15, 2015.

FDA. Guidance for industry on Validation of Chromatographic Methods and USP General. (621) CHROMATOGRAPHY 40–NF 35. **Food and Drug Administration** 2017.

FERREIRA, V. L. et al. Safety of interferon-free therapies for chronic hepatitis C: a network meta-analysis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 41, n. 5, p. 478–485, 2016.

FERREIRA, V. L. et al. Efficacy of Interferon-Free Therapies for Chronic Hepatitis C: A Systematic Review of All Randomized Clinical Trials. **Clinical Drug Investigation**, 2017.

GAO, M. et al. Combination of Hepatitis C Virus Inhibitors. . **Bristol-Myers Squibb Company US 2012/0196794 A1**, 2011.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45–S57, 2014.

HUBER, L. Validation of analytical methods. **Agilent Technologies Germany**, v. 2, 2010.

ICH. Q1B - Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. **International Conference on Harmonization**, n. November, 1996.

ICH. Q1A (R2) - Stability Testing of New Drug Substances and Products. **International Conference on Harmonization**, n. February, p. 24, 2003.

ICH. Q2 (R1) - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

ICH. Q3B (R2) - Impurities in New Drug Products. **International Conference on Harmonization**, n. June, p. 12, 2006a.

ICH. Q3a (R2) - Impurities in New Drug Substances. **International Conference on Harmonization**, n. October 2006, p. 15, 2006b.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2016.

IUPAC. Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis (technical report). **União Internacional de Química Pura e Aplicada**, p. 1–34, 2000.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. **União Internacional de Química Pura e Aplicada** Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997), 2012. v. 2

JACOBSON, I. M. et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v. 364, n. 25, p. 2405–16, 2011.

JAIN, D.; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11–35, 2013.

JANZEN, H.; SELENT-STIER, C.; MUAZZAM, U. Forced degradation studies – comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015. Dissertação. **Faculdade de Matemática e Ciências Naturais da Rheinische Friedrich-Wilhelms**, 2016.

LAW, V. et al. DrugBank 4.0: Shedding new light on drug metabolism. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 1091–1097, 2014.

LOHMANN, V. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. **Science**, v. 285, n. 5424, p. 110–113, 1999.

MANNS, M. P. et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17006, 2017.

MANTRY, P. S.; PATHAK, L. Dasabuvir (ABT333) for the treatment of chronic HCV genotype I: a new face of cure, an expert review. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7210, n. November 2015, p. 1–9, 2015.

MIRCO, J.; ROCHA, M. S. DA. Estudo de Estabilidade de Medicamentos. **Revista**

**acadêmica Oswaldo Cruz**, n. 1, p. 1–12, 2015.

OCQUE, A. J. et al. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of Direct Acting Antiviral drugs in human liver fine needle aspirates. **Journal of Chromatography B**, v. 1052, p. 103–109, 2017.

OMS. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis c infection. **Organização Mundial da Saúde**, n. April, 2016a.

OMS. Guidelines on validation, QAS/16.666, **Organização Mundial da Saúde**. 2016.

PENIN, F. et al. Structural Biology of Hepatitis C Virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5–19, 2004.

PERUZZO, F.; CANTO, E. **Química na abordagem do cotidiano**. 4. ed. São Paulo: Moderna, 2006. v. 1

PHCN. New Hepatitis C Treatments - The Four Classes of Hep C Treatment DAAs. **Pacific Hepatitis C Network**. Disponível em: <<http://www.hepctip.ca/daas/>>. Acesso em: 2 maio. 2017.

POLEPALLY, A. R. et al. Drug–Drug Interaction of Omeprazole With the HCV Direct-Acting Antiviral Agents Paritaprevir/Ritonavir and Ombitasvir With and Without Dasabuvir. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 5, n. 4, p. 269–277, 2016.

POORDAD, F. et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med**, p. 557–568, 2011.

POORDAD, F.; DIETERICH, D. Treating hepatitis C: Current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, n. 7, p. 449–464, 2012.

SHEN, A. J. et al. Metabolism and Disposition of Hepatitis C Polymerase Inhibitor Dasabuvir in Humans. 2016.

SMITH, MICHAEL B.; MARCH, J. **Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities**. v. 6, 2006

SULKOWSKI, M. Hepatitis C Infection. **AIDS Therapy**, p. 939–952, 2008.

UPRICHARD, S. L. Hepatitis C virus experimental model systems and antiviral drug research. **Virologica Sinica**, v. 25, n. 4, p. 227–245, 2010.

USP. <1225> Validation of compendial procedures - **United States Pharmacopeia** 40-NF 35. p. 1–6, 2018.