



Quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por cromatografia a líquido de alta eficiência

Simultaneous quantitation of efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate in fixed dose combination tablet by high performance liquid chromatography.

Paula C. R. Enéas¹, André L. O. Costa¹, Danielle E. R. Souza¹, Jessica C. Alvesa, Milena Magalhães^b, Sílvia L. Fialho^b, Isabela C. César^{1*}, Gerson A. Pianetti¹.

¹ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

² Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil

***Autora correspondente:** Profa. Isabela da Costa César. ORCID 0000-0003-1349-9413

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, cep: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

E-mail: isacesar@gmail.com. Tel: (31) 3409-6958

Recebido: 03/10/20; Aceito: 05/12/20

Citar: ENÉAS, P.C.R.; COSTA, A.L.O.; SOUZA, D.E.R.; ALVES, J.C.; MAGALHÃES, M.; FIALHO, S.L.; CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por cromatografia a líquido de alta eficiência. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy*, v. 2, n. 4, p. 38-50, 2020. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.4-5>

RESUMO

O regime terapêutico para o tratamento da AIDS utilizando efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila tem demonstrado eficácia e segurança. Neste trabalho, um método analítico foi desenvolvido e validado para a quantificação simultânea de efavirenz (EFV), lamivudina (3TC) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em comprimidos de dose fixa combinada. A análise por cromatografia a líquido de alta eficiência foi realizada em coluna de fase reversa Sun Fire® C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) a 30 °C, com 20 µL de volume de injeção e detecção a 260 nm. A fase móvel, composta por metanol e solução tampão acetato pH 5,4, foi utilizada em vazão de 1,0 mL/min, sob gradiente. Foi obtida linearidade adequada na faixa de 66 a 198 µg/mL para EFV, 66 a 198 µg/mL para 3TC e 33 a 99 µg/mL para TDF. Os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 5% e recuperações médias no intervalo de 98% a 102%, confirmando a precisão e a exatidão do método, respectivamente. Além disso, o método desenvolvido mostrou-se seletivo e robusto, podendo ser aplicado com sucesso a análises rotineiras de controle de qualidade.

Palavras-chave: Efavirenz; lamivudina; fumarato de tenofovir desoproxila; antiretroviral; validação; CLAE.

ABSTRACT

The therapeutic regimen for the treatment of AIDS using efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate has demonstrated efficacy and safety. In this work, an analytical method was developed and validated for simultaneous quantitation of efavirenz (EFV), lamivudine (3TC) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) in fixed-dose combination tablet. Analysis by high performance liquid chromatography was performed using a reversed phase column Sun Fire® C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) at 30 °C, 20 µL injection volume and detection at 260 nm. The mobile phase, composed of acetate buffer pH 5.4 and methanol, was employed at 1.0 mL/min flow rate and gradient elution. Adequate linearity was obtained in the range from 66 to 198 µg/mL for EFV, 66 to 198 µg/mL from 3TC and 33 to 99 µg/mL for TDF. Relative



standard deviation values were lower than 5% and mean recoveries were within 98% to 102%, confirming the precision and accuracy of the method, respectively. In addition, the developed method showed to be selective and robust and can be successfully applied for routine quality control analysis.

Keywords: Efavirenz; lamivudine; tenofovir disoproxil fumarate; antiretroviral; validation; HPLC.

INTRODUÇÃO

Diversas combinações e esquemas terapêuticos de antirretrovirais (ARV) são utilizados no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) com o objetivo de alcançar o máximo benefício e diminuir o risco do desenvolvimento de resistência viral. A otimização da terapia consiste em estabelecer doses ideais dos fármacos, reduzir o número de unidades posológicas e elaborar formulações adequadas. Constantemente, busca-se melhorar a biodisponibilidade, desenvolver novos fármacos e novas combinações medicamentosas, de modo a aumentar a eficácia, a conveniência, a durabilidade, a estabilidade, o custo e a tolerabilidade dos pacientes aos esquemas terapêuticos (CLERCQ, 2009; GOMES et al., 2009).

Em estudo observacional, Maggiolo e Suter (2003) concluíram que a terapia ARV ideal deve ser constituída em não mais que duas formas farmacêuticas por dia, de pequenas dimensões, em administração diária única e sem interferência com a alimentação. Outros trabalhos demonstram que quanto mais simples o esquema terapêutico, maior é a probabilidade de adesão do paciente ao tratamento (AMBERBIER et al., 2008; BARTLETT, 2002; CHESNEY, 2003; LANIECE et al., 2003; MOLINA, 2008, PARIENTI et al., 2009; ROSENBAACH et al., 2004). A associação de fármacos em dose fixa e combinada tem grande aplicação e aceitação nesse sentido, uma vez que proporciona administração com menor frequência de formas farmacêuticas, além de oferecer comodidade e maior adesão do paciente.

O esquema terapêutico com efavirenz (EFV), lamivudina (3TC) e fumarato de tenofovir desoproxil (TDF) tem demonstrado eficácia e segurança no tratamento da AIDS (GALLANT et al., 2004; ARRIZABALAGA et al., 2007; CASSETI et al., 2007; DIOP et al., 2012). Os três fármacos atuam, respectivamente, como inibidores não nucleosídeo, nucleosídeo e nucleotídeo da transcriptase reversa e são recomendados em terapias iniciais ARV, conforme diretrizes da OMS, do FDA e do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013; FDA, 2006; WHO, 2010).

As moléculas de EFV, 3TC e TDF (Figura 1) são estruturalmente distintas e apresentam propriedades físico-químicas diferenciadas. O EFV é um fármaco hidrofóbico com pKa 10,2 (MAURIN et al., 2002; MOFFAT et al., 2004). A 3TC é um análogo da desoxicitidina, possui pKa 4,3 e permanece primariamente na forma não-ionizada em soluções aquosas (CIHLAR et al., 2002; MOFFAT et al., 2004). O TDF, análogo da adenina 5' monofosfato, é um pró-fármaco lipofílico, pKa 3,75, biodisponível na forma de tenofovir (CIHLAR et al., 2002; GALLANT e DERESINSKI, 2003; SHARMA e MEHTA, 2010).

Diante das diferentes características físico-químicas dos fármacos, evidencia-se a necessidade de um método analítico simples, rápido e eficiente, aplicável ao controle de qualidade e que viabilize o estudo e a fabricação de comprimidos com associação dos ARV. Neste trabalho, um método por cromatografia a líquido de alta eficiência foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada.

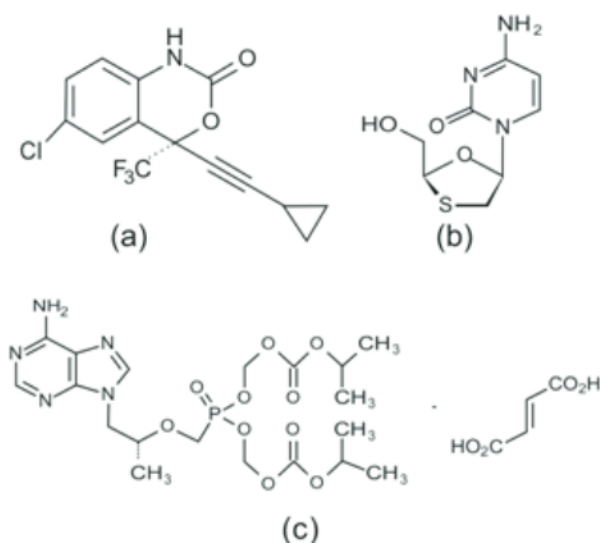


Figura 1. Estruturas químicas de efavirenz (a), lamivudina (b) e fumarato de tenofovir desoproxila (c).

METODOLOGIA

Materiais

Comprimidos e excipientes

Comprimidos revestidos de dose fixa combinada contendo 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF foram produzidos na Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Minas Gerais, Brasil. Os comprimidos foram produzidos por compressão indireta, em que grânulos de EFV foram obtidos por via úmida. As matérias-primas utilizadas foram EFV (Nortec Química S.A., Rio de Janeiro, Brasil), TDF (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil e Blanver, Itapevi, São Paulo, Brasil) e 3TC (Coben Pharmaceutical Co., Zhejiang, China). Os excipientes utilizados foram celulose microcristalina 102 (diluyente; Blanver Farmoquímica Ltda, Brasil), croscarmelose sódica (desintegrante; Colorcon do Brasil Ltda, Brasil), laurilsulfato de sódio (tensoativo; Cognis Brasil Ltda, Brasil), estearato de magnésio (lubrificante; Magnesia, Alemanha) e amido parcialmente pré-gelatinizado (aglutinante; Colorcon do Brasil Ltda, Brasil).

Reagentes e substâncias químicas de referência

Os reagentes grau cromatográfico e analítico empregados foram metanol (J.T. Baker, México), ácido acético (Sigma-Aldrich, Alemanha), acetato de amônio (Sigma-Aldrich, Alemanha) e ácido trifluoroacético (Tedia, EUA). Água purificada foi produzida pelo sistema Direct-Q3 Millipore® (Bedford, USA). As substâncias químicas de referência foram provenientes da Farmacopeia Americana: efavirenz lote F0G376, teor 99,8%; lamivudina lote H0I378, teor 99,7% e fumarato de tenofovir desoproxila lote F0J134, teor 99,1%.

Preparação das soluções

A solução padrão estoque, a solução padrão diluída, a solução amostra e a solução placebo foram utilizadas nas etapas de desenvolvimento e validação do método analítico e foram preparadas conforme descrito a seguir.

Solução padrão estoque

Aproximadamente 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF foram transferidos separadamente para balões volumétricos de 50 mL. Adicionaram-se 40 mL de metanol, submeteu-se a banho de ultrassom (Bransonic 220) por cinco minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente.

Solução padrão diluída

Transferiram-se 5 mL de cada solução *Solução padrão estoque* para um único balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com a fase móvel inicial (mistura de metanol e solução tampão acetato pH 5,4; 30:70, v/v). As concentrações finais de 132,0 µg/mL para EFV e 66,0 µg/mL para 3TC e TDF foram consideradas como concentrações de trabalho.

Solução amostra

O peso médio foi determinado empregando-se vinte comprimidos revestidos contendo 66 mg de



EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF. Em seguida, os comprimidos foram pulverizados e quantidade de pó equivalente ao peso médio referente a uma unidade foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 40 mL de metanol e, após agitação em banho de ultrassom por 20 minutos, o volume foi completado com o mesmo solvente e filtrado em papel de filtro quantitativo. A solução obtida foi diluída com fase móvel inicial até a concentração de 132,0 µg/mL para EFV e 66,00 µg/mL para 3TC e TDF. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm.

Solução placebo

Quantidade de pó de placebo equivalente ao peso médio referente a uma unidade foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 40 mL de metanol e, após agitação em banho de ultrassom por 20 minutos, o volume foi completado com o mesmo solvente e filtrado em papel de filtro quantitativo. Transferiram-se 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com fase móvel inicial e, em seguida, a solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm.

Solução tampão acetato pH 5,4

Dissolveram-se 7,7 g de acetato de amônio em 1 L de ácido acético diluído 0,1% (v/v). O pH da solução foi ajustado para 5,4 com ácido acético concentrado, com auxílio de pHmetro (Metrohm Herisau E510).

Condições cromatográficas

Utilizou-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett Packard (HP 1100), equipado com bomba quaternária, forno de coluna, injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD). Os dados cromatográficos foram obtidos e processados no *software* HP ChemStation®. As análises quantitativas foram realizadas em coluna cromatográfica de fase reversa Sun Fire® C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) a 30 °C e com 20 µL de volume de injeção. A fase móvel, composta de metanol e solução tampão acetato pH 5,4, foi utilizada em vazão de 1,0 mL/min sob gradiente (Tabela 1). Os espectros de absorção no ultravioleta de soluções metanólicas dos três ARV foram obtidos por meio do detector DAD para avaliação dos comprimentos de onda máximos de absorção.

Tabela 1. Gradiente da fase móvel para quantificação de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada.

Intervalo de tempo (min)	% MeOH	% Tampão acetato
0 - 4	30	70
4 - 6	30 → 85	70 → 15
6 - 13	85	15
13 - 14	85 → 30	15 → 70
14 - 15	30	70

Validação do método analítico

O método analítico foi validado conforme a Resolução RE nº 166 de 24 de julho de 2017 da Anvisa e o Guia ICH Q2 (R1) (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) (BRASIL, 2017; ICH,

2005). Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e de quantificação.

Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela



análise de possíveis interferentes presentes na mistura excipientes da formulação (placebo) sujeitos à coeluição com os analitos de interesse. Para isso, o cromatograma proveniente da *Solução amostra* foi comparado ao da *Solução placebo*. Além disso, a pureza espectral dos picos de EFV, 3TC e TDF foi avaliada no cromatograma da *Solução amostra* com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD).

Linearidade

As curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF foram estabelecidas a partir de três soluções padrão de EFV 660,0 µg/mL, 3TC 330 µg/mL e TDF 330 µg/mL preparadas em metanol. Alíquotas dessas soluções foram diluídas em fase móvel, de forma a obter onze concentrações diferentes, na faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho de EFV (132 µg/mL), 3TC (66 µg/mL) e TDF (66 µg/mL). As relações entre as áreas dos picos cromatográficos e as concentrações dos analitos foram submetidas à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O ajuste dos dados ao modelo de regressão, o coeficiente de correlação (r), o intercepto, a inclinação da curva e a aleatoriedade dos resíduos foram verificados.

Precisão

A precisão foi definida pelas análises de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), a partir da quantificação dos fármacos na concentração de trabalho (132 µg/mL para EFV e 66 µg/mL para 3TC e TDF) em seis amostras e em três dias consecutivos ($n=18$). A precisão intra-dia foi avaliada pelas medições do desvio-padrão relativo das determinações diárias, enquanto a precisão inter-dias foi verificada pelo desvio-padrão relativo de todos os resultados.

Exatidão

Quantidades conhecidas de cada fármaco foram adicionadas a misturas dos componentes da formulação (excipientes) com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação. O experimento foi executado em triplicata em três níveis, correspondentes a 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho. A recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a respectiva concentração teórica de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (1)$$

Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade do analito que se pode detectar nas condições experimentais do método. O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito que se pode quantificar com adequada precisão e exatidão. Esses parâmetros foram estimados pelo desvio padrão do intercepto (s_a) e inclinação da curva analítica (b) dos fármacos (Equações 2 e 3). Em seguida, *soluções padrão* de cada fármaco foram preparadas nas concentrações de LQ

e de LD estimadas e diluições sucessivas foram realizadas até a obtenção de uma relação entre sinal e ruído próxima de 3 para o LD e próxima de 10 para o LQ. Ao encontrar a relação sinal/ruído esperada para o LQ e LD, a solução foi injetada cinco vezes no cromatógrafo e determinado o DPR das áreas obtidas.

$$LD = 3,3s_a/b \quad (2)$$

$$LQ = 10s_a/b \quad (3)$$



Robustez

Os efeitos de sete variáveis (temperatura do forno da coluna, pH da solução tampão acetato, vazão da fase móvel, comprimento de onda, marca da coluna, modelo do cromatógrafo e tempo de agitação em banho de ultrassom) foram estudados por análise

multivariada e a influência de cada uma delas foi identificada e ordenada (GREEN, 1996; YOUNG e STEINER, 1975). O delineamento experimental incluiu oito análises, conforme demonstrado na matriz dos fatores (Tabela 2), sendo os parâmetros nominais identificados pelas letras maiúsculas e os parâmetros variados pelas letras minúsculas.

Tabela 2. Matriz de fatores para avaliação da robustez do método analítico.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura do forno da coluna (°C)	A	A	A	A	a	a	a	a
pH do tampão acetato	B	B	b	b	B	B	b	b
Vazão da fase móvel (mL/min)	C	c	C	c	C	c	C	C
Comprimento de onda (nm)	D	D	d	d	d	d	D	D
Tempo de agitação no ultrassom (min)	E	e	E	e	e	E	e	E
Marca da coluna	F	f	f	F	F	f	f	F
Equipamento	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Fatores A: 30 °C, a: 25 °C, B: 5,4, b: 5,7, C: 1,0 mL/min, c: 1,2 mL/min, D: 260 nm, d: 262 nm, E: 20 min, e: 15 min, F: Sun Fire® (C18 250 x 4,6 mm, 5 µm), f: Zorbax Eclipse® (C18 250 x 4,6 mm, 5 µm), G: HP 1100 e g: HP 1200. Resultados s, t, u, v, w, x, y, e z avaliados em relação ao teor (%), tempo de retenção (min), número de pratos teóricos, e fator de cauda.

Os resultados de cada experimento foram avaliados em relação ao teor, tempo de retenção, eficiência da coluna (representada pelo número de pratos teóricos, N) e fator de cauda. Estimou-se o efeito de cada fator pela diferença entre a média dos resultados das análises com o parâmetro nominal (letras maiúsculas) e a média daqueles com o parâmetro variado (letras minúsculas). Assim, o efeito da temperatura do forno da coluna, por exemplo, foi estimado de acordo com a Equação 4.

$$\text{Efeito } \frac{A}{a} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad (4)$$

As diferenças mais relevantes indicaram que os fatores correspondentes têm maior influência que os outros sobre a precisão do método. Essas influências são consideradas relevantes se o valor absoluto do efeito é superior à expressão $s\sqrt{2}$, em que s é o desvio padrão obtido das oito determinações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de absorção no ultravioleta de soluções metanólicas dos três ARV (EFV 10 µg/mL, 3TC 10 µg/mL e TDF 20 µg/mL) apresentaram picos de absorção em 247 nm, 271 nm e 260 nm, respectivamente

(Figura 2). Optou-se pela detecção em 260 nm, uma vez que os ARV em estudo absorvem consideravelmente nesse comprimento de onda. Apesar de não ser o comprimento de onda máximo de EFV e 3TC, foi possível a quantificação com sensibilidade e seletividade adequadas.

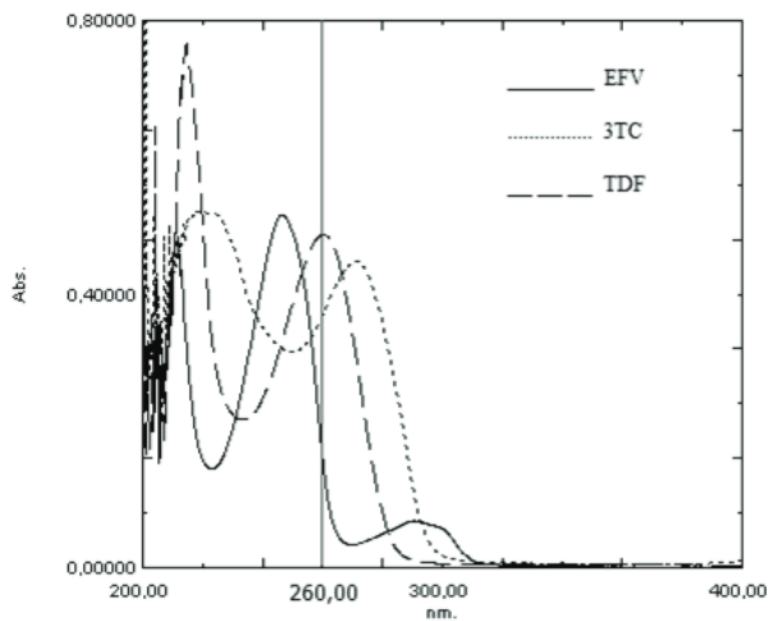


Figura 2. Espectros na região do ultravioleta, de 200 a 400 nm, de EFV, 3TC e TDF em metanol.

Na análise cromatográfica dos ARV, 3TC foi o primeiro fármaco a eluir, seguido de TDF e EFV (Figura 3). A menor afinidade de 3TC pela fase estacionária resultou em menor tempo de retenção ($t_R = 2,8$ min) quando comparada aos fármacos mais hidrofóbicos TDF ($t_R = 9,2$ min) e EFV ($t_R = 11,0$ min). Todos os picos apresentaram resolução, simetria e número de pratos teóricos adequados para análise cromatográfica.

Sharma e Mehta (2010) descreveram método de quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF, por espectrofotometria derivada, pela técnica do ponto de anulação em 291,4 nm, 305,6 nm e 271,4 nm para cada fármaco, respectivamente. Um método por CLAE em fase reversa também foi descrito por Reddiah *et al.* (2012), em modo gradiente e com pH da

fase móvel em 3,8. A quantificação por espectrofotometria proposta por Sharma e Mehta (2010) apresenta como desvantagem o fato de não possuir alto nível de especificidade e sensibilidade obtido com CLAE. Já o método de Reddiah *et al.* (2012) possui um tempo de corrida longo (120 min), o que muitas vezes inviabiliza as análises de rotina, quando grandes quantidades de amostras são preparadas.

Mesmo com as características físico-químicas distintas dos fármacos, a seleção do pH da fase móvel e o esquema de gradiente proposto neste estudo permitiram que a análise simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada fosse desenvolvida em condições satisfatórias e em curto tempo de corrida cromatográfica (15 min).

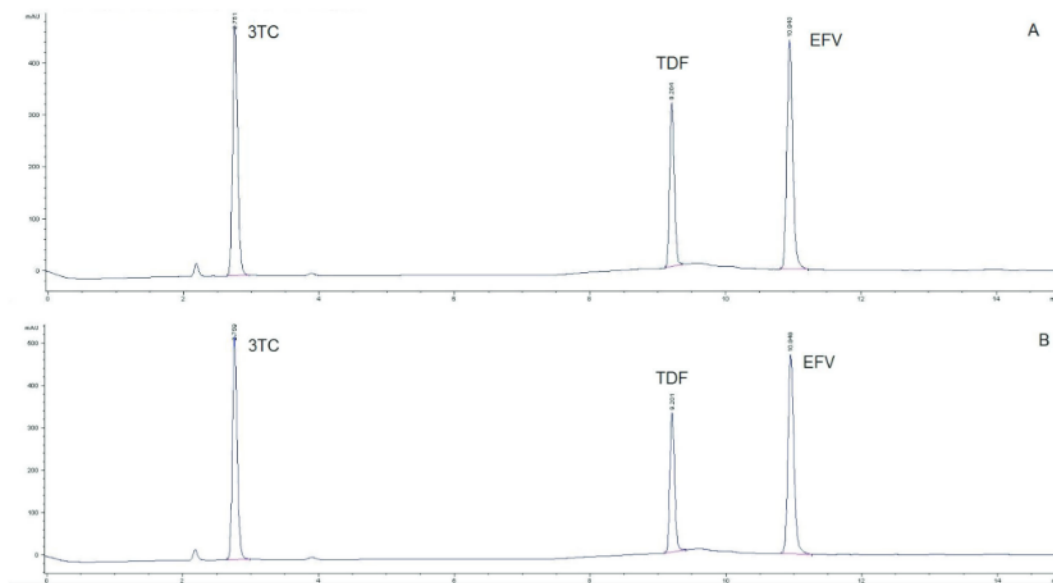


Figura 3. Cromatogramas obtidos para (A) solução amostra dos comprimidos de dose fixa combinada e (B) solução padrão contendo lamivudina a 66 µg/mL (3TC), fumarato de tenofovir desopoxila a 66 µg/mL (TDF) e efavirenz a 132 µg/mL (EFV), obtidos conforme as condições cromatográficas otimizadas.

Seletividade

Entende-se por seletividade a capacidade do método em avaliar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma matriz complexa (BRASIL, 2017). O estudo da seletividade do método proposto foi realizado por verificação da resposta da matriz (placebo) na detecção dos fármacos. O cromatograma da *Solução placebo* não apresentou interferências nos picos dos ARV, o que demonstra a seletividade do método em relação aos componentes presentes na formulação estudada. Adicionalmente, as purezas espectrais dos picos da *Solução amostra* foram avaliadas com o detector DAD (3TC = 99,95%, TDF = 99,86% e EVF = 99,27%). Os elevados valores de pureza obtidos evidenciam ausência de coeluição de substâncias junto aos fármacos.

Linearidade

As curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF indicaram

correlação linear adequada entre as concentrações e as áreas dos picos no intervalo de 50% a 150% da concentração de trabalho (Tabela 3). As regressões lineares foram significativas ($p < 0,05$) e os coeficientes de correlação (EFV = 0,9971; 3TC = 0,9983; TDF = 0,9962) foram superiores ao valor recomendado de 0,99 (BRASIL, 2017). O intercepto não foi diferente de zero ($p > 0,05$) e os resíduos apresentaram distribuição aleatória e sem tendências na regressão de todos os fármacos.

Precisão

A precisão da determinação de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada foi estabelecida em três dias consecutivos de análises e expressa em valores de DPR (Tabela 4). As concentrações médias apresentadas na Tabela 4 estão expressas como porcentagem obtida do valor teórico. Na análise de EFV, 3TC e TDF, nos comprimidos de dose fixa combinada, os valores de DPR para a precisão intra-dia ($n=6$) foram 1,16%, 1,12% e 1,32%, respec-



Tabela 3. Parâmetros das curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF.

Parâmetros da regressão	Resultados		
	EFV	3TC	TDF
Faixa de trabalho (µg/mL)	66 a 198	33 a 99	33 a 99
Coefficiente de correlação (r)	0,9971	0,9983	0,9962
Inclinação ± desvio padrão	25,92 ± 0,36	47,75 ± 0,50	29,80 ± 0,47
Intercepto ± desvio padrão	99,04 ± 49,25	- 8,69 ± 34,92	29,93 ± 32,55

Tabela 4. Resultados da repetibilidade (precisão intra-dia) e da exatidão de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada.

Fármacos	Efavirenz		Lamivudina		Fumarato de tenofovir desoproxila	
	Dia	Média ± DPR (%) n=6	Dia	Média ± DPR (%) n=6	Dia	Média ± DPR (%) n=6
Precisão	1	102,09 ± 1,16	1	96,55 ± 1,12	1	93,41 ± 1,32
	2	100,79 ± 0,87	2	96,83 ± 1,38	2	93,87 ± 1,37
	3	103,04 ± 1,28	3	95,64 ± 1,46	3	96,54 ± 1,45
Exatidão	Padrão adicionado (µg/mL)	Recuperação ± DPR (%) n = 3	Padrão adicionado (µg/mL)	Recuperação ± DPR (%) n = 3	Padrão adicionado (µg/mL)	Recuperação ± DPR (%) n = 3
	105,6	99,70 ± 0,41	52,8	100,13 ± 0,56	52,8	100,00 ± 0,30
	132,0	100,07 ± 0,92	66,0	100,26 ± 0,01	66,0	99,87 ± 1,28
	158,4	99,53 ± 1,81	79,2	99,88 ± 0,49	79,2	100,83 ± 0,08

tivamente. Para a precisão inter-dias, os valores de DPR ($n=18$) para EFV, 3TC e TDF foram 1,40%, 1,36% e 1,98%, respectivamente. Em todos os casos, os desvios foram menores que 5,0%, o que garante precisão satisfatória do método para doseamento dos ARV (GREEN, 1996).

Exatidão

O método de adição de padrão ao placebo, em três diferentes concentrações, foi utilizado no experimento de exatidão (Tabela 4). As recuperações médias ($n=9$) obtidas para os ARV (EFV = 99,77%, 3TC = 100,09% e TDF = 100,24%) estão compreendidas no

intervalo recomendado de 98% a 102% e os valores de DPR foram inferiores a 2,0% (GREEN, 1996). Alternativamente, esses resultados foram comparados ao valor teórico de 100% utilizando o teste *t* de Student ($\alpha = 0.05$; G.L. = 8). Os valores de *t* obtidos (EFV = 0,66; 3TC = 0,68 e TDF = 0,89) foram inferiores ao valor crítico $t_{0,05;8} = 2,31$, o que evidencia não existir diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as quantidades de fármacos que foram recuperadas daquelas utilizadas nas contaminações dos placebos.

Limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD)

Os valores dos LD e de LQ foram estimados a partir



das curvas analíticas e determinados experimentalmente por diluições sucessivas (Tabela 5). As concentrações obtidas pela relação entre o sinal e o ruído da linha de base foram inferiores às concentrações estimadas por regressão. Mesmo assim, podem-se considerar válidos os resultados experimentais de LD

e LQ, uma vez que os valores de DPR de cinco injeções consecutivas foram inferiores a 2% para os ARV. Isso demonstra a reprodutibilidade das respostas nas concentrações experimentais de detecção e quantificação dos fármacos.

Tabela 5. Valores estimados a partir da curva analítica e valores experimentais para os limites de detecção e de quantificação de EFV, 3TC e TDF.

Fármaco	Limite de detecção		Limite de quantificação	
	Estimado pela curva analítica (µg/mL)	Experimental (µg/mL) ± DPR (%)	Estimado pela curva analítica (µg/mL)	Experimental (µg/mL) ± DPR (%)
EFV	45,29	2,78 ± 0,66	137,23	9,28 ± 0,66
3TC	34,86	0,29 ± 1,08	105,64	0,78 ± 0,69
TDF	52,07	0,99 ± 1,27	157,78	6,90 ± 0,45

Robustez

O efeito de cada variável foi verificado em relação aos parâmetros de teor, tempo de retenção, número de pratos teóricos e fator de cauda (Tabela 6), mediante delineamento experimental de combinações por matriz de fatores. As diferenças superiores ao valor crítico ($s\sqrt{2}$, em que s é o desvio padrão obtido nas oito determinações) foram consideradas significativas nas análises.

O parâmetro que mais influenciou a determinação do teor dos ARV foi o tempo de agitação da amostra em banho de ultrassom. A solubilização do fármaco é condição essencial para a análise cromatográfica e constitui-se em um parâmetro crítico na determinação do teor. A redução do tempo de agitação para 15 min prejudicou a extração dos fármacos no solvente orgânico e, por conseguinte, os teores foram significativamente inferiores quando comparados aos resultados do procedimento normal de agitação em 20 min. Recomenda-se que a pulverização dos comprimidos seja feita cuidadosamente até a obtenção de partículas finas e homogêneas e o tempo de extração em metanol seja padronizado

e seguido conforme o procedimento descrito no preparo das amostras.

Apesar de possuir a mesma fase estacionária, diâmetro interno e tamanho de partículas, a mudança da coluna provocou alterações no tempo de retenção, no número de pratos teóricos e no fator de cauda dos picos. Essas alterações são normais e esperadas devido à diferença no processo de fabricação de cada coluna, da sílica utilizada como suporte e da manutenção e condições de uso pelos usuários, o que pode promover alterações abruptas da seletividade da fase estacionária em relação ao analito (SNYDER et al., 1997).

A mudança na vazão da fase móvel interferiu diretamente no t_R dos ARV. O aumento da vazão da fase móvel promove redução do tempo de retenção e, conseqüentemente, redução do tempo de corrida (SNYDER et al., 1997).

A temperatura do forno da coluna, o comprimento de onda de detecção e o pH da solução tampão acetato não apresentaram influência significativa nos parâmetros avaliados. A mudança do equipamento também não foi considerada uma variável crítica,

Tabela 6. Efeitos das variáveis estudadas em relação aos parâmetros de teor (%), tempo de retenção (min), eficiência da coluna (N) e fator de cauda.

Variável	EFV				3TC				TDF			
	Teor	tR	N	Fc	Teor	tR	N	Fc	Teor	tR	N	Fc
Forno da coluna (°C) A: 30; a: 25	-0,54	-0,15	8579	0,01	-0,31	-0,09	150	0,00	0,30	-0,05	15020	-0,03
pH do tampão B: 5,4 ; b: 5,7	-0,50	0,03	1641	-0,01	0,77	0,00	120	-0,02	1,10	0,02	-70	-0,02
Vazão (mL) C: 1,0; c: 1,2	0,46	0,94	-2728	0,01	-0,49	0,56	770	0,02	-0,62	0,67	-7398	0,03
λ detecção (nm) D: 260; d: 262	0,30	0,03	-1003	-0,01	0,09	0,02	-104	0,01	0,14	0,01	-1422	-0,01
Tempo ultrassom (min) E: 20 min; e: 15 min	1,50	0,03	-11274	-0,01	1,55	0,01	-72	0,00	2,14	0,01	611	0,01
Coluna F: SunFire; f: Eclipse	1,36	0,98	-13287	-0,04	0,37	0,50	1028	-0,08	1,02	0,34	-10189	-0,09
Modelo equipamento G: HP110; g: HP1200	0,56	-0,03	-11430	0,04	0,53	0,10	-460	0,02	0,39	0,03	-23731	0,01
Valor crítico (s√2)	1,24	0,73	12372	0,04	1,06	0,39	777	0,05	1,31	0,40	18299	0,06

exceto pela alteração da eficiência na determinação do teor de TDF.

CONCLUSÃO

O método analítico apresentado neste estudo permitiu a quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa e combinada. Apesar das diferenças nas características físico-químicas dos fármacos, a análise por CLAE em fase reversa com gradiente de fase móvel (solução tampão acetato pH 5,4 e metanol) e detecção em 260 nm foi eficiente na separação e quantificação dos ARV.

O método desenvolvido foi seletivo em relação aos

demais componentes da formulação e apresentou precisão e exatidão satisfatórias. O tempo de extração dos fármacos é uma variável crítica do procedimento de preparo das amostras, sendo recomendável a pulverização cuidadosa até a obtenção de grânulos finos e homogêneos, de forma a permitir a total solubilização dos analitos. Os limites de detecção e quantificação dos fármacos e as faixas lineares obtidas também foram adequados para as análises simultâneas dos ARV.

O método proposto é de simples execução, rápido e capaz de garantir resultados confiáveis nas análises de rotina de controle de qualidade.



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG e à Farmacopeia Brasileira pelo suporte financeiro e à Fundação Ezequiel Dias pela parceria no desenvolvimento e produção dos comprimidos.

CONFLITO DE INTERESSE: Nada a declarar.

REFERÊNCIAS

- AMBERBIER, A.; WOLDEMICHAEL, K.; GETACHEW, S.; GIRMA, B.; DERIBE, K. Predictors of adherence to antiretroviral therapy among HIV-infected persons: a prospective study in Southwest Ethiopia. *BMC Public Health*, v. 8, n. 265, p. 1-9, 2008.
- ARRIZABALAGA, J.; ARAZO, P.; AGUIREBENGOA, K.; GARCÍA-PALOMO, D.; CHOCARRO, A.; LABARGA, P.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, M. J.; ECHEVARRÍA, S.; OTEO, J. A.; URIZ, J.; LETONA, S.; FARIÑAS, C.; PERALTA, G.; PINILLA, J.; FERRER, P.; ÁLVAREZ, M. L.; IRIBARREN, J. A. Effectiveness and safety of simplification therapy with once-daily tenofovir, lamivudine, and efavirenz in HIV-1-infected patients with undetectable plasma viral load on HAART. *HIV Clinical Trials*, v. 8, n. 5, p. 328-336, 2007.
- BARTLETT, J. A. Addressing the challenges of adherence. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 29, suppl. 1, p. S2-S10, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 25 de julho de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV: 2012. 7ª Ed. Brasília, DF, 2012.
- CASSETI, J.; MADRUGA, J. V. R.; SULEIMAN, J. M. A. H.; ETZEL, A.; ZHONG, L.; CHENG, A. K.; ENEJOSA, J. The safety and efficacy of tenofovir DF in combination with lamivudine and efavirenz through 6 years in antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients. *HIV Clinical Trials*, v. 8, n. 3, p. 164-172, 2007.
- CHESNEY, M. Adherences to HAART regimens. *Aids Patient Care and STDs*, v. 17, n. 4, p. 169-177, 2003.
- CIHLAR, T.; BIRKUS, G.; GREENWALT, D. E.; HITCHCOCK, M. J. M. Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Research*, v. 54, p. 37-45, 2002.
- CLERCQ, E. D. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. *Reviews in Medical Virology*, v. 19, p. 287-299, 2009.
- DIOP, S. A.; FORTES-DÉGUÉNONVO, L.; SEYDI, M.; DIENG, A. B.; BASSE, C. D.; MANGA, N. M.; DIA, N. M.; NDAW, G.; NDOUR, C. T.; SOUMARÉ, M.; DIOP, B. M.; SOW, P. S. Efficacité et tolérance de l'association ténofovir-lamivudine-éfavirenz chez les patients VIH-1 à la Clinique des maladies infectieuses du CHNU de Fann à Dakar. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, v. 106, p. 22-26, 2013.
- GALLANT, J. E.; DERESINSKI, S. Tenofovir disoproxil fumarate. *Clinical Infectious Diseases*, v. 37, p. 944-950, 2003.
- GALLANT, J. E.; STASZEWSKI, S.; POZNIAK, A. L.; DEJESUS, E.; SULEIMAN, J. M. A. H.; MILLER, M. D.; COAKLEY, D. F.; LU, B.; TOOLE, J. J.; CHENG, A. K. Efficacy and safety of tenofovir DF vs. stavudine in combination therapy in antiretroviral naïve patients: a 3 year randomized trial. *JAMA*, v. 292, p. 191-201, 2004.
- GOMES, R. R. F. M.; MACHADO, C. J.; ACURCIO, F. A.; GUIMARÃES, M. D. C. Utilização dos registros de dispensação da farmácia como indicador da não-adesão à terapia antirretroviral em indivíduos infectados pelo HIV. *Caderno de Saúde Pública*, v. 25, p. 495-506, 2009.
- GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.
- INTERNATIONAL Conference on Harmonisation – ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2 R1). London, 2005.
- MAGGILOLO, F.; SUTER, F. Terapia once-a-day. *Read Files – Resistenza e Adesione alle terapie nella cura dell'AIDS*, v. 3, n. 5, p. 2, 2003.
- MAURIN, M. B.; ROWE, S. M.; BLOM, K.; PIERCE, M. E. Kinetics and mechanism of hydrolysis of efavirenz. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 4, p. 517-521, 2002.
- MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3. ed. London: Pharmaceutical Press (PhP), 2004. v. 2, 1935 p.
- MOLINA, J. M. Efficacy and safety of once-daily regimens in the treatment of HIV infection. *Drugs*, v. 68, n. 5, p. 567-578, 2008.



PARIENTI, J. J.; BANGSBERG, D. R.; VERDON, R.; GARDNER, E. M. Better adherence with once-daily antiretroviral regimens: a meta-analysis. *Clinical Infections Diseases*, v. 48, n. 4, p. 484-488, 2009.

REDDIAH, C. H. V.; DEVI, P. R.; MUKKANTI, K.; SRINIVASU, P. Development and validation of stability indicating HPLC method for combination tablet dosage form of efavirenz, lamivudine and tenofovir in tablet. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, v. 2, n. 1, p. 40-45, 2012.

ROSENBAACH, K. A.; ALLISON, R.; NADLER, J. P. Daily dosing of highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infections Diseases*, v. 34, n. 5, p. 686-692, 2002.

SHARMA, R.; MEHTA, K. Simultaneous spectrophotometric estimation of tenofovir disoproxil fumarate and lamivudine in three component tablet formulation containing efavirenz. *Indian Journal of Pharmaceutical*

Sciences, v. 72, n. 4, p. 527-530, 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2 ed. New York Wiley Interscience, 1997. 765 p.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for industry. Fixed dose combinations, co-packaged drug products and single-entity versions of previously approved antiretrovirals for the treatment of HIV*. Rockville, 2006.

WHO – World Health Organization. *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach*. 2010 revision. [on line]. Geneva, 2010.

YODEN, W. J.; STEINER E. H. *Statistical manual of the AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*. Washington: AOAC, 1975. 88 p.