

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA OLÍVIA NOGUEIRA TEIXEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE TENOFOVIR  
PARA APLICAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE E ESTUDO DE  
BIOEQUIVALÊNCIA/ BIODISPONIBILIDADE RELATIVA.**

BELO HORIZONTE - MG

2011

MARIA OLÍVIA NOGUEIRA TEIXEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE TENOFOVIR  
PARA APLICAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE E ESTUDO DE  
BIOEQUIVALÊNCIA/ BIODISPONIBILIDADE RELATIVA.**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti – UFMG

Co-orientadora Dra. Sílvia Ligório Fialho – Funed

Belo Horizonte - MG

2011


## FOLHA DE APROVAÇÃO

**MARIA OLIVIA NOGUEIRA TEIXEIRA**

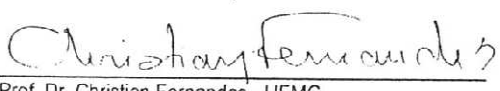
**"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE TENOFOVIR  
PARA APLICAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE E ESTUDO DE  
BIOEQUIVALÊNCIA/BIODISPONIBILIDADE RELATIVA"**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação,  
em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

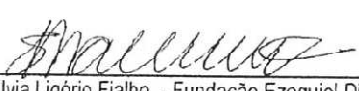
**COMISSÃO EXAMINADORA**

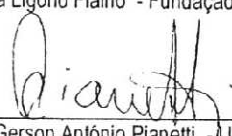
Dr. Leonardo de Souza Teixeira - ICF

Prof. Dr. Christian Fernandes - UFMG

Dra. Sílvia Ligório Fialho - Fundação Ezequiel Dias

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - UFMG

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2011

*Dedico este trabalho...*

*À mamãe e ao papai, pelos esforços não medidos,  
pelo amor e pela formação da pessoa que sou.*

*Ao Mateus, pelo sonho sonhado junto.*

## Agradecimentos

Agradeço sempre a Deus, pelas oportunidades e pelas pessoas colocadas em minha vida.

Ao Mateus, pelo companheirismo, amor, incentivo e toda compreensão. Só chegamos aqui porque chegamos juntos.

À minha amada família, meus pais, Maria das Graças e Raimundo, meus irmãos, Mara, Ramiro e Grazi, minha sobrinha Alice, por terem suportado com carinho toda minha ausência. Ao vô Nelson, pelo exemplo de vida e caráter. À Clarice, pela companhia e pela descontração das noites de terça. A todos os demais familiares, pelo berço sólido e incentivo.

Ao meu orientador, Pianetti, pela confiança depositada e por estar com as portas sempre abertas.

A minha co-orientadora, Sílvia, pelo grande apoio e por partilhar dos problemas diários.

Ao meu grande amigo Diego, pela disposição em ajudar sempre e por todo caráter e competência demonstrados em suas ações.

Ao meu grande amigo Alisson, por estar sempre por perto quando precisei e pela imensurável ajuda na elaboração deste trabalho.

Às meninas do SAR, Cristine, Karin, Juliana, Isabella, Thaís e Érica, por entenderem meus momentos difíceis e pela amizade.

Aos amigos do SEEP, SDM e SCFQ, em especial Leonardo, Fabiana, Jamile, Bruno, Stela, Ailton, pela colaboração.

Aos amigos do LCQ da Faculdade de Farmácia, em especial Fernando, André, Paula Enéas, Paula Chellini, Geovani, Léo, Tiago, Luciano, pela torcida, mesmo que distante.

Aos amigos do CEDAFAR-BIO, Isabela, Ricardo e Juliana, pela colaboração no desenvolvimento do método bioanalítico.

Ao Prof. Armando, pela confiança e incentivo.

Ao ICF, em especial ao Ricardo, Iram, Sandro, Vilmar, Elson, pela atenção dispensada e parceria no desenvolvimento do método bioanalítico e pela competente execução do estudo de bioequivalência. À Dra. Fabiana, ao Dr. Guilherme e ao amigo Eduardo, pela companhia durante a monitoria do estudo de bioequivalência.

Aos voluntários que participaram da etapa clínica do estudo, pela doação.

À Fundação Ezequiel Dias – Funed, pela estrutura e pelo projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.*

*É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”*

Martin Luther King

## RESUMO

O HIV, vírus da imunodeficiência humana, é um retrovírus que afeta o sistema imune das pessoas infectadas. Embora as tendências globais indiquem um declínio geral de novas infecções pelo HIV nos últimos anos, estes números mascaram importantes diferenças geográficas no tamanho, tendências temporais e formas de transmissão na epidemia. No Brasil, do início da epidemia, em 1980, até 2009, foram registrados aproximadamente 600 mil casos de Aids e 300 mil mortes em decorrência da doença. Na história da pandemia do HIV, o Brasil foi pioneiro ao criar um programa estatal com distribuição gratuita do tratamento antirretroviral a toda a população com Aids. O tenofovir (TEN; 1-(6-aminopurin-9-il) propan-2-ilo ximetilfosfônico ácido) pertence à classe dos antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos. Atualmente, os custos do tratamento com o tenofovir têm limitado sua utilização como terapia de primeira escolha em países em desenvolvimento. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em produtos farmacêuticos e tenofovir em amostras de plasma humano, de forma a contribuir para sua fabricação nacional. O método desenvolvido e validado para quantificação do TDF em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria em ultravioleta (CLAE-UV) utilizou coluna cromatográfica C18 (125 x 4,0 mm, 5µm), detecção em 260 nm e fase móvel composta de solução trietilamina 0,1% pH 5,3:metanol (55:45). O método demonstrou ser seletivo, linear na faixa de 0,075 a 0,45 mg/mL, exato, preciso, robusto e o efeito matriz não foi significativo. O método desenvolvido e validado para avaliação da dissolução por espectrometria no UV utilizou solução HCl 0,1 M como diluente e detecção em 260 nm. O método demonstrou ser seletivo, linear na faixa de 0,0165 a 0,0495 mg/mL, exato, preciso, robusto e o efeito matriz não foi significativo. Desenvolveu-se ainda, método bioanalítico por CLAE com detecção por espectrofotometria de massas e ionização por electrospray no modo positivo para quantificação de tenofovir em plasma humano. A análise cromatográfica utilizou coluna C18 (100 x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel composta por tampão acetato de amônio 2 mM + 0,2% de ácido fórmico:metanol (85:15) e foi utilizada extração em fase sólida. O método se mostrou seletivo, exato, preciso e linear na faixa de 5,00 a 600,00 ng/mL. Realizou-se ainda estudo de bioequivalência com aplicação do método desenvolvido. O estudo foi do tipo quantitativo direto com delineamento aleatório, monocêntrico, aberto, cruzado, randomizado, dois tratamentos, dois períodos, duas seqüências, utilizando-se 35 voluntários sadios, com administração dos medicamentos após alimentação padronizada. Os medicamentos teste e referência foram considerados bioequivalentes, com IC 90% de 95,75 – 109,97 para o  $C_{max}$  e 96,19 – 103,82 para  $ASC_{0-t}$ .

*Palavras-chave:* fumarato de tenofovir desoproxila, tenofovir, CLAE, espectrofotometria UV, espectrometria de massas, bioequivalência.



## ABSTRACT

HIV, human immunodeficiency virus, is a retrovirus that affects the immune system of infected people. Overall global declines in the rate of new HIV infections and AIDS deaths hide important geographical differences in the size, temporal trends and modes of transmission of the HIV epidemics. In Brazil, from the beginning of epidemic, in 1980, until 2009, 592,914 cases of AIDS and 229,222 deaths due to this disease were reported. In the history of HIV pandemic, Brazil was a pioneer due to the creation of a national program that allows the free distribution of antiretroviral medicines to those who live with AIDS. Tenofovir (TEN; 1-(6-aminopurin-9-yl) propan-2-yloxymethylphosphonic acid) belongs to the nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitors class of antiretroviral. Actually, the costs of treatment with tenofovir have limited its use as first choice therapy in developing countries. The aim of the present work was to develop and validate analytical methods for quantification of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) in pharmaceutical products and tenofovir in human plasma samples, in order to contribute to national manufacturing of the medicine. A sensitive high-performance liquid chromatography (CLAE) method coupled to UV detection was developed for the determination of TDF in tablets using C18 column (125 x 4.0 mm, 5 $\mu$ m), detection at 260 nm and mobile phase containing triethylamine 0.1 % pH 5.3 solution: methanol (55:45). The proposed method has been validated with a linear range of 0.075 to 0.45 mg/mL, and demonstrated selectivity, accuracy, precision, ruggedness and matrix effect was not significant. A spectrometric UV method was developed for assessment of tablets dissolution using HCl 0.1 M solution as solvent and detection at 260 nm. The proposed method has been validated with a linear range of 0.0165 to 0.0495 mg/mL, and demonstrated selectivity, accuracy, precision, ruggedness and matrix effect was not significant.

A CLAE method coupled to mass spectrometry and electrospray ionization in positive mode was developed for tenofovir quantification in human plasma. The chromatographic analysis was performed using a C18 column (100 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m) with mobile phase consisting of ammonium acetate 2 mM + 0.2% formic acid buffer: methanol (85:15) and involved solid phase extraction. The proposed method has been validated with a linear range of 5.00 to 600.00 ng/mL, and demonstrated selectivity, accuracy, precision and matrix effect was not significant. A bioequivalence study was performed using the developed method. It was a randomized, single-dose, open-label, 2-way, crossover study, fixed-dose single-tablet regimen, with 35 healthy adults and under fed conditions study. The evaluated products were considered bioequivalent and the geometric mean ratios (90% CI) for C<sub>max</sub>, AUC<sub>0-t</sub> were 95.75 to 109. and 96.19 to 103.82, respectively.

**Keywords:** tenofovir disoproxil fumarate, tenofovir, CLAE, UV spectrometry, mass spectrometry, bioequivalence.

## LISTA DE FIGURAS

1	Conversão do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) a tenofovir	37
2	Conversão do tenofovir a tenofovir difosfato	37
3	Cromatogramas obtidos para a substância de referência Nortec, padrão de trabalho e placebo fortificado.	66
4	Cromatogramas obtidos para as substâncias de referência USP e Nortec	66
5	Cromatograma obtido no estudo de estresse da matéria-prima com condição básica (NaOH 0,01 M)	68
6	Comparação do perfil de degradação do produto terminado (comprimido) versus matéria-prima ativa em condição básica (NaOH 0,01 M)	68
7	Cromatograma obtido no estudo de fotoestabilidade para exposição da matéria-prima à luz UV	69
8	Cromatogramas das amostras submetidas ao estresse na luz UV	70
9	Cromatograma obtido no estudo de fotoestabilidade para exposição da matéria-prima à luz branca.	70
10	Cromatogramas das amostras submetidas ao estresse na luz branca.	71
11	Curva obtida para o fármaco na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação	72
12	Curva matrizada obtida para o fármaco na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação	74
13	Espectros obtidos para o diluente e para o placebo puro.	89
14	Espectros obtidos para o padrão de referência e o placebo fortificado.	89
15	Curva obtida para o fármaco na faixa de 0,01650 mg/mL a 0,04950 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação	91
16	Curva matrizada obtida para o fármaco na faixa de 0,0165 mg/mL a 0,0495 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação	92
17	Espectro no IV obtido para a substância química de referência USP	109
18	Espectro no IV obtido para a substância de referência Nortec	109
19	Espectro no IV obtido para a matéria-prima	110
20	Cromatograma obtido na análise da substância de referência Nortec	111
21	Perfil de dissolução comparativo	116
22	Espectro de fragmentação ESI(+) do tenofovir	126
23	Espectro de fragmentação ESI(+) do aciclovir.	126
24	Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 1)	136
25	Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 2)	136

<b>26</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 3)</b>	<b>137</b>
<b>27</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 4)</b>	<b>137</b>
<b>28</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma branco lipêmico</b>	<b>137</b>
<b>29</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma branco hemolisado</b>	<b>138</b>
<b>30</b>	<b>Cromatograma da análise do LIQ extraído</b>	<b>138</b>
<b>31</b>	<b>Cromatograma da análise do padrão interno extraído</b>	<b>138</b>
<b>32</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma contaminado com cafeína</b>	<b>139</b>
<b>33</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma contaminado com paracetamol</b>	<b>139</b>
<b>34</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma contaminado com dipirona</b>	<b>139</b>
<b>35</b>	<b>Cromatograma da análise do plasma contaminado com clorfeniramina</b>	<b>140</b>
<b>36</b>	<b>Curvas médias de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para os medicamentos teste e referência</b>	<b>165</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	<b>Antirretrovirais aprovados pelo FDA para tratamento do HIV</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>Antirretrovirais genéricos aprovados pelo FDA</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Resumos das condições cromatográficas e métodos de extração utilizados na quantificação de tenofovir no plasma disponíveis na literatura</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>Resumo das faixas de linearidade e padrões internos dos métodos encontrados na literatura para quantificação de tenofovir em plasma</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Soluções para construção da curva para avaliação da linearidade</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Soluções para construção da curva para avaliação do efeito matriz</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Experimento para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Variáveis analíticas e variações aplicadas para avaliação da robustez</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Combinação de variáveis para avaliação da robustez pelo método de Youden</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>Dados de recuperação aparente para avaliação da exatidão</b>	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,225 mg/mL</b>	<b>76</b>
<b>12</b>	<b>Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,300 mg/mL</b>	<b>76</b>
<b>13</b>	<b>Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,375 mg/mL</b>	<b>77</b>
<b>14</b>	<b>Resultados de recuperação média obtidos para cada grupo no ensaio de robustez</b>	<b>78</b>
<b>15</b>	<b>Efeito das variáveis analíticas no ensaio da robustez</b>	<b>79</b>
<b>16</b>	<b>Soluções para construção da curva para avaliação da linearidade</b>	<b>82</b>
<b>17</b>	<b>Soluções para construção da curva para avaliação do efeito matriz</b>	<b>84</b>
<b>18</b>	<b>Experimento para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação</b>	<b>86</b>
<b>19</b>	<b>Variáveis analíticas e variações aplicadas para avaliação da robustez</b>	<b>87</b>
<b>20</b>	<b>Combinação de variáveis para avaliação da robustez pelo método de Youden</b>	<b>88</b>
<b>21</b>	<b>Dados de recuperação aparente para avaliação da exatidão</b>	<b>94</b>
<b>22</b>	<b>Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,02475 mg/mL</b>	<b>94</b>
<b>23</b>	<b>Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,03300 mg/mL</b>	<b>95</b>
<b>24</b>	<b>Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,04125 mg/mL</b>	<b>95</b>
<b>25</b>	<b>Resultados de recuperação média obtidos para cada grupo no ensaio de robustez</b>	<b>97</b>
<b>26</b>	<b>Efeito das variáveis analíticas no ensaio da robustez</b>	<b>97</b>

27	Resultados obtidos para o teste de dissolução em equipamentos diferentes.	99
28	Critérios de aceitação do teste de dissolução	103
29	Resultados obtidos para a determinação de peso do lote 09080844 do produto candidato a similar/genérico	111
30	Resultado de dissolução com diferentes velocidades	114
31	Dados do perfil de dissolução comparativo para o medicamento teste	115
32	Dados do perfil de dissolução comparativo para o medicamento referência	115
33	Resultados obtidos no estudo de equivalência farmacêutica	118
34	Preparo das soluções padrão de calibração e das amostras de controle de qualidade	128
35	Condições experimentais do espectrômetro de massas	129
36	Resultados do experimento de avaliação do efeito matriz para o analito	140
37	Resultados do experimento de avaliação do efeito matriz para o padrão interno	141
38	Resultados de recuperação obtidos na extração do analito	142
39	Resultados de recuperação obtidos na extração do padrão interno	142
40	Resultados do experimento da precisão e da exatidão para o lote 1	144
41	Resultados do experimento da precisão e da exatidão para o lote 2	144
42	Resultados do experimento da precisão e da exatidão para o lote 3	145
43	Resultados inter-lotes	145
44	Valores teóricos para curva de calibração	145
45	Resultados obtidos para as curvas de calibração	146
46	Equações e coeficientes de correlação das curvas de calibração	146
47	Resultado da avaliação da estabilidade do analito em matriz	147
48	Resultado da avaliação da estabilidade do padrão interno em matriz	148
49	Resultados da avaliação da estabilidade do analito em solução	149
50	Resultado da avaliação da estabilidade do padrão interno em solução	149
51	Resultados da avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento	150
52	Resultados da avaliação da estabilidade de curta duração para o analito	151
53	Resultados da estabilidade pós-processamento do analito	151
54	Resultados da estabilidade pós-processamento do padrão interno	152
55	Resultados da estabilidade de longa duração para o analito	153
56	Lista de randomização	159
57	Cronograma de coletas e avaliação dos sinais vitais	161

<b>58</b>	<b>Concentrações plasmáticas médias, mínima e máxima, desvio padrão e CV (%)</b>	<b>163</b>
<b>59</b>	<b>Parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração do medicamento referência</b>	<b>165</b>
<b>60</b>	<b>Parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração do medicamento teste</b>	<b>166</b>
<b>61</b>	<b>Resultados da análise de variância para avaliação dos efeitos da formulação, do período e da sequência</b>	<b>169</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$  – microgramas

3TC – Lamivudina

$\text{ASC}_{0-t}$  – Área sobre a curva do tempo zero ao último ponto de coleta

$\text{ASC}_{0-\text{inf}}$  – Área sobre a curva do tempo zero até extrapolação ao infinito

Aids – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA – Análise de variância

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARV – Antirretrovirais

AUC – Área sobre a curva

AZT – Zidovudina

BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

CEDAFAR – Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico

CLAE/ CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

$C_{\text{max}}$  – Concentração máxima

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

DAD – Detector de arranjo de diodos

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

ECCD – Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

ECD – Estabilidade de curta duração

EPP – Estabilidade pós-processamento

FDA – Food and Drug Administration

FTC – Emtricitabina

Funed – Fundação Ezequiel Dias

h – hora(s)

HAART – Terapia antirretroviral de alta potência ou terapia antirretroviral combinada

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas

IP – Inibidor de Protease

LIQ – Limite inferior de quantificação

LSQ – Limite superior de quantificação

M – molar

mL – mililitro(s)

ng – nanogramas

ITRNNs – Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos

ITRNs – Inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos

MS – Ministério da Saúde

OMS/ WHO – Organização Mundial de Saúde

PIs – Inibidores da protease

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução

rpm – Rotações por minuto

SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SIV – Vírus da imunodeficiência símia

SQR – Substância química de referência

$T_{1/2}$  – Tempo de meia-vida

$T_{max}$  – Tempo para atingir  $C_{max}$

Temp. – Temperatura

TDF – Fumarato de tenofovir desopoxila

TEN – Tenofovir

UNAids – Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids

USP – United States Pharmacopeia

VR – Valor rotulado

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV - Ultravioleta



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	21
1 INTRODUÇÃO .....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 HIV e Aids .....	24
2.2 Terapia antirretroviral .....	28
2.3 Produção pública de antirretrovirais no Brasil .....	35
2.4 Tenofovir e seu pró-fármaco, fumarato de tenofovir desoproxila .....	36
2.5 Métodos analíticos para determinação de fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos .....	41
2.6 Métodos bioanalíticos para determinação de tenofovir no plasma.....	42
2.7 Validação de métodos analíticos e bioanalíticos.....	46
3 OBJETIVOS .....	48
3.1 Objetivo geral .....	48
3.2 Objetivos específicos .....	48
CAPÍTULO 2 .....	49
1 INTRODUÇÃO .....	50
1.1 Métodos analíticos para controle de qualidade do fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos.....	50
1.1.1 Instrumental.....	50
1.1.2 Reagentes .....	51
1.1.3 Materiais .....	51
1.1.4 Sustâncias de referência e amostras.....	52
1.1.5 Preparo do placebo .....	52
2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR E UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO .....	53
2.1 Condições experimentais .....	53
2.2 Preparo do diluente solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 (1000 mL) .....	53
2.3 Parâmetros e critérios de aceitação .....	54
2.3.1 Seletividade .....	54
2.3.2 Linearidade.....	57
2.3.3 Teste de efeito matriz .....	59

2.3.4	Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.....	61
2.3.5	Robustez .....	63
2.3.6	Estabilidade das soluções .....	64
2.4	Resultados e discussão .....	65
2.4.1	Seletividade .....	65
2.4.2	Linearidade.....	71
2.4.3	Teste de efeito matriz .....	73
2.4.4	Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.....	74
2.4.5	Robustez .....	78
2.4.6	Estabilidade das soluções .....	79
3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DA DISSOLUÇÃO.....	80
3.1	Condições experimentais .....	80
3.2	Preparo do meio de dissolução: HCl 0,1 M.....	80
3.3	Parâmetros e critérios de aceitação .....	81
3.3.1	Seletividade .....	81
3.3.2	Linearidade.....	82
3.3.3	Teste de efeito matriz .....	83
3.3.4	Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.....	85
3.3.5	Robustez .....	87
3.3.6	Estabilidade das soluções .....	88
3.3.7	Teste de dissolução.....	88
3.4	Resultados e discussão .....	89
3.4.1	Seletividade .....	89
3.4.2	Linearidade.....	90
3.4.3	Teste de efeito matriz .....	91
3.4.4	Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.....	93
3.4.5	Robustez .....	97
3.4.6	Estabilidade das soluções .....	98
3.4.7	Teste de dissolução.....	98
4	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NO CONTROLE DE QUALIDADE.....	100
4.1	Teste de identificação .....	100
4.1.1	Espectrometria de absorção no infravermelho .....	100
4.1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	100

4.2	Determinação de peso em formas farmacêuticas .....	100
4.3	Determinação de água .....	101
4.4	Teste de desintegração .....	101
4.5	Teste de dissolução .....	101
4.5.1	Condições experimentais .....	101
4.5.2	Preparo do meio de dissolução: HCl 0,1 M .....	101
4.5.3	Preparo da solução padrão .....	101
4.5.4	Preparo da solução problema.....	102
4.5.5	Leitura das amostras .....	102
4.5.6	Quantificação.....	102
4.5.7	Critério de aceitação.....	103
4.6	Teste de teor (doseamento) .....	103
4.6.1	Condições experimentais .....	103
4.6.2	Preparo do diluente solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 (1000 mL) .....	104
4.6.3	Preparo da solução padrão .....	104
4.6.4	Preparo da solução problema.....	104
4.6.5	Quantificação.....	105
4.6.6	Cálculo do teor de tenofovir .....	105
4.6.7	Critérios de aceitação .....	105
4.7	Teste de uniformidade de conteúdo .....	106
4.7.1	Preparo da solução problema.....	106
4.7.2	Cálculo da concentração do fármaco por dose unitária.....	106
4.7.3	Cálculo do desvio padrão relativo.....	107
4.7.4	Critério de aceitação.....	108
4.8	Resultados e discussão .....	108
4.8.1	Teste de identificação.....	108
4.8.2	Determinação de peso em formas farmacêuticas.....	111
4.8.3	Determinação de água .....	112
4.8.4	Teste de desintegração .....	112
4.8.5	Teste de dissolução.....	113
4.8.6	Teste de teor e uniformidade de conteúdo .....	116
4.8.7	Equivalência Farmacêutica.....	117
6	CONCLUSÕES .....	119

CAPÍTULO 3 .....	120
1 MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TENOFOVIR EM PLASMA.....	121
1.1 Instrumental .....	121
1.2 Reagentes.....	121
1.3 Materiais.....	121
1.4 Substâncias de referência.....	122
1.5 Desenvolvimento do método bioanalítico.....	122
1.6 Método bioanalítico .....	127
1.6.1 Preparo da solução de metanol 50%.....	127
1.6.2 Preparo da solução mãe de tenofovir .....	127
1.6.3 Preparo das soluções padrão de calibração e amostras de controle de qualidade.....	127
1.6.4 Preparo da solução mãe do padrão interno aciclovir.....	128
1.6.5 Preparo da fase móvel.....	128
1.6.6 Preparo da solução de ácido fosfórico 5% .....	129
1.6.7 Condições experimentais .....	129
1.6.8 Método de extração .....	130
1.7 Validação do método bioanalítico .....	130
1.7.1 Parâmetros e critérios de aceitação .....	130
1.7.2 Resultados e discussão.....	136
CAPÍTULO 4 .....	154
1 ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA/ BIODISPONIBILIDADE RELATIVA .....	155
1.1 Procedimento do estudo .....	155
1.2 Seleção dos voluntários .....	156
1.3 Administração dos medicamentos.....	157
1.4 Período de jejum e alimentação.....	158
1.5 Coleta das amostras .....	158
1.6 Processamento das amostras.....	160
1.7 Análise estatística .....	160
1.8 Resultados e discussão .....	162
1.8.1 Voluntários que concluíram o estudo.....	162
1.8.2 Eventos adversos durante o estudo .....	162
1.8.3 Desvios de coleta .....	163

1.8.4	Resultados das concentrações plasmáticas.....	163
1.8.5	Dados farmacocinéticos .....	165
1.8.6	Análise de variância.....	169
1.8.7	Intervalos de confiança.....	170
2	CONCLUSÕES.....	171
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	172
	ANEXO A – Concentrações plasmáticas individuais obtidas a partir do estudo de bioequivalência.....	184
	ANEXO B – Cópia do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP nº 331/2010.....	194

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O HIV, vírus da imunodeficiência humana, é um retrovírus que afeta o sistema imune das pessoas por ele infectadas devido à destruição de células brancas sanguíneas, denominadas células T. Na fase inicial da infecção pelo HIV os sintomas são similares aos de uma gripe (febre, calafrios, glândulas inchadas, entre outros) e ocorrem aproximadamente 2 (duas) semanas após a infecção. Depois da fase inicial, a maior parte das pessoas infectadas não apresenta sintomas durante muitos anos. Com a progressão da infecção, os portadores do vírus começam a apresentar sinais e sintomas de sistema imune debilitado, como aparecimento constante de doenças que refletem na perda da habilidade do organismo de lutar contra infecções (Sarcoma de Kaposi, herpes zoster, tuberculose, entre outras). A partir do momento em que o indivíduo desenvolve certas infecções oportunistas ou quando o sistema imune é suprimido abaixo de um limite específico (linfócitos T-CD4+ < 200 células/mL), as pessoas portadoras do HIV passam a ser diagnosticadas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) (CDC, 2008).

Embora as tendências globais indiquem um declínio geral de novas infecções pelo HIV nos últimos anos (principalmente devido à redução de novas infecções na África Subsaariana), estes números mascaram importantes diferenças geográficas no tamanho, tendências temporais e formas de transmissão da doença (DELPECH, 2009).

No Brasil, do início da epidemia, em 1980, até 2009, foram registrados aproximadamente 600 mil casos de Aids. Neste período, foram registradas aproximadamente 230 mil mortes em decorrência da doença, segundo dados da versão preliminar do Boletim Epidemiológico de 2010. Por ano, são notificados entre 33 e 35 mil novos casos de Aids no país. Dos casos de Aids acumulados de 1980 até 2009, a região Sudeste é a que tem o maior percentual (58%) do total de notificações, com 344.150 registros da doença. O Sul concentra 19,5% dos casos, com 115.598 notificações; o Nordeste, 12,5%, com 74.364; o Centro-Oeste, 5,7%, com 34.057; e a região Norte, 4,2%, com 24.745 casos (BRASIL, 2010a). Necessário considerar ainda a existência de subnotificação, fato relacionado ao preconceito associado à doença, à desarticulação entre os sistemas de informação em saúde e

ao próprio acesso da população aos serviços de saúde (GONÇALVES *et al*, 2008; RIQUE e SILVA, 2011).

Na história da pandemia do HIV, o Brasil foi pioneiro a criar um programa federal com distribuição gratuita do tratamento antirretroviral. O programa proporcionou melhoria da saúde dos pacientes e aumento da sobrevivência de dezenas de milhares de brasileiros e resultou ainda em uma economia estimada em 2,2 bilhões de dólares em custos de hospitalização entre 1996 e 2004 (OKIE, 2006).

Com relação ao tratamento antirretroviral, os consensos para adultos do Brasil e dos Estados Unidos recomendam como 1ª opção para a terapia inicial uma combinação de 3 (três) fármacos: 2 (dois) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) associados a 1 (um) inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN) (BRASIL, 2008; EUA, 2010).

Existem várias boas opções para a combinação de 2 (dois) ITRN nos regimes iniciais de tratamento. A combinação tenofovir-emtricitabina, particularmente formulada como dose fixa combinada de tenofovir-emtricitabina-efavirenz, apresenta a conveniência de ser preparada em apenas 1 (um) comprimido com 1 (uma) dose diária. Zidovudina-lamivudina é a associação mais utilizada entre as combinações de ITRN, mas requer administração duas vezes ao dia (GULICK, 2007).

Atualmente, os custos do tratamento com o tenofovir têm limitado sua utilização como terapia de primeira escolha nos países em desenvolvimento (HOUGHTON *et al*, 2010).

Como parte do cenário no enfrentamento da pandemia de HIV/Aids, a indústria farmacêutica ganha grande importância. O acesso aos antirretrovirais (ARV) remete aos custos que, por sua vez, remete à produção dos medicamentos e à indústria farmacêutica. A política brasileira de ARVs tem apresentado aspectos inovadores não somente por garantir a distribuição gratuita e universal dos medicamentos, mas também, por estimular a produção nacional de ARVs (GALVÃO, 2002).

A produção nacional do medicamento antirretroviral tenofovir requer o cumprimento da legislação vigente no país para registro de medicamentos genéricos ou similares (BRASIL, 2007a; BRASIL, 2007b). Entre os requisitos encontra-se a necessidade de realização de testes *in vitro* e *in vivo* para comprovação da qualidade e segurança. A realização de testes para controle de qualidade *in vitro* de



produtos farmacêuticos requer a utilização de métodos publicados em farmacopéias reconhecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), órgão regulatório nacional, e na ausência destes a utilização de métodos devidamente validados. A realização de estudos de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência também requer a utilização de método bioanalítico devidamente validado.

Até o início do presente trabalho, não foram encontradas monografias oficiais em farmacopéias reconhecidas pela Anvisa para aplicação no controle de qualidade de comprimidos contendo fumarato de tenofovir desoproxila.

Considerando a ausência de métodos oficiais para controle de qualidade de comprimidos contendo fumarato de tenofovir desoproxila e a necessidade de realização de estudos de bioequivalência para registro do produto de fabricação nacional, torna-se imprescindível o desenvolvimento e a validação de métodos aplicáveis.

Os estudos realizados neste trabalho foram utilizados no dossiê de registro do medicamento contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila na forma farmacêutica comprimido revestido, contribuindo para a incorporação nacional da produção deste antirretroviral, permitindo ao país maior autonomia para continuidade do programa de acesso gratuito ao tratamento antirretroviral, reduzindo os custos de aquisição e melhorando o acesso da população a este medicamento.

O registro do medicamento similar foi concedido pela Anvisa em 22 de novembro de 2010, Resolução RE nº 5.332 de 19 de novembro de 2010 e do medicamento genérico em 07 de fevereiro de 2011, Resolução RE nº 487, de 4 de fevereiro de 2011.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 HIV e Aids**

A história do HIV teve início ainda na década de 1930 na África Subsaariana. Em 1959, cientistas isolaram um vírus em uma mulher da República Democrática do Congo. Acreditava-se que este vírus, que era geneticamente similar ao HIV-1 e que foi chamado SIV (vírus da imunodeficiência símia), havia migrado dos chimpanzés

para os humanos quando caçadores foram expostos ao sangue infectado. Através do sequenciamento genético, cientistas isolaram posteriormente o HIV-1, grupo M, subtipo B nos primeiros pacientes haitianos com HIV. De acordo com estes relatos, este vírus se originou na África Central na década de 1930 e chegou ao Haiti em 1966, quando profissionais haitianos retornaram do trabalho na recente independente Congo. Depois de circular pelo Haiti, o vírus se diversificou antes de migrar para os Estados Unidos por volta de 1969. O vírus continuou se diversificando e circulando pela população homossexual dos Estados Unidos até 1981, quando a Aids foi reconhecida (GILBERT *et al*, 2007).

O HIV é derivado da família dos vírus *retroviridae* e é um membro do gênero *lentivirus*. Duas espécies deste retrovírus são conhecidas na infecção de humanos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1, originado dos chimpanzés, é mais virulento que o HIV-2 e é responsável pela maior parte das infecções pelo HIV. O HIV-2, originado do macaco Sooty Mangabay, é menos virulento e está mais restrito à África Ocidental. O HIV-1 pode ser subdividido em 4 (quatro) grupos principais: M (90% das infecções pelo HIV-1), N (grupo raro descoberto em Camarões em 1998), O (grupo restrito ao centro-oeste da África ) e P (descoberto em 2009 em uma mulher de Camarões, cepa nova estreitamente relacionada com o vírus da imunodeficiência simiana de gorilas). Para o grupo M são conhecidos pelo menos 9 (nove) subtipos geneticamente distintos: A, B, C, D, F, G, H, J e K (AVERT, 2010).

Numerosos subtipos do HIV-1 e formas recombinantes circulantes compõem o complexo mosaico da pandemia do HIV-1. A alta taxa de replicação viral, a baixa fidelidade da transcriptase reversa e a habilidade de recombinar levou à diversidade genética do HIV, que foi caracterizado em subtipos. Uma análise realizada em 2004 de 23.874 amostras de indivíduos infectados pela HIV de 70 países mostrou que em termos de diversidade viral, o subtipo C do vírus foi dominante, sendo responsável por metade de todas as infecções pelo HIV-1 ao redor do mundo, enquanto os subtipos A, B, D e G são responsáveis por 12%, 10%, 3% e 6% respectivamente. Formas recombinantes circulantes são responsáveis por 18% das infecções mundiais. O subtipo C é predominante na África e na Ásia, enquanto o subtipo B é o mais comum na Europa e nas Américas. Na América Latina, subtipo B foi responsável por 74% dos casos (HEMELAAR *et al*, 2006). Embora incomum,

existem relatos de co-infecção, que indica que indivíduos podem ser infectados por mais de um subtipo (KARIM *et al*, 2007).

Os vírus HIV-1 e HIV-2 são relativamente diferentes, sendo sua seqüência de ácidos nucléicos apenas cerca de 40% homóloga. Nenhum SIV causa imunodeficiência em seu hospedeiro primata nativo, porém ambos HIV-1 e HIV-2 são patogênicos em humanos. O HIV-1 foi identificado pela primeira vez em 1983 e o HIV-2 em 1985. Ambos os vírus infectam células CD4+ da linhagem dos linfócitos e fagócitos mononucleares e causam Aids, porém o HIV-2 é menos virulento, tem menor transmissão vertical e tem uma prevalência bem menor (LEVER, 2009). A infecção pelo HIV-2 difere do HIV-1 por vários motivos que incluem o fato do HIV-2 ser naturalmente resistente aos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNNs), além das pessoas infectadas possuírem cargas virais mais baixas, declínio mais lento de CD4 e progressão à Aids 12 vezes mais lenta (LEWTHWAITE e WILKINS, 2009).

Uma vez ocorrida a exposição ao HIV, o vírus infecta células T auxiliares e se replica no sangue periférico e nos órgãos linfóides. O sistema imune responde gerando linfócitos T citotóxicos que reconhecem e matam as partículas virais. A invasão inicial e a viremia podem ser inicialmente confundidas com uma gripe leve, mas depois, devido à reduzida viremia resultante da ação dos linfócitos T citotóxicos, ocorre uma fase de latência clínica, assintomática que pode durar por anos. Infelizmente, o sistema imune se deteriora com o aumento da viremia, com desenvolvimento de sintomas e levando conseqüentemente a Aids. A Aids é diagnosticada quando a contagem CD4+CD3- cai abaixo de 200 células/mL ou quando uma das condições definidoras da Aids ocorre (BENTON, 2010).

O aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias é definidor da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Entre as infecções oportunistas destacam-se: pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (antigamente *P. carinii*), toxoplasmose do sistema nervoso central, tuberculose pulmonar atípica ou disseminada, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus. As neoplasias mais comuns são: sarcoma de Kaposi, linfomas não-Hodgkin e o câncer de colo uterino em mulheres jovens. Nessas situações, a contagem de linfócitos T-CD4+ está, na maioria das vezes, abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2008).

De acordo com último boletim do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids da Organização Mundial de Saúde (UNAids/ OMS), o número de pessoas vivendo com HIV no mundo cresceu em 2008, atingindo uma estimativa de 33,4 milhões (31,1 a 35,8 milhões) de pessoas. O total de pessoas vivendo com o vírus em 2008 foi superior a 20% do que se observava em 2000 e a prevalência foi cerca de 3 (três) vezes superior em comparação com os dados de 1990. O aumento contínuo da população de pessoas vivendo com HIV reflete uma combinação das taxas de novas infecções e o efeito benéfico da terapia antirretroviral. Em 2008, ocorreu um número estimado de 2,7 milhões de novas infecções pelo HIV no mundo. O número de mortes devido à Aids e condições relacionadas em 2008 foi estimado em 2 milhões (WHO, 2009a).

As estimativas para a América Latina sugerem que em 2008 aproximadamente 2 milhões de pessoas viviam com HIV e em 2008 ocorreram 170.000 novas infecções. Em 2008, estima-se ainda que 77.000 pessoas foram a óbito em decorrência da Aids (WHO, 2009a).

No Brasil, dos 5.564 municípios, 87,5% (4.867 municípios) registram pelo menos um caso da doença. Os grandes centros urbanos do país, onde estão concentrados 52% dos casos de Aids, registraram queda de 15% na taxa de incidência da doença entre 1997 e 2007. Nesse mesmo período, a incidência nos municípios com menos de 50 mil habitantes dobrou, revelando que a epidemia caminhou para o interior do país. Em 1997, a taxa nas cidades com menos de 50 mil habitantes era cerca de 8 (oito) vezes menor do que a registrada nas cidades com mais de 500 mil pessoas. Em 2007, essa relação caiu para 3 (três) vezes. A razão de sexo (número de casos em homens dividido por número de casos em mulheres) no Brasil diminuiu consideravelmente do início da epidemia para os dias atuais. Em 1986, a razão era de 15 casos de Aids em homens para cada caso em mulheres. A partir de 2003, a cada 15 casos em homens passaram a existir 10 em mulheres. Chama atenção a análise da razão de sexo em jovens de 13 a 19 anos, nessa faixa etária o número de casos de Aids é maior entre as meninas. A inversão vem desde 1998, com 8 casos em meninos para cada 10 casos em meninas (BRASIL, 2010b).

Importantes progressos foram alcançados na prevenção de novas infecções pelo HIV e na redução do número anual de mortes relacionadas à Aids. Porém, o número de pessoas vivendo com HIV continua crescendo, reflexo das taxas ainda

altas de aparecimento de novas infecções e dos impactos positivos da terapia antirretroviral. Doenças relacionadas à Aids continuam sendo uma das principais causas de morte no mundo e a tendência é que permaneçam como uma significativa causa de mortalidade prematura nas próximas décadas (WHO, 2009a).

Até o momento, não existe vacina disponível capaz de proteger contra a infecção pelo HIV. Entretanto, existem fármacos antirretrovirais capazes de reduzir a carga do HIV e retardar a progressão da infecção pelo HIV à Aids, podendo prolongar a expectativa de vida das pessoas infectadas. Além disso, a utilização de regimes de antirretrovirais adequados e no momento correto pode reduzir drasticamente a probabilidade de transmissão vertical do HIV de mães infectadas para os recém-nascidos e a transmissão relacionada à exposição ocupacional (CDC, 2008).

## **2.2 Terapia antirretroviral**

Os primeiros fármacos utilizados no tratamento antirretroviral foram os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) na forma de dideoxynucleosídeos. A descoberta das amplas propriedades antirretrovirais de uma série de 2,3-dideoxynucleosídeos, dos quais o mais proeminente era a zidovudina (AZT, 3-azido-2,3-dideoximidina), mostrou que o tratamento do HIV-1 era possível. Os primeiros agentes ainda exercem um papel importante como integrantes das combinações da terapia antirretroviral, no entanto, o importante é que eles quebraram a barreira crítica e iluminaram o caminho para o surgimento de outros fármacos. A eficácia clínica de fármacos isolados ao longo do tempo é limitada pela resistência devido a mutações nos alvos dos fármacos (BRODER, 2010). O primeiro fármaco anti-HIV, zidovudina, foi licenciado para uso clínico em 1987 (DE CLERCQ, 2009).

O vírus HIV apresenta uma elevada taxa de erros durante sua replicação, o que geram freqüentes mutações, levando à ocorrência de resistência à terapia. Desta forma, várias classes de medicamentos antirretrovirais têm sido desenvolvidas para o combate do vírus HIV em diferentes estágios de seu ciclo de vida. Entre as classes de antirretrovirais encontram-se os inibidores de fusão/ entrada, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos, nucleosídeos e não-

nucleosídeos, inibidores da integrase e inibidores de protease. Os principais objetivos da terapia antirretroviral incluem a redução da morbidade associada ao HIV e aumento da sobrevivência, melhora da qualidade de vida, restauração e preservação da função imunológica, supressão máxima da carga viral e prevenção da transmissão vertical (HALLIGAN *et al*, 2009).

Em 2008, o arsenal de fármacos utilizados na terapia anti-HIV cresceu para um total de 25 fármacos licenciados pelo Food and Drug Administration (FDA) em um período de 25 anos após a descoberta do HIV; sete inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (zidovudina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir e emtricitabina), um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (fumarato de tenofovir desoproxila), quatro inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (nevirapina, efavirenz, delavirdina, etravirina), dez inibidores de protease (saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir e darunavir), um inibidor da fusão/entrada (enfuvirtida), um inibidor de co-receptor (maraviroc) e um inibidor da integrase (raltegravir). Embora licenciados, nem todos os fármacos citados são utilizados com a mesma frequência, por exemplo, a zalcitabina e delavirdina não são mais usadas e nem se encontram disponíveis (DE CLERCQ, 2010).

Na tabela 1 estão citados os antirretrovirais aprovados pelo FDA para tratamento da infecção pelo HIV, constando nome de marca, nome do fabricante e data de licenciamento.

**Tabela 1 – Antirretrovirais aprovados pelo FDA para tratamento do HIV**

<b>Nome comercial</b>	<b>Nome genérico</b>	<b>Nome do fabricante</b>	<b>Data de licenciamento</b>
Atripla	efavirenz, emtricitabina e fumarato de tenofovir desoproxila	Bristol-Myers Squibb and Gilead Sciences	12-Jul-06
Combivir	lamivudina e zidovudina	GlaxoSmithKline	27-Set-97
Emtriva	emtricitabina	Gilead Sciences	02-Jul-03
Epivir	lamivudina	GlaxoSmithKline	17-Nov-95

**Tabela 1 (continuação)**

<b>Nome comercial</b>	<b>Nome genérico</b>	<b>Nome do fabricante</b>	<b>Data de licenciamento</b>
Epzicom	abacavir e lamivudina	GlaxoSmithKline	02-Ago-04
Hivid	zalcitabina (não mais comercializado)	Hoffmann- La Roche	19-Jun-92
Retrovir	zidovudina	GlaxoSmithKline	19-Mar-87
Trizivir	abacavir, zidovudina e lamivudina	GlaxoSmithKline	14-Nov-00
Truvada	fumarato de tenofovir desoproxila e emtricitabina	Gilead Sciences, Inc.	02-Ago-04
Videx EC	didanosina com revestimento entérico	Bristol Myers-Squibb	31-Out-00
Videx	didanosina	Bristol Myers-Squibb	09-Out-91
Viread	fumarato de tenofovir desoproxila	Gilead	26-Out-01
Zerit	estavudina	Bristol Myers-Squibb	24-Jun-94
Ziagen	sulfato de abacavir	GlaxoSmithKline	17-Dez-98
Intelence	etravirina	Tibotec Therapeutics	18-Jan-08
Rescriptor	delavirdina	Pfizer	04-Apr-97
Sustiva	efavirenz	Bristol Myers-Squibb	17-Set-98
Viramune	nevirapina	Boehringer Ingelheim	21-Jun-96
Agenerase	amprenavir	GlaxoSmithKline	15-Apr-99
Aptivus	tipranavir	Boehringer Ingelheim	22-Jun-05
Crixivan	indinavir	Merck	13-Mar-96
Fortovase	saquinavir (não mais comercializado)	Hoffmann- La Roche	07-Nov-97
Invirase	mesilato de saquinavir	Hoffmann- La Roche	06-Dez-95
Kaletra	lopinavir e ritonavir	Abbott Laboratories	15-Set-00
Lexiva	fosamprenavir cálcico	GlaxoSmithKline	20-Out-03
Norvir	ritonavir	Abbott Laboratories	01-Mar-96
Prezista	darunavir	Tibotec, Inc.	23-Jun-06
Reyataz	sulfato de atazanavir	Bristol-Myers Squibb	20-Jun-03
Viracept	mesilato de nelfinavir	Agouron Pharmaceuticals	14-Mar-97

**Tabela 1 (conclusão)**

<b>Nome comercial</b>	<b>Nome genérico</b>	<b>Nome do fabricante</b>	<b>Data de licenciamento</b>
Fuzeon	enfuvirtide	Hoffmann-La Roche & Trimeris	13-Mar-03
Selzentry	maraviroc	Pfizer	06-Ago-07
Isentress	raltegravir	Merck & Co., Inc.	12-Out-07

Fonte: FDA, 2010.

Na tabela 2 estão citados os antirretrovirais genéricos aprovados pela FDA para tratamento da infecção pelo HIV, constando nome genérico, nome do fabricante, data de licenciamento.

**Tabela 2 – Antirretrovirais genéricos aprovados pelo FDA.**

<b>Nome genérico</b>	<b>Nome do fabricante</b>	<b>Data licenciamento</b>
didanosina cápsula de liberação prolongada, 125 mg, 200 mg, 250 mg, e 400 mg	Matrix Laboratories Limited	06-Abr-10
didanosina cápsula de liberação prolongada, 125 mg, 200 mg, 250 mg, e 400 mg	Aurobindo Pharma Limited	24-Set-08
didanosina para solução oral (pó pediátrico), 10 mg/mL	Aurobindo Pharma Limited	08-Mar-07
didanosina cápsula de liberação prolongada, 125 mg, 200 mg, 250 mg, e 400 mg	Barr Laboratories, Inc.	03-Dez-04
estavudina para solução oral, 1 mg/mL	Aurobindo Pharma Limited	29-Dez-08
estavudina cápsulas (15 mg, 20 mg, 30 mg, e 40 mg)	Aurobindo Pharma Limited	29-Dez-08
estavudina cápsulas (15 mg, 20 mg, 30 mg, e 40 mg)	Hetero Drugs Limited	29-Dez-08
zidovudina injeção USP, 10 mg/mL	PharmaForce Inc.	06-Maio-10
zidovudina 60 mg comprimidos para dosagem pediátrica	Aurobindo Pharma Limited	23-Jul-09
zidovudina solução oral USP, 50 mg/5 mL	Cipla Limited	26-Jun-08
zidovudina (300 mg comprimido)	Matrix Laboratories, Inc.	14-Fev-08
zidovudina (100 mg cápsula)	Cipla Limited	23-Maio-07
zidovudina (100 mg cápsula)	Aurobindo Pharma LTD.	27-Mar-06



**Tabela 2 (conclusão)**

<b>Nome genérico</b>	<b>Nome do fabricante</b>	<b>Data licenciamento</b>
zidovudina (300 mg comprimido)	Aurobindo Pharma Limited	19-Set-05
zidovudina solução oral USP, 50 mg/5 mL	Aurobindo Pharma Limited	19-Set-05
zidovudina (300 mg comprimido)	Ranbaxy Laboratories Limited	19-Set-05
zidovudina (300 mg comprimido)	Roxane Laboratories	19-Set-05

Fonte: FDA, 2010.

A terapia antirretroviral de alta potência ou terapia antirretroviral combinada (HAART) se refere à utilização de fármacos antirretrovirais em combinações múltiplas para tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1) e está associada a uma melhora significativa da qualidade de vida das pessoas infectadas. Entretanto, existe uma série de desafios na tentativa de otimizar os benefícios da terapia antirretroviral para os pacientes, incluindo toxicidade relacionada aos fármacos, recuperação parcial das funções imunológicas em indivíduos que já haviam desenvolvido Aids, aparecimento de diversos tipos de câncer como consequência do prolongamento da sobrevida e da síndrome inflamatória da reconstituição imune, além do aumento do custo da terapia. Em particular, a resistência do HIV aos fármacos se tornou o maior obstáculo no controle da infecção pelo HIV-1. Além disso, as taxas alarmantes de transmissão de variantes do HIV-1 resistentes aos fármacos na infecção primária se tornou um grave problema. Desta forma, a identificação de novas classes de antirretrovirais, com mecanismos únicos de ação, com mínimos efeitos adversos e que não permita ou retarde a emergência de variantes resistentes continua sendo o principal desafio para a terapia antirretroviral (MAEDA e MITSUYA, 2001).

Estima-se que no final de 2008, 4.030.000 pessoas estavam recebendo terapia antirretroviral no mundo, 1 (um) milhão de pessoas a mais que em 2007, o que representa um aumento de 36% em 1 (um) ano. Entre 2003 e 2008, o acesso aos antirretrovirais em países de baixa e média renda cresceu 10 (dez) vezes, demonstrando um expressivo aumento no acesso ao tratamento antirretroviral em locais com recursos limitados (WHO, 2009b).

Em países desenvolvidos onde os antirretrovirais já estão amplamente disponíveis, o acesso ao tratamento teve um impacto extraordinário na mortalidade relacionada ao HIV. Em um estudo multicêntrico em 12 países desenvolvidos, a razão da mortalidade entre pessoas vivendo com HIV em comparação com a população não infectada caiu 85% após a introdução da terapia antirretroviral combinada (BHASKARAN *et al*, 2008). O declínio acentuado do número de mortes relacionadas à Aids como consequência dos avanços no tratamento, tem contribuído para um aumento na prevalência de HIV em países desenvolvidos (CDC, 2008).

No Brasil, onde os antirretrovirais estão disponíveis gratuitamente desde 1996, a sobrevida média após o diagnóstico da Aids no Estado de São Paulo subiu de quatro meses, em 1992-1995 para 50 meses em 1998-2001 (KILSZTAJN *et al*, 2007).

De acordo com dados atualizados até junho de 2009, no Brasil, 190 mil pacientes HIV positivo estão em tratamento ARV e quase 35 mil pacientes iniciaram a terapia em 2008. Dentre esses pacientes que iniciaram o tratamento em 2008, 98,7% continuavam em tratamento após 12 meses do início (BRASIL, 2009b).

Aproximadamente 2,9 milhões de vidas foram salvas pelo acesso ao tratamento antirretroviral, sendo até 2004 a maior parte concentrada em países desenvolvidos. O número de anos de vida ganhos é a melhor medida do impacto do tratamento, pois facilita a comparação entre programas e permite a avaliação do custo-efetividade. Um número estimado de 11,7 milhões de anos de vida foram ganhos mundialmente entre 1996 e 2008 como resultado da terapia antirretroviral. Estima-se que este número cresça rapidamente nos próximos anos considerando que os programas de combate ao HIV continuem a se expandir na taxa atual (WHO, 2009a).

Os guias atuais disponíveis nos Estados Unidos recomendam o tratamento inicial da infecção pelo HIV em pacientes que ainda não realizaram tratamento com uma combinação de fármacos antirretrovirais que consiste em (EUA, 2009):

- dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (2-ITRN) concomitante com um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN)

- dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (2-ITRN) concomitante com um inibidor de protease (IP) de preferência com ritonavir para reforçar as concentrações plasmáticas do inibidor de protease
- dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (2-ITRN) concomitante com um inibidor de integrase.

As combinações recomendadas são:

- Efavirenz + tenofovir + emtricitabina
- Ritonavir/atazanavir + tenofovir + emtricitabina
- Ritonavir/darunavir + tenofovir + emtricitabina
- Raltegravir + tenofovir + emtricitabina (EUA, 2009)

De acordo com a versão mais atual divulgada pelo Ministério da Saúde (MS) das recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV, a terapia inicial deve sempre incluir combinações de três fármacos: dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) associados a um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN) ou a um inibidor da protease reforçado com ritonavir (IP/r). Sendo o esquema preferencial para a terapia inicial a combinação de 2 ITRN + ITRNN e o esquema alternativo a combinação de 2 ITRN + IP/r. A associação zidovudina/ lamivudina (AZT/3TC) é a dupla de ITRN de primeira escolha para compor o esquema antirretroviral inicial. Nos casos de intolerância ao AZT, a didanosina entérica ou o fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) são alternativas para substituí-lo, sempre combinados com a lamivudina. Quanto à escolha dos ITRNN, o efavirenz continua sendo preferencial a nevirapina, exceto em gestantes. Caso a escolha da terapia inicial envolva um esquema composto por um inibidor da protease, o lopinavir/ritonavir deve ser o IP/r preferencial (BRASIL, 2008).

Importante destacar que o tenofovir é um dos fármacos de primeira escolha no guia para tratamento nos Estados Unidos. No Brasil, a utilização do tenofovir ainda é limitada principalmente pelos altos custos do tratamento, considerando que não existe produção nacional deste antirretroviral.

Na co-infecção HIV/HBV (vírus da hepatite B), quando indicada terapia antirretroviral, esta deve incluir tenofovir (TDF) associado a lamivudina como dupla de nucleosídeos (ITRN), estando ou não indicado tratar o HBV (BRASIL, 2008).

## **2.3 Produção pública de antirretrovirais no Brasil**

O acesso universal e gratuito aos medicamentos antirretrovirais é política prioritária do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais desde 1996. No Brasil, aproximadamente 190 mil pacientes fazem tratamento com 19 medicamentos antirretrovirais distribuídos pelo Sistema Único de Saúde.

O Brasil fabrica medicamentos antirretrovirais desde 1993. Começou com a zidovudina, também chamada de AZT. Hoje, o Brasil tem condições de produzir nove antirretrovirais: zidovudina (comprimido de 100mg, soluções oral e injetável), didanosina (comprimidos de 100mg, 25mg e pó para preparação extemporânea); associação zidovudina e lamivudina (comprimido de 300mg + 150mg), lamivudina (comprimido de 150mg e solução oral); estavudina (comprimido de 40mg e 30mg e pó para solução oral); indinavir (comprimido de 400mg); nevirapina (comprimido de 200mg); ritonavir (comprimido de 100mg) e efavirenz (comprimido de 600mg). Em maio de 2010, o Ministério da Saúde anunciou a previsão do início da produção nacional do tenofovir (BRASIL, 2010c).

Atualmente, são adquiridas 32 apresentações de medicamentos, das quais 13 nacionais e 19 importadas. Esse último grupo corresponde a 72% do gasto total do Ministério da Saúde (MS) na compra de medicamentos antirretrovirais (BRASIL, 2010d).

Entre as ações previstas no Programa Mais Saúde (PAC Saúde) está o fortalecimento do Complexo Industrial da Saúde, tendo como uma de suas medidas o investimento na rede de Laboratórios Oficiais de medicamentos, estruturando a produção pública e a transferência de tecnologia de farmoquímicos estratégicos para o país, incluindo a nacionalização de antirretrovirais. Para alcançar este objetivo estão sendo firmadas algumas parcerias público-privadas, para melhorar o suprimento nacional de fármacos e medicamentos e, conseqüentemente, reduzir a dependência externa (BRASIL, 2009a).

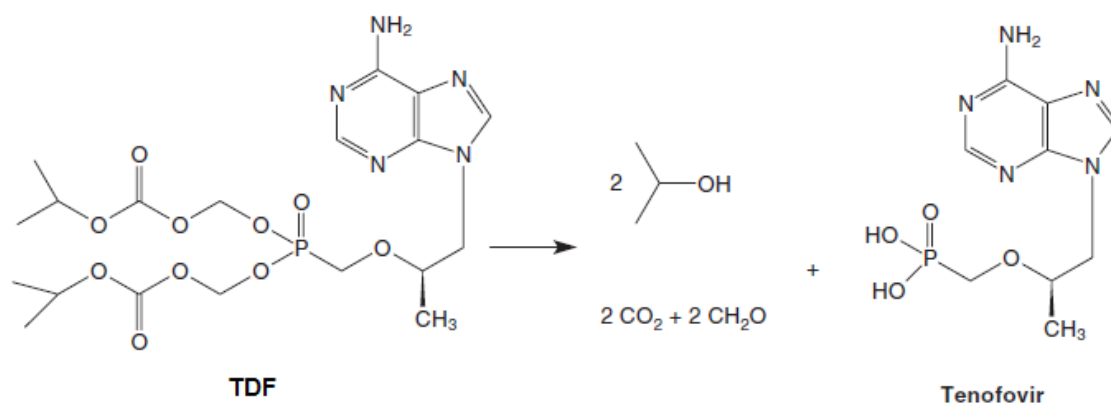
Dentre estas parcerias, destacam-se as parcerias firmadas em 2009 pela Fundação Ezequiel Dias (Funed) e pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) com empresas do setor privado, para fabricação nacional do medicamento tenofovir.

## 2.4 Tenofovir e seu pró-fármaco, fumarato de tenofovir desoproxila

O tenofovir (TEN; 1-(6-aminopurin-9-il) propan-2-iloximetilfosfonico ácido) pertence à classe dos antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos. Quimicamente, o tenofovir é um análogo da adenosina 5'-monofosfato (DELAHUNTY *et al*, 2006). É o primeiro inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo aprovado para utilização no tratamento da infecção pelo HIV. Diferente dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos que precisam passar por três etapas de fosforilação intracelular para se tornarem ativos, os análogos de nucleotídeos como o tenofovir só precisam passar por duas etapas. Esta redução de uma etapa de fosforilação torna o processo de conversão ao metabólito farmacologicamente ativo mais rápido e mais completo (GOMES *et al*, 2008). A reação de fosforilação inicial é uma etapa limitante para os análogos de nucleosídeos (BENNETTO-HOOD *et al*, 2007).

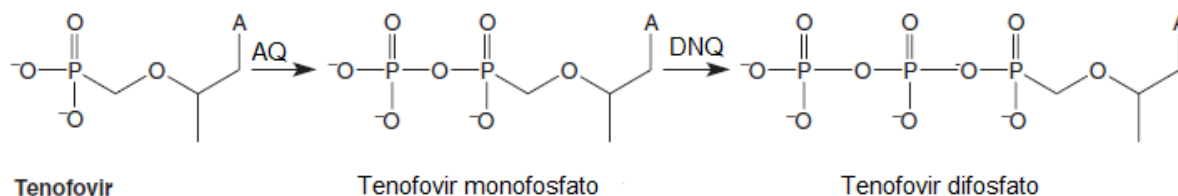
Estudos demonstraram que o tenofovir é um potente antiviral com uma meia-vida intracelular prolongada, porém, sua baixa biodisponibilidade apresentou uma limitação ao seu desenvolvimento. A adição de dois ésteres alquil metil carbonato melhoraram a estabilidade, a absorção intestinal e a biodisponibilidade oral do tenofovir, permitindo sua formulação como um comprimido para administração oral (KEARNEY *et al*, 2004). O tenofovir é administrado como um pró-fármaco na forma de fumarato de tenofovir desoproxila. Esta formulação de pró-fármaco aumentou a lipofilicidade do fármaco de  $\log P = -2,5$  para  $\log P = 1,3$ , melhorando sua capacidade de atravessar a membrana intestinal (PALOMBO *et al*, 2009). Após a administração oral, o pró-fármaco sofre hidrólise mediada por esterases, que removem os dois grupos ester como ilustrado na figura 1, gerando o tenofovir. O tenofovir penetra nas células e sofre fosforilação pela adenilato quinase (AQ) gerando um intermediário monofosfatado que é rapidamente convertido pela difosfato nucleosídeo quinase (DNQ) a sua forma ativa bifosfatada, conforme apresentado na figura 2. O tenofovir difosfato atua como um inibidor competitivo da transcriptase reversa do HIV-1, competindo com o substrato natural deoxiadenosina 5'-trifosfato pelo sítio ativo de ligação na transcriptase reversa viral (DNA polimerase viral). A incorporação do tenofovir difosfato no DNA viral resulta na terminação da

cadeia, uma vez que no tenofovir difosfato falta o grupamento hidroxil na posição 3', que seria o ponto de ligação do próximo deoxiribonucleosídeo trifosfato. Desta forma, a transcrição reversa, etapa chave para a proliferação viral, é inibida (FUNG *et al*, 2002; KEARNEY *et al*, 2004; BENNETTO-HOOD *et al*, 2007).



**Figura 1 – Conversão do fumarato de tenofovir desopoxila (TDF) a tenofovir.**

Fonte: KEARNEY *et al*, 2004



**Figura 2 – Conversão do tenofovir a tenofovir difosfato.**

Fonte: Adaptada de KEARNEY *et al*, 2004

O tenofovir tem a capacidade de ser metabolizado por células em repouso e pode atingir uma concentração duas vezes maior em monócitos periféricos em repouso em relação a monócitos ativos (ROBBINS *et al*, 1998). O acúmulo do fármaco em células em repouso significa que o tenofovir tem a capacidade de inibir o HIV em células latentes, característica ausente nos ITRNs desenvolvidos anteriormente como zidovudina ou estavudina (KEARNEY *et al*, 2004).

Em um estudo clínico fase I/II, 49 pacientes infectados pelo HIV (8 mulheres e 41 homens) foram distribuídos em 4 coortes entre 6 de maio de 1997 e 18 de maio de 1999: 15 na coorte de 75 mg, 10 na coorte de 150 mg, 11 na coorte de 300 mg e

13 na coorte de 600 mg). Trinta e oito pacientes receberam o TDF, 12 receberam comprimidos contendo 75 mg, 8 receberam comprimidos de 150 mg, 11 comprimidos de 300 mg e 13 de 600 mg. Os 11 pacientes restantes receberam placebo. Os resultados demonstraram que a concentração máxima foi proporcional à dose. O tempo necessário para atingir as concentrações máximas foram similares para todas as doses em jejum (0,5 a 1 hora), sendo aumentado para 0,5 a 2,2 horas quando o fármaco é administrado com alimentação. Os parâmetros farmacocinéticos médios no estado de equilíbrio foram calculados no 15º dia (e no 35º dia para as dosagens de 300 mg e 600 mg) e foram lineares à dose para todos os grupos. A biodisponibilidade oral para as doses de 300 mg e 600 mg foram estimadas em 25% e 21%, respectivamente, em jejum e 39% e 34%, respectivamente, no estado alimentado. A concentração máxima ( $C_{max}$ ) e a área sobre a curva (ASC) médios em estado de equilíbrio foi de 326 ng/mL e 3020 ng x h/mL, respectivamente em pacientes infectados pelo HIV que recebiam 300 mg/dia de tenofovir com alimentação por 28 dias. Nas coortes que recebiam doses de 300 mg e 600 mg, após atingida  $C_{max}$ , a concentração de tenofovir no soro decaiu de forma bifásica, com meia-vida terminal entre 12 e 15 horas (BARDITCH-CROVO *et al*, 2001).

Após administração, com ou sem alimentação, o TDF é rapidamente absorvido e eliminado inalterado na urina por processos de filtração glomerular e secreção ativa. O TDF é administrado em combinação com outros fármacos antirretrovirais, possui algumas vantagens em relação aos análogos de nucleosídeos, incluindo sua longa meia-vida plasmática (17 h) e meia-vida intracelular (>60h) o que permite sua administração apenas 1 vez ao dia (KEARNEY *et al*, 2004). Além disso, o fármaco apresenta um perfil mais favorável em relação à resistência mantendo sua atividade *in vitro* contra uma variedade de cepas do HIV resistentes a outros fármacos. Desta forma, ele é bastante útil no tratamento de pacientes infectados com cepas resistentes a ITRNs (BENNETTO-HOOD *et al*, 2007).

Acredita-se que o tenofovir penetre nas células por um processo passivo de endocitose e aparentemente não estão envolvidos processos saturáveis ou relacionados a transportadores. As informações disponíveis não indicam ocorrência de transporte ativo do tenofovir ou seus anabólitos, incluindo glicoproteína P, proteínas de resistência multidrogas 1 (MRP1), transportadores de cátions orgânicos

ou transportadores de nucleosídeos por concentração ou equilíbrio. Este fármaco é substrato para os transportadores de anions orgânicos 1 e 3 localizados nos túbulos renais proximais, sendo estes transportadores os prováveis responsáveis pela secreção tubular na urina. Estudos *in vivo* não demonstraram alterações significativas nos parâmetros farmacocinéticos do tenofovir resultantes de interações em transportadores (KEARNEY *et al*, 2004).

A ligação do tenofovir a proteínas plasmáticas é baixa, sendo menor que 1% no plasma e menor que 7,2% no soro. A extensão da ligação não é dependente da concentração (KEARNEY *et al*, 2004; KAKUDA *et al*, 2009).

O tenofovir não é um substrato do citocromo P450 e não é metabolizado pelo fígado (KAKUDA *et al*, 2009; GAGNIEU *et al*, 2008).

O tenofovir é amplamente distribuído através do organismo com distribuição do estado de equilíbrio atingindo aproximadamente 1,3 L/kg a partir de uma dose intravenosa. A ampla distribuição deste fármaco através do organismo e tecidos pode ser atribuída à sua natureza polar. Apesar de seu amplo volume de distribuição, ele não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e embora a penetração na barreira hematoencefálica (BHE) seja limitada, o tenofovir tem a capacidade de passar pela barreira do fluido cérebro-espinhal do plexo corióide garantindo acesso aos macrófagos perivasculares e meníngeos (ANTHONY PILLAI *et al*, 2006; PALOMBO *et al*, 2009).

Testes *in vitro* com altas doses de tenofovir em uma variedade de células humanas não demonstraram redução no DNA mitocondrial, nenhum efeito na expressão celular das proteínas mitocondriais da cadeia respiratória citocromo oxidase C (COX) II ou COX IV e o aumento do ácido láctico celular foi <10% do observado após exposição à zidovudina. Em modelos animais, a exposição ao fármaco não foi associada à redução do conteúdo do DNA mitocondrial ou atividades das enzimas. A seleção de antirretrovirais com menor propensão à toxicidade mitocondrial para uso na prevenção à transmissão vertical é uma vantagem, considerando que não ocorre aumento na toxicidade relacionada a outros eventos para a mãe e sua criança. O tenofovir atravessa a placenta de mulheres grávidas em tratamento antirretroviral, atingindo uma razão entre sangue maternal: sangue do cordão de aproximadamente 0,65:1. A administração de uma dose única de 600 mg de TDF em mulheres grávidas infectadas pelo HIV-1 após 34 semanas



de gestação leva a uma concentração de tenofovir que é similar à concentração encontrada em pacientes que recebem por longos períodos a terapia com 300 mg do fármaco uma vez ao dia, sendo a concentração média de tenofovir no sangue do cordão umbilical 65% da concentração sanguínea da mãe (GALLANT e DERESINSKI, 2003; FOSTER *et al*, 2009).

De acordo com resultados de estudos pré-clínicos e estudos de avaliação de interação medicamentosa, a farmacocinética do tenofovir se mantém inalterada na administração concomitante com a maioria dos demais antirretrovirais e outros medicamentos comumente utilizados por pacientes com HIV. As interações mais importantes ocorrem com administração concomitante do tenofovir com a didanosina e atazanavir, porém, nestes casos as doses podem ser ajustadas utilizando dosagens comercialmente disponíveis (KEARNEY *et al*, 2004).

Em pacientes com insuficiência renal é necessário ajuste no regime de administração do tenofovir acompanhado de extensão do período entre as doses. Nenhum ajuste nas doses é necessário em casos de insuficiência hepática. (KEARNEY *et al*, 2004).

Em relação às suas características físico-químicas, o fumarato de tenofovir desoproxila é um pó cristalino branco a quase branco, sem odor, com massa molecular de 635,52. Apresenta solubilidade de 13,4 mg/mL em água destilada a 25°C (DECHRISTOFORO e PENZAK, 2004).

O fumarato de tenofovir desoproxila foi aprovado para o tratamento da hepatite B crônica em vários países em 2008. Esta aprovação foi baseada em 2 estudos randomizados e prospectivos em andamento que demonstraram a superioridade do TDF administrado na dose de 300 mg/dia comparado com o adefovir administrado na dose de 10 mg/dia em pacientes com hepatite B e pacientes antígeno (HBeAg)-positivos e negativos, a maior parte destes pacientes nunca haviam sido submetidos a tratamento. Para os pacientes incluídos no estudo que já tinham sido previamente tratados com lamivudina, o TDF apresentou uma potente eficácia antiviral (BERG *et al*, 2010; MARCELLIN *et al*, 2008).

O fumarato de tenofovir desoproxila na forma farmacêutica comprimido revestido e dosagem de 300mg foi aprovado para utilização no tratamento antirretroviral pelo FDA em 2001, com o nome comercial Viread®, sendo a empresa Gilead (EUA) a detentora do registro.

No Brasil, o registro do medicamento foi concedido pela Anvisa em 2003. Porém, o medicamento tem sua fabricação no exterior (Alemanha) e é importado pelo governo federal para utilização no país por meio do Programa Nacional de DST/Aids.

## **2.5 Métodos analíticos para determinação de fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos**

Até o início do presente trabalho, não foram encontradas monografias oficiais em Farmacopéias reconhecidas pela Anvisa para aplicação no controle de qualidade de comprimidos contendo fumarato de tenofovir desoproxila. Na literatura científica foram encontrados poucos artigos com relato de métodos para quantificação do fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos.

Em agosto de 2009, propostas de monografia para a matéria-prima fumarato de tenofovir desoproxila e para comprimidos contendo o fármaco foram divulgadas pela Farmacopéia Internacional para avaliação e comentários. O texto final destas monografias foi disponibilizado em junho de 2010.

No método relatado por SHIRKHEDKAR *et al* (2009), o doseamento do fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos é realizado por espectrofotometria no ultravioleta (UV). Este método é bastante simples, com preparo das soluções padrão e amostra utilizando solução de HCl 0,1 M como diluente e leitura a 260 nm.

No texto final da monografia proposta para a Farmacopeia Internacional (2010), são propostos dois métodos para o doseamento do TDF em comprimidos. O primeiro método utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção na região do ultravioleta a 260 nm. Este método apresenta maior complexidade para execução, pois envolve duas fases móveis que são preparadas pela mistura de diferentes proporções de tampão fosfato, água e acetonitrila e demanda uma corrida de 80 minutos, o que tem um impacto considerável na rotina analítica. O segundo método, de fácil execução, utiliza espectrofotometria no UV utilizando metanol como diluente e leitura a 260 nm.

Também foram encontrados na literatura dois métodos descritos para o doseamento do fumarato de tenofovir desoproxila em associações em comprimidos

com outros fármacos, um para a associação com emtricitabina e outro para associação com emtricitabina e efavirenz.

No método descrito por RAJU e BEGUM (2008), o doseamento dos três fármacos (fumarato de tenofovir desoproxila, emtricitabina e efavirenz) é realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção na região do ultravioleta a 265 nm. Este método também envolve duas fases móveis eluídas em gradiente, com corrida de 15 minutos.

No método descrito por SHARMA e GUPTA (2009), foi empregado método por CLAE com detecção por UV para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila e emtricitabina em comprimidos. A fase móvel utilizada é composta de uma mistura de acetonitrila: tampão fosfato de potássio (pH 3.0 ajustado com ácido ortofosfórico) na razão 70:30 (v/v), com adição de 0,5 mL de trietilamina e detecção por UV a 260 nm, com corrida analítica de 4 minutos.

Métodos por espectrofotometria no UV apresentam, muitas vezes, problemas relacionados à especificidade. Esta é uma limitação intrínseca ao método, uma vez que compostos estruturalmente relacionados, como impurezas, possuem cromóforos muito semelhantes que por sua vez apresentam absorvidades semelhantes e podem representar interferências na análise (LOUGH e WAINER, 1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por espectrofotometria no UV é uma técnica bastante útil, uma vez que permite a separação dos componentes previamente à detecção. As condições cromatográficas como coluna, fase móvel, fluxo, entre outras, podem ser ajustadas de diferentes formas para permitir a melhor separação entre os compostos analisados (LOUGH e WAINER, 1995).

## **2.6 Métodos bioanalíticos para determinação de tenofovir no plasma**

Vários métodos bioanalíticos para quantificação do tenofovir no plasma encontram-se descritos na literatura, sendo sua maioria aplicáveis à quantificação concomitante de outros antirretrovirais utilizados no tratamento. As condições cromatográficas e os métodos de extração destes métodos estão resumidos na tabela 3, as faixas de linearidade e padrões internos utilizados encontram-se na tabela 4.

Com relação aos métodos de detecção utilizados, podemos observar que houve uma evolução ao longo do tempo, com a modernização dos equipamentos utilizados para detecção, redução dos tempos de corrida e obtenção de menores limites de quantificação. Nos trabalhos mais recentes a espectrometria de massas se destaca como método de escolha, devido principalmente à sua sensibilidade e seletividade.

Nos métodos descritos por SPARIDANS *et al* (2003) e JULLIEN *et al* (2003), utilizou-se detecção por fluorimetria, o que demandou 45 e 40 minutos, respectivamente, para a reação de derivatização, o que torna o método mais demorado. Posteriormente, REZK *et al* (2005) e SENTENAC *et al* (2003) utilizaram o detector de arranjo de diodos (DAD). Nos artigos mais recentes predomina a detecção por espectrometria de massas com ionização no modo positivo.

Existe grande variação nas fases móveis utilizadas, mas pode ser observada uma tendência de utilização de maior proporção de fase aquosa em relação à fase orgânica e vazão baixa.

Com relação ao método de extração, observa-se a utilização das técnicas de precipitação de proteínas e extração em fase sólida.

O preparo ou tratamento das amostras, conhecido como extração, é uma etapa essencial do método bioanalítico, uma vez que a substância de interesse está contida em uma matriz biológica de natureza complexa juntamente com numerosos componentes (KOLE *et al*, 2011). Entre os métodos de extração comumente empregados para análises quantitativas por espectrometria de massas, 3 (três) se destacam, precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida (MA *et al*, 2007).

**Tabela 3 – Resumos das condições cromatográficas e métodos de extração utilizados na quantificação de tenofovir no plasma disponíveis na literatura.**

Referência	Fármaco(s)	Método de extração	Fase móvel	Coluna	Fluxo	Deteção	Tempo de corrida
Sparidans <i>et al</i> (2003)	Tenofovir	Extração por precipitação de proteínas	Fase A: tampão 10 mM de fosfato de sódio e 5 mM de sulfato de tetrabutilamônio hidrogênio (pH 7,0) Fase B: tampão : acetonitrila (50:50 v/v)	Chromspher C8 (150 X 4.6 mm, 5 µm)	1,5 mL/min	Fluorescência	26 min
Jullien <i>et al</i> (2003)	Tenofovir	Extração por precipitação de proteínas	Tampão cloreto de tetrabutilamônio (5 mM, pH 6): acetonitrila (85:15, v/v)	C8 (250 X 3 mm, 5 µm)	0,5 mL/min	Fluorescência	Não informado
Sentenac <i>et al</i> (2003)	Tenofovir	Extração em fase sólida	Fase A: tampão 15 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (diidrato de hidrogeniofosfato sódico) e 10 mM TBA (sulfato de tetrabutilamônio hidrogênio) pH 6 Fase B: acetonitrila	RP18 Symmetry Shield 5 µm (250 x 4,6 mm)	1 mL/min (10 min) 1,3 mL/min (6 min)	Detector de Arranjo de diodos (DAD)	25 min
Rezk <i>et al</i> (2005)	Tenofovir e emtricitabina	Extração em fase sólida	Fase A: fosfato monobásico 20mM e sulfato de tetrabutilamônio hidrogênio 4mM (pH 5,7). Fase B: metanol	Atlantis TM dC-18 (150mm x 3,9mm, 5,0 µm)	1,0 mL/min	Detector de Arranjo de diodos (DAD)	18 min
Bezy <i>et al</i> (2005)	Zalcitabina, lamivudina, didanosina, estavudina, carbovir, zidovudina, tenofovir	Extração em fase sólida	Tampão acetato de hidroxilamina e acetonitrila (gradiente)	AtlantisTM dC18 e Zorbax Extend-C18 (150mm X 2,1mm, 5 µm)	0,2 mL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo para o tenofovir	18 min
Delahunty <i>et al</i> (2006)	Tenofovir	Extração por precipitação de proteínas	3% acetonitrila/ 1% ácido acético em água deionizada	Synergi 4 µm Polar RP 80A, 2,0mm x 150mm	0,2 mL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	7 min
Barkil <i>et al</i> (2007)	Tenofovir	Extração em fase sólida	Tampão acetato de amônio e metanol (98,5:1,5, v/v)	Atlantis© dC-18 (150mm x 3,0mm; 3µm)	0,6 mL/min	Detector de Arranjo de diodos (DAD) e espectrometria de massas – ionização modo positivo	8 min

**Tabela 3 (conclusão)**

Referência	Fármaco(s)	Método de extração	Fase móvel	Coluna	Fluxo	Deteção	Tempo de corrida
Takahashi <i>et al</i> (2007)	Tenofovir	Extração por precipitação de proteínas	Fase A: ácido trifluoracético 0.3% Fase B: acetonitrila Fase C: acetado de amônio 100mM	SunFire C18 (3,5 µm, 2,1 X 50 mm)	0,2 mL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	20 min
Bennetto-Hood <i>et al</i> (2007)	Tenofovir	Extração em fase sólida	Tampão hidroxilamina/ ácido acético (pH 6,75) e metanol (93:7, v/v)	Atlantis dC18 (2,0 X 100mm, 3µm)	0,2 mL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	10 min
Gomes <i>et al</i> (2008)	Tenofovir e emtricitabina	Extração em fase sólida	Acetonitrila e acetato de amônio (pH 3,0, 40mM) (20:80, v/v)	Chromolith Speed Rod RP18 (50mm x 4,6mm)	0,7 mL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	2,0 min
Le Saux <i>et al</i> (2008)	Abacavir, didanosina, emtricitabina, lamivudina, estavudina, tenofovir e zidovudina	Extração por precipitação de proteínas	Fase A: ácido fórmico 0,05% Fase B: metanol contendo 0,05% de ácido fórmico	Atlantis® T3 (100mm x 2,1 mm, 3µm)	250 µL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	14 min
Nirogi <i>et al</i> (2008)	Efavirenz, emtricitabina e tenofovir	Extração em fase sólida	Fase A: ácido fórmico 0,1% Fase B: acetonitrila (gradiente)	Chromolith Performance RP-18e (100 X 4.6 mm)	1,5 mL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	4min
Delahunty <i>et al</i> (2009)	Tenofovir e emtricitabina	Extração por precipitação de proteínas	3% acetonitrila/ 1% ácido acético em água deionizada	Synergi 4µm Polar RP 80 Å, 2,0mm x 150mm	200 µL/min	Espectrometria de massas – ionização modo positivo	11 min

**Tabela 4 – Resumo das faixas de linearidade e padrões internos dos métodos encontrados na literatura para quantificação de tenofovir em plasma.**

Referência	Faixa de linearidade (para TNF)	Padrão interno
Jullien <i>et al</i> (2003)	5 – 1000 ng/mL	adefovir
Sentenac <i>et al</i> (2003)	10 – 4000 ng/mL	NA
Sparidans <i>et al</i> (2003)	21–1120 ng/mL	adefovir
Bezy <i>et al</i> (2005)	30 – 10.000 ng/mL	antipirina
Rezk <i>et al</i> (2005)	10 – 10 000 ng/mL	2',3'didoxiuridina
Delahunty <i>et al</i> (2006)	10 – 750 ng/mL	adefovir
Barkil <i>et al</i> (2007)	50 – 1000 ng/mL	3-metilcitidina metosulfato
Bennetto-Hood <i>et al</i> (2007)	1,0 – 750,0 ng/mL	zalcitibina
Takahashi <i>et al</i> (2007)	19 – 1567 ng/mL	atenolol
Gomes <i>et al</i> (2008)	10 – 600 ng/mL	lamivudina
Le Saux <i>et al</i> (2008)	5,0 – 750,0 ng/mL	6-beta-hidroxi-teofilina
Nirogi <i>et al</i> (2008)	20 – 2000 ng/mL	propranolol e rosuvastatin
Delahunty <i>et al</i> (2009)	10 – 1500 ng/mL	Iso-TEN e Iso-FTC

NA – não se aplica

TEN – tenofovir

FTC – emtricitabina

## 2.7 Validação de métodos analíticos e bioanalíticos

Segundo a RDC 899/2003 da Anvisa, o objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Neste contexto, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Para a validação de métodos quantitativos para determinação de fármacos em produtos farmacêuticos, devem ser considerados os seguintes parâmetros:

- **Seletividade** - capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- **Linearidade** - capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
- **Intervalo** - o intervalo especificado é a faixa determinada no estudo de linearidade. No caso de métodos analíticos para quantificação de analitos em

formas farmacêuticas, o método deve abranger, no mínimo, a faixa de 80 a 120% da concentração teórica do produto.

- **Precisão** - a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para o parâmetro precisão existem três níveis de avaliação: repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão inter-corridas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), que são aplicáveis conforme a finalidade do método.
- **Exatidão** - a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.
- **Robustez** - a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003a).

Os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho serão validados conforme as recomendações da Anvisa (BRASIL, 2003a) e conforme procedimento de validação intralaboratorial definido por SOUZA, 2007, que propõe um delineamento experimental e testes estatísticos aplicáveis à análise de dados para cada parâmetro a ser avaliado durante a validação.

Os métodos bioanalíticos serão validados conforme as recomendações da Anvisa (BRASIL, 2003a).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver métodos analíticos para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila em produtos farmacêuticos para aplicação em controle de qualidade e método bioanalítico para quantificação de tenofovir em amostras de plasma humano e aplicação em estudo de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta para doseamento de fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos;
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas para quantificação de tenofovir em plasma humano;
- Realizar análise de perfil de dissolução comparativo entre amostras de comprimidos do medicamento fumarato de tenofovir desoproxila de dois fabricantes distintos;
- Aplicar método bioanalítico em estudo de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 300mg de fumarato de tenofovir desoproxila.
- Determinar os parâmetros farmacocinéticos do tenofovir em voluntários sadios da população brasileira.

## **CAPÍTULO 2**

### **VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DESENVOLVIDOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE COMPRIMIDOS CONTENDO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA**

## 1 INTRODUÇÃO

Para aplicação no controle de qualidade de comprimidos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila (TDF), foram desenvolvidos e validados métodos para avaliação do teor, da uniformidade de conteúdo e da dissolução. Os demais testes foram realizados conforme os métodos gerais da Farmacopéia Brasileira IV edição (BRASIL, 1988).

No início do desenvolvimento e aplicação dos métodos de dissolução, doseamento e uniformidade de conteúdo não havia disponível substância química de referência farmacopéico para a substância fumarato de tenofovir desoproxila. Portanto, foi utilizado padrão de referência disponibilizado e caracterizado pela empresa Nortec Química Ltda. Posteriormente, a Farmacopeia Americana (USP) disponibilizou o padrão de referência, que foi adquirido e testado frente ao padrão utilizado na validação, para confirmar a identidade do mesmo e a validade dos testes realizados.

### 1.1 Métodos analíticos para controle de qualidade do fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos

#### 1.1.1 Instrumental

- Agitador orbital IKA KS 125.
- Agitador magnético IKA BIG SQUID Oceano.
- Balança analítica Mettler Toledo AX 205.
- Balança analítica Mettler Toledo AT 201.
- Banho ultra-som Elma Transonic Digital S.
- Bomba a vácuo Fanem 089-A.
- Câmara de Fotoestabilidade Weiss Pharma 500 L.
- Chapa aquecedora Nova Ética 119.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) Merck Lachrom Elite UV/VIS.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) Merck Lachrom Elite DAD.
- Dissolutor Vankel VK 7000.

- Dissolutor Varian VK 7025.
- Espectrofotômetro Unicam UV/VIS Spectrometer UV3.
- Espectrofotômetro IV Perkin Helmer, Spectrum One – FT.
- Potenciômetro Digimed DM 20.

### **1.1.2 Reagentes**

- Ácido clorídrico PA Mallickrodt.
- Ácido clorídrico PA Merck.
- Ácido fosfórico PA Merck.
- Água deionizada.
- Água ultra-pura.
- Metanol (grau CLAE) J.T. Backer.
- Trietilamina PA Merck.

### **1.1.3 Materiais**

- Aparato para filtração.
- Balão volumétrico (100 mL, 1000 mL, 6000 mL).
- Béquer (100 mL, 1000 mL).
- Coluna cromatográfica ACE: C18, 125 x 4,0 mm, 5µm.
- Cubeta de quartzo (caminho óptico de 10 mm).
- Espátula.
- Gral e pistilo.
- Membrana filtrante de celulose regenerada (diâmetro: 47 mm, poro: 0,45µm).
- Papel de filtro quantitativo.
- Papel para pesagem (manteiga ou vegetal).
- Placas de petri.
- Pinça.
- Pipeta volumétrica (1 mL, 5 mL, 10 mL).
- Pipetador automático.
- Proveta (100 mL, 1000 mL).

- Unidade filtrante de PVDF ou celulose regenerada (poro 0,45µm).
- *Vials*.

#### **1.1.4 Sustâncias de referência e amostras**

- Substância Química de Referência fumarato de tenofovir desoproxila USP - Lote FOJ134.
- Substância de Referência fumarato de tenofovir desoproxila Nortec - SQR WS 001/09.
- Padrão de Trabalho fumarato de tenofovir desoproxila – fabricante Aurisco Pharmaceutical Limited, Lote 907049.
- Placebo fortificado 100% de fumarato de tenofovir desoproxila.
- Fumarato de tenofovir desoproxila 300 mg comprimido revestido, lotes 09080843, 09080844 e 09080845 (cedidos pela Fundação Ezequiel Dias, Brasil)
- Viread® - fumarato de tenofovir desoproxila 300 mg comprimido revestido, lote T190391 (medicamento referência da empresa Gilead, EUA – cedido pela Fundação Ezequiel Dias).

#### **1.1.5 Preparo do placebo**

Para utilização na validação dos métodos analíticos foi preparado um placebo conforme a técnica de fabricação do produto contendo todos os excipientes da formulação na mesma proporção da fórmula centesimal.

Seguem os excipientes utilizados no preparo do placebo (as informações quantitativas foram omitidas por se tratarem de segredo industrial): croscarmelose sódica, amido de milho, lactose monoidratada, celulose microcristalina, laurilsulfato de sódio, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol 400, polietilenoglicol, dióxido de titânio, corante azul laca indigotina N°2.

## **2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR E UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO**

O método analítico desenvolvido para determinação de teor de fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos foi validado de acordo com recomendações da RDC 899/ 2003 (BRASIL, 2003a) e procedimento de validação intralaboratorial definido por SOUZA, 2007.

### **2.1 Condições experimentais**

- Equipamento: Cromatógrafo a líquido de alta eficiência
- Coluna cromatográfica: C18, 125 x 4,0 mm, 5 $\mu$ m.
- Comprimento de onda: 260 nm.
- Volume de injeção: 20  $\mu$ L.
- Fluxo: 1,0 mL/min.
- Temperatura da coluna: 30°C.
- Tempo de corrida: aproximadamente 22 minutos.
- Fase móvel: Solução Trietilamina 0,1% pH 5,3 : Metanol (grau CLAE) (55:45).
- Solução diluente: Solução Trietilamina 0,1% pH 5,3.

### **2.2 Preparo do diluente solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 (1000 mL)**

Transferiu-se 1 mL de trietilamina, com auxílio de pipeta volumétrica, para béquer contendo 900 mL de água ultra-pura e ajustou-se o pH para  $5,3 \pm 0,1$  com solução de ácido fosfórico. A solução preparada foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL, completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se. A solução final foi filtrada em membrana de celulose regenerada de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45  $\mu$ m.

## **2.3 Parâmetros e critérios de aceitação**

### **2.3.1 Seletividade**

Para determinação da seletividade foi avaliada a interferência do diluente, fase móvel e dos componentes da formulação (placebo) no tempo de retenção do fármaco. Foi realizado também o estudo com amostras estressadas sob condições ácidas, básicas, oxidativas e fotólitas (luz branca e UV), para verificar a possível interferência de produtos de degradação.

Foi realizada também análise de pureza de pico para comprovar que o pico cromatográfico obtido era atribuído apenas ao fármaco.

#### **2.3.1.1 Procedimento**

Foram preparadas amostras da substância de referência fumarato de tenofovir desoproxila Nortec (lote SQR 907049), padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila (matéria-prima lote 907049), placebo 100% fortificado com fumarato de tenofovir desoproxila, placebo puro, diluente (solução trietilamina 0,1% pH 5,3) e fase móvel [solução trietilamina 0,1% pH 5,3 : metanol (grau CLAE) (55:45)].

As amostras da substância de referência Nortec, do padrão de trabalho e do placebo fortificado foram preparadas a uma concentração de 0,30 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila. As amostras do placebo fortificado e do placebo puro foram preparadas a uma concentração de 0,37 mg/mL de placebo.

No preparo da amostra da substância de referência Nortec, foram pesados 75 mg da substância e transferidos para balão de 25 mL com auxílio de 15 mL de solução diluente.

No preparo da amostra de padrão de trabalho, foram pesados 150,00 mg da substância, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 35 mL de solução diluente.

No preparo do placebo fortificado 100%, foram pesados 184,00 mg do placebo puro e 150,00 mg padrão de trabalho, os quais foram, em seguida, transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 35 mL de solução diluente.

No preparo do placebo foram pesados 184,00 mg e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 35 mL de solução diluente.

Todas as amostras foram submetidas a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultra-som (temperatura ambiente). O volume foi completado com solução diluente e homogeneizado. Procedeu-se a diluição de 10 mL para balão de 100 mL, completando o volume do balão com solução diluente. A solução final foi filtrada para *vial*.

#### **2.3.1.2 Estudo das amostras sob condições de estresse**

De acordo com Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008, divulgado pela Anvisa, o objetivo do teste é promover uma degradação de pequena extensão (10-30%) do fármaco.

Os estudos de estresse são recomendados também pelo guia Q1A(R2) da Conferência Internacional em Harmonização (ICH), uma vez que a avaliação de produtos de degradação sob condições de estresse é bastante útil no desenvolvimento e validação de métodos analíticos adequados (ICH, 2003).

Foram realizados testes de degradação forçada em condições ácidas (HCl 0,1 M e 1 M), básicas (NaOH 0,1M e 1 M) e oxidativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% v/v), sendo as condições iniciais de estresse com utilização de solução, com e sem aquecimento. As condições iniciais aplicadas não geraram os perfis de degradação desejados, desta forma foram aplicadas outras condições descritas no item 2.4.1.1.

Para as amostras do fármaco foram pesados 150,0 mg e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 25 mL de solução diluente. Submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). O volume foi completado com cada uma das soluções de estresse: HCl 0,1 M ou HCl 1 M ou NaOH 0,1 M ou NaOH 1 M ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e homogeneizado. As soluções com cada uma das condições foram divididas em dois volumes de 50 mL sendo que um deles foi submetido a aquecimento em banho-maria a 60°C por 6



horas (o frasco foi tampado com auxílio de parafilme para evitar evaporação da solução). Em seguida, procedeu-se a diluição de 10 mL para balão de 50 mL, completando o volume do balão com solução diluente. A solução final foi filtrada para *vial*.

Para as amostras do placebo puro foram pesados 184,0 mg e seguido o mesmo procedimento relatado acima.

Para as amostras do produto acabado (comprimidos revestidos) foram triturados 20 comprimidos e pesou-se o equivalente a ½ peso médio (334 mg), equivalente a 150 mg de fumarato de tenofovir desoproxila e seguiu-se o mesmo procedimento relatado anteriormente.

### **2.3.1.3 Estudo das amostras sob condições de fotólise**

Amostras de matéria-prima (lote 907049), placebo puro (021RD\_09T12PL) e produto acabado (comprimidos revestidos dos lotes 09080843, 09080844 e 09080845) foram analisadas.

Para o produto acabado foram avaliadas amostras de comprimidos, comprimidos armazenados em frascos (embalagem primária) e frascos armazenados em caixas (embalagem secundária). O objetivo foi avaliar a proteção contra a luz das embalagens do produto acabado.

O estudo foi conduzido em câmara para fotoestabilidade, com fonte de luz conforme a opção 2 do guia Q1B do ICH, contendo prateleiras separadas com lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977 (1993) e lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm (ICH, 1996).

As condições de temperatura e umidade foram padronizadas para o estudo em 25°C ± 2°C e 60% ± 5% de umidade relativa (UR). A exposição das amostras foi de no mínimo 1,2 Klux x hora para luz branca, e no mínimo 200 watt horas/m<sup>2</sup> para luz ultravioleta.

As amostras da matéria-prima e do placebo foram colocadas em placas de petri em quantidade suficiente para formar uma fina camada cobrindo todo o fundo da placa. As amostras de comprimidos também foram colocadas em placas de petri distribuídas sem sobreposição.

Após finalizado o teste, as amostras foram retiradas da câmara e o aspecto observado. No preparo da amostra do fármaco e do placebo foram pesados 150,0 mg e 184,0 mg, respectivamente. Os quantitativos pesados foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL com auxílio de 25 mL de solução diluente. Submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). O volume foi completado com solução diluente e homogeneizado. Procedeu-se a diluição de 10 mL para balão de 50 mL, completando o volume do balão com solução diluente. A solução final foi filtrada para *vial*.

Para as amostras do produto acabado (comprimidos revestidos) foram triturados 10 comprimidos e pesados o equivalente a  $\frac{1}{2}$  peso médio (334 mg), equivalente a 150 mg de fumarato de tenofovir desoproxila e seguiu-se o mesmo procedimento relatado acima.

### **2.3.2 Linearidade**

Para avaliação da linearidade foram preparadas amostras na faixa de 25% a 150% da concentração esperada para o fármaco (0,30 mg/mL). Foram preparadas três amostras independentes de cada nível da curva.

Foram preparadas três soluções-mãe padrão pesando-se exatamente 187,50 mg de padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila, as quais foram transferidas para balão volumétrico de 250 mL, com auxílio de 140 mL de solução diluente. Submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se. Desta forma obteve-se três soluções-mãe padrão independentes com concentração de 0,75 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila cada.

A partir de cada solução-mãe foram preparadas seis soluções, uma em cada nível de concentração da curva.

O preparo das amostras seguiu conforme descrito na tabela 5.

**Tabela 5 – Soluções para construção da curva para avaliação da linearidade.**

Nível de concentração (%)	Volume da solução-mãe (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração final de TDF (mg/mL)
25	5	50	0,075
50	10	50	0,150
75	15	50	0,225
100	20	50	0,300
125	25	50	0,375
150	15	25	0,450

TDF – fumarato de tenofovir desoproxila

O volume da solução-mãe foi pipetado com auxílio de pipeta volumétrica. Completou-se o volume de cada uma das soluções obtidas com solução diluente e homogeneizou-se. A solução final foi filtrada para *vial*.

#### **2.3.2.1 Testes de premissas**

Para identificação de valores considerados extremos ou *outliers*, foi realizado teste do resíduo padronizado de Jackknife ( $\alpha=0,05$ ). Os valores considerados extremos foram excluídos até o máximo de 22% dos dados originais da curva de linearidade.

Para avaliação da normalidade dos resíduos, foi aplicado o teste de Ryan-Joiner. O valor do coeficiente de correlação de Ryan-Joiner calculado ( $R_{eq}$ ) deve ser maior que o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner crítico ( $R_{crítico}$ ).

A independência entre os resíduos foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. O valor da estatística de Durbin-Watson ( $d$ ) deve estar compreendido entre o limite inferior ( $d_L$ ) e  $4-d_L$  ( $\alpha=0,05$ ).

A homoscedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe. O valor da estatística  $t$  de Levene ( $t_L$ ) deve ser menor que  $t_{crítico}$  ( $\alpha=0,05$ ).

### **2.3.2.2 Adequação ao modelo linear**

A significância da regressão foi avaliada por análise de variância (ANOVA), o valor da estatística F calculado ( $F_{\text{calculado}}$ ) deve ser maior que o valor crítico ( $F_{\text{crítico}}$ ).

O desvio da linearidade também foi avaliado por ANOVA. Neste teste, o valor da estatística F calculado ( $F_{\text{calculado}}$ ) deve ser menor ou igual ao valor crítico ( $F_{\text{crítico}}$ ).

Foi realizado ainda o cálculo do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ), que deve ser maior que 0,99 e o valor de r, maior que 0,9950.

### **2.3.3 Teste de efeito matriz**

A avaliação do efeito da matriz sobre a resposta do método foi avaliada pela construção de curva contendo a matriz semelhante à curva construída para teste de linearidade e pela comparação de inclinações e interseções das duas curvas obtidas.

Para construção da curva matrizada foram preparadas amostras na faixa de 25% a 150% da concentração esperada do fármaco (300 mg) com adição de placebo. Foram preparadas três amostras independentes de cada nível.

Foram preparadas três soluções-mãe padrão de padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila conforme descrito no item 2.3.2.

Preparou-se uma solução-mãe placebo pesando-se 370,00 mg do placebo puro e transferiu-se para balão volumétrico de 200 mL com auxílio de 140 mL de solução diluente. Submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se. Obteve-se uma solução com 1,85 mg/mL de placebo puro.

As soluções-mãe foram adicionadas em cada uma das três amostras de cada nível de concentração, conforme demonstrado na tabela 6.

**Tabela 6 – Soluções para construção da curva para avaliação do efeito matriz.**

Nível de concentração (%)	Volume da solução-mãe padrão (mL)	Volume da solução-mãe placebo (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração final de TDF (mg/mL)
25	5	10	50	0,075
50	10	10	50	0,150
75	15	10	50	0,225
100	20	10	50	0,300
125	25	10	50	0,375
150	15	5	25	0,450

TDF – fumarato de tenofovir desopoxila

O volume das soluções-mãe foi pipetado com auxílio de pipeta volumétrica. Completou-se o volume de cada uma das soluções obtidas com solução diluente e homogeneizou-se. A solução final foi filtrada para *vial*. A concentração final de placebo puro foi de 0,37 mg/mL em todas as soluções obtidas.

#### **2.3.3.1 Testes de premissas**

As premissas foram avaliadas conforme descrito no item 2.3.2.1.

#### **2.3.3.2 Adequação ao modelo linear**

A verificação da adequação dos dados ao modelo linear foi realizada conforme descrito no item 2.3.2.2.

#### **2.3.3.3 Teste de homoscedasticidade das curvas usual e matrizada**

Para comparação das inclinações das curvas usual e matrizada foi utilizado o teste t com variâncias combinadas. Este teste tem aplicação nos casos em que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  é menor que o valor  $F_{\text{crítico}}$  ( $\alpha=0,05$ ).

#### **2.3.3.4 Teste t para comparação de inclinações e interseções**

No teste t com variâncias combinadas conclui-se que não há efeito matriz se os valores para a estatística t para contrastes entre interseções ( $t_a$ ) e estatística t para contrastes entre inclinações ( $t_b$ ), forem menores que o  $t_{\text{crítico}}$  ( $\alpha=0,05$ ).

#### **2.3.4 Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação**

No experimento para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação foi preparada uma curva de calibração com três níveis de concentração (75%, 100% e 125%) em cada dia (Dia 1 e Dia 2). As curvas de calibração foram utilizadas para determinar a concentração das amostras fortificadas.

Para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação, foram preparadas amostras fortificadas em três níveis de concentração (75%, 100% e 125%). As amostras foram preparadas em triplicata, em dois dias diferentes, por analistas diferentes, conforme tabela 7, gerando quatro conjuntos de dados analíticos.

Para cada nível de concentração da curva foram preparadas três amostras independentes. O quantitativo pesado de padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila foi de 112,50 mg, 150,00 mg e 187,50 mg, para preparo das amostras a 75%, 100% e 125%, respectivamente. Para cada solução foram pesados também 184,00 mg do placebo puro. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 35 mL de solução diluente, submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se. As amostras foram diluídas em 10 vezes para balão de 100 mL. As soluções finais foram filtradas para *vial* e quantificadas.

Para o preparo das amostras do placebo puro, pesou-se 184,00 mg e seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima para as demais amostras.

**Tabela 7 – Experimento para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.**

	Dia 1		Dia 2	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
<b>Analista 1</b>	Experimento 1	---	---	Experimento 4
<b>Analista 2</b>	---	Experimento 2	Experimento 3	---
<b>Equipamentos</b>	Balança Analítica Mettler Toledo AX205	Balança Analítica Mettler Toledo AX205	Balança Analítica Ohaus Adventurer Pro	Balança Analítica Ohaus Adventurer Pro
	CLAE DAD Merck LaChrom Elite	CLAE DAD Merck LaChrom Elite	CLAE UV/VIS Merck LaChrom Elite	CLAE UV/VIS Merck LaChrom Elite

#### **2.3.4.1 Exatidão – critérios de aceitação**

Para avaliação de possíveis valores extremos ou *outliers* foi aplicado o teste de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ).

A média de recuperação e o intervalo de confiança em relação à mesma devem ficar entre 98,0 e 102,0%. Os valores individuais de recuperação devem estar entre 97,0 e 103,0%.

#### **2.3.4.2 Precisão – premissas e critérios de aceitação**

##### **2.3.4.2.1 Teste de premissas para ANOVA**

Para avaliação da normalidade dos resíduos, foi aplicado o teste de Ryan-Joiner. O valor de  $R_{eq}$  deve ser maior o valor de  $R_{crítico}$ .

A homoscedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe. O valor de  $t_L$  deve ser menor que  $t_{crítico}$  ( $\alpha=0,05$ ).

#### 2.3.4.2.2 Teste de ANOVA para estimativa da precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial

Para avaliação da precisão foram calculados o desvio padrão sob condições de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) e o desvio padrão sob condições de repetitividade ( $DPR_r$ ). Para que o método seja considerado preciso, o  $DPR_R$  calculado deve ser menor ou igual a 5% e o  $DPR_r$  deve ser menor ou igual a 2/3 do valor encontrado para o  $DPR_R$  (SILVA, 2007).

#### 2.3.4.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ do método serão definidos a partir do menor nível de concentração estudado com exatidão (recuperação média) e precisão ( $DPR_R$  e  $DPR_r$ ) adequadas.

#### 2.3.5 Robustez

O parâmetro robustez foi avaliado através do teste de Youden (YOUTEN e STEINER, 1975). Foram avaliadas sete variáveis do método através de oito análises de cada amostra, conforme tabelas 8 e 9.

**Tabela 8 – Variáveis analíticas e variações aplicadas para avaliação da robustez.**

	Variável	Limites inferior e superior
<b>A</b>	Coluna cromatográfica	a: C18 250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m A: C18 125 mm x 4,0 mm, 5 $\mu$ m
<b>B</b>	Comprimento de onda de detecção	b: 256 nm B: 264 nm
<b>C</b>	Fluxo de corrida	c: 0,8 mL/minuto C: 1,2 mL/minuto
<b>D</b>	Proporção da fase móvel (Metanol (grau CLAE):Solução trietilamina 0,1% pH 5,3)	d: 47:53 D: 43:57



**Tabela 8 (conclusão)**

	Variável	Limites inferior e superior
<b>E</b>	Volume de injeção	e: 15 µL E: 25 µL
<b>F</b>	Temperatura do forno	f: 27°C F: 33°C
<b>G</b>	Unidade filtrante	g: Unidade filtrante de PVDF porosidade de 0,45µm G: Unidade filtrante de celulose regenerada porosidade de 0,45µm

PVDF - decafluoreto de polivinil

**Tabela 9 – Combinação de variáveis para avaliação da robustez pelo método de Youden.**

Variável	Análise							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>A, a</b>	A	A	A	A	a	a	a	a
<b>B, b</b>	B	B	b	b	B	B	b	b
<b>C, c</b>	C	c	C	c	C	c	C	c
<b>D, d</b>	D	D	d	d	d	d	D	D
<b>E, e</b>	E	e	E	e	e	E	e	E
<b>F, f</b>	F	f	f	F	F	f	f	F
<b>G, g</b>	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Resultado</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Os critérios de aceitação para avaliação da exatidão na robustez foram os mesmos descritos no item 2.3.4.1 para o parâmetro exatidão.

A média de recuperação e o intervalo de confiança, em relação à mesma, deve estar entre 97,0 e 103,0%. Os valores individuais de recuperação devem estar entre 95,0 e 105,0%.

### **2.3.6 Estabilidade das soluções**

As amostras preparadas para a avaliação da seletividade foram armazenadas em temperatura ambiente por no mínimo 24 horas e reinjetadas no CLAE sob as mesmas condições analíticas.

Foram avaliadas as amostras da substância de referência Nortec, do padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila e do placebo fortificado 100%.

#### **2.3.6.1 Critério de aceitação**

As respostas obtidas para a mesma solução, quantificadas em diferentes dias, devem apresentar coeficiente de variação inferior a 2% para serem consideradas estáveis.

### **2.4 Resultados e discussão**

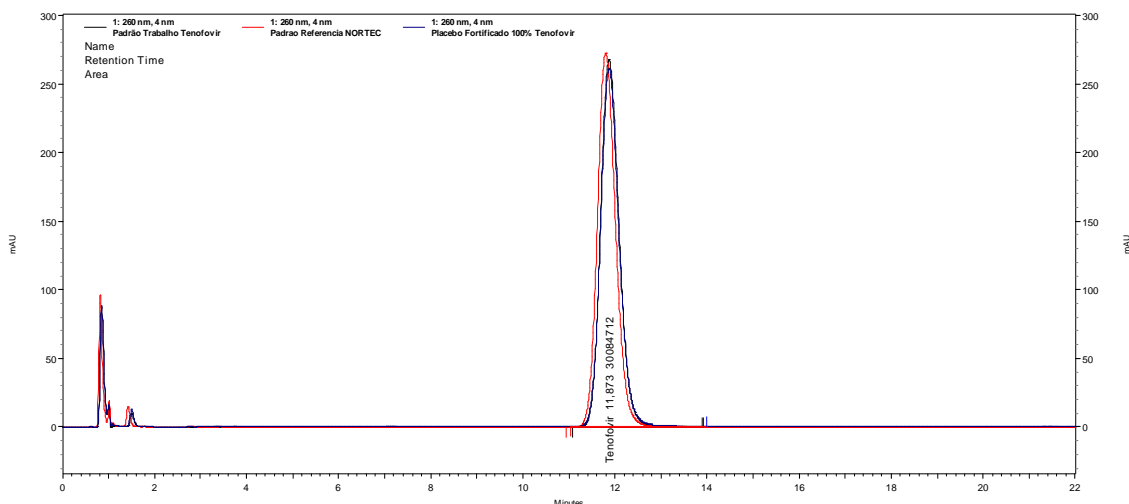
#### **2.4.1 Seletividade**

Os cromatogramas obtidos nas análises do diluente e do placebo puro demonstraram que nenhum interferente elui no tempo de retenção do fármaco.

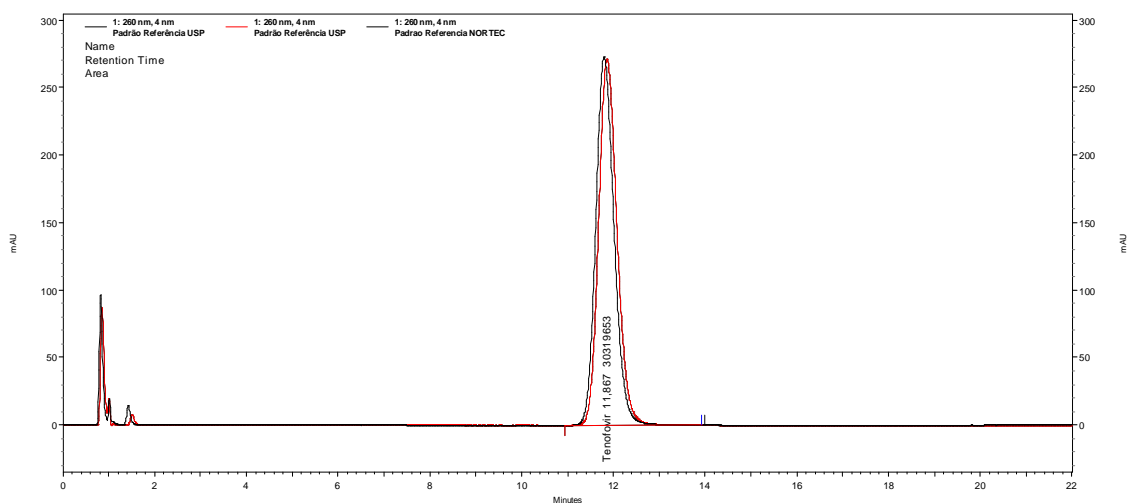
O cromatograma obtido para o placebo fortificado (mistura de excipientes com quantidade conhecida de princípio ativo) apresentou pico com mesmo tempo de retenção, simetria e largura do pico obtido para o padrão de referência da Nortec e o padrão de trabalho, conforme demonstrado na figura 3, levando à conclusão de que os excipientes utilizados na formulação não interferem na seletividade do método. A pureza total do pico analisada através de análise espectral no ultravioleta com detector de arranjo de diodo (DAD) foi de 1, sugerindo se tratar de um composto puro. O espectro entre 200 nm e 400 nm apresentou similaridade de 1 com o espectro do padrão de referência da Nortec, confirmando a identidade da substância em análise.

A validação foi realizada utilizando o padrão disponibilizado pela empresa Nortec Química como substância de referência devido à indisponibilidade de substâncias de referência farmacopeicas. Após disponibilização do padrão de referência pela Farmacopéia Americana (USP), o mesmo foi adquirido e o teste de seletividade foi repetido de forma a garantir os resultados obtidos na validação. O espectro entre 200 nm e 400 nm do padrão Nortec apresentou similaridade de 1,0000 com o espectro do padrão de referência fumarato de tenofovir desoproxila da

USP, confirmando a identidade da substância em análise e a validade dos dados obtidos. Na figura 4 estão demonstrados os cromatogramas obtidos para a substância química de referência USP e a substância de referência Nortec.



**Figura 3 – Cromatogramas obtidos para a substância de referência Nortec, padrão de trabalho e placebo fortificado.**



**Figura 4 – Cromatogramas obtidos para as substâncias de referência USP e Nortec**

#### **2.4.1.1 Estudo das amostras sob condições de estresse**

O fármaco se demonstrou estável em solução ácida sem aquecimento, em ambas as concentrações da solução de HCl utilizadas. A solução de HCl a 1 M com aquecimento gerou uma degradação de mais de 70% e a solução de HCl a 0,1 M com aquecimento gerou uma degradação de 20%. A solução oxidante gerou uma degradação de 65% e 5%, respectivamente, para as condições sem e com

aquecimento. A solução básica gerou uma degradação de 100% em todas as condições avaliadas.

Para avaliação da condição de estresse ideal, o teste foi repetido utilizando-se como condições estressantes soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 1% e NaOH 0,05 M. O preparo das amostras foi semelhante ao descrito no item 2.3.1.2. A degradação do fármaco foi de 100% para a solução de NaOH 0,05 M sem aquecimento e de 10% para a solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 1% sem aquecimento.

Foi realizado um último teste para verificar a formação de produtos de degradação em água e em NaOH 0,01 M. Na figura pode ser observado o cromatograma do estudo de estresse da matéria-prima com condição básica (NaOH 0,01 M).

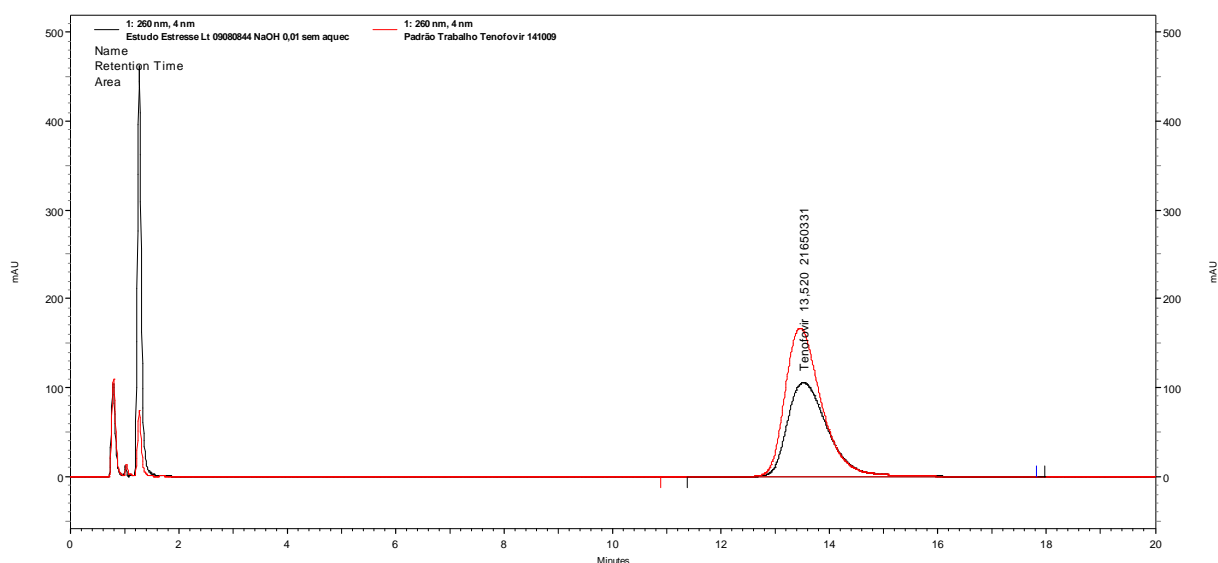
Não houve degradação significativa do fármaco em água, sendo a diferença de quase 2% no teor do fármaco ser justificada pelas próprias variações do método analítico. No cromatograma desta solução não foram observados picos referentes a produtos de degradação, na região do ultravioleta.

O estudo realizado em condições de estresse foi útil para determinar a melhor proporção da fase móvel, de forma a obter a melhor separação entre os produtos cujos picos foram observados.

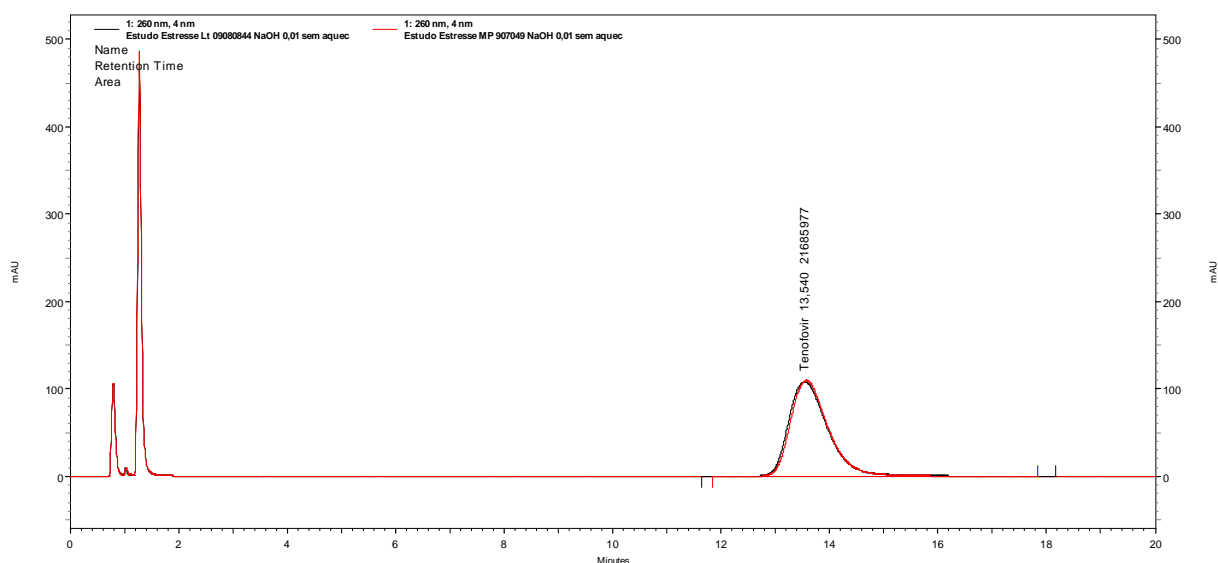
O fármaco e produto acabado apresentaram perfis de degradação semelhantes nas condições avaliadas. Como exemplo, na figura 6 pode ser observado cromatogramas com comparação do perfil de degradação do produto terminado (comprimido) *versus* matéria-prima ativa em condição básica (NaOH 0,01M).

O método de análise desenvolvido para avaliação das amostras submetidas ao estudo de estresse apresentou-se seletivo para o fármaco, permitindo a quantificação do ativo de interesse em presença de outras substâncias (impurezas e/ou produtos de degradação).

Não podemos descartar a possibilidade de existência de outras impurezas / produtos de degradação, que não foram detectadas em função da limitação intrínseca ao método analítico utilizado, pois para serem avaliadas as substâncias químicas necessariamente precisam apresentar absorvidade na região do ultravioleta.



**Figura 5 – Cromatograma obtido no estudo de estresse da matéria-prima com condição básica (NaOH 0,01 M)**



**Figura 6 – Comparação do perfil de degradação do produto terminado (comprimido) versus matéria-prima ativa em condição básica (NaOH 0,01 M)**

#### **2.4.1.2 Estudo das amostras sob condições de fotólise**

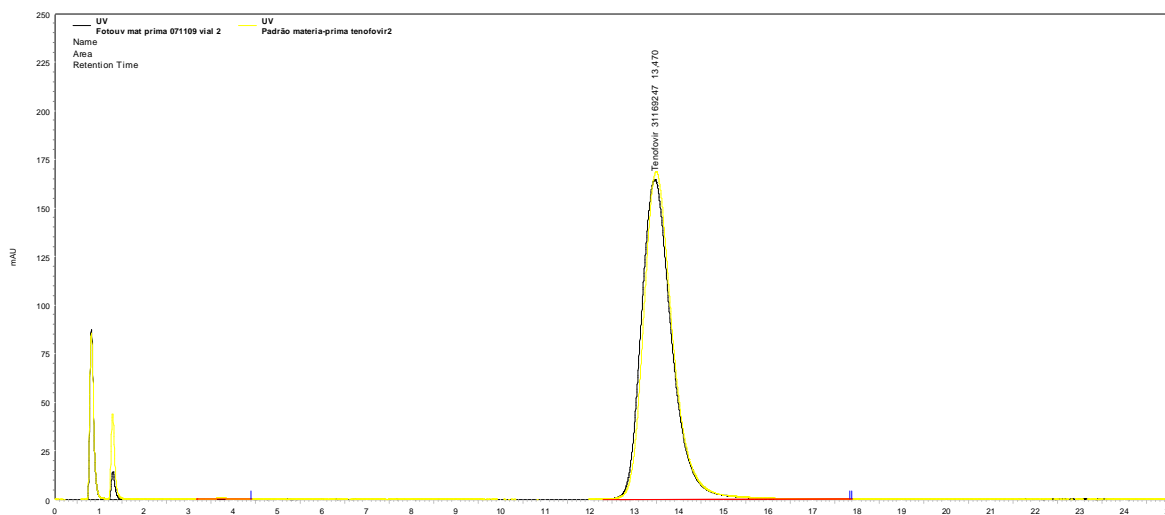
Não foi observada diferença no aspecto das amostras submetidas ao estudo quando comparadas às amostras não submetidas e também não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para as amostras expostas à luz branca e à luz ultravioleta (Figuras 7 e 9).

Em relação à quantificação do fármaco não houve diferença significativa entre as amostras submetidas ao estudo (fármaco, comprimidos revestidos, comprimidos revestidos acondicionados em frasco de polietileno e frascos de polietileno acondicionados em caixas de embarque) e as amostras não submetidas ao estudo. As diferenças encontradas podem ser justificadas pela variabilidade analítica (Figuras 8 e 10).

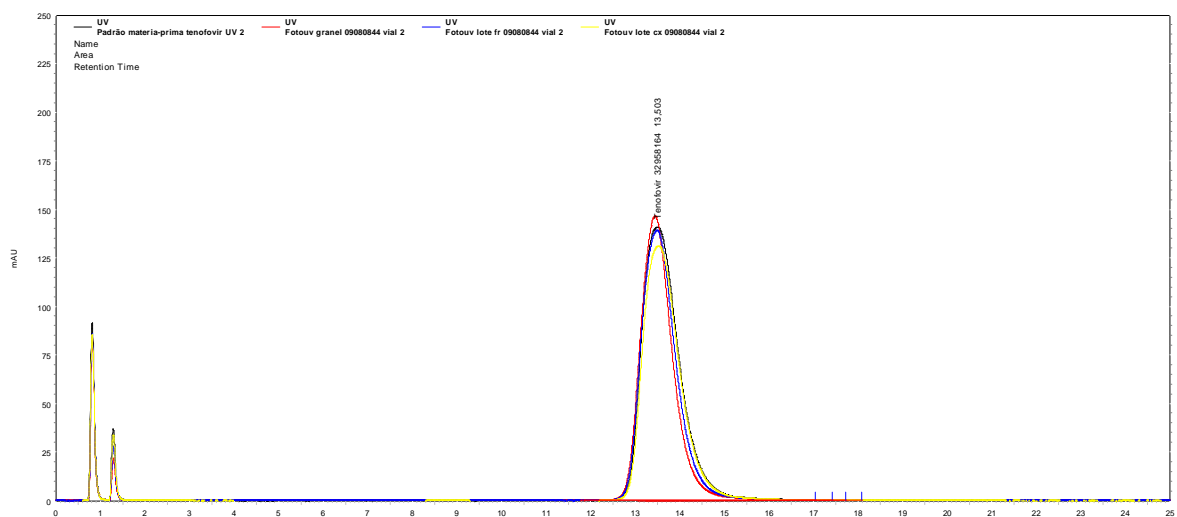
Não foram identificados produtos de degradação nas condições de estresse, no método aplicado. Porém, não é possível garantir a ausência de impurezas/ produtos de degradação em função da limitação intrínseca ao método analítico utilizado, pois para serem detectadas as substâncias químicas necessariamente precisariam apresentar absorvidade na região do ultravioleta.

Com o estudo, foi possível concluir que o fármaco e o produto acabado são estáveis na presença de luz, em todas as condições avaliadas.

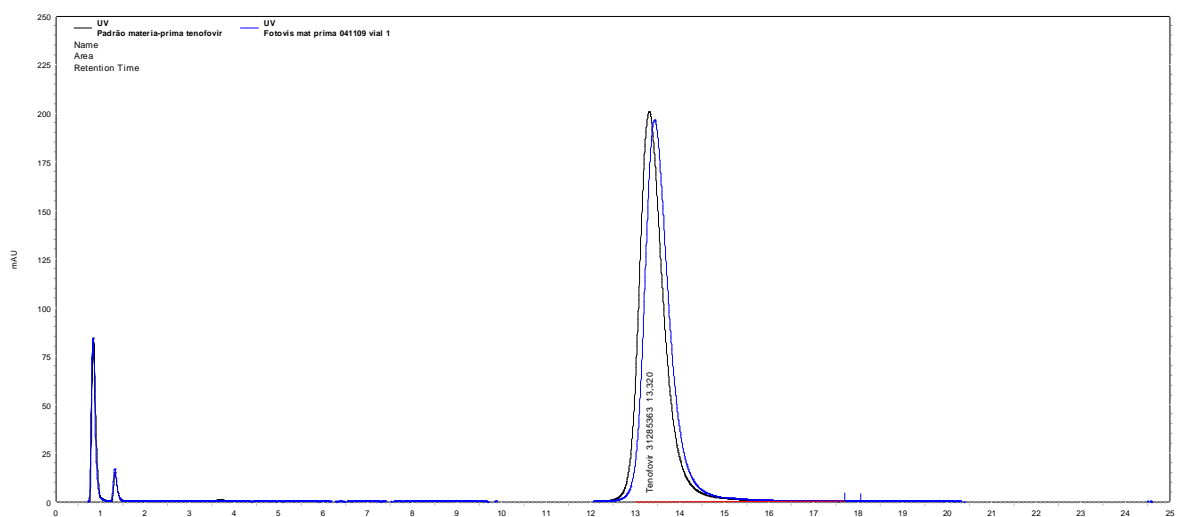
O método de análise utilizado para avaliação das amostras submetidas ao estudo apresentou-se seletivo para o fármaco, uma vez que não foi observada presença de outras substâncias (impurezas e/ou produtos de degradação) no tempo de retenção do fármaco.



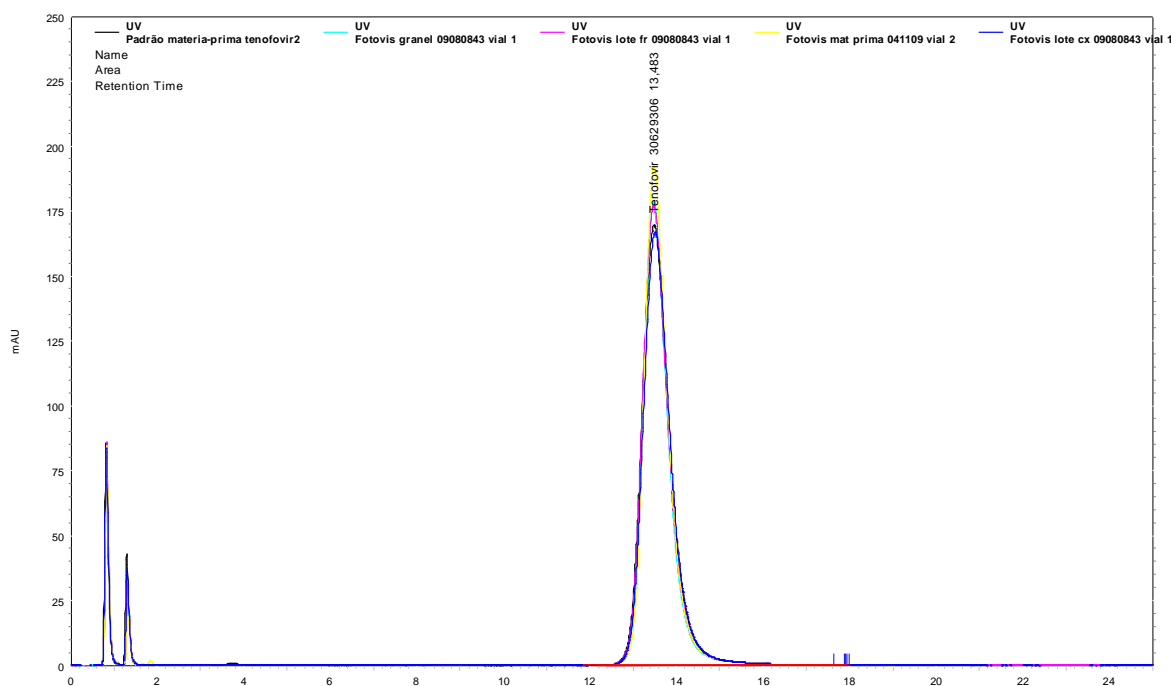
**Figura 7 – Cromatograma obtido no estudo de fotoestabilidade para exposição da matéria-prima à luz UV**



**Figura 8 – Cromatogramas das amostras submetidas ao estresse na luz UV.**



**Figura 9 – Cromatograma obtido no estudo de fotoestabilidade para exposição da matéria-prima à luz branca.**



**Figura 10 – Cromatogramas das amostras submetidas ao estresse na luz branca.**

## **2.4.2 Linearidade**

### **2.4.2.1 Testes de premissas**

A presença de valores extremos foi avaliada pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. O cálculo dos resíduos padronizados Jackknife emprega uma estimativa da variância dos resíduos da regressão independente do ponto sob suspeita. Se o teste é significativo, os valores suspeitos são considerados como sendo outliers (valores extremos) e isolados do grupo, sendo permitida exclusão de no máximo 22% dos valores originais. Não é permitida a exclusão da última replicata de um nível de concentração estudado.

O teste de resíduos padronizados de Jackknife permitiu a identificação de um (01) valor extremo (ponto 18, terceira replicata do nível de concentração a 150%), o qual foi excluído do conjunto de dados.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação obtido



foi de 0,9897, superior ao valor crítico de 0,9549. Desta forma podemos concluir que o desvio da normalidade não é significativo ( $p > 0,10$ ).

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários assume que cada nível da faixa tem uma variação absoluta constante (homoscedasticidade). A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste de Brown-Forsythe, com estatística  $t_L$  (t de Levene) igual a -7,20E-01 menor que t crítico de 2,131449536.

A independência dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson, indicando que não existe correlação entre os resíduos.

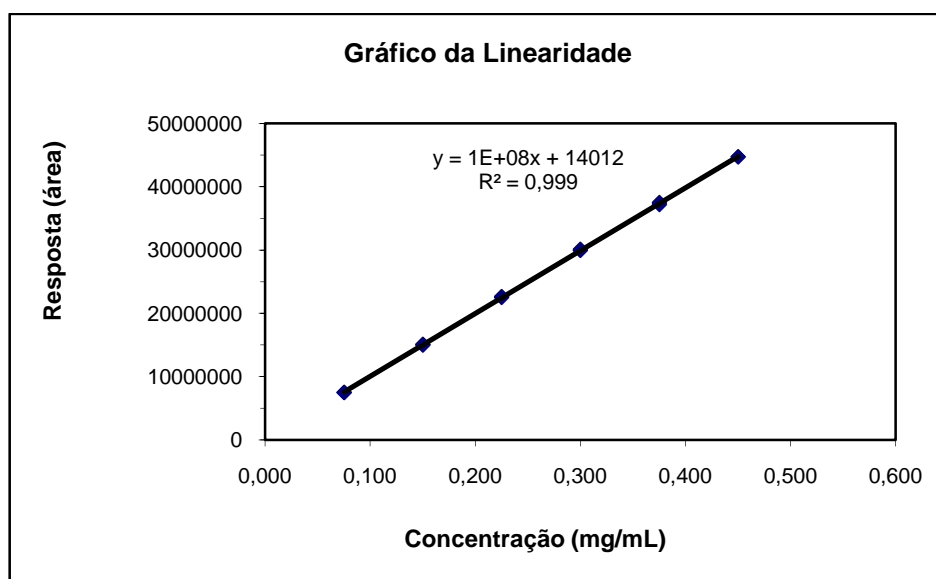
#### **2.4.2.2 Adequação ao modelo linear**

A significância da regressão foi avaliada por análise de variância, onde o valor de F calculado, 172334,96, foi maior que o F crítico, 4,54, mostrando que a regressão é significativa.

O desvio de linearidade também foi avaliado por análise de variância, onde o valor de F calculado, 2,279, foi menor que o F crítico, 3,357, mostrando que não há desvio de linearidade.

O coeficiente de correlação linear,  $r^2$ , foi de 0,99991.

A curva de calibração obtida para o fármaco na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação apresentados na figura 11.



**Figura 11 – Curva obtida para o fármaco na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação.**

### **2.4.3 Teste de efeito matriz**

#### **2.4.3.1 Testes de premissas**

O teste de resíduos padronizados de Jackknife permitiu a identificação de um (01) valor extremo (ponto 14, segunda replicata do nível de concentração a 125%), o qual foi excluído do conjunto de dados.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9582, superior ao valor crítico de 0,9549. Desta forma podemos concluir que o desvio da normalidade não é significativo ( $p > 0,10$ ).

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários assume que cada nível da faixa tem uma variação absoluta constante (homoscedasticidade). A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste de Brown-Forsythe, com  $t_L$  (t de Levene) igual a -2,41E-01 menor que t crítico de 2,131449536.

A independência dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson, indicando que não existe correlação entre os resíduos.

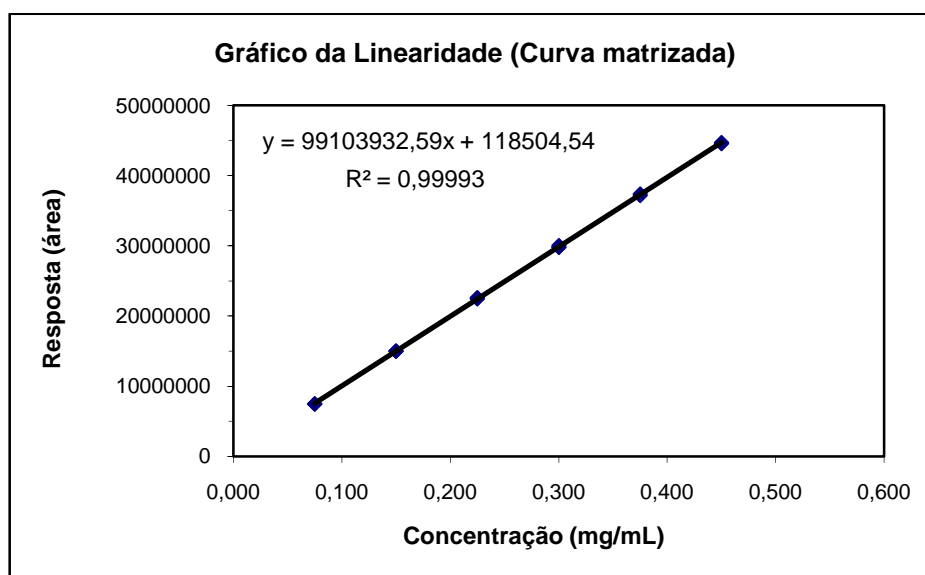
#### **2.4.3.2 Adequação ao modelo linear**

A significância da regressão foi avaliada por análise de variância, onde o valor de F calculado, 229829,25, foi maior que o F crítico, 4,54, mostrando que a regressão é significativa.

O desvio de linearidade também foi avaliado por análise de variância, onde o valor de F calculado, 2,402, foi menor que o F crítico, 3,357, mostrando que não há desvio de linearidade.

O coeficiente de correlação linear,  $r^2$ , foi de 0,99993.

A curva matrizada obtida para o fármaco na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação encontra-se na figura 12.



**Figura 12 – Curva matrizada obtida para o fármaco na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação.**

#### **2.4.3.3 Teste de homoscedasticidade das curvas usual e matrizada**

O teste de F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas usual e matrizada, com valor de F calculado igual a 1,22384 menor que F crítico de 2,40345, portanto, foi utilizado teste t com variâncias combinadas para avaliação do efeito de matriz.

#### **2.4.3.4 Teste t para comparação de inclinações e interseções**

Os valores de  $t_a$  e  $t_b$  calculados foram 0,242201 e 0,375703, ambos menores que t crítico de 2,042272, indicando que não existem diferenças significativas entre as inclinação e a interseção das curvas, concluindo que não existe efeito de matriz.

#### **2.4.4 Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação**

A estimativa das concentrações das amostras fortificadas foi determinada por meio da curva de calibração.

A recuperação foi calculada através da comparação das concentrações obtidas para as amostras fortificadas em relação à concentração teórica adicionada.

#### 2.4.4.1 Exatidão

O teste de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ) não indicou a presença de valores extremos entre os resultados de recuperação para as amostras adicionadas em todos os níveis de concentração.

Os valores individuais de recuperação encontram-se entre 98,000% e 101,778%, conforme tabela 10, e as médias de recuperação obtidas encontram-se entre 99,59% e 99,96%.

O método se mostrou exato para os níveis de concentração estudados.

**Tabela 10 – Dados de recuperação aparente para avaliação da exatidão.**

	Nível de concentração		
	0,225 mg/mL	0,300 mg/mL	0,375 mg/mL
Recuperação aparente (%)	98,074	98,000	98,133
	98,667	98,222	98,222
	98,815	98,333	98,756
	99,111	98,444	99,200
	99,556	98,667	99,289
	100,000	100,000	99,644
	100,148	100,556	99,733
	100,148	101,111	100,000
	100,741	101,333	100,236
	101,185	101,444	100,267
	101,333	101,667	100,533
	101,778	101,667	101,156

#### 2.4.4.2 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi avaliada pela concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial (precisão inter-corridas) foi avaliada pela concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtido em dias diferentes, com analistas diferentes e equipamentos diferentes.

Os dados para cada nível de concentração estão apresentados nas tabelas 11, 12 e 13.

**Tabela 11– Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,225 mg/mL.**

Experimento	Replicatas do ensaio	Recuperação aparente
1	1	100,000
	2	101,778
	3	100,148
2	1	101,185
	2	100,148
	3	101,333
3	1	100,741
	2	98,815
	3	98,667
4	1	99,111
	2	99,556
	3	98,074

**Tabela 12 – Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,300 mg/mL**

Experimento	Replicatas do ensaio	Recuperação aparente
1	1	98,333
	2	100,556
	3	101,111
2	1	100,000
	2	98,444
	3	101,444
3	1	98,222
	2	98,667
	3	101,667
4	1	101,333
	2	101,667
	3	98,000

**Tabela 13 – Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,375 mg/mL**

Ensaio	Replicatas do ensaio	Recuperação aparente
1	1	99,733
	2	100,267
	3	98,756
2	1	100,533
	2	99,200
	3	101,156
3	1	99,289
	2	98,133
	3	100,000
4	1	100,236
	2	99,644
	3	98,222

#### 2.4.4.2.1 Teste de premissas para ANOVA

A normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner com  $R_{eq}$  calculado de 0,9490, 0,9740 e 0,9334, respectivamente para os níveis de concentração de 0,225 mg/mL, 0,300 mg/mL e 0,375 mg/mL, maiores que  $R_{crítico}$  de 0,9275 ( $\alpha=0,05$ ).

A homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Brown-Forsythe, com  $F_{calculado}$  de 0,077, 0,027 e 0,044, respectivamente para os níveis de concentração de 0,225 mg/mL, 0,300 mg/mL e 0,375 mg/mL, menores que  $F_{crítico}$  de 4,066 ( $\alpha=0,05$ ).

#### 2.4.4.2.2 Teste de ANOVA para estimativa da precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial

Nos experimentos em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, a precisão é avaliada por análise de variância. O  $DPR_r$  calculado foi de 0,91%, 1,74% e 0,95%, respectivamente para os níveis de concentração de 0,225 mg/mL, 0,300 mg/mL e 0,375 mg/mL, menores que o limite estipulado de 3,30%. O  $DPR_R$  calculado foi de 1,21%, 1,74% e 0,95%, respectivamente para os níveis de

concentração de 0,225 mg/mL, 0,300 mg/mL e 0,375 mg/mL, menores que o limite estipulado de 5,00%.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que todas as premissas foram cumpridas e que os desvios calculados estão abaixo do limite, demonstrando a precisão do método em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.

#### **2.4.4.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)**

Os limites de detecção e quantificação do método foram testados apenas em relação ao menor nível estudado nos testes de precisão e exatidão do método, sendo iguais a 0,225 mg/mL.

#### **2.4.5 Robustez**

Os resultados de recuperação média obtidos para cada grupo no ensaio de robustez estão demonstrados na tabela 14.

**Tabela 14 – Resultados de recuperação média obtidos para cada grupo no ensaio de robustez.**

Variável	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z
	98,38%	97,90%	98,27%	98,50%	97,78%	97,80%	97,61%	97,41%

O teste de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ) não indicou a presença de valores extremos no ensaio da robustez. Os valores individuais de recuperação encontram-se entre 95,0% e 105,0% e a média de recuperação encontra-se entre 97,0% e 103,0%.

Para avaliação do efeito de cada variável, foi calculada a diferença entre as médias para os quatro resultados obtidos nas duas condições avaliadas, o que pode ser observado na tabela 15.

De acordo com os resultados obtidos, as variáveis que apresentam maior influência sobre o método em questão foram a coluna cromatográfica, a proporção da fase móvel e a unidade filtrante. O método analítico apresentou-se robusto para todas as condições avaliadas, uma vez que a recuperação média observada para todos os grupos encontra-se entre 97% e 103%.

**Tabela 15 – Efeito das variáveis analíticas no ensaio da robustez.**

Variáveis		Resultados	X - x
Coluna cromatográfica	A	98,26	0,61
	a	97,65	
Comprimento de onda de detecção	B	97,97	0,02
	b	97,95	
Fluxo de corrida	C	98,01	0,11
	c	97,91	
Proporção da fase móvel	D	97,83	-0,26
	d	98,09	
Volume de injeção	E	97,97	0,02
	e	97,95	
Temperatura do forno	F	98,02	0,12
	f	97,90	
Unidade filtrante	G	98,07	0,23
	g	97,84	

X – média dos valores obtidos na primeira condição avaliada (Ex: A)

x – média dos valores obtidos na segunda condição avaliada (Ex: a)

#### **2.4.6 Estabilidade das soluções**

A diferença entre as respostas obtidas para a mesma solução, quantificadas com intervalo de 24 horas, foi de 1,69%, 1,64% e 1,85%, respectivamente para as amostras da substância de referência Nortec, do padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila e do placebo fortificado 100%.

Todas as diferenças encontradas foram inferiores a 2% e as amostras foram consideradas estáveis nas condições do método aplicado.



### **3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DA DISSOLUÇÃO**

O método analítico utilizado para determinação da dissolução de comprimidos contendo fumarato de tenofovir desoproxila foi validado de acordo com recomendações da RDC 899/2003 e procedimento de validação intralaboratorial definido por SOUZA, 2007.

#### **3.1 Condições experimentais**

- Equipamento: dissolutor
- Aparato: 2 (pás)
- Velocidade de rotação: 50 rpm
- Meio de dissolução: 900 mL de HCl 0,1 M.
- Tempo de dissolução: 45 (quarenta e cinco) minutos
- Amostra: 01 comprimido por cuba
- Tolerância (Q): 80 %.

#### **3.2 Preparo do meio de dissolução: HCl 0,1 M**

Em balão volumétrico de 12 litros contendo cerca de 50% do volume do balão de água deionizada, adicionou-se lentamente 100 mL de ácido clorídrico (HCl). Após a solução ter atingido a temperatura ambiente completou-se o volume do balão com água deionizada e homogeneizou-se.

O meio de dissolução foi aquecido a 41 °C e desaerado sob sistema de filtração a vácuo sob agitação. A agitação foi mantida por aproximadamente 5 (cinco) minutos após o término da filtração.

### **3.3 Parâmetros e critérios de aceitação**

#### **3.3.1 Seletividade**

Para determinação da seletividade foi avaliada a interferência do diluente (meio de dissolução) e dos componentes da formulação (placebo).

O limite para as interferências observadas foi determinado em 2%.

##### **3.3.1.1 Procedimento**

Foram preparadas amostras da substância de referência fumarato de tenofovir desoproxila Nortec (lote SQR 907049), padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila (matéria-prima lote 907049), placebo 100% fortificado com fumarato de tenofovir desoproxila, placebo puro, diluente (meio de dissolução, solução HCl 0,1 M).

Para preparo da amostra da substância de referência Nortec pesou-se 16,50 mg de fumarato de tenofovir desoproxila e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL, com 35 mL de solução de HCl 0,1 M.

Para preparo da amostra do padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila pesou-se 66,00 mg de fumarato de tenofovir desoproxila em papel vegetal e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL, com 140 mL de solução de HCl 0,1 M.

Para preparo da amostra do placebo fortificado 100% pesou-se 82,00 mg do placebo puro e 66,00 mg padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL, com 140 mL de solução de HCl 0,1 M.

Para preparo da amostra do placebo puro pesou-se 82,00 mg do placebo puro e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL, com 140 mL de solução de HCl 0,1 M.

Todas as amostras citadas acima foram submetidas a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultra-som (temperatura ambiente). O volume foi completado com solução diluente e homogeneizado. Procedeu-se a diluição de 10

mL para balão de 100 mL, completando o volume do balão com solução diluente. As soluções finais foram filtradas com o auxílio de papel de filtro.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm e foi realizada varredura entre 200nm e 400nm.

### 3.3.2 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparadas amostras na faixa de 50% a 150% da concentração esperada (300 mg), sendo três amostras independentes de cada nível.

Foram preparadas três soluções-mãe padrão pesando-se 20,62 mg de padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila e transferiu-se para balão volumétrico de 250 mL, com auxílio de 140 mL de solução diluente. Submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se. Desta forma obteve-se três soluções-mãe padrão independentes com concentração de 0,0825 mg / mL de fumarato de tenofovir desoproxila.

A partir de cada solução-mãe foram preparadas cinco soluções, uma em cada nível de concentração da curva.

O preparo das amostras seguiu conforme tabela 16.

**Tabela 16 – Soluções para construção da curva para avaliação da linearidade.**

Nível de concentração	Volume da solução-mãe	Balão volumétrico	Concentração final TDF
50%	10 mL	50 mL	0,01650 mg/mL
75%	15 mL	50 mL	0,02475 mg/mL
100%	20 mL	50 mL	0,03300 mg/mL
125%	25 mL	50 mL	0,04125 mg/mL
150%	15 mL	25 mL	0,04950 mg/mL

TDF – fumarato de tenofovir desoproxila

O volume da solução-mãe foi pipetado com auxílio de pipeta volumétrica. Completou-se o volume de cada uma das soluções obtidas com solução diluente e homogeneizou-se. A solução final foi filtrada em papel de filtro e quantificada.

### **3.3.2.1 Testes de premissas**

A verificação das premissas foi realizada conforme descrito no item 2.3.2.1.

### **3.3.2.2 Adequação ao modelo linear**

A verificação da adequação dos dados ao modelo linear foi realizada conforme descrito no item 2.3.2.2.

### **3.3.3 Teste de efeito matriz**

A avaliação do efeito da matriz sobre a resposta do método foi avaliada pela construção de curva semelhante à curva construída para o teste de linearidade e comparação de inclinações e interseções das duas curvas obtidas.

Para construção da curva matrizada foram preparadas amostras na faixa de 50% a 150% da concentração esperada (300 mg) com adição de placebo. Foram preparadas três amostras independentes de cada nível.

Foram preparadas três soluções-mãe padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila conforme descrito no item 3.3.2.

Preparou-se uma solução-mãe placebo pesando-se 41,00 mg do placebo puro e transferiu-se para balão volumétrico de 200 mL com 140 mL de solução diluente. Submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se. Obteve-se uma solução com 0,205 mg/mL de placebo puro.

A solução-mãe placebo foi adicionada em cada uma das três amostras de cada nível de concentração, conforme demonstrado na tabela 17.

**Tabela 17 – Soluções para construção da curva para avaliação do efeito matriz**

Nível de concentração	Volume da solução-mãe padrão	Volume da solução-mãe placebo	Balão volumétrico	Concentração final de TDF
50%	10 mL	10 mL	50 mL	0,01650 mg/mL
75%	15 mL	10 mL	50 mL	0,02475 mg/mL
100%	20 mL	10 mL	50 mL	0,03300 mg/mL
125%	25 mL	10 mL	50 mL	0,04125 mg/mL
150%	15 mL	10 mL	25 mL	0,04950 mg/mL

TDF – fumarato de tenofovir desoproxila

O volume das soluções-mãe foi pipetado com auxílio de pipeta volumétrica. Completou-se o volume de cada uma das soluções obtidas com solução diluente e homogeneizou-se. As soluções finais foram filtradas em papel de filtro e quantificadas. A concentração de final de placebo puro foi de 0,041 mg/mL em todas as soluções obtidas.

#### **3.3.3.1 Testes de premissas**

A verificação das premissas foi realizada conforme descrito no item 2.3.2.1.

#### **3.3.3.2 Adequação ao modelo linear**

A verificação da adequação dos dados ao modelo linear foi realizada conforme descrito no item 2.3.2.2.

#### **3.3.3.3 Teste de homoscedasticidade das curvas usual e matrizada**

Para comparação das inclinações das curvas usual e matrizada foi utilizado o teste t com variâncias distintas. Este teste tem aplicação nos casos em que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  é maior que o valor  $F_{\text{crítico}}$  ( $\alpha=0,05$ ), ou seja, quando há heterocedasticidade dos resíduos.

#### **3.3.3.4 Teste t para comparação de inclinações e interseções**

No teste t com variâncias distintas conclui-se que não há efeito matriz se os valores para a estatística t para contrastes entre interseções ( $t'_a$ ) e estatística t para contrastes entre inclinações ( $t'_b$ ), forem menores que o  $t_{\text{crítico}}$  ( $\alpha=0,05$ ).

#### **3.3.4 Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação**

No experimento para avaliação da exatidão, precisão e limites foi preparada uma curva de calibração com três níveis de concentração (75%, 100% e 125%) em cada dia de experimento (Dia 1 e Dia 2). As curvas de calibração foram utilizadas para determinar a concentração das amostras fortificadas.

As amostras foram preparadas em triplicata, em dois dias diferentes, por analistas diferentes, conforme tabela 18, gerando quatro conjuntos de dados analíticos.

Para cada nível de concentração da curva preparou-se três amostras independentes. O quantitativo pesado de padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila foi de 49,50 mg, 66,00 mg e 82,50 mg, para preparo das amostras a 75%, 100% e 125%, respectivamente. Para cada solução foram pesados também 82,00 mg do placebo puro. Transferiu-se para balão volumétrico de 200 mL com auxílio de 140 mL de solução diluente, submeteu-se a 10 minutos em agitador orbital e 10 minutos em banho ultrassom (temperatura ambiente). Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se. As amostras foram diluídas em 10 vezes para balão de 100 mL. As soluções finais foram filtradas em papel de filtro e quantificadas.

Preparou-se também amostras do placebo puro, pesando-se 82,00 mg do placebo puro e seguindo mesmo procedimento descrito acima para as demais amostras.

**Tabela 18 – Experimento para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.**

	Dia 1		Dia 2	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
<b>Analista 1</b>	Experimento 1	---	---	Experimento 4
<b>Analista 2</b>	---	Experimento 2	Experimento 3	---
Equipamentos	Balança Analítica Mettler Toledo AX205	Balança Analítica Mettler Toledo AX205	Balança Analítica Mettler Toledo AT201	Balança Analítica Mettler Toledo AT201
	Espectrofotômetro UNICAM UV3-200	Espectrofotômetro UNICAM UV3-200	Espectrofotômetro UNICAM UV3-200	Espectrofotômetro UNICAM UV3-200

#### **3.3.4.1 Exatidão – critérios de aceitação**

Para avaliação de possíveis valores extremos ou *outliers* foi aplicado o teste de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ).

A média de recuperação e o intervalo de confiança em relação à mesma devem ficar entre 98,0 e 102,0%. Os valores individuais de recuperação devem estar entre 97,0 e 103,0%.

#### **3.3.4.2 Precisão – premissas e critérios de aceitação**

##### **3.3.4.2.1 Teste de premissas para ANOVA**

Para avaliação da normalidade dos resíduos, foi aplicado o teste de Ryan-Joiner. O valor de  $R_{eq}$  deve ser maior o valor de  $R_{crítico}$ .

A homoscedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe. O valor de  $t_L$  deve ser menor que  $t_{crítico}$  ( $\alpha=0,05$ ).

##### **3.3.4.2.2 Teste de ANOVA para estimativa da precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial**

Para avaliação da precisão foram calculados o desvio padrão sob condições de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) e o desvio padrão sob condições de

repetitividade ( $DPR_r$ ). Para que o método seja considerado preciso, o  $DPR_R$  calculado deve ser menor ou igual a 5% e o  $DPR_r$  deve ser menor ou igual a 2/3 do valor encontrado para o  $DPR_R$ .

#### 3.3.4.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ do método serão o menor nível de concentração estudado com exatidão (recuperação média) e precisão ( $DPR_R$  e  $DPR_r$ ) adequadas.

#### 3.3.5 Robustez

O parâmetro robustez foi estudado através do teste de Youden (YOU DEN e STEINER, 1975). Foram avaliadas cinco variáveis do método através de oito análises de cada amostra, conforme tabelas 19 e 20.

Os critérios de aceitação para avaliação da exatidão na robustez são os mesmos descritos para avaliação da exatidão do método no item 3.3.4.1.

A média de recuperação e o intervalo de confiança, em relação à mesma, deve estar entre 97,0 e 103,0%. Os valores individuais de recuperação devem estar entre 95,0 e 105,0%.

**Tabela 19 – Variáveis analíticas e variações aplicadas para avaliação da robustez.**

	Variável	Limites inferior e superior
A	Comprimento de onda de leitura	a: 258 A: 262
B	Tempo de agitação no orbital	b: 8 min B: 12 min
C	Tempo de agitação no ultrassom	c: 8 min C: 10 min
D	Filtro de papel quantitativo	d: Filtro quantitativo Marca J Prolab D: Filtro quantitativo Marca Microclar
E	Reagentes	e: HCl Marca Mallinckrodt E: HCl Marca Merck



**Tabela 20 – Combinação de variáveis para avaliação da robustez pelo método de Youden.**

Variável	Análise							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

### **3.3.6 Estabilidade das soluções**

As amostras preparadas para a avaliação da seletividade foram armazenadas em temperatura ambiente por no mínimo 24 horas e quantificadas sob as mesmas condições analíticas.

Foram avaliadas as amostras da substância de referência Nortec, do padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila e do placebo fortificado 100%.

#### **3.3.6.1 Critério de aceitação**

As respostas obtidas para a mesma solução, quantificadas em diferentes dias, devem apresentar coeficiente de variação inferior a 2% para serem consideradas estáveis.

### **3.3.7 Teste de dissolução**

O método desenvolvido e validado para a avaliação da dissolução de comprimidos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila foi testado em equipamentos com diferentes métodos de coleta (manual e automático) para verificar a adequabilidade do método.

O teste foi realizado com comprimidos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila do lote 09080845 do produto candidato a similar/ genérico.

### 3.4 Resultados e discussão

#### 3.4.1 Seletividade

Foi realizada a varredura espectral das amostras do placebo puro e do diluente e não foram identificadas bandas de absorção em 260 nm. A amostra do placebo fortificado apresentou o mesmo perfil espectral do padrão de referência tenofovir da Nortec e do padrão de trabalho, indicando que os excipientes não interferem na seletividade do método, conforme demonstrado nas figuras 13 e 14.

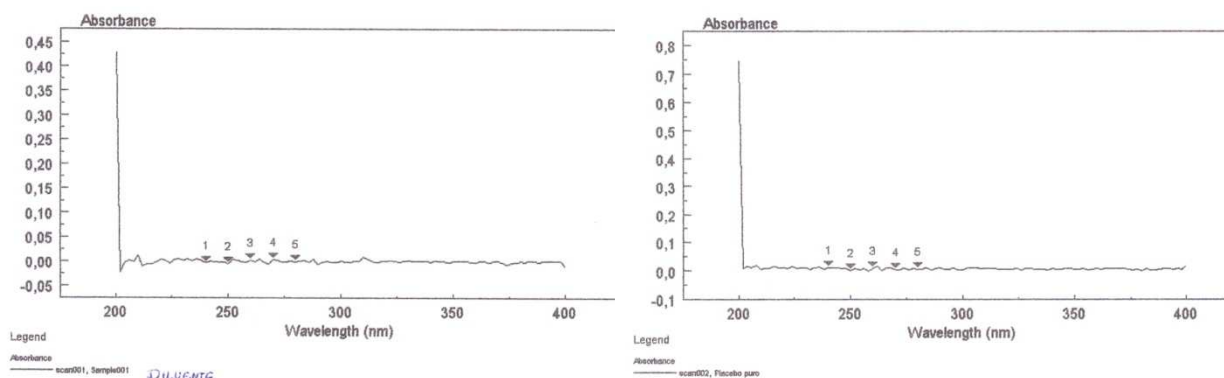


Figura 13 – Espectros obtidos para o diluente e para o placebo puro.

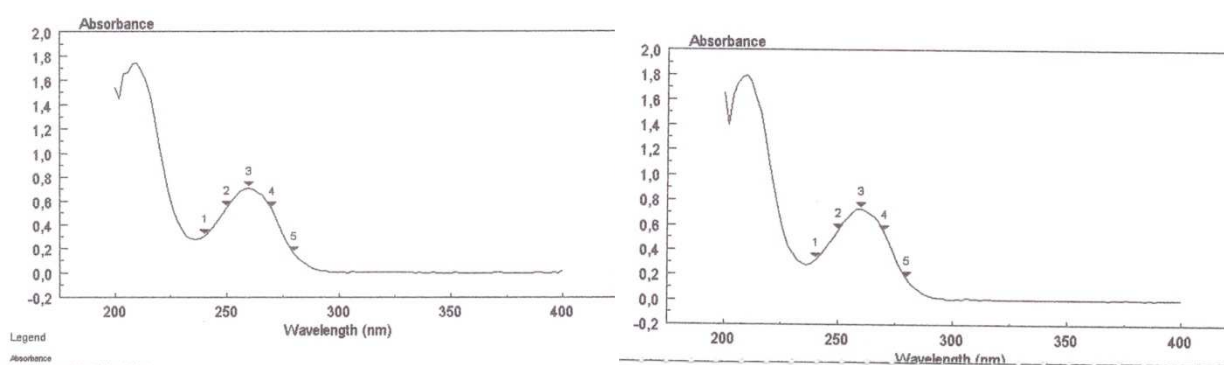


Figura 14 – Espectros obtidos para o padrão de referência e o placebo fortificado.

### **3.4.2 Linearidade**

#### **3.4.2.1 Testes de premissas**

O teste de resíduos padronizados de Jackknife não identificou nenhum valor extremo, sendo mantidos todos os dados obtidos.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9759, superior ao valor crítico de 0,9506. Desta forma podemos concluir que o desvio da normalidade não é significativo ( $p > 0,10$ ).

A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste de Brown-Forsythe, com estatística  $t_L$  (t de Levene) igual a 1,61 menor que t crítico de 2,160.

A independência dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson, indicando que não existe correlação entre os resíduos.

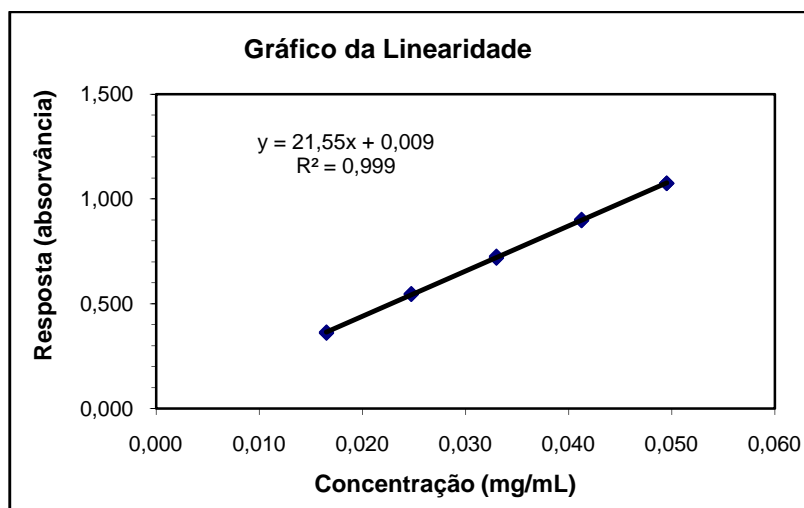
#### **3.4.2.2 Adequação ao modelo linear**

A significância da regressão foi avaliada por análise de variância, onde o valor de F calculado, 77817,08, foi maior que o F crítico, 4,667, mostrando que a regressão é significativa.

O desvio de linearidade também foi avaliado por análise de variância, onde o valor de F calculado, 2,994, foi menor que o F crítico, 3,708, mostrando que não há desvio de linearidade.

O coeficiente de correlação linear,  $r^2$ , foi de 0,99983.

A curva obtida para o fármaco na faixa de 0,01650 mg/mL a 0,04950 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação encontra-se na figura 15.



**Figura 15** – Curva obtida para o fármaco na faixa de 0,01650 mg/mL a 0,04950 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação.

### 3.4.3 Teste de efeito matriz

#### 3.4.3.1 Testes de premissas

O teste de resíduos padronizados de Jackknife permitiu a identificação de dois (2) valores extremos (pontos 12 e 13, terceira replicata do nível de concentração a 125% e primeira replicata do nível de concentração a 150%), os quais foram excluídos do conjunto de dados.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9701, superior ao valor crítico de 0,9454. Desta forma podemos concluir que o desvio da normalidade não é significativo ( $p > 0,10$ ).

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários assume que cada nível da faixa tem uma variação absoluta constante (homocedasticidade). A homoscedasticidade foi confirmada pelo teste de Brown-Forsythe, com  $t_L$  (t de Levene) igual a 8,28E-01 menor que t crítico de 2,201.

A independência dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson, indicando que não existe correlação entre os resíduos.

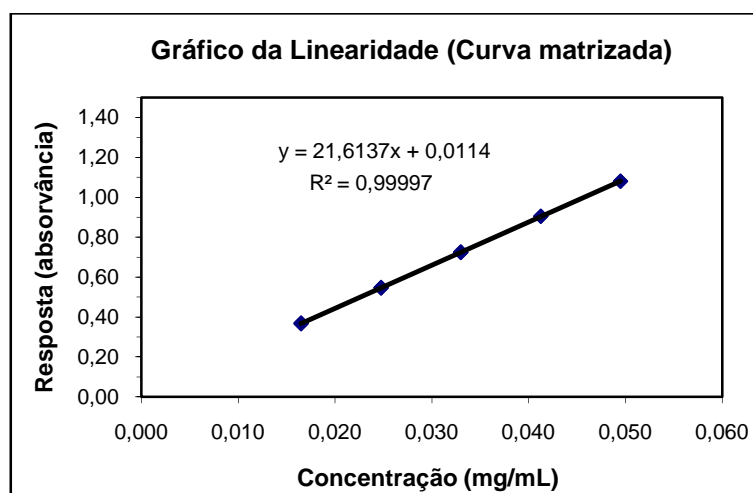
### 3.4.3.2 Adequação ao modelo linear

A significância da regressão foi avaliada por análise de variância, onde o valor de F calculado, 316695,19, foi maior que o F crítico, 4,84, mostrando que a regressão é significativa.

O desvio de linearidade também foi avaliado por análise de variância, onde o valor de F calculado, 0,515, foi menor que o F crítico, 4,066, mostrando que não há desvio de linearidade.

O coeficiente de correlação linear,  $r^2$ , foi de 0,99997.

A curva matrizada obtida para o fármaco na faixa de 0,0165 mg/mL a 0,0495 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação encontra-se na figura 16.



**Figura 16** – Curva matrizada obtida para o fármaco na faixa de 0,0165 mg/mL a 0,0495 mg/mL, com a equação e coeficiente de correlação.

### 3.4.3.3 Teste de homoscedasticidade das curvas usual e matrizada

O teste de F indicou heterogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas usual e matrizada, com valor de F calculado igual a 4,99 maior que F crítico de 2,76, portanto, será utilizado teste t com variâncias distintas para avaliação do efeito de matriz.

#### **3.4.3.4 Teste t para comparação de inclinações e interseções**

Os valores de  $t'_a$  e  $t'_b$  calculados foram 0,5957 e 0,7055, ambos menores que  $t$  crítico de 2,1009, indicando que não existem diferenças significativas entre a inclinação e a interseção das curvas, concluindo que não existe efeito de matriz.

#### **3.4.4 Exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação**

A estimativa das concentrações das amostras fortificadas foi determinada por meio da curva de calibração.

A recuperação foi calculada através da comparação das concentrações obtidas para as amostras fortificadas em relação à concentração teórica adicionada.

##### **3.4.4.1 Exatidão**

O teste de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ) indicou a presença de dois valores extremos (replicatas 11 e 12) para o nível de concentração de 0,03300 mg/mL os quais foram excluídos do conjunto de dados. Não foram identificados valores extremos entre os resultados de recuperação para as amostras adicionadas nos níveis de concentração de 0,02475 mg/mL e 0,04125 mg/mL.

Os valores individuais de recuperação encontrados estão entre 98,57% e 101,70%, conforme tabela 21, e as médias de recuperação obtidas encontram-se entre 99,96% e 100,49%.

O método se mostrou exato para os níveis de concentração estudados.

##### **3.4.4.2 Precisão**

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi avaliada pela concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial (precisão inter-corridas) foi avaliada pela concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtido em dias diferentes, com analistas diferentes e equipamentos diferentes.

Os dados para cada nível de concentração estão apresentados nas tabelas 22, 23 e 24.

**Tabela 21 – Dados de recuperação aparente para avaliação da exatidão.**

	Nível de concentração		
	0,02475 mg/mL	0,03300 mg/mL	0,04125 mg/mL
Recuperação aparente (%)	99,221	98,883	98,569
	99,407	99,385	98,791
	99,777	99,439	99,014
	100,020	99,717	99,681
	100,207	99,806	99,904
	100,334	100,086	100,013
	100,704	100,273	100,461
	100,954	100,412	100,685
	101,075	100,506	100,685
	101,141	101,107	100,797
	101,328	<b>101,206 *</b>	101,021
	101,701	<b>101,766 *</b>	101,349

\* dados excluídos identificados como valores extremos pelo teste de Grubbs.

**Tabela 22 – Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,02475 mg/mL.**

Experimento	Replicatas do ensaio	Recuperação aparente
1	1	99,407
	2	100,704
	3	101,075
2	1	99,777
	2	99,221
	3	100,334
3	1	100,020
	2	100,954
	3	101,328
4	1	101,141
	2	100,207
	3	101,701

**Tabela 23 - Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,03300 mg/mL.**

Experimento	Replicatas do ensaio	Recuperação aparente
1	1	100,273
	2	100,412
	3	101,107
2	1	99,439
	2	98,883
	3	99,717
3	1	100,086
	2	<b>101,206 *</b>
	3	100,506
4	1	99,385
	2	99,806
	3	<b>101,766 *</b>

\* dados excluídos identificados como valores extremos pelo teste de Grubbs.

**Tabela 24- Dados obtidos nos 4 experimentos para o nível de concentração 0,04125 mg/mL**

Experimento	Replicatas do ensaio	Recuperação aparente
1	1	99,904
	2	99,014
	3	98,569
2	1	98,791
	2	101,349
	3	99,681
3	1	100,461
	2	100,685
	3	101,021
4	1	100,685
	2	100,797
	3	100,013



#### **3.4.4.3 Teste de premissas para ANOVA**

A normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner com  $R_{eq}$  calculado de 0,9518, 0,9771 e 0,9777, maiores que  $R_{crítico}$  de 0,9422, 0,9347 e 0,9422 ( $\alpha = 0,05$ ), respectivamente para os níveis de concentração de 0,02475 mg/mL, 0,03300 mg/mL e 0,04125 mg/mL.

A homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Brown-Forsythe, com  $F_{calculado}$  de 0,077, 0,236 e 1,011, menores que  $F_{crítico}$  de 4,066, 4,757 e 4,066 ( $\alpha = 0,05$ ), respectivamente para os níveis de concentração de 0,02475 mg/mL, 0,03300 mg/mL e 0,04125 mg/mL.

#### **3.4.4.4 Teste de ANOVA para estimativa da precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial**

Nos experimentos em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, a precisão é avaliada por análise de variância. O  $DPR_r$  calculado foi de 0,72%, 0,40% e 0,78%, respectivamente para os níveis de concentração de 0,02475 mg/mL, 0,03300 mg/mL e 0,04125 mg/mL, menores que o limite de 3,30%. O  $DPR_R$  calculado foi de 0,80%, 0,69% e 0,94%, respectivamente para os níveis de concentração de 0,02475 mg/mL, 0,03300 mg/mL e 0,04125 mg/mL, menores que o limite estipulado de 5,00%.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que todas as premissas foram cumpridas e que os desvios calculados estão abaixo do limite, demonstrando a precisão do método em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.

#### **3.4.4.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)**

Os limites de detecção e quantificação do método foram definidos a partir do menor nível estudado nos testes de precisão e exatidão do método, sendo iguais a 0,024750 mg/mL.

### 3.4.5 Robustez

Os resultados de recuperação média obtidos para cada grupo no ensaio de robustez estão demonstrados na tabela 25.

**Tabela 25 – Resultados de recuperação média obtidos no ensaio de robustez.**

Variável	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
	s	t	u	v	w	x	y	z
Resultado	99,46%	99,86%	104,67%	98,23%	100,27%	97,16%	101,94%	99,36%

O teste de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ) não indicou a presença de valores extremos no ensaio da robustez. Os valores individuais de recuperação encontram-se entre 95,0% e 105,0% e a média de recuperação (100,12%) encontra-se entre 97,0% e 103,0%.

Para avaliação do efeito de cada variável, foi calculada a diferença entre as médias para os quatro resultados obtidos nas duas condições avaliadas, os resultados estão representados na tabela 26.

**Tabela 26 – Efeito das variáveis analíticas no ensaio da robustez.**

Variáveis		Resultados	X - x
Comprimento de onda de leitura	A	100,56	0,87
	a	99,68	
Tempo de agitação no orbital	B	99,19	-1,86
	b	101,05	
Tempo de agitação no ultrassom	C	101,58	2,93
	c	98,65	
Filtro de papel quantitativo	D	100,16	0,07
	d	100,08	
Reagentes	E	100,16	0,09
	e	100,08	

X – média dos valores obtidos na primeira condição avaliada (Ex: A)

x – média dos valores obtidos na segunda condição avaliada (Ex: a)

De acordo com os resultados obtidos, as variáveis que apresentam maior influência sobre o método em questão foram o tempo de agitação no ultrassom, o tempo de agitação no agitador orbital e o comprimento de onda de leitura. É importante que estas variáveis sejam monitoradas com atenção na rotina de utilização do método analítico.

Em relação à recuperação, o método analítico apresentou-se robusto para todas as condições avaliadas, uma vez que a recuperação média encontrada para todos os grupos encontra-se entre 97% e 103%.

#### **3.4.6 Estabilidade das soluções**

A diferença entre as respostas obtidas para a mesma solução, quantificadas com intervalo de 24 horas, foi de 0,57%, 0,37% e 0,82%, respectivamente para as amostras da substância de referência Nortec, do padrão de trabalho de fumarato de tenofovir desoproxila e do placebo fortificado 100%.

Todas as diferenças encontradas foram inferiores a 2% e as amostras foram consideradas estáveis nas condições do método aplicado, o que já era esperado uma vez que o fármaco se demonstrou bastante estável em soluções de HCl a temperatura ambiente durante os estudos de estresse.

#### **3.4.7 Teste de dissolução**

Os resultados obtidos para o teste de dissolução do lote 09080845 do produto candidato a similar/ genérico encontram-se na tabela 27.

**Tabela 27 – Resultados obtidos para o teste de dissolução em equipamentos diferentes.**

<b>Cuba</b>	<b>CEDÊNCIA (%)</b>	
	Dissolutor Vankel 7000 Coleta Manual	Dissolutor Varian 7025 Coleta Automática
Cuba 1	99,68 %	99,33 %
Cuba 2	98,73 %	97,06 %
Cuba 3	97,10 %	98,26 %
Cuba 4	95,75 %	97,99 %
Cuba 5	97,38 %	96,52 %
Cuba 6	98,19 %	96,93 %
<b>Média</b>	<b>97,81 %</b>	<b>97,68 %</b>
Desvio padrão relativo (DPR)	1,40 %	1,07 %

Não houve diferença significativa entre as médias obtidas para os valores de cedência nos dois equipamentos, indicando que ambos podem ser utilizados para aplicação do método.

## **4 MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NO CONTROLE DE QUALIDADE**

### **4.1 Teste de identificação**

#### **4.1.1 Espectrometria de absorção no infravermelho**

Foram obtidos espectros no infravermelho do fumarato de tenofovir desoproxila para a matéria-prima, para a substância de referência Nortec e para a substância química de referência USP. A leitura foi realizada no comprimento de onda entre  $3800\text{ cm}^{-1}$  e  $650\text{ cm}^{-1}$ .

Os espectros obtidos foram comparados, sendo a semelhança entre os espectros dada pela correlação entre as bandas de absorção.

#### **4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência**

Aplicou-se o método por cromatografia líquida de alta eficiência descrito para o teste de teor (doseamento), item 4.6. O tempo de retenção obtido para o maior pico no cromatograma da solução problema foi comparado com tempo de retenção encontrado para a solução padrão.

### **4.2 Determinação de peso em formas farmacêuticas**

Pesou-se, individualmente, 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora do limite especificado, em relação ao peso médio, porém, nenhuma pode estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas (BRASIL, 1988).

No caso dos comprimidos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila, aplicou-se o limite de variação de  $\pm 5,0\%$ , limite estabelecido para comprimidos revestidos com filme com peso médio superior a 250 mg (BRASIL, 1988).

### **4.3 Determinação de água**

A determinação de água foi realizada de acordo com o Método Geral V.2.20.1 da F. Bras. IV (BRASIL, 1988) utilizando equipamento específico para método de *Karl Fischer*. O resultado da determinação de água foi determinado apenas como parâmetro informativo, uma vez que não havia histórico relativo ao produto para determinação da especificação.

### **4.4 Teste de desintegração**

O teste de desintegração foi realizado conforme procedimento definido no Método Geral V.1.4.1 da F. Bras IV (BRASIL, 1988).

O critério de aceitação utilizado foi: todos os comprimidos devem desintegrar-se completamente em água deionizada a  $37 \pm 1$  ° C em no máximo 60 (sessenta) minutos (com disco).

### **4.5 Teste de dissolução**

#### **4.5.1 Condições experimentais**

As condições experimentais utilizadas foram citadas no item 3.1.

#### **4.5.2 Preparo do meio de dissolução: HCl 0,1 M**

O meio de dissolução foi preparado conforme descrito no item 3.2.

#### **4.5.3 Preparo da solução padrão**

Pesou-se 33,00 mg de padrão de fumarato de tenofovir desoproxila e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de aproximadamente

70 mL de solução HCl 0,1 M. Procedeu-se a agitação por 10 (dez) minutos em agitador orbital e submeteu-se a banho ultra-som por 10 (dez) minutos. Completou-se o volume com solução HCl 0,1 M e homogeneizou-se.

Pipetou-se 10 mL da solução anterior para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com solução HCl 0,1 M e homogeneizou-se. Obteve-se uma solução com concentração de 0,033 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila.

#### **4.5.4 Preparo da solução problema**

Pesou-se individualmente 6 (seis) comprimidos utilizando balança analítica. Adicionou-se, em cada cuba, 900 mL de meio de dissolução e procedeu-se o teste. Após 45 (quarenta e cinco) minutos de teste, foram recolhidas alíquotas de no mínimo 15 mL de cada cuba, filtrando-as adequadamente. Pipetou-se 10 mL de cada alíquota filtrada para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com solução HCl 0,1 M e homogeneizou-se.

#### **4.5.5 Leitura das amostras**

Procedeu-se a leitura das amostras em espectrômetro com detecção no UV ajustado em 260 nm.

#### **4.5.6 Quantificação**

A quantificação da porcentagem dissolvida em cada cuba e da cedência média foi realizada com as fórmulas descritas abaixo:

$$C_{Pa} = \frac{M_{Pa} \times Pot_{Pa} \times 10}{100 \times 100 \times 100} \qquad C_{Pb} = \frac{VD \times 10}{900 \times 100}$$

$$\% \text{ de cedência individual} = \frac{A_{Pb} \times C_{Pa} \times 100,0}{A_{Pa} \times C_{Pb}}$$

$$\text{Média} = \frac{\sum \% \text{ de cedência individual}}{N^{\circ} \text{ de comprimidos testados}}$$

Onde:  $A_{Pa}$ : Absorvância da solução padrão  
 $A_{Pb}$ : Absorvância da solução problema  
 $C_{Pa}$ : concentração da solução padrão  
 $C_{Pb}$ : concentração da solução problema  
 $\sum$  %: somatório das cedências individuais  
 $M_{Pa}$ : massa pesada de padrão  
 $Pot_{Pa}$ : potência (teor) do padrão  
VD: valor declarado do produto (mg)

#### 4.5.7 Critério de aceitação

O teste de dissolução foi avaliado de acordo com a F. Bras. IV. Os critérios de aceitação encontram-se resumidos na tabela 28.

**Tabela 28 – Critérios de aceitação do teste de dissolução**

Etapa	Unidades	Critérios de aceitação
E <sub>1</sub>	06	Cada unidade apresenta resultados maiores ou iguais a Q + 5%
E <sub>2</sub>	06	Média de 12 (doze) unidades (E <sub>1</sub> + E <sub>2</sub> ) é igual ou maior do que Q e nenhuma unidade apresenta resultados inferiores a Q – 15%
E <sub>3</sub>	12	Média de 24 (vinte e quatro) unidades (E <sub>1</sub> + E <sub>2</sub> + E <sub>3</sub> ) é igual ou maior do que Q e não mais que duas unidades apresentam resultados inferiores a Q – 15%

Fonte: Adaptado de Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> edição

#### 4.6 Teste de teor (doseamento)

##### 4.6.1 Condições experimentais

As condições experimentais utilizadas foram citadas no item 2.1.



#### **4.6.2 Preparo do diluente solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 (1000 mL)**

O diluente foi preparado conforme descrito no item 2.2.

#### **4.6.3 Preparo da solução padrão**

Pesaram-se 30,00 mg de padrão de fumarato de tenofovir desoproxila e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de aproximadamente 70 mL de solução trietilamina 0,1 % pH 5,3. Procedeu-se agitação em agitador orbital por 10 (dez) minutos e submeteu-se a banho de ultra-som por 10 (dez) minutos. Completou-se o volume com solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 e homogeneizou-se. A solução obtida foi filtrada para *vial*, utilizando unidade filtrante de porosidade de 0,45 µm acoplado à seringa. Obteve-se uma concentração final de 0,30 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila.

#### **4.6.4 Preparo da solução problema**

Pesaram-se individualmente, 20 (vinte) comprimidos e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram pulverizados com auxílio de gral e pistilo. Pesou-se o equivalente a 01 (um) peso médio e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de aproximadamente 70 mL solução trietilamina 0,1 % pH 5,3. Procedeu-se agitação em agitador orbital por 10 (dez) minutos e submeteu-se a banho de ultra-som por 10 (dez) minutos. Completou-se o volume com solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 e homogeneizou-se.

Pipetou-se 10 mL da solução anterior para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 e homogeneizou-se.

A solução final foi filtrada para *vial*, utilizando unidade filtrante de porosidade de 0,45 µm acoplado à seringa. Obteve-se uma concentração final de 0,30 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila.

#### 4.6.5 Quantificação

Procedeu-se a análise em cromatógrafo a líquido de alta eficiência, realizando no mínimo 3 (três) injeções da solução padrão e no mínimo 2 (duas) injeções da solução problema.

Determinou-se a média e o desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas referentes ao fármaco da solução padrão e solução problema.

#### 4.6.6 Cálculo do teor de tenofovir

Procedeu-se o cálculo do teor de tenofovir conforme as fórmulas abaixo:

$$C_{Pa} = \frac{M_{Pa} \times Pot_{Pa}}{100 \times 100}$$

$$C_{Pb} = \frac{M_{Pb} \times VD \times 10}{PM \times 100 \times 100}$$

$$\% VR = \frac{A_{Pb} \times C_{Pa} \times 100}{A_{Pa} \times C_{Pb}} \quad \text{mg do princípio ativo por comprimido} = \frac{\% VR \times VD}{100}$$

Onde:  $A_{Pa}$  : área da solução padrão

$A_{Pb}$  : área da solução problema (amostra)

$C_{Pa}$  : concentração da solução padrão

$C_{Pb}$  : concentração da solução problema (amostra)

$M_{Pa}$  : massa pesada do padrão

$M_{Pb}$  : massa pesada do problema (amostra)

$Pot_{Pa}$  : potência (teor) do padrão (%)

%VR: porcentagem do valor rotulado

VD: valor declarado do produto (mg)

PM: peso médio (mg)

#### 4.6.7 Critérios de aceitação

O produto foi considerado satisfatório se o valor obtido teste de teor estivesse contido no intervalo de 90,0% a 110,0 % do valor rotulado.

Todos os picos que apresentassem área superior ao equivalente a 0,1% da área do pico principal (referente ao fármaco) e que não estivessem presentes na

solução diluente das amostras e no placebo da formulação foram quantificados. A soma das áreas de todos os picos de prováveis impurezas/produtos de degradação deve corresponder a no máximo 5% da soma das áreas de todos os picos.

#### **4.7 Teste de uniformidade de conteúdo**

As condições experimentais, o preparo da solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 e o preparo da solução padrão foram os mesmos descritos para o teste de teor (doseamento), itens 2.2 e 4.6.3, respectivamente.

##### **4.7.1 Preparo da solução problema**

Pesou-se individualmente 10 (dez) comprimidos e cada um foi transferido para um balão volumétrico distinto de 100 mL. Adicionou-se 70 mL solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 e submeteu-se a agitação por 10 (dez) minutos em agitador orbital e 10 (dez) minutos em banho ultra-som. Completou-se o volume com solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 e homogeneizou-se.

Pipetou-se 10 mL da solução anterior para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com solução trietilamina 0,1 % pH 5,3 e homogeneizou-se.

A solução final foi filtrada para *vial*, utilizando unidade filtrante de porosidade de 0,45 µm acoplado à seringa. Obteve-se uma solução de concentração final de 0,30 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila.

##### **4.7.2 Cálculo da concentração do fármaco por dose unitária**

Procedeu-se o cálculo da concentração do fármaco por dose unitária conforme fórmulas descritas abaixo:

$$C_{Pa} = \frac{M_{Pa} \times Pot_{Pa}}{100 \times 100}$$

$$C_{Pb} = \frac{M_{Pb} \times VD \times 10}{PM \times 100 \times 100}$$

$$\% VR = \frac{A_{Pb} \times C_{Pa} \times 100}{A_{Pa} \times C_{Pb}}$$

$$\overline{\%VR} = \frac{\sum \%VR_n}{n}$$

Onde:  $A_{Pa}$ : área da solução padrão

$A_{Pb}$ : área da solução problema

$C_{Pa}$ : concentração da solução padrão

$C_{Pb}$ : concentração da solução problema

$M_{Pa}$ : massa pesada de padrão

$M_{Pb}$ : massa pesada do problema

$Pot_{Pa}$ : potência (teor) do padrão

VD: valor declarado do produto (mg)

$\Sigma$ : somatório

$\%VR_n$ : valores individuais das unidades avaliadas, expressas em % VR ( $\%VR_1, \%VR_2, \dots, \%VR_n$ )

$\overline{\%VR}$  : média dos valores obtidos nas unidades testadas (porcentagem do valor rotulado)

n: número de unidades testadas

#### 4.7.3 Cálculo do desvio padrão relativo

Calculou-se o desvio padrão relativo conforme fórmulas descritas abaixo:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (\%VR_n - \overline{\%VR})^2}{(n-1)}} \qquad DPR = \frac{100 \times S}{\overline{\%VR}}$$

Onde:

$\%VR_n$ : valores individuais das unidades avaliadas, expressas em % VR ( $\%VR_1, \%VR_2, \dots, \%VR_n$ )

$\overline{\%VR}$ : média dos valores obtidos nas unidades testadas (porcentagem do valor rotulado)

n: número de unidades testadas

S: desvio padrão da amostra

DPR: desvio padrão relativo

#### **4.7.4 Critério de aceitação**

O produto foi considerado satisfatório se a quantidade do fármaco em cada uma das 10 (dez) unidades testadas para uniformidade de conteúdo estivesse entre 85,0% e 115,0% do valor rotulado (VR) e o desvio padrão relativo (DPR) fosse menor ou igual a 6,0%;

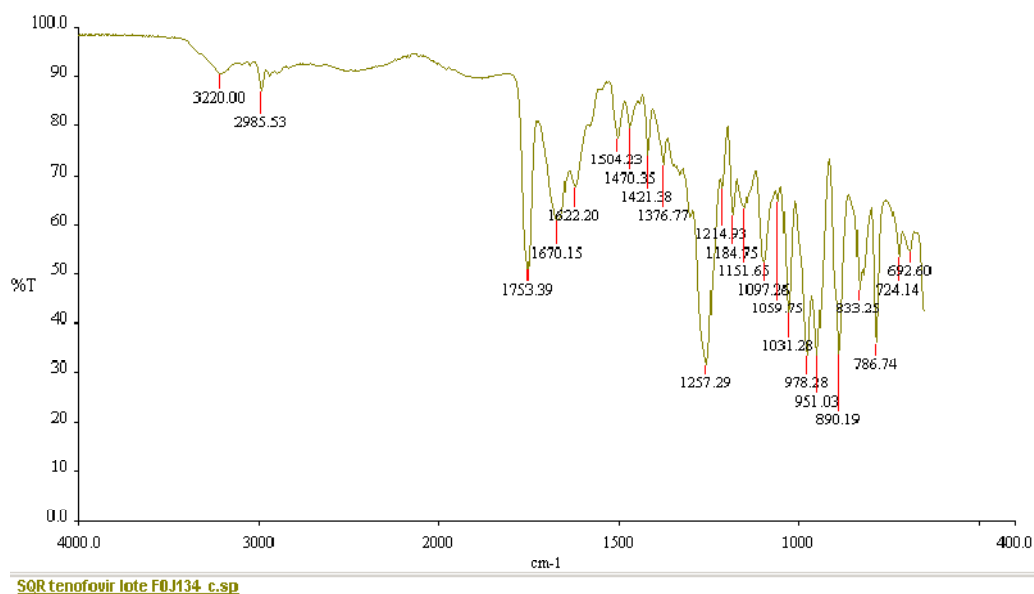
### **4.8 Resultados e discussão**

Todos os testes preconizados para comprimidos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila foram aplicados no produto candidato a similar/genérico e serão apresentados a seguir.

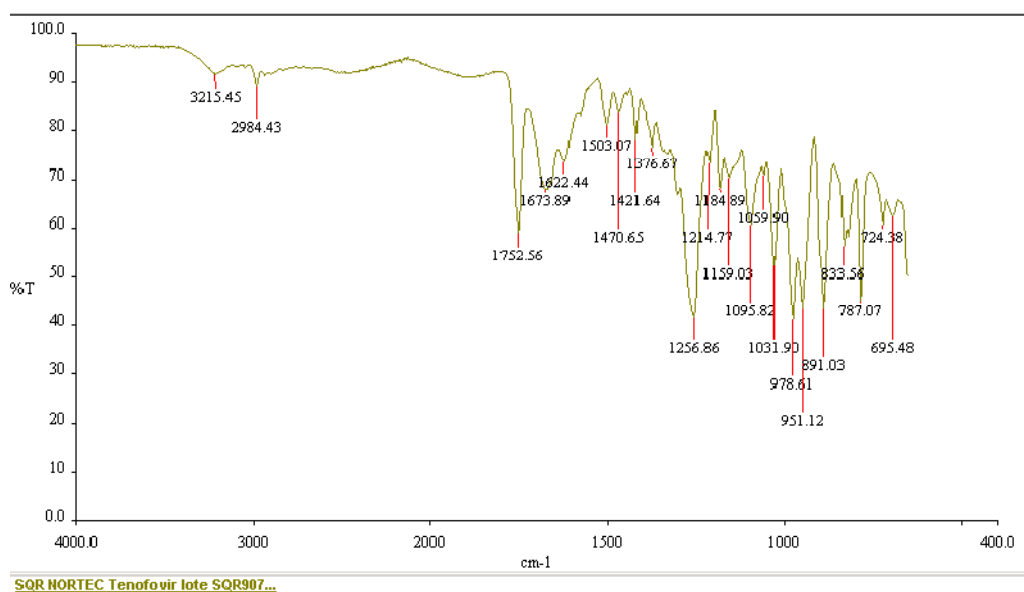
#### **4.8.1 Teste de identificação**

##### **4.8.1.1 Espectrometria de absorção no infravermelho**

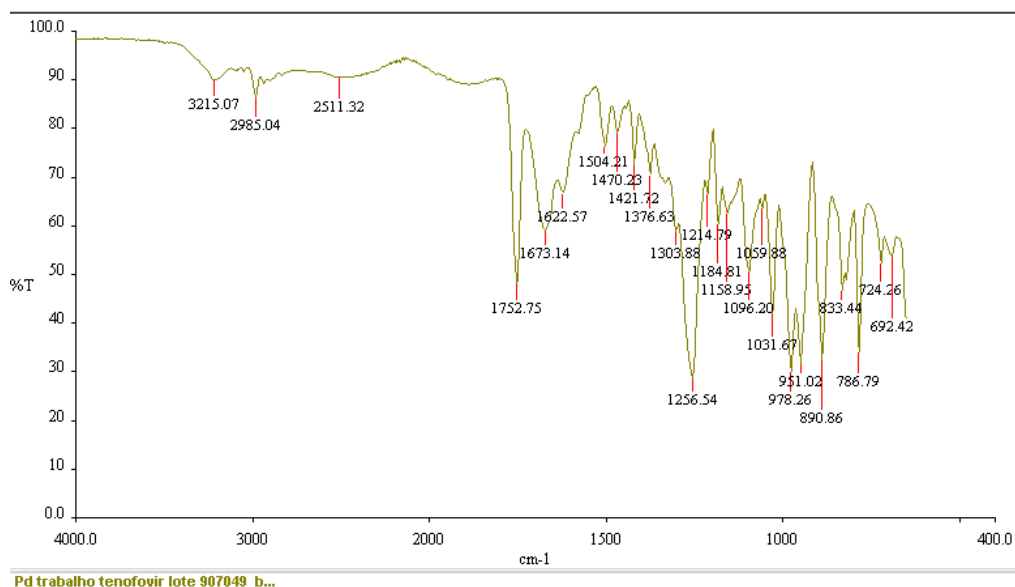
Os espectros no infravermelho obtidos para a substância química de referência USP, substância de referência Nortec e para a matéria-prima (fabricante Aurisco Pharmaceutical Limited) são apresentados nas figuras 17, 18 e 19, respectivamente.



**Figura 17 – Espectro no IV obtido para a substância química de referência USP.**



**Figura 18 – Espectro no IV obtido para a substância de referência Nortec.**



**Figura 19 – Espectro no IV obtido para a matéria-prima.**

A correspondência entre as posições das bandas de absorção do fumarato de tenofovir desopoxila matéria-prima e padrão demonstra que ocorreram as mesmas transições induzidas pela radiação infravermelha. Foi realizado cálculo da correlação pelo software do equipamento (espectrômetro IV Perkin Helmer, modelo Spectrum One – FT, software Spectrum) entre os espectros da substância de referência Nortec e da matéria-prima em relação à substância química de referência da USP, obtendo-se correlações de 0,9977 e 0,9914, respectivamente. Dessa forma foi confirmada a identidade da matéria-prima e da substância de referência da Nortec.

#### **4.8.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência**

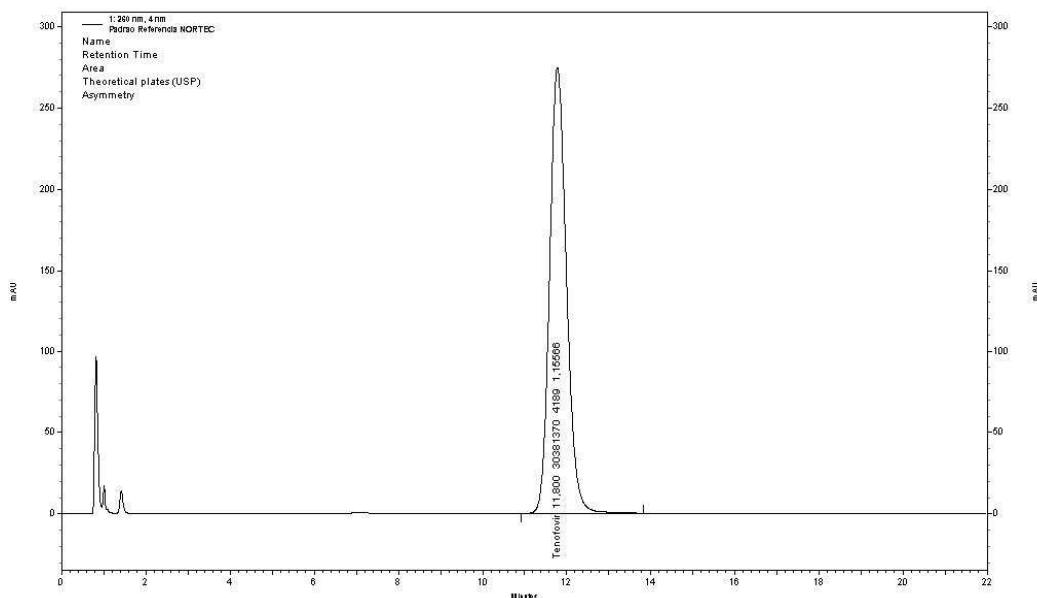
O pico cromatográfico referente ao fármaco na análise da substância química de referência USP, substância de referência Nortec e matéria-prima apresentou tempo de retenção de 11,86 min, 11,80 min e 11,87 min, respectivamente.

A pureza total dos picos analisada através de análise espectral no ultravioleta com detector de arranjo de diodo (DAD) foi de 1,000000 para todas as amostras. Este valor sugere se tratar de um composto puro.

Os espectros entre 200 nm e 400 nm da matéria-prima e da substância de referência Nortec apresentaram similaridade de 1,0000 com o espectro da

substância química de referência USP, confirmando a identidade das substâncias em análise.

Na figura 20, está representado o cromatograma obtido para a substância de referência Nortec, a título de exemplo.



**Figura 20 – Cromatograma obtido na análise da substância de referência Nortec.**

#### 4.8.2 Determinação de peso em formas farmacêuticas

Na tabela 29, são apresentados os resultados obtidos para a determinação de peso para o lote 09080844 do produto candidato a similar/ genérico.

**Tabela 29 – Resultados obtidos para a determinação de peso do lote 09080844 do produto candidato a similar/genérico.**

Unidade	Peso unitário (mg)	% desvio
1	664,80	-0,15
2	658,10	-1,16
3	676,10	1,55
4	670,20	0,66
5	672,70	1,04
6	653,20	-1,89
7	663,00	-0,42
8	670,80	0,75



Tabela 29 (conclusão)

Unidade	Peso unitário (mg)	% desvio
9	679,50	2,06
10	658,00	-1,17
11	661,00	-0,72
12	655,80	-1,50
13	686,70	3,14
14	663,50	-0,34
15	670,00	0,63
16	660,50	-0,80
17	666,70	0,14
18	660,50	-0,80
19	671,30	0,83
20	653,50	-1,85
<b>Peso médio</b>	<b>665,80</b>	-

Os desvios encontrados são inferiores ao limite permitido, estando o lote do produto aprovado neste parâmetro.

#### **4.8.3 Determinação de água**

O valor encontrado no teste de umidade foi de 2,47%, menor que o limite estabelecido no texto final para inclusão na Farmacopeia Internacional (WHO, 2010c) de 5% (50 mg/g). O teste foi incluído como informativo, uma vez que no início do trabalho não havia nenhuma especificação farmacopeica e não existia um histórico para o produto. Considerando o limite determinado no texto final da monografia da Farmacopeia Internacional e os resultados obtidos na análise do produto, sugere-se a inclusão do limite de 5% na análise de outros lotes do produto.

#### **4.8.4 Teste de desintegração**

Os comprimidos se desintegraram em um tempo máximo de 01 minuto e 46 segundos, estando bem abaixo do limite estabelecido de 60 minutos. O método geral nº 5.1.4 referente ao teste de desintegração da F. Bras. V (BRASIL, 2010f)

estabelece o limite de 30 minutos para desintegração completa de comprimidos revestidos com filme, valor que difere do limite de 60 minutos apontado na F. Bras. IV (BRASIL, 1988), referência adotada na execução deste trabalho. Porém, o produto testado atende também ao disposto na nova edição da farmacopéia, podendo o novo limite ser adotado na análise de outros lotes do produto.

#### **4.8.5 Teste de dissolução**

O resultado obtido para o teste de dissolução do lote 09080844 do produto candidato a similar/ genérico foi de 97,99%, cumprindo com os requisitos do ensaio. O limite estabelecido está de acordo com a proposta da Farmacopeia Internacional (WHO, 2010c).

Para definição do meio e dos parâmetros a serem utilizados no teste de dissolução foram avaliados alguns critérios como solubilidade, estabilidade do fármaco e os dados disponíveis no FDA sobre métodos de dissolução para o medicamento referência (FDA, 2009).

De acordo com as recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata disponibilizadas pela Anvisa (BRASIL, 2010e), para medicamentos com fármacos altamente solúveis que apresentam dissolução rápida (casos I e III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica), um teste de dissolução de um único ponto (60 minutos ou menos) que demonstre dissolução de no mínimo 85%, é suficiente para controle da uniformidade lote a lote. Desta forma, o limite de 85% (Q + 5%) e o tempo de 45 minutos estão adequados, considerando que o fármaco é solúvel, sendo classificado como caso III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

O meio de dissolução, HCl 0,1 M, foi escolhido em razão da alta estabilidade do fármaco nesse meio, que foi comprovado pelos resultados do estudo de estresse realizado e também porque este meio fornece um pH na faixa fisiológica (entre 1,2 e 6,8), o que é indicado para os meios de dissolução. O meio corresponde ainda ao recomendado pelo FDA para comprimidos contendo este fármaco (FDA, 2009).

O aparato escolhido, pá (aparato 2), segue as recomendações do FDA (FDA, 2009). Os aparatos 1 (cesta) e 2 (pá) são recomendados para realização de ensaios de dissolução de comprimidos de liberação imediata sendo que, a utilização de

outros aparatos deve ser justificada (FDA, 1997). No caso do produto em questão, um comprimido com revestimento de filme, foi escolhida a pá uma vez que o revestimento poderia prejudicar a realização do estudo em cesto.

Foram realizados testes com rotações de 50 e 75 rpm e observou-se que não existe diferença significativa entre as duas condições (tabela 30). Dessa forma, foi definida a rotação de 50 rpm, seguindo as recomendações do FDA (FDA, 2009) e adotando a condição mais rigorosa, uma vez que o aumento da velocidade de rotação pode favorecer a dissolução.

**Tabela 30 – Resultado de dissolução com diferentes velocidades.**

Cuba	Cedência (%)	
	75 rpm	50 rpm
1	104,74	100,45
2	102,27	100,71
3	101,72	102,98
4	100,76	100,85
5	101,30	100,98
6	100,89	100,85
<b>MÉDIA (%):</b>	101,95	101,14

Pode-se observar ainda que não foi verificada uma alta variação da dissolução entre as cubas, o que indica boa uniformidade do produto.

Em cumprimento aos requisitos para registro de medicamentos genéricos e similares, o produto foi submetido a estudo de perfil de dissolução comparativo entre o medicamento teste e o referência em laboratório habilitado pela Anvisa. Este estudo foi realizado pelo Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR), da Faculdade de Farmácia da UFMG, utilizando o método desenvolvido e validado para o teste de dissolução que foi devidamente co-validado pelo centro. Nas tabelas 31 e 32 estão apresentados os resultados obtidos no estudo realizado para o medicamento teste e referência, respectivamente e o perfil de dissolução comparativo gerado pode ser observado na figura 21. Deve ser considerado que o teste foi realizado sem a reposição do meio.

**Tabela 31 – Dados do perfil de dissolução comparativo para o medicamento teste.**

<b>Tempo</b> <b>Cuba</b>	<b>15 min</b>	<b>20 min</b>	<b>30 min</b>	<b>45 min</b>	<b>90 min</b>
<b>1</b>	97,28	95,87	96,39	95,96	94,03
<b>2</b>	98,01	95,82	96,46	96,07	94,28
<b>3</b>	97,39	95,95	96,90	95,08	94,24
<b>4</b>	97,64	96,02	96,94	95,35	93,88
<b>5</b>	98,06	96,99	96,37	95,37	93,77
<b>6</b>	97,82	96,64	96,72	95,47	94,32
<b>7</b>	97,69	97,31	96,20	95,37	94,46
<b>8</b>	97,80	97,05	96,23	95,48	94,16
<b>9</b>	97,94	95,82	95,25	94,14	93,15
<b>10</b>	97,52	96,18	95,08	94,46	93,10
<b>11</b>	97,82	95,51	95,09	94,13	93,03
<b>12</b>	98,05	95,84	95,31	94,60	92,92
<b>Média</b>	97,75	96,25	96,08	95,12	93,78
<b>Desvio %</b>	0,26	0,61	0,73	0,69	0,61

Fonte: CEDAFAR, 2010a.

Pela avaliação do perfil de dissolução comparativo percebe-se uma sobreposição entre as curvas de dissolução dos medicamentos teste e referência, inclusive comprometendo a visualização das duas curvas. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) sugere que para fármacos da classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade), a cedência de 85% em 15 minutos em HCl 0,1 M é um forte indicativo de que a biodisponibilidade do fármaco não é afetada pela dissolução (FDA, 1997).

O método de dissolução proposto está em conformidade com o método proposto no texto final da monografia da Farmacopeia Internacional (WHO, 2010c).

**Tabela 32 – Dados do perfil de dissolução comparativo para o medicamento referência.**

<b>Tempo</b> <b>Cuba</b>	<b>15 min</b>	<b>20 min</b>	<b>30 min</b>	<b>45 min</b>	<b>90 min</b>
<b>1</b>	97,20	96,37	96,94	95,62	95,04
<b>2</b>	97,68	96,55	97,03	95,39	94,97
<b>3</b>	97,90	96,21	96,85	95,71	94,92
<b>4</b>	97,43	96,08	96,99	95,80	95,23
<b>5</b>	97,93	96,57	96,28	95,53	94,05

Tabela 32 (conclusão)

Tempo	15 min	20 min	30 min	45 min	90 min
<b>Cuba</b>					
6	97,68	97,12	96,53	95,83	93,91
7	97,62	97,56	96,25	95,77	93,80
8	97,52	97,42	96,11	95,00	94,34
9	98,50	96,14	94,98	94,86	93,26
10	98,36	96,01	95,42	94,35	92,77
11	98,40	95,44	95,30	94,42	93,76
12	97,73	95,85	94,51	94,45	93,34
<b>Média</b>	97,83	96,44	96,10	95,23	94,12
<b>Desvio %</b>	0,42	0,66	0,89	0,61	0,84

Fonte: CEDAFAR, 2010a.

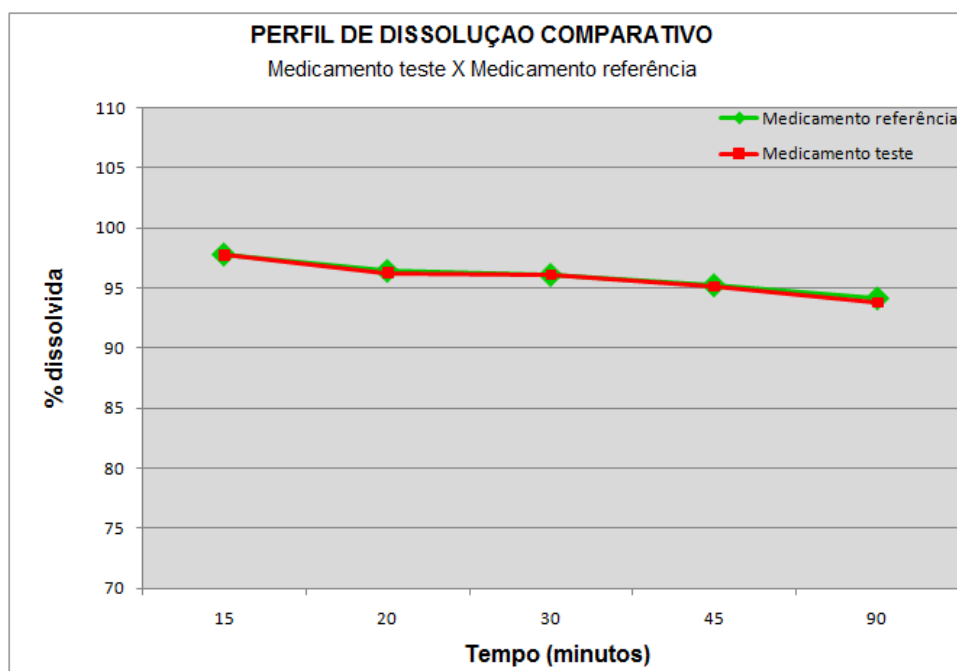


Figura 21 – Perfil de dissolução comparativo.

#### 4.8.6 Teste de teor e uniformidade de conteúdo

O teor encontrado para o lote em questão foi de 97,99% e a uniformidade de conteúdo foi de 94,88% a 100,00%, com desvio padrão relativo (DPR) de 1,55.

O texto final da monografia da Farmacopeia Internacional (WHO, 2010c) propõe dois métodos para doseamento do fumarato de tenofovir desoproxila em

comprimidos, um por CLAE e outro por espectrometria no UV. O método por CLAE utiliza gradiente e tem um tempo total de corrida de 80 minutos e o método por UV adota a leitura no comprimento de onda de 260 nm.

Não foi realizada a comparação do método proposto por CLAE, pela indisponibilidade dos padrões das impurezas citadas na monografia, porém foi realizado teste com método por UV que demonstrou ser, a princípio, aplicável ao produto, uma vez que os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos na aplicação da metodologia proposta neste trabalho. Porém, o método desenvolvido e validado neste trabalho apresenta uma alternativa aos métodos propostos pela Farmacopeia Internacional, por ser de mais fácil execução em relação ao método por CLAE, utilizando fluxo isocrático e menor tempo de corrida e apresenta um método mais seletivo que o método por UV, característica intrínseca do método utilizado, uma vez que por CLAE a quantificação do fármaco é inequívoca e a pureza do composto pode ser comprovada. Além disso, o método por CLAE é mais indicativo da estabilidade do produto, uma vez que os picos referentes a possíveis produtos de degradação podem ser monitorados.

#### **4.8.7 Equivalência Farmacêutica**

Todos os métodos apresentados foram aplicados no estudo de equivalência farmacêutica executado pelo Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR), da Faculdade de Farmácia da UFMG, sendo os métodos devidamente co-validados pelo centro com sucesso. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 33.

**Tabela 33 – Resultados obtidos no estudo de equivalência farmacêutica.**

<b>Ensaio</b>	<b>Medicamento teste</b>	<b>Medicamento referência</b>	<b>Especificação</b>
<b>Determinação de peso</b>	667,37 mg (-1,41% a +1,80%)	686,18 mg (-1,92% a +1,64%)	± 5%
<b>Desintegração</b>	2 min e 27 seg	3 min e 1 seg	Até 60 min em água
<b>Umidade</b>	2,94%	2,79%	Informativo
<b>Dissolução</b>	95,55% em 45 min (95,08% a 96,07%)	95,64 em 45 min (95,39% a 95,83%)	Mínimo 80% em 45 min
<b>Uniformidade de conteúdo</b>	91,03% a 96,14% DPR = 1,63%	94,97% a 103,43% DPR = 2,68%	85% a 115% DPR ≤ 6,0%
<b>Impurezas totais e produtos de degradação</b>	Não detectada	Não detectada	Máximo 5%
<b>Identificação por CLAE</b>	Positivo	Positivo	Fumarato de tenofovir desoproxila
<b>Doseamento por CLAE</b>	283,97 mg/comp ou 94,66% VR	292,47 mg/comp ou 97,49% VR	90,0% a 110,0% VR

Fonte: CEDAFAR, 2010b.

Pelos resultados obtidos concluiu-se que os lotes dos medicamentos teste e referência são equivalentes farmacêuticos.

## 6 CONCLUSÕES

- Um método por CLAE em fase reversa, modo isocrático e detecção no ultravioleta foi desenvolvido e validado para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos. O método se demonstrou seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de 0,075 mg/mL a 0,450 mg/mL. A interferência da matriz (excipientes da formulação) não foi significativa, indicando a adequação do método ao produto.
- Um método por espectrometria de absorção no UV foi desenvolvido e validado para o teste de dissolução de comprimidos contendo fumarato de tenofovir desoproxila. O método se demonstrou seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de 0,0165 mg/mL a 0,0495 mg/mL. A interferência da matriz (excipientes da formulação) não foi significativa, indicando a adequação do método ao produto.
- O método desenvolvido para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos se apresenta como uma boa alternativa em relação aos métodos propostos pela Farmacopeia Internacional, podendo ser utilizado no controle de qualidade do produto e em estudos de estabilidade.
- Os métodos propostos foram aplicados em estudo de Equivalência Farmacêutica e Perfil de Dissolução comparativo e os resultados obtidos foram satisfatórios.
- Os métodos propostos foram submetidos à avaliação da Anvisa juntamente com o dossiê de registro do produto registrado pela Fundação Ezequiel Dias, tendo sido aceitos como satisfatórios ao controle da qualidade do produto.



**CAPÍTULO 3**  
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TENOFOVIR EM  
PLASMA

## **1 MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TENOFOVIR EM PLASMA**

O método bioanalítico para determinação do tenofovir em plasma foi desenvolvido em parceria com o ICF - Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas. Este centro, certificado em Boas Práticas em Biodisponibilidade/ Bioequivalência pela Anvisa, foi o responsável pela execução do estudo de Bioequivalência dos medicamentos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila.

### **1.1 Instrumental**

- Agitador de tubos (vortex) Tecnal.
- Balança analítica Shimadzu AW-220.
- Centrífuga refrigerada Hitachi.
- CLAE acoplado a espectrômetro de massas (Agilent 1100, Applied Biosystems API 3200).

### **1.2 Reagentes**

- Metanol grau CLAE J.T.Baker.
- Acetato de amônio PA J.T.Baker.
- Ácido fórmico PA J.T.Baker.
- Ácido fosfórico PA J.T.Baker.

### **1.3 Materiais**

- Balões volumétricos.
- Micropipetas (200 µL, 1000 µL).
- Pipetador automático.
- Ponteira descartável para pipetador automático.

- Tubos eppendorfs.

#### **1.4 Substâncias de referência**

- Tenofovir – Lote 1132-012A1 (PGS), validade 02/2013.
- Aciclovir – Lote 1021 (F. Bras.), lote corrente.

#### **1.5 Desenvolvimento do método bioanalítico**

Pela avaliação dos métodos com detecção por espectrometria de massas descritos na literatura, observou-se que todos utilizam ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+)). Dessa forma, foram realizadas infusões diretas de soluções de tenofovir e prováveis padrões internos nestas condições. Para escolha do padrão interno foram testadas as substâncias adefovir, aciclovir, ganciclovir e lamivudina.

Não foram encontradas dificuldades na ionização do tenofovir e dos candidatos a padrão interno. As condições do espectrômetro de massas foram ajustadas e partiu-se para definição das condições cromatográficas e teste de extração.

Foram avaliadas várias colunas cromatográficas com diferentes fases móveis, utilizando as condições relatadas na literatura. Devido à elevada polaridade da molécula de tenofovir, o pico do fármaco apresenta tempo de retenção consideravelmente baixo, muito próximo ao tempo morto da coluna.

Nos testes realizados com a coluna Zic®-Hilic (Merck) utilizou-se como fase móvel misturas de acetato de amônio e acetonitrila, em diferentes proporções (20:80, 30:70, 35:75 e 40:60), pHs (2,4; 4,5; 5,3 e 6,3) e concentrações de acetato de amônio (2 mM e 5 mM). Esta coluna promoveu maior retenção do tenofovir, entretanto, variações significativas no tempo de retenção dos picos foram verificadas em réplicas de injeções.

A coluna Zorbax SB-Ciano – Agilent (150 x 4,6 mm; 5 µm) também apresentou resultados satisfatórios em relação à retenção dos picos. Para minimizar a variação no tempo de retenção de tenofovir, foi necessário acidificar a fase móvel consideravelmente com ácido acético (0,25%) e ácido fórmico (0,5%) para alcançar

pH 2,3. A melhor condição cromatográfica obtida nas análises com a coluna Zorbax SB-Ciano, foi fase móvel constituída de metanol e água com 0,25% de ácido acético e 0,5% de ácido fórmico. O ácido acético foi adicionado também para aumentar a intensidade dos picos devido à uma melhor ionização, como verificado experimentalmente. Foram testadas várias proporções da fase móvel (20:80, 25:75, 28:72) e o melhor resultado encontrado foi com a condição de 28% de metanol, apesar dos picos ainda se apresentarem parcialmente deformados.

Os testes realizados com colunas de fase reversa C18 resultaram em tempos de retenção baixos para o tenofovir, de forma que os efeitos de matriz eram muito acentuados para dar continuidade ao desenvolvimento do método com esta coluna.

Os testes relatados até aqui foram executados em CLAE Waters acoplado a espectrômetro de massas Waters Quatro LC. As condições testadas neste equipamento foram otimizadas em CLAE Agilent acoplado a espectrômetro de massas API 3200. Neste equipamento, cuja sensibilidade é maior, foi possível otimizar as condições testadas, de forma a reduzir o fluxo e o volume de injeção, contribuindo para redução dos efeitos de matriz observados.

Com relação ao método de extração, foram testados procedimentos de precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Foram testados vários procedimentos de extração por precipitação de proteínas, com os seguintes solventes:

- Acetonitrila
- Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico
- Acetonitrila com 0,5% de ácido fórmico e 0,25% de ácido acético
- Metanol
- Metanol com 0,1% de ácido fórmico
- Ácido perclórico 5% metanólico seguido de neutralização com acetato de sódio 0,1M metanólico.

No procedimento de precipitação de proteínas empregado foram adicionados 125 µl de plasma contaminado com concentração conhecida do analito (600 ng/mL) e 25 µl de solução padrão interno (lamivudina) em tubo eppendorf, o qual foi submetido a agitação em vórtex por 5 segundos. Em seguida, adicionou-se 350 µl do solvente precipitante, submeteu-se a agitação em vórtex por 60 segundos e centrifugou-se a 14000 rpm por 5 min. Foram injetados 50 µl do sobrenadante.

O solvente que promoveu maior recuperação do analito foi acetonitrila com ácido fórmico e ácido acético, entretanto, verificou-se efeito de matriz significativo em todas as condições, além de picos inadequados. Na tentativa de eliminar o efeito matriz, 200 µl do sobrenadante do plasma foram diluídos com 200 µl de fase móvel antes da injeção. Foi observado redução do efeito matriz, porém, os resultados obtidos com a utilização desta técnica não foram reproduzíveis.

Desta forma, a técnica de precipitação de proteínas não demonstrou resultados satisfatórios, neste experimento, para o analito em questão.

Foram avaliados procedimentos de extração líquido-líquido empregando-se os seguintes solventes extratores:

- Acetato de etila: MTBE (éter metil terc-butílico): diclorometano (4:3:3).
- Acetato de etila: MTBE: diclorometano (4:3:3) após acidificação do plasma com 25 µl de ácido fosfórico 5%.
- Acetato de etila: hexano (8:2).
- Acetato de etila: hexano (8:2) após acidificação do plasma com 25 µl de ácido fosfórico 5%.
- Acetato de etila: isopropanol (85:15).
- Acetato de etila: isopropanol (85:15) após acidificação do plasma com 25 µl de ácido fosfórico 5%.

A recuperação observada para todas as condições avaliadas foi inferior a 10% e a técnica não foi considerada adequada. Não foram encontrados relatos na literatura de utilização desta técnica para o analito em questão.

A técnica de extração em fase sólida foi testada em dois tipos de cartuchos: Waters Oasis HLB® (Waters, EUA) e Phenomenex Strata-X® (Phenomenex, EUA).

No primeiro teste os cartuchos foram condicionados com 1 mL de metanol e 1 mL de água. Em tubo eppendorf foram adicionados 250 µL de plasma e 50 µL de solução contendo todos os fármacos candidatos a padrão interno (adefovir, aciclovir, ganciclovir e lamivudina), 50 µL de solução de tenofovir. Os tubos foram submetidos a agitação em vortex por 2 min, todo o conteúdo dos tubos foi transferido para o cartucho apoiado em tubo de ensaio e submeteu-se a centrifugação a 3000 rpm por 2 min. Posteriormente, o cartucho foi transferido para um tubo limpo e eluiu-se com 200 µL de solução metanol:água (1:1). Os resultados de extração foram superiores a 60%, porém foi observado elevado efeito matriz para ambos os cartuchos.

Vários testes foram realizados na tentativa de reduzir o efeito matriz. A eluição foi testada com solução a 30% de metanol, água, metanol 100%, acetonitrila 50%, acetonitrila 100%, fase móvel [tampão 2 mM de acetato de amônio + 0,2% de ácido fórmico: metanol (85:15)]. Os melhores resultados obtidos foram com metanol 30% e fase móvel.

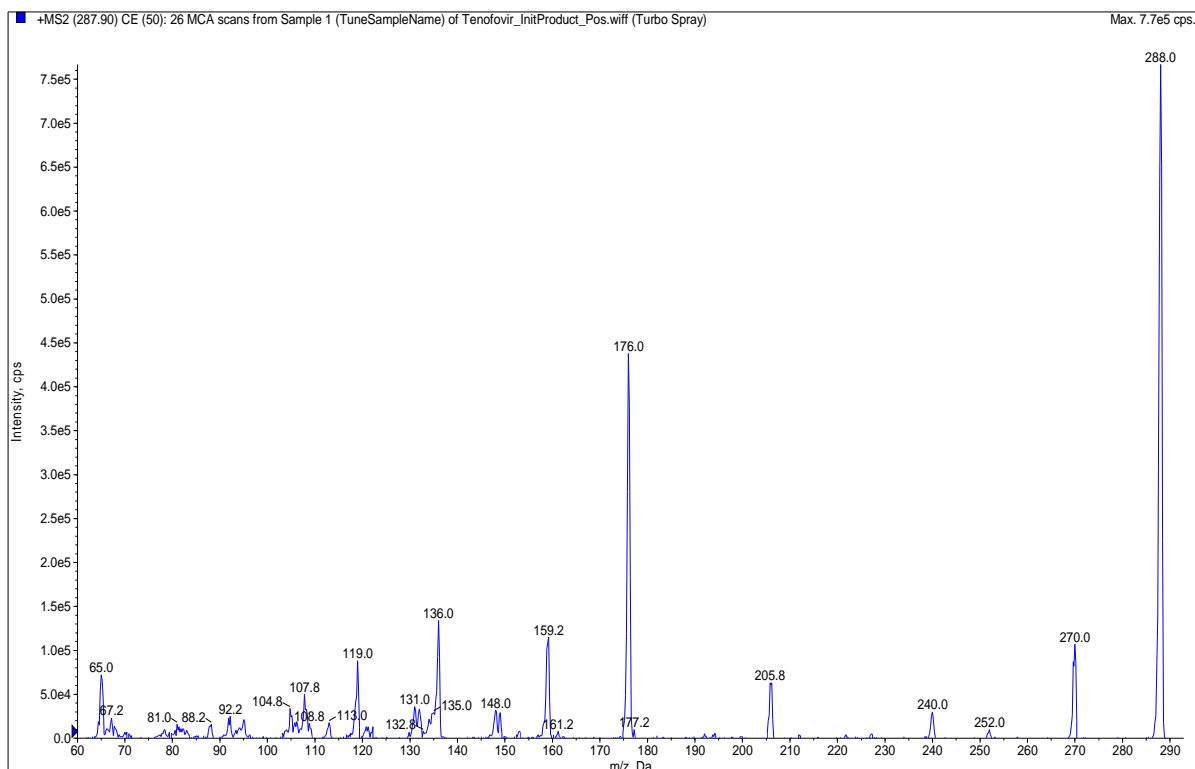
Foram realizadas também alterações no procedimento de extração com adição de solução de ácido fosfórico juntamente com o plasma e a solução do padrão interno, que resultou em efeito de matriz não significativo quando a fase móvel foi utilizada como eluente. Os melhores resultados foram obtidos com cartucho Phenomenex Strata-X® (Phenomenex, EUA).

O procedimento final de extração foi definido com a adição de 200 µL de ácido fosfórico 5% juntamente com 250 µL de plasma e 50 µL de solução de padrão interno e eluição com 500 µL de fase móvel.

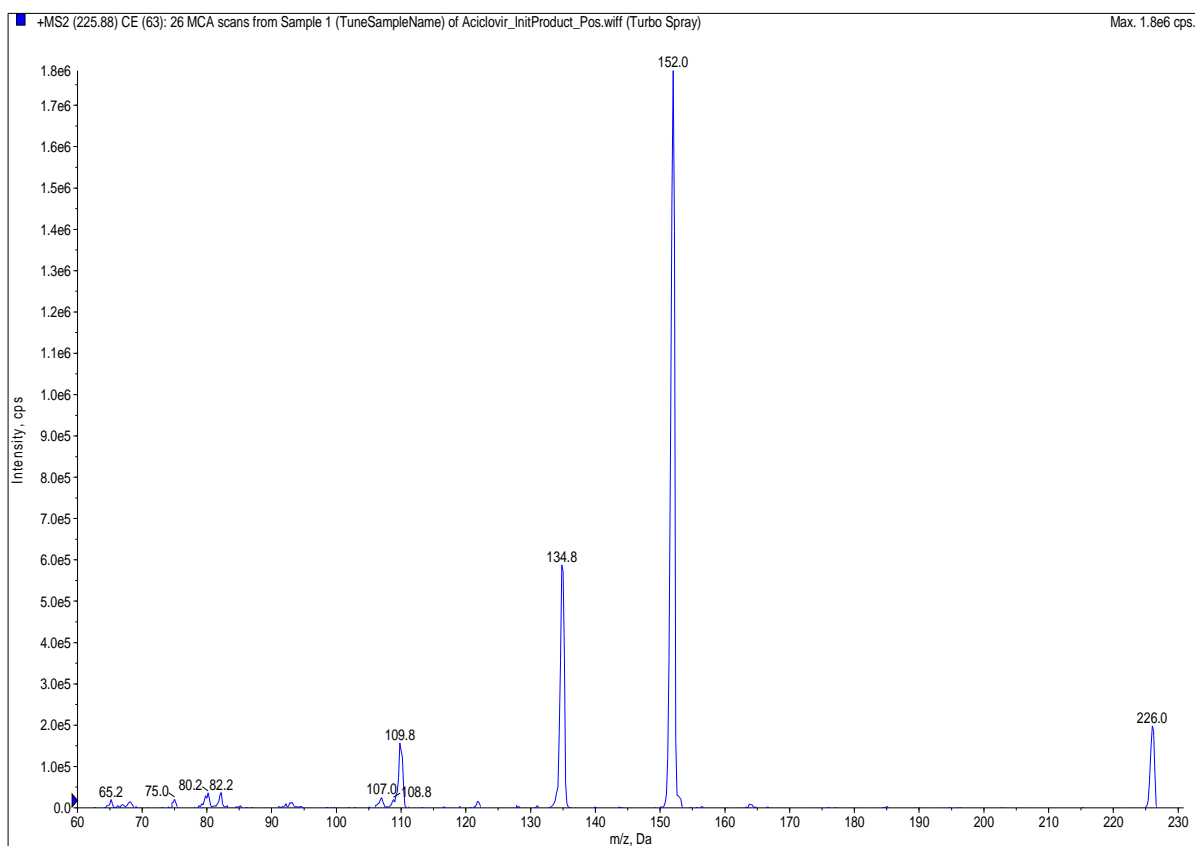
Foram realizados testes com colunas C18 de 100 mm e 50 mm, optou-se pela utilização de coluna C18, 100 mm, uma vez o efeito matriz observado com a utilização da coluna de 50 mm foi significativo.

Considerando os resultados obtidos na extração e na cromatografia, optou-se pela utilização do aciclovir como padrão interno, uma vez que obteve-se um tempo de retenção mais próximo do analito, permitindo a redução do tempo da corrida analítica e melhor intensidade do sinal.

Os espectros de fragmentação obtidos para o tenofovir e para o aciclovir encontram-se nas figuras 22 e 23.



**Figura 22 – Espectro de fragmentação ESI(+) do tenofovir.**



**Figura 23 – Espectro de fragmentação ESI(+) do aciclovir.**

## **1.6 Método bioanalítico**

Segue descrição do preparo das soluções utilizadas no método e as condições experimentais definidas.

### **1.6.1 Preparo da solução de metanol 50%**

Em uma proveta de 1.000 mL, contendo 500 mL de água ultra-pura, adicionou-se 500 mL de metanol e homogeneizou-se.

### **1.6.2 Preparo da solução mãe de tenofovir**

Pesaram-se 10 mg da substância de referência de tenofovir, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com solução de metanol a 50%. Obteve-se uma concentração final de 1,00 mg/mL em solução.

Transferiu-se 200 µL da solução preparada acima para um volume final de 10 mL de plasma. Obteve-se uma concentração final de 20,00 µg/mL da substância de referência tenofovir em plasma.

### **1.6.3 Preparo das soluções padrão de calibração e amostras de controle de qualidade**

O preparo das soluções padrão de calibração e das amostras de controle de qualidade foi realizado conforme descrito na tabela 34.



**Tabela 34 – Preparo das soluções padrão de calibração e das amostras de controle de qualidade.**

<b>Amostra</b>	<b>Concentração em plasma (ng/mL)</b>	<b>Volume a ser pipetado (µL)</b>	<b>Solução mãe em plasma (µg/mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>
<b>LIQ</b>	5,00	500	0,40	40
<b>2</b>	25,00	1250	0,40	20
<b>3</b>	100,00	200	20,00	40
<b>4</b>	200,00	250	20,00	25
<b>5</b>	400,00	500	20,00	25
<b>LSQ</b>	600,00	750	20,00	25
<b>CQB</b>	15,00	1500	0,40	40
<b>CQM</b>	240,00	300	20,00	25
<b>CQA</b>	480,00	960	20,00	40

LIQ – Limite inferior de quantificação  
 LSQ – Limite superior de quantificação  
 CQA – Controle de qualidade alto  
 CQB – Controle de qualidade baixo  
 CQM – Controle de qualidade médio

#### **1.6.4 Preparo da solução mãe do padrão interno aciclovir**

Pesou-se 10 mg da substância de referência de aciclovir, transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol 50%. Obteve-se uma concentração final de 1,00 mg/mL.

Transferiu-se 200 µL da solução preparada acima para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol 50%. Obteve-se uma concentração final de 2,00 µg/mL em solução.

#### **1.6.5 Preparo da fase móvel**

A fase móvel utilizada foi composta de uma mistura de tampão 2 mM de acetato de amônio + 0,2% de ácido fórmico e metanol em uma proporção de 85:15. O preparo foi realizado em um frasco de capacidade de 4.000 mL. Neste frasco adicionou-se 3.400 mL de água ultra-pura, 524 mg de acetato de amônio, 680 µL de ácido fórmico e 600 mL de metanol, homogeneizou-se e submeteu-se a ultrassom por 10 minutos.

### 1.6.6 Preparo da solução de ácido fosfórico 5%

Em uma proveta de 1.000 mL contendo 500 mL de água ultra-pura, adicionou-se 50 mL de ácido fosfórico, completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se.

### 1.6.7 Condições experimentais

- Equipamento: Cromatógrafo a líquido de alta eficiência.
- Coluna cromatográfica: ACE C18, 100 x 4,6 mm, 5µm.
- Volume de injeção: 5 µL.
- Vazão: 800 µL/min (com utilização de splitter)
- Temperatura da coluna: 20°C.
- Temperatura do auto-injetor: 20°C.
- Tempo de corrida: 2,5 minutos.
- Fase móvel: tampão 2 mM de acetato de amônio + 0,2% de ácido fórmico: metanol (85:15).
- Anticoagulante: heparina
- Tempo de retenção para o tenofovir: 1,76 min
- Tempo de retenção para o aciclovir: 2,05 min
- Detecção: espectrômetro de massas operando no modo de ionização eletronspray positivo (ESI+).
- Gás de colisão: N<sub>2</sub>

Na tabela 35 estão apresentadas as condições empregadas no espectrômetro de massas.

**Tabela 35 – Condições experimentais do espectrômetro de massas.**

Íon precursor (m/z)	Fragmento (m/z)	DP (v)	EP (v)	CE (v)	DWell (ms)
287,90 (tenofovir)	176,10	41,0	4,5	37,0	250,0
225,90 (aciclovir)	152,00	21,0	3,5	35,0	250,0

DP: potencial do cone

EP: potencial de entrada

CE: energia de colisão

DWell: tempo de permanência no pico ou tempo de monitoramento

### **1.6.8 Método de extração**

O método de extração utilizado foi extração em fase sólida com cartucho Phenomenex Strata-X® (Phenomenex, EUA).

Em um tubo de ensaio adicionou-se 250 µL de plasma, 50 µL de solução de padrão interno, 200 µL de ácido fosfórico 5% e agitou-se em vortex por 5 segundos. O conteúdo foi totalmente transferido para o cartucho e centrifugou-se por 2 minutos. Após a centrifugação transferiu-se o cartucho para um tubo limpo, eluiu-se com 500 µL de fase móvel e centrifugou-se por 2 minutos. A solução eluída foi transferida para *vial* contendo *insert* e injetou-se 5 µL.

## **1.7 Validação do método bioanalítico**

A validação do método bioanalítico foi realizada conforme descrito a seguir, de acordo com recomendações da Anvisa (BRASIL, 2003a).

### **1.7.1 Parâmetros e critérios de aceitação**

#### **1.7.1.1 Especificidade**

No caso de métodos bioanalíticos, os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo.

Foram testadas 6 amostras, sendo 4 amostras de plasma branco normal de lotes diferentes, 1 amostra de plasma hemolisado e 1 amostra de plasma lipêmico, todas não contaminadas.

Foram avaliadas amostras extraídas do fármaco e do padrão interno para identificar o tempo de retenção individual e possíveis interferências.

Foram avaliadas também amostras de plasma branco contaminado com possíveis medicamentos que possam ser utilizados pelos voluntários, entre estes foram avaliados cafeína, paracetamol, dipirona e clorfeniramina. Estes fármacos

foram escolhidos por serem os mais comumente encontrados em medicamentos utilizados para tratamento da cefaléia e sintomas da gripe, que são os medicamentos de uso mais comum relatado pelos voluntários cadastrados no centro.

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.

#### **1.7.1.2 Efeito matriz**

O efeito matriz pode ser avaliado através de experimentos de recuperação onde amostras são contaminadas com quantidades conhecidas do analito.

Para o experimento foram preparadas 12 amostras branco extraídas, utilizando 6 lotes diferentes de plasma branco. As amostras extraídas foram contaminadas com soluções de concentração conhecida do analito (6 na concentração do CQA e 6 na concentração do CQB) e do padrão interno.

Os resultados obtidos foram comparados com amostras preparadas nas mesmas concentrações em solução.

A variação foi calculada pela razão entre a resposta obtida nas amostras pela resposta obtida em solução. A variação encontrada deve ser no máximo 15%.

#### **1.7.1.3 Recuperação**

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003a).

O experimento da recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), com os resultados obtidos com amostras de soluções de plasma branco extraídas e posteriormente adicionadas com as mesmas concentrações do analito e do padrão interno.

Foram preparadas 6 amostras de cada concentração (baixa, média e alta) e extraídas conforme método de extração definido. Foram preparadas 18 amostras de plasma branco, extraídas conforme método de extração, e posteriormente contaminadas com concentrações baixa, média e alta.

O cálculo da recuperação foi realizado em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

#### **1.7.1.4 Linearidade, precisão e exatidão**

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo (BRASIL, 2003a).

O experimento para avaliação da linearidade, precisão e exatidão foi conduzido com o preparo das seguintes amostras:

- 2 amostras de plasma branco.
- 2 amostras de plasma branco adicionado com padrão interno.
- 2 amostras de cada concentração dos padrões de calibração para construção da curva de calibração com padrão interno.
- 6 amostras na concentração do controle de qualidade alto (CQA).
- 6 amostras na concentração do controle de qualidade médio (CQM).
- 6 amostras na concentração do controle de qualidade baixo (CQB).
- 6 amostras na concentração do LIQ.

Para avaliação dos resultados foram utilizados os seguintes critérios:

- o limite de variação da precisão é de 15% para os CQBs, CQMs e CQAs e de 20% para o LIQ;
- o limite de variação da exatidão é de 85% a 115% para os CQBs, CQMs e CQAs e de 80% a 120% para o LIQ;

- no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- no mínimo quatro das seis amostras de cada concentração (CQA, CQM, CQB e LIQ) devem atender aos limites de precisão e exatidão;
- o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

#### **1.7.1.5 Limite de quantificação**

O pico de resposta do fármaco no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% (vinte por cento) e exatidão de 80 – 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de padrões.

#### **1.7.1.6 Estudo de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos**

##### **1.7.1.6.1 Estabilidade das soluções-padrão em matriz**

A estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno em plasma foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos para amostras de preparo recente, amostras armazenadas em freezer e amostras mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas após preparação.

Para o experimento foram preparadas as seguintes amostras:

- 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB adicionadas de solução de padrão interno e mantidas a temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas;
- 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB adicionadas de solução de padrão interno retiradas do freezer após o preparo das amostras do item anterior;
- 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB adicionadas de solução de padrão interno de preparo recente, não submetidas a congelamento.

#### 1.7.1.6.2 Estabilidade das soluções-padrão em solução

A estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno em solução foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos para amostras de preparo recente, amostras armazenadas em geladeira e amostras mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas após preparação.

Para o experimento foram preparadas as seguintes amostras:

- 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB adicionadas de solução de padrão interno e mantidas a temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas;
- 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB adicionadas de solução de padrão interno retiradas da geladeira após o preparo das amostras do item anterior;
- 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB adicionadas de solução de padrão interno de preparo recente, não submetidas a resfriamento.

#### 1.7.1.6.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O experimento foi executado para avaliação da estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, 6 amostras das concentrações baixa e alta, nas seguintes condições: as amostras foram congeladas à temperatura indicada para o armazenamento ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

Foram preparadas também 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB recentes.

As amostras foram quantificadas de acordo com uma curva de calibração.

Foi realizada a comparação entre as médias obtidas para as amostras submetidas às etapas de congelamento e descongelamento e as amostras recentes. A variação aceitável foi de no máximo 15%.

#### 1.7.1.6.4 Estabilidade pós-processamento e estabilidade de curta duração

Para verificação da estabilidade de curta duração foram utilizadas 6 amostras do CQA e 6 amostras do CQB. Cada uma delas permaneceu à temperatura ambiente de 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas e analisadas.

Para verificação da estabilidade pós-processamento foram preparadas 6 amostras CQA e 6 amostras CQB, adicionadas do padrão interno, submetidas ao processo de extração e armazenadas no auto-injetor por um período de tempo superior à duração da corrida analítica. Utilizou-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

A variação entre as médias das amostras do teste de estabilidade e as amostras recém preparadas deveria ser no máximo 15%.

#### 1.7.1.6.5 Estabilidade de longa duração

O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência (BRASIL, 2003a).

Para o experimento foram utilizadas 6 amostras CQA e 6 amostras CQB armazenadas pelo período definido no estudo e 6 amostras CQA e 6 amostras CQB recentes.

As concentrações das amostras de estabilidade foram comparadas com a média dos valores para as amostras recém preparadas.



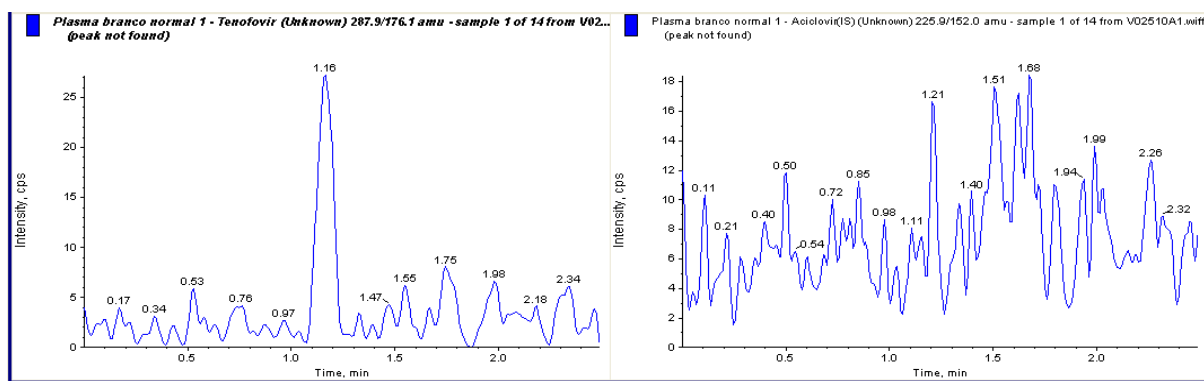
## 1.7.2 Resultados e discussão

### 1.7.2.1 Especificidade

A avaliação de amostras extraídas do fármaco e do padrão interno permitiu identificar o tempo de retenção individual, definido em 1,76 min para o tenofovir e 2,05 min para o aciclovir.

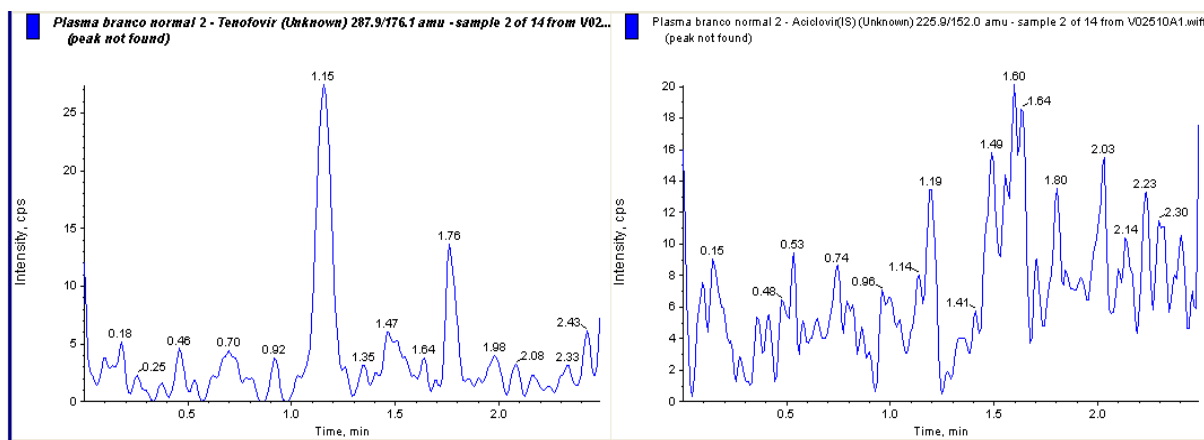
Nenhuma das amostras testadas apresentou pico interferente significativo no mesmo tempo de retenção do fármaco e do padrão interno. Entre os fármacos testados, também não foi verificada interferência.

Os cromatogramas obtidos para este estudo podem ser verificados nas figuras 24 a 35.



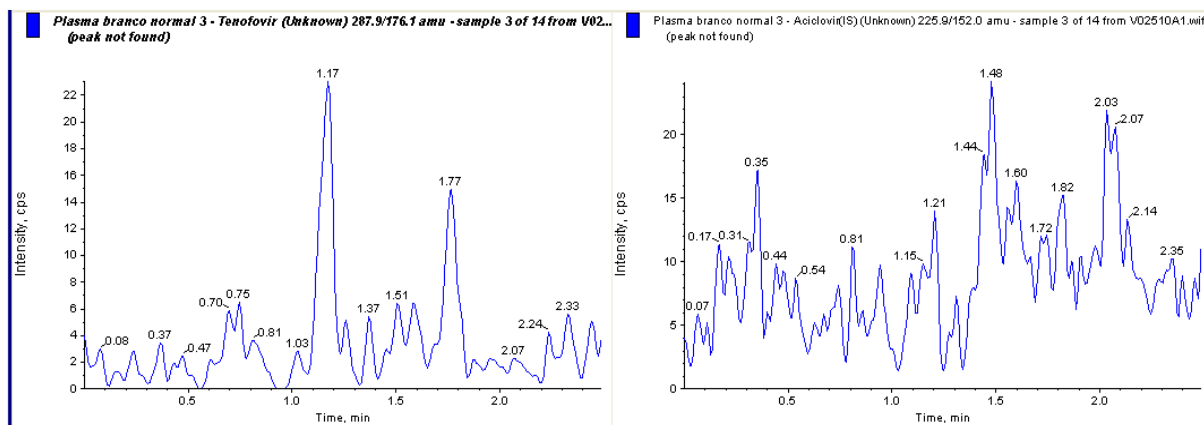
**Figura 24 – Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 1).**

Fonte: ICF, 2010.



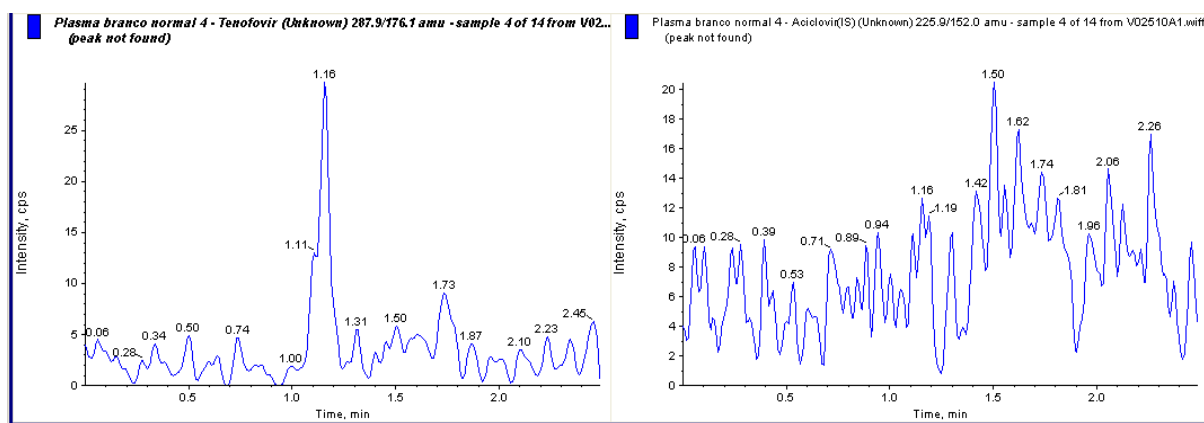
**Figura 25 – Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 2).**

Fonte: ICF, 2010.



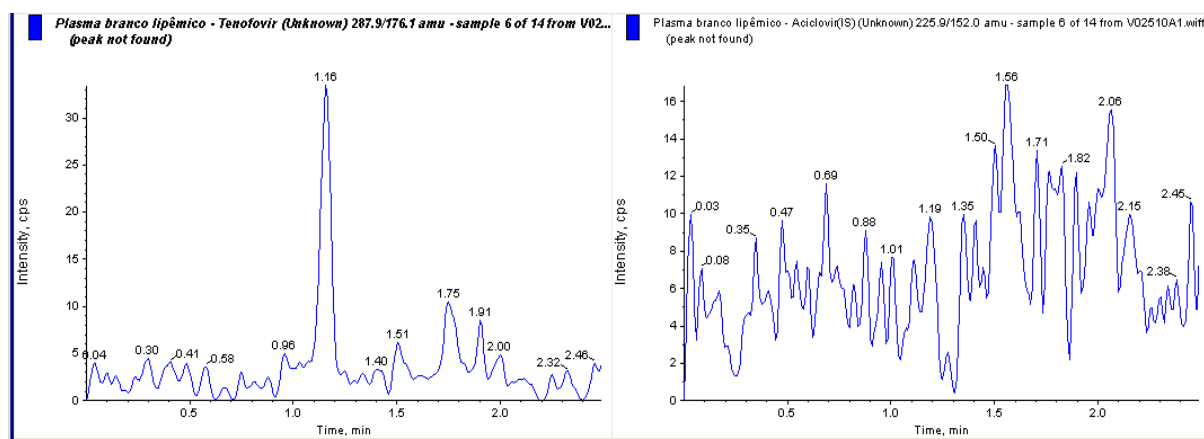
**Figura 26 – Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 3).**

Fonte: ICF, 2010.



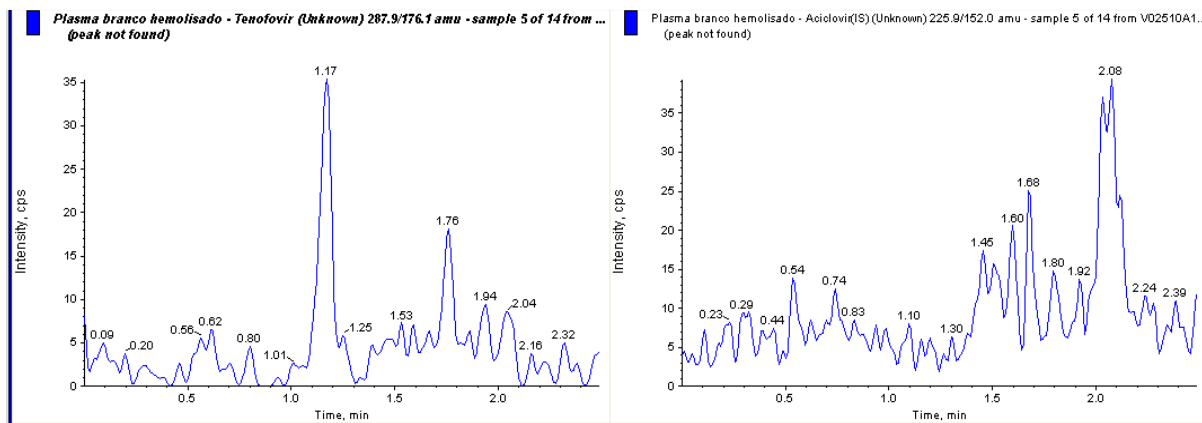
**Figura 27 – Cromatograma da análise do plasma branco normal (lote 4).**

Fonte: ICF, 2010.



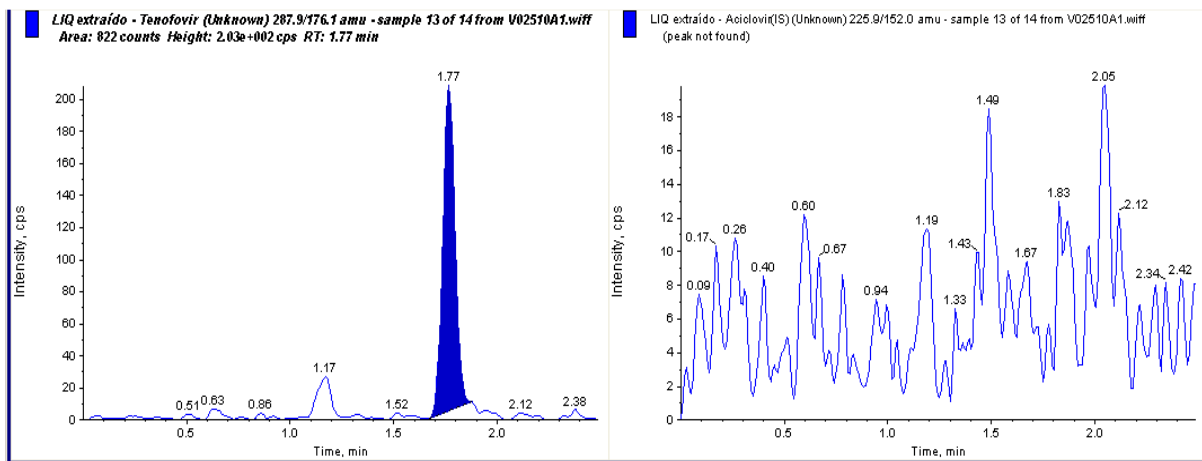
**Figura 28 – Cromatograma da análise do plasma branco lipêmico.**

Fonte: ICF, 2010.



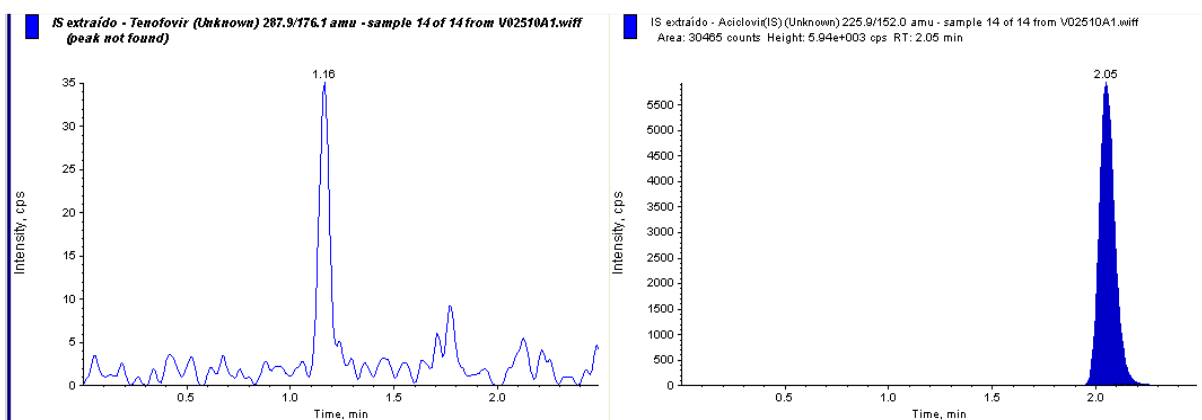
**Figura 29 – Cromatograma da análise do plasma branco hemolisado.**

Fonte: ICF, 2010.



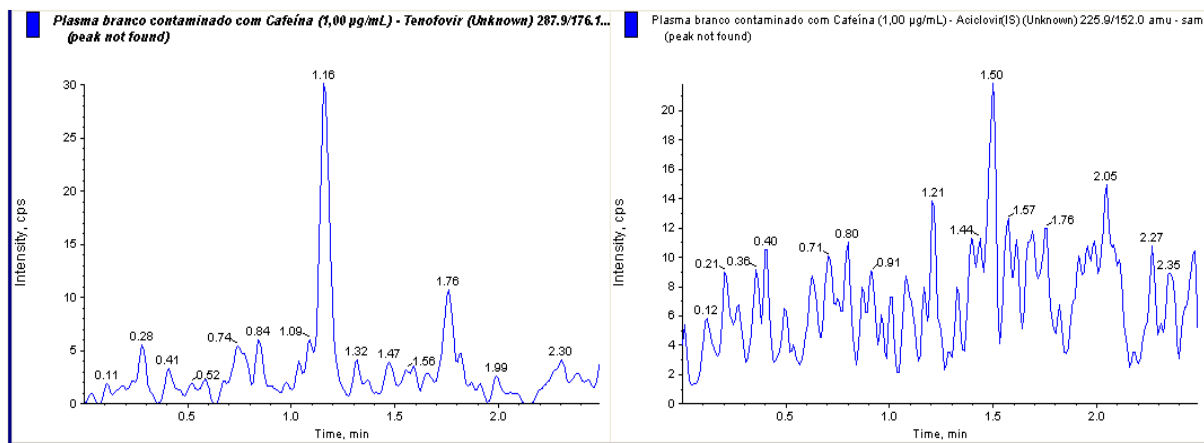
**Figura 30 – Cromatograma da análise do LIQ extraído.**

Fonte: ICF, 2010.



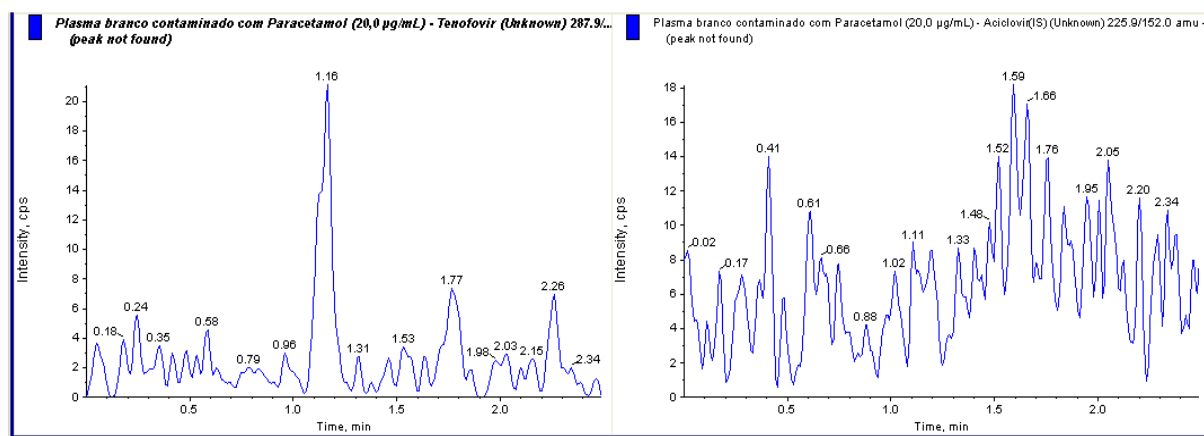
**Figura 31 – Cromatograma da análise do padrão interno extraído.**

Fonte: ICF, 2010.



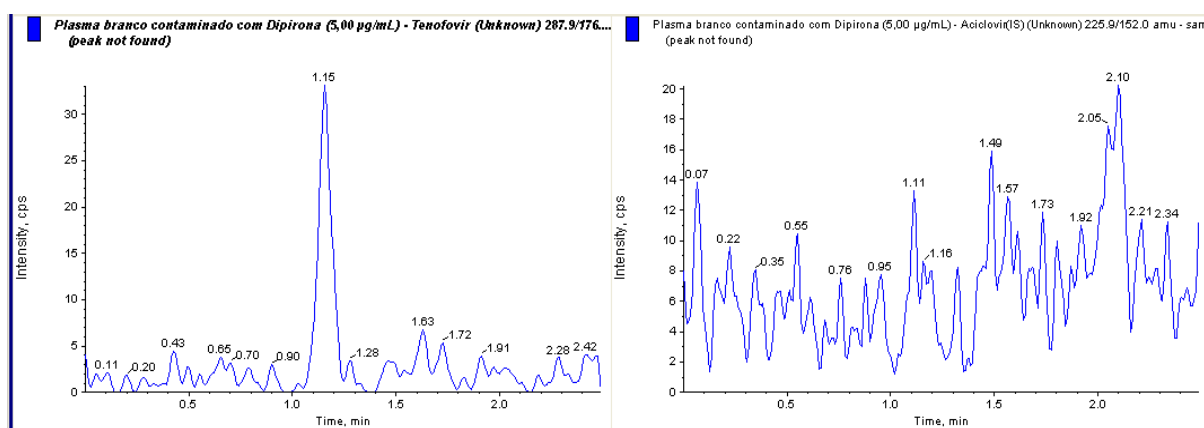
**Figura 32 – Cromatograma da análise do plasma contaminado com cafeína.**

Fonte: ICF, 2010.



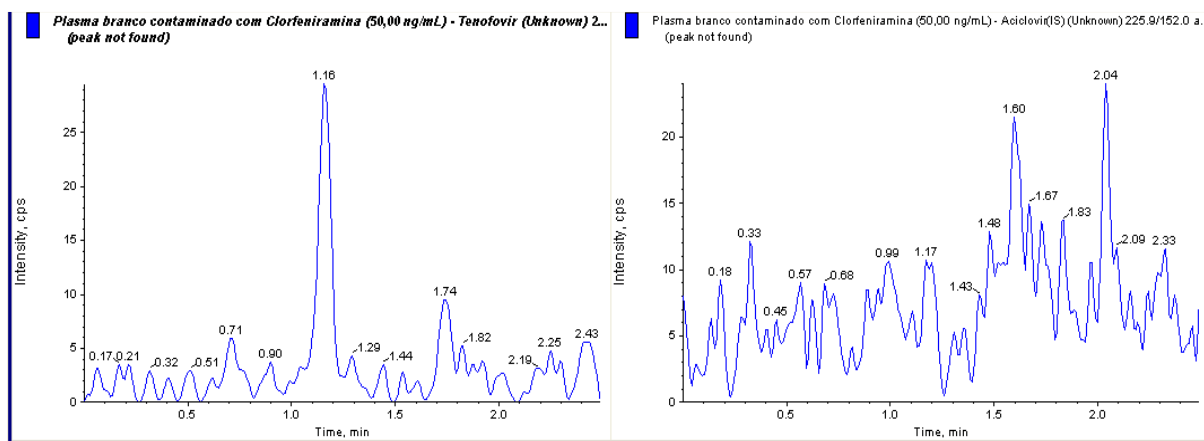
**Figura 33 – Cromatograma da análise do plasma contaminado com paracetamol.**

Fonte: ICF, 2010.



**Figura 34 – Cromatograma da análise do plasma contaminado com dipirona.**

Fonte: ICF, 2010.



**Figura 35 – Cromatograma da análise do plasma contaminado com clorfeniramina.**

Fonte: ICF, 2010.

### 1.7.2.2 Efeito matriz

Os resultados obtidos no experimento de avaliação de efeito matriz para análise do fármaco encontram-se na tabela 36. Todas as amostras de plasma contaminadas apresentaram desvios menores que 15% em relação à média dos resultados obtidos em solução, demonstrando que o efeito de matriz não é significativo para o fármaco tenofovir.

Os resultados obtidos no experimento de avaliação de efeito matriz para análise do padrão interno encontram-se na tabela 37. Todas as amostras de plasma contaminadas apresentaram desvios menores que 15% em relação à média dos resultados obtidos em solução, demonstrando que o efeito de matriz não é significativo para o padrão interno.

**Tabela 36 – Resultados do experimento de avaliação do efeito matriz para o analito.**

Amostra	CQA (área)			CQB (área)		
	Solução	Plasma	Desvio %	Solução	Plasma	Desvio %
1	185100	190193	6,8%	7027	6150	- 2,9%
2	184407	201421	13,1%	6788	6002	- 5,2%
3	176088	195477	9,7%	6075	6543	3,3%
4	175670	193992	8,9%	5079	6188	- 2,3%
5	176440	183244	2,9%	6663	5838	- 7,8%
6	171034	187087	5,0%	6355	6398	1,1%
Média	178123	-----	-----	6331	-----	-----

**Tabela 37 – Resultados do experimento de avaliação do efeito matriz para o padrão interno.**

Amostra	CQA (área)			CQB (área)		
	Solução	Plasma	Desvio %	Solução	Plasma	Desvio %
1	86951	85167	3,7%	102714	88547	-5,6%
2	79776	81704	-0,6%	102780	88822	-5,3%
3	78865	80964	-1,5%	90540	88574	-5,6%
4	82629	85185	3,7%	85268	101006	7,7%
5	80385	81075	-1,3%	90780	80988	-13,7%
6	84345	86964	5,8%	90680	91844	-2,1%
Média	82159	-----	-----	93794	-----	-----

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

### **1.7.2.3 Recuperação**

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

O experimento da recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), com os resultados obtidos com amostras não extraídas (soluções de plasma branco extraídas adicionadas com as mesmas concentrações do analito e do padrão interno).

Os resultados obtidos para a recuperação do analito e para o padrão interno encontram-se nas tabelas 38 e 39, respectivamente.

Na literatura são relatados métodos de extração com valores de recuperação superiores (GOMES *et al*, 2008; REZK *et al*, 2005; NIROGI *et al*, 2008), porém, os resultados descritos não foram reproduzidos nas tentativas realizadas, considerando as condições analíticas do laboratório. Observou-se que a utilização de métodos com maior recuperação, resultava em maiores efeitos de matriz.

Desta forma, considerando que os demais parâmetros foram validados com sucesso, que o procedimento empregado na extração é reprodutível e que o método desenvolvido é de simples execução, rápido e permite o doseamento do tenofovir

em plasma, concluiu-se que o método de extração empregado apresentou-se adequado aos objetivos deste trabalho.

**Tabela 38 – Resultados de recuperação obtidos na extração do analito.**

Amostra	CQA (área)		CQM (área)		CQB (área)	
	Não extraída	Extraída	Não extraída	Extraída	Não extraída	Extraída
1	191322	39765	91534	21906	6703	1491
2	189598	48854	84497	24526	6997	1684
3	200568	374469	86778	23642	7255	1402
4	195995	42627	94332	22953	6773	1344
5	183472	43123	88300	23375	6021	1344
6	181641	43375	90987	22639	6215	1405
Média	190433	42536	89405	23174	6661	1445
Recuperação	22,3%		25,9%		21,7%	
Média	23,3%					

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – coeficiente de variação

**Tabela 39 – Resultados de recuperação obtidos na extração do padrão interno.**

Amostra	Não extraída (área)	Extraída (área)
1	96400	18022
2	93104	20405
3	88415	18759
4	93652	20240
5	92213	19494
6	97257	19653
7	82727	17698
8	86370	19816
9	86832	20223
10	84938	20131
11	83134	19417
12	85113	19551
13	98148	20366

**Tabela 39 (conclusão)**

<b>Amostra</b>	<b>Não extraída (área)</b>	<b>Extraída (área)</b>
<b>14</b>	99563	20067
<b>15</b>	98674	19812
<b>16</b>	112785	19858
<b>17</b>	94708	19359
<b>18</b>	97724	19712
<b>Média</b>	92875	19588
<b>CV</b>	8,2%	3,8%
<b>Recuperação</b>	21,1%	

CV – coeficiente de variação

#### **1.7.2.4 Linearidade, precisão e exatidão**

A precisão de um método analítico foi avaliada pelo coeficiente de variação de uma série de medidas e a exatidão pela comparação com o valor teórico esperado.

O experimento da precisão e da exatidão foi realizado com três lotes diferentes de plasma, os resultados encontram-se nas tabelas 40, 41 e 42. Os resultados comparativos entre os três lotes avaliados encontram-se na tabela 43.

A linearidade do método foi testada na faixa de 5,00 ng/mL a 600,00 ng/mL. Para validação deste parâmetro foram construídas 6 curvas de calibração utilizando duplicatas de cada nível de concentração descrito na tabela 44. Os resultados obtidos para as curvas de calibração encontram-se na tabela 45. A equação da curva e coeficiente de correlação calculado para cada uma das curvas encontra-se na tabela 46.

Pelos resultados obtidos, o método se demonstrou preciso e exato, todos os critérios de aceitação definidos foram cumpridos. A variação máxima encontrada na análise intra-lote foi de 5,5% para o CQB, 8,0% para o CQM e 4,0% para o CQA, sendo menores que o limite de 15%. Para o LIQ a variação máxima foi de 10,2%, menor que o limite de 20%.

Todas as amostras da curva de calibração atenderam aos limites de precisão e exatidão, ou seja, os desvios encontrados foram inferiores a 15% para todas as concentrações, incluindo o LIQ. O coeficiente de correlação linear foi superior a 0,98 para todas as curvas obtidas. Dessa forma, o método encontra-se validado no parâmetro linearidade.



**Tabela 40 – Resultados do experimento da precisão e da exatidão para o lote 1.**

Amostras	LIQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	3,89	13,24	244,27	471,93
2	4,11	14,56	226,22	459,52
3	4,67	15,48	218,74	478,50
4	4,36	14,06	190,07	470,17
5	4,58	15,14	224,77	437,11
6	5,07	14,66	223,49	459,66
<b>Média</b>	4,45	14,52	221,26	462,82
<b>CV</b>	9,5%	5,5%	8,0%	3,2%
<b>Exatidão</b>	88,9%	96,8%	92,2%	96,4%

LIQ – Limite inferior de quantificação

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

**Tabela 41 – Resultados do experimento da precisão e da exatidão para o lote 2.**

Amostras	LIQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
1	4,70	13,60	241,57	477,89
2	4,01	13,67	225,20	458,01
3	4,10	12,82	220,31	453,24
4	3,84	13,00	218,94	445,14
5	3,76	14,10	220,02	479,76
6	4,74	13,71	216,25	455,28
<b>Média</b>	4,19	13,48	223,72	461,55
<b>CV</b>	10,2%	3,6%	4,1%	3,0%
<b>Exatidão</b>	83,8%	89,9%	93,2%	96,2%

LIQ – Limite inferior de quantificação

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

**Tabela 42 – Resultados do experimento da precisão e da exatidão para o lote 3.**

<b>Amostras</b>	<b>LIQ (ng/mL)</b>	<b>CQB (ng/mL)</b>	<b>CQM (ng/mL)</b>	<b>CQA (ng/mL)</b>
<b>1</b>	4,75	15,91	227,45	435,19
<b>2</b>	5,60	14,68	230,73	467,01
<b>3</b>	6,13	16,44	220,29	481,93
<b>4</b>	5,56	16,11	243,06	464,63
<b>5</b>	5,73	14,73	245,85	484,14
<b>6</b>	5,94	14,55	266,46	451,23
<b>Média</b>	5,62	15,40	238,97	464,02
<b>CV</b>	8,5%	5,5%	6,9%	4,0%
<b>Exatidão</b>	112,4%	102,7%	99,6%	96,7%

LIQ – Limite inferior de quantificação

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

**Tabela 43 – Resultados inter-lotes.**

<b>Parâmetros</b>	<b>LIQ</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>
<b>Média</b>	4,75	14,47	227,98	462,80
<b>CV</b>	16,0%	7,3%	7,1%	3,2%
<b>Exatidão</b>	95,0%	96,5%	95,0%	96,4%

LIQ – Limite inferior de quantificação

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

**Tabela 44 – Valores teóricos para curva de calibração.**

<b>Amostra</b>	<b>Nível</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>
<b>Curva de calibração</b>	<b>LIQ</b>	5,00
	<b>2</b>	25,00
	<b>3</b>	100,00
	<b>4</b>	200,00
	<b>5</b>	400,00
	<b>LSQ</b>	600,00

LIQ – Limite inferior de quantificação

LSQ – Limite superior de quantificação

**Tabela 45 – Resultados obtidos para as curvas de calibração.**

Concentração nominal (ng/mL)	Curva 1	Desvio %	Curva 2	Desvio %	Curva 3	Desvio %	Curva 4	Desvio %	Curva 5	Desvio %	Curva 6	Desvio %
<b>5,00</b>	5,06	1,23	4,86	-2,76	5,01	0,14	4,87	-2,66	5,38	7,51	4,92	-1,70
<b>5,00</b>	4,97	-0,50	5,20	4,06	5,00	0,04	5,09	1,73	4,51	-9,70	5,07	1,37
<b>25,00</b>	23,47	-6,10	24,64	-1,44	23,56	-5,76	25,69	2,74	25,85	3,42	24,84	-0,65
<b>25,00</b>	25,41	1,64	22,97	-8,12	25,27	1,06	25,16	0,62	26,80	7,20	25,50	1,99
<b>100,00</b>	105,08	5,08	112,43	12,43	109,26	9,26	96,65	-3,35	97,84	-2,16	102,89	2,89
<b>100,00</b>	100,67	0,67	103,08	3,08	102,93	2,93	106,77	6,77	106,45	6,45	97,79	-2,21
<b>200,00</b>	199,48	-0,26	205,02	2,51	216,54	8,27	210,72	5,36	202,30	1,15	207,74	3,87
<b>200,00</b>	185,35	-7,32	179,27	-10,37	211,85	5,92	209,37	4,69	196,98	-1,51	197,83	-1,08
<b>400,00</b>	410,86	2,71	416,09	4,02	390,04	-2,49	386,45	-3,39	380,82	-4,80	391,91	-2,02
<b>400,00</b>	410,50	2,63	415,28	3,82	384,94	-3,77	378,86	-5,29	388,41	-2,90	405,71	1,43
<b>600,00</b>	607,82	1,30	593,41	-1,10	533,46	-11,09	582,08	-2,99	574,46	-4,26	594,48	-0,92
<b>600,00</b>	593,50	-1,08	563,18	-6,14	572,84	-4,53	574,51	-4,25	597,57	-0,41	582,28	-2,95

**Tabela 46 – Equações e coeficientes de correlação das curvas de calibração.**

Curva	Equação da curva	Coeficiente de correlação
<b>1</b>	$Y = 0,0042 x + 0,0016$	0,9992
<b>2</b>	$Y = 0,0037 x + 0,0016$	0,9975
<b>3</b>	$Y = 0,0029 x + 4,51e-005$	0,9978
<b>4</b>	$Y = 0,0029 x + 7,73e-005$	0,9989
<b>5</b>	$Y = 0,0029 x + 0,0012$	0,9982
<b>6</b>	$Y = 0,0031 x + 0,0010$	0,9997

### 1.7.2.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método foi definido como sendo 5,00 ng/mL, que corresponde ao menor nível estudado nos testes de precisão e exatidão do método.

### 1.7.2.6 Estudo de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos

#### 1.7.2.6.1 Estabilidade das soluções-padrão em matriz

A estabilidade das soluções padrão do analito em matriz foi avaliada após um período de 7 dias à -20°C e após 06h e 30min em temperatura ambiente. A estabilidade do padrão interno foi avaliada apenas em temperatura ambiente, uma vez que o plasma é contaminado no momento da análise e a amostra não é armazenada em freezer contaminada com o padrão interno. Os resultados obtidos foram comparados com os encontrados na análise de amostras de preparo recente. Os resultados estão apresentados nas tabelas 47 e 48.

**Tabela 47 – Resultado da avaliação da estabilidade do analito em matriz.**

Amostra	CQB (área)			CQA (área)		
	Recente	Temp. ambiente	Freezer	Recente	Temp. ambiente	Freezer
1	3791	3152	3856	95351	102758	90520
2	3529	3526	3539	116685	107972	87664
3	3134	3380	3168	89797	111490	117367
4	3736	3695	3863	113566	118616	116102
5	4333	3312	4115	111909	101118	113267
6	3049	3286	3263	99832	104516	97798
Média	3595	3392	3634	104523	107745	103786
CV	13,2%	5,7%	10,3%	10,5%	6,0%	12,9%
Variação	-	-5,7%	1,1%	-	3,1%	-0,7%

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CV – coeficiente de variação

**Tabela 48 – Resultado da avaliação da estabilidade do padrão interno em matriz.**

<b>Amostra</b>	<b>Recente (área)</b>	<b>T°C ambiente (área)</b>
<b>1</b>	70158	68674
<b>2</b>	85250	71810
<b>3</b>	71626	73081
<b>4</b>	89906	80546
<b>5</b>	90595	71018
<b>6</b>	79265	76793
<b>7</b>	89642	74788
<b>8</b>	80356	74820
<b>9</b>	76534	74842
<b>10</b>	90222	91580
<b>11</b>	99426	74417
<b>12</b>	76621	72988
<b>Média</b>	83300	75446
<b>CV</b>	10,7%	7,8%
<b>Variação</b>	-9,4%	

CV – coeficiente de variação

Pela avaliação dos resultados obtidos, verificou-se que as soluções do analito e do padrão interno se mantiveram estáveis na matriz nas condições e pelos períodos avaliados.

#### 1.7.2.6.2 Estabilidade das soluções-padrão em solução

A estabilidade das soluções padrão do analito e do padrão interno em solução foi avaliada nas condições de -2°C a 8°C pelo período de 7 dias e após 8 h em temperatura ambiente. Os resultados encontrados estão apresentados nas tabelas 49 e 50.

Pela avaliação dos resultados obtidos, verificou-se que as soluções do analito e do padrão interno se mantêm estáveis em solução nas condições e nos períodos avaliados.

**Tabela 49 – Resultados da avaliação da estabilidade do analito em solução.**

Amostra	CQB (área)			CQA (área)		
	Recente	Temp. ambiente	Geladeira	Recente	Temp. ambiente	Geladeira
1	3638	3361	3806	95628	100580	94832
2	3202	3596	3222	115282	103648	88366
3	3195	3460	3063	91695	102560	112800
4	4049	3530	3487	109715	107115	113199
5	4190	3348	3718	108170	99792	107793
6	3129	3384	3045	100399	106980	98930
<b>Média</b>	3567	3447	3390	103482	103446	102653
<b>CV</b>	13,1%	2,9%	9,7%	8,8%	3,0%	9,9%
<b>Variação</b>	-	-3,4%	-5,0%	-	0,0%	-0,8%

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CV – coeficiente de variação

**Tabela 50 – Resultado da avaliação da estabilidade do padrão interno em solução.**

Amostra	Recente (área)	Temp. ambiente (área)	Geladeira (área)
1	70521	69511	78408
2	87463	73395	73863
3	69473	77795	89705
4	88188	78718	85754
5	90994	73976	90903
6	81904	78805	77760
7	93288	77511	89623
8	83291	76491	86045
9	77147	71980	79732
10	91014	74291	98760
11	100532	72863	97513
12	78154	69594	77690
<b>Média</b>	84331	74578	85480
<b>CV</b>	11,1%	4,4%	9,5%
<b>Variação</b>	-	-11,6%	1,4%

CV – coeficiente de variação

#### 1.7.2.6.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras foram submetidas a ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (temperatura ambiente), conforme descrito no item 1.7.1.6.3. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 51.

**Tabela 51 – Resultados da avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/ descongelamento.**

Amostra	CQB (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	ECCD	Recente	ECCD
1	14,83	15,88	462,22	489,67
2	14,06	14,68	478,66	466,88
3	15,72	14,25	449,39	513,85
4	14,26	15,39	483,34	468,43
5	15,97	14,20	455,13	438,95
6	16,19	15,56	460,68	446,16
Média	15,17	14,99	464,90	470,66
CV	6,0%	4,8%	2,9%	5,9%
Exatidão	101,1%	100,0%	96,9%	98,1%
Variação	-1,2%		1,2%	

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CV – coeficiente de variação

ECCD – estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Os resultados obtidos demonstram que o analito é estável quando submetido a ciclos de congelamento e descongelamento, uma vez que todas as variações encontram-se dentro dos limites de aprovação.

#### 1.7.2.6.4 Estabilidade pós-processamento e estabilidade de curta duração

No experimento para avaliação da estabilidade de curta duração as amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por um período de 6h e 15min e submetidas ao processo de extração. A estabilidade de curta duração foi avaliada apenas para o analito, uma vez que as amostras não foram armazenadas contaminadas com o padrão interno. Os resultados encontram-se na tabela 52.

No experimento para avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras foram submetidas ao processo de extração e mantidas no auto-injetor, a 20°C, por um período de 28h 34min. Os resultados para o analito e para o padrão interno encontram-se nas tabelas 53 e 54, respectivamente.

**Tabela 52 – Resultados da avaliação da estabilidade de curta duração para o analito.**

Amostra	CQB (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	ECD	Recente	ECD
1	15,34	14,74	458,56	463,15
2	14,68	13,64	461,08	508,28
3	14,85	14,28	452,23	493,90
4	14,60	14,35	497,79	469,45
5	15,40	14,10	465,03	449,08
6	15,42	14,41	472,33	477,63
Média	15,05	14,25	467,84	476,92
CV	2,5%	2,6%	3,4%	4,5%
Exatidão	100,3%	95,0%	97,5%	99,4%
Variação	-5,3%		1,9%	

CQA – Controle de qualidade alto  
CQB – Controle de qualidade baixo  
CV – coeficiente de variação  
ECD – estabilidade de curta duração

**Tabela 53 – Resultados da estabilidade pós-processamento do analito.**

Amostra	CQB (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	EPP	Recente	EPP
1	15,41	14,73	499,59	485,76
2	13,76	14,87	476,99	475,41
3	15,90	15,20	479,37	479,29
4	16,06	15,94	439,68	489,48
5	16,97	14,70	475,53	468,32
6	15,55	15,24	461,60	418,75
Média	15,61	15,11	472,13	469,50
CV	6,8%	3,1%	4,2%	5,5%
Exatidão	104,1%	100,8%	98,4%	97,8%
Variação	-3,2%		-0,6%	

CQA – Controle de qualidade alto  
CQB – Controle de qualidade baixo  
CV – coeficiente de variação  
EPP – estabilidade pós-processamento



**Tabela 54 – Resultados da estabilidade pós-processamento do padrão interno.**

<b>Amostra</b>	<b>Recente (ng/mL)</b>	<b>EPP (ng/mL)</b>
<b>1</b>	66591	61088
<b>2</b>	67295	67229
<b>3</b>	67799	63597
<b>4</b>	81055	60877
<b>5</b>	74388	62391
<b>6</b>	64459	72508
<b>7</b>	68698	71028
<b>8</b>	70350	73198
<b>9</b>	66456	71089
<b>10</b>	67394	62614
<b>11</b>	61839	69520
<b>12</b>	68583	66709
<b>Média</b>	68742	66821
<b>CV</b>	7,2%	6,9%
<b>Variação</b>	-2,8%	

CV – coeficiente de variação

EPP – estabilidade pós-processamento

#### 1.7.2.6.5 Estabilidade de longa duração

Para avaliação da estabilidade de longa duração, as amostras permaneceram armazenadas à temperatura de -80°C pelo período de 121 dias, tempo superior ao compreendido entre a data da primeira coleta e data da análise da última amostra que foi de 52 dias. Os resultados estão apresentados na tabela 55.

Pela avaliação dos resultados do experimento pode-se concluir que o analito é estável nas condições de armazenamento por tempo superior ao tempo de duração do estudo.

**Tabela 55 – Resultados da estabilidade de longa duração para o analito.**

Amostra	CQB (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Recente	ELD	Recente	ELD
<b>1</b>	15,37	15,65	505,66	460,65
<b>2</b>	14,00	13,84	459,56	467,76
<b>3</b>	14,69	13,90	433,59	521,87
<b>4</b>	15,77	13,60	461,74	528,60
<b>5</b>	15,63	16,20	487,90	427,90
<b>6</b>	16,33	15,47	473,55	472,70
<b>Média</b>	15,30	14,78	470,33	487,41
<b>CV</b>	5,44%	7,60%	5,30%	6,10%
<b>Exatidão</b>	101,99%	98,51%	97,99%	101,54%
<b>Variação</b>	-3,41%		3,63%	

CQA – Controle de qualidade alto  
 CQB – Controle de qualidade baixo  
 CV – coeficiente de variação  
 ELD – estabilidade de longa duração

**CAPÍTULO 4**  
**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA/ BIODISPONIBILIDADE**  
**RELATIVA**

## 1 ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA/ BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

O estudo intitulado “Avaliação da bioequivalência farmacêutica do fármaco Fumarato de Tenofovir Desoproxila – Funed Tenofovir 300mg [Blanver Farmoquímica Ltda / Fundação Ezequiel Dias (FUNED)] sob a forma de comprimido revestido versus o Viread® 300mg (United Medical Ltda) sob a forma de comprimido revestido, em voluntários sadios após alimentação padronizada, utilizando técnicas de Cromatografia Líquida” foi conduzido conforme as diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos das Resoluções nº 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, das Boas Práticas Clínicas segundo a Conferência Internacional em Harmonização (ICH) e de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e suas revisões.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP em 27 de abril de 2010 (Anexo B).

O estudo foi executado pelo ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas, centro devidamente certificado pela Anvisa em Boas Práticas em Biodisponibilidade/ Bioequivalência para as etapas clínica, analítica e estatística de acordo com a Resolução RE nº 5.836, de 16 de dezembro de 2010.

### 1.1 Procedimento do estudo

O estudo foi do tipo quantitativo direto com delineamento aleatório, monocêntrico, aberto, cruzado, randomizado, prospectivo, dois tratamentos, dois períodos, duas seqüências, utilizando-se 36 voluntários sadios (masculino e feminino), com idade variando na faixa de 18 – 50 anos de idade, onde os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência de acordo com a lista de randomização e após alimentação padronizada.

De acordo com a resolução RE nº. 1170, de 19 de abril de 2006, o intervalo entre os períodos (*washout*) deve ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco e/ou metabólito (BRASIL, 2006). O medicamento em questão, tenofovir, apresenta meia-vida de aproximadamente 17 horas, sendo assim, o período de

*washout* do estudo foi de 3 semanas afim de certificar-se que o medicamento foi eliminado completamente do organismo.

## **1.2 Seleção dos voluntários**

Foram selecionados 36 voluntários (18 indivíduos do sexo masculino e 18 indivíduos do sexo feminino) com idade de 18 a 50 anos.

Os seguintes critérios foram utilizados para inclusão dos voluntários:

- Índice de Massa Corpórea (IMC) compreendido na faixa de 18,5 a 25,0 podendo variar até 15% quanto ao limite superior (18,5 a 28,75);
- ser considerado saudável após avaliação clínica;
- ter concordado livremente e assinado o termo de consentimento;

Os seguintes critérios foram utilizados para excluir um voluntário do estudo:

- resultados dos exames complementares fora dos valores considerados normais,
- voluntários que foram submetidos à cirurgia ou que foram internados por qualquer motivo antes do início do estudo serão avaliados criteriosamente pelo médico quanto à admissão no estudo;
- teste positivo para hepatite B, hepatite C ou HIV nos exames pré-estudo;
- ter sabidamente uma hipersensibilidade ao fármaco em estudo ou a compostos quimicamente relacionados;
- ter participado de qualquer estudo experimental ou ter ingerido qualquer fármaco experimental dentro dos seis meses que antecedem o início deste estudo, em cumprimento à Resolução RDC nº34, de 3 de junho de 2008;
- ter feito uso de medicação regular dentro das 2 semanas que antecederam o início do estudo. Será permitido apenas o uso de anticoncepcional para mulheres. O uso eventual de medicação, que a juízo do Investigador ou médico responsável não interfira na farmacocinética do medicamento em estudo não será considerado como critério de exclusão;
- histórico de abuso de álcool ou ter ingerido bebidas alcoólicas nas 24 horas que antecedem o período de internação;
- histórico de abuso de drogas (maconha e haxixe - serão excluídos os voluntários que apresentaram o uso em menos de três meses antes da consulta - e para

- drogas como a cocaína, fenciclidina, crack, heroína serão excluídos os voluntários que apresentaram o uso em menos de 1 ano antes da consulta);
- consumo de fármacos indutores e/ou inibidores do metabolismo hepático, organotóxicas ou que apresentem tempo de meia-vida longo (meia-vida >50horas) dentro de 30 dias antes da administração do medicamento em estudo;
  - uso de inibidores da monoamina oxidase (MAO) duas semanas antes do início do tratamento;
  - uso de inibidores de recaptação de serotonina;
  - doença psiquiátrica e/ou doença psicológica (inclusive depressão), a menos que julgado clinicamente não significativo pelo investigador clínico;
  - histórico clinicamente significativo e/ou presença de patologia gastrointestinal, sintomas gastrointestinais presentes, doença hepática ou renal, ou outra condição conhecida que pode interferir na absorção, distribuição, metabolismo, ou excreção do medicamento. Voluntários que apresentaram episódios de vômito dentro das 24 horas antes da administração do medicamento deverão ser avaliados pelo investigador clínico;
  - histórico clinicamente significativo ou presença de doença neurológica, endócrina, pulmonar, hematológica, imunológica, cerebral, metabólica ou doença cardiovascular, hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; histórico ou caso clínico de infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
  - ter doado ou perdido 450 mL ou mais de sangue dentro dos três meses que antecederam ao estudo;
  - fumante inveterado (fumar mais de 5 cigarros por dia);
  - exame de  $\beta$ HCG (gonadotrofina coriônica humana) positivo para mulheres;
  - mulheres que estejam em período de amamentação.

### **1.3 Administração dos medicamentos**

Em cada período, os voluntários receberam por via oral uma dose de 300mg de fumarato de tenofovir desoproxila (245mg de tenofovir desoproxila) correspondente a 1 comprimido revestido do medicamento teste (Fumarato de

tenofovir desoproxila/ Funed Tenofovir, lote 09080844) ou 1 comprimido revestido do medicamento referência (Viread®, lote T190391) juntamente com 200mL de água. O medicamento foi administrado 30 minutos após a ingestão do café da manhã padronizado.

Após a administração do medicamento os voluntários permaneceram sentados (plano de 45°) durante as primeiras quatro horas.

Os voluntários foram divididos em grupos conforme lista de randomização apresentada na tabela 56.

#### **1.4 Período de jejum e alimentação**

A última refeição dos voluntários foi realizada até as 20h e 30min do dia anterior ao estudo e os mesmos permaneceram em jejum por no mínimo 10 horas até o dia seguinte, quando receberão café da manhã padronizado 30 minutos antes da administração do medicamento em estudo.

A dieta oferecida aos voluntários sadios foi padronizada, destacando ainda a proibição da ingestão de bebidas ou alimentos contendo cafeína ou xantinas.

Os voluntários receberam almoço, lanche da tarde, jantar e café da manhã respectivamente quatro, oito, doze e vinte e quatro horas após a administração do medicamento.

A ingestão de líquidos foi proibida de sete horas antes da administração do medicamento até duas horas após a administração do mesmo.

#### **1.5 Coleta das amostras**

Antes da administração do medicamento em estudo (Período 1 e 2) foi realizada uma coleta de 15mL de sangue (pool) para a validação de metodologias analíticas e para o banco de plasma dos voluntários para preparação das curvas padrão a serem utilizadas durante o estudo.

**Tabela 56 – Lista de randomização.**

<b>Voluntário</b>	<b>Sexo</b>	<b>Período 1</b>	<b>Período 2</b>
<b>01</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>02</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>03</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>04</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>05</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>06</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>07</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>08</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>09</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>10</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>11</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>12</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>13</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>14</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>15</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>16</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>17</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>18</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>19</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>20</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>21</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>22</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>23</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>24</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>25</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>26</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>27</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>28</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>29</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>30</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>31</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>32</b>	Masculino	Teste	Referência
<b>33</b>	Masculino	Referência	Teste
<b>34</b>	Feminino	Teste	Referência
<b>35</b>	Feminino	Referência	Teste
<b>36</b>	Feminino	Teste	Referência



A coleta pré-dose (coleta 1 - tempo zero), foi realizada antes da administração do medicamento.

No total foram coletadas 52 amostras de sangue de 7,5mL e 2 amostras de sangue de 15 mL cada (pool), conforme tabela 57. O volume total de sangue incluindo os 15 mL da triagem e pós-estudo não ultrapassou 450mL de sangue por voluntário.

Os voluntários foram liberados da internação após a coleta de 24 horas e retornaram para as coletas de 36, 48, 72 e 96 horas.

Foram monitorados a pressão arterial, temperatura e pulso dos voluntários de acordo com os horários estabelecidos na tabela 57.

## **1.6 Processamento das amostras**

A coleta foi realizada utilizando o sistema S-Monovette SARSTEDT® contendo o anticoagulante heparina. Após a coleta, todos os tubos de ensaio foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Após centrifugação o plasma (sobrenadante) foi separado do sedimento e distribuído em tubos de armazenamento. Os tubos de armazenamento foram congelados em um banho de gelo seco e imediatamente transferidos para freezer a – 80°C. Foram congelados 2 tubos de armazenamento com 2,0 mL de plasma destinados para o ensaio propriamente dito e amostra de retenção.

## **1.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada conforme recomendações da Anvisa (BRASIL, 2003b) e do Food and Drug Administration (FDA, 2001). Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos das curvas de concentração sanguínea do fármaco “*versus*” tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram determinados:

- $C_{max}$ : pico de concentração máxima do fármaco, obtido a partir dos dados experimentais;

**Tabela 57 – Cronograma de coletas e avaliação dos sinais vitais**

Nº da coleta	Tempo (h)	Volume coletado (mL)	Avaliação de sinais vitais
<b>POOL</b>	Antes da	15,0	NA
<b>1 (pré-dose)</b>	administração do medicamento	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>2</b>	00:10	7,5	NA
<b>3</b>	00:20	7,5	NA
<b>4</b>	00:30	7,5	NA
<b>5</b>	00:40	7,5	NA
<b>6</b>	00:50	7,5	NA
<b>7</b>	01:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>8</b>	01:15	7,5	NA
<b>9</b>	01:30	7,5	NA
<b>10</b>	01:45	7,5	NA
<b>11</b>	02:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>12</b>	02:15	7,5	NA
<b>13</b>	02:30	7,5	NA
<b>14</b>	03:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>15</b>	03:30	7,5	NA
<b>16</b>	04:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>17</b>	05:00	7,5	NA
<b>18</b>	06:00	7,5	NA
<b>19</b>	08:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>20</b>	10:00	7,5	NA
<b>21</b>	12:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>22</b>	24:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>23</b>	36:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>24</b>	48:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>25</b>	72:00	7,5	PA, pulso, temperatura
<b>26</b>	96:00	7,5	PA, pulso, temperatura

- $ASC_{0-t}$  : área sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo, do tempo zero ao tempo t, onde t é o tempo relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação);
- $ASC_{0-inf}$  : área sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito, onde  $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_t/k$ , onde  $C_t$  é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação) e k é a constante de eliminação da fase terminal.

- $T_{max}$ : tempo para atingir  $C_{max}$
- $t_{1/2}$ : meia-vida de eliminação do fármaco (BRASIL, 2006).

Os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e da construção do intervalo de confiança 90%. O modelo de ANOVA incluiu os termos seqüência, período, formulação e voluntário dentro da seqüência.

Os dados obtidos para os parâmetros  $ASC_{0-t}$  e  $C_{max}$  foram transformados em logaritmo natural. Em geral, a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados originais (ANVISA, 2006).

Os medicamentos são considerados bioequivalentes se os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas ( $ASC_{0-t}$  teste/ $ASC_{0-t}$  referência e  $C_{max}$  teste/ $C_{max}$  referência) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25 (ANVISA, 2006).

Os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos serão processados no *software WinNonlin Professional* (Pharsight®, EUA).

## **1.8 Resultados e discussão**

### **1.8.1 Voluntários que concluíram o estudo**

Dos 36 voluntários incluídos, 35 concluíram o estudo. O voluntário 31, sexo feminino, foi excluído do estudo durante a avaliação clínica realizada na pré-internação do período 2 pelo relato de utilização de 1 comprimido de diclofenaco sódico no dia anterior à internação. Este voluntário recebeu apenas o medicamento referência no período 1.

### **1.8.2 Eventos adversos durante o estudo**

Não ocorreram eventos adversos graves nos dois períodos do estudo, o evento mais comumente relatado pelos voluntários foi cefaléia e a intervenção farmacológica, quando considerada necessária pela avaliação médica, foi a administração de paracetamol 750 mg por via oral.

### 1.8.3 Desvios de coleta

Nas coletas do período da internação ocorreram alguns atrasos sendo que o maior deles foi de 10 minutos, os atrasos foram devidos a perda do acesso venoso.

Nas coletas externas, após a alta dos voluntários, ocorreram adiantamentos de coletas, sendo o maior deles foi de 1 hora e 26 minutos.

Os desvios ocorridos não causaram conseqüências significativas ao estudo.

### 1.8.4 Resultados das concentrações plasmáticas

A tabela 58 apresenta as concentrações plasmáticas médias de tenofovir após administração dos medicamentos referência e teste a 35 voluntários sadios. Os valores individuais são apresentados no anexo A.

As concentrações abaixo do limite inferior de quantificação (LIQ) foram consideradas iguais a 0 (zero) para fins de cálculos estatísticos.

Os pontos a serem reanalisados foram definidos conforme critérios previstos em procedimento. Foi realizada reanálise de 10 amostras, sendo 1 por ausência de padrão interno ou com alterações, 4 por possível troca de amostra, 4 por possível contaminação durante o processo de extração e 1 por possível erro de extração. As amostras reanalisadas representaram 0,55% do total de amostras analisadas,

As curvas médias de decaimento plasmático referentes aos produtos teste e referência, encontram-se na figura 36.

**Tabela 58 – Concentrações plasmáticas médias, mínima e máxima, desvio padrão e CV (%).**

Tempo (h)	Concentrações plasmáticas médias (ng/mL)									
	Referência (Viread®)					Teste (Fumarato de tenofovir desoproxila/ Funed Tenofovir)				
	Média	DP	Mínimo	Máximo	CV%	Média	DP	Mínimo	Máximo	CV%
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NC	0,00	0,00	0,00	0,00	NC
0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	NC	0,20	1,20	0,00	7,10	591,61
0,33	10,29	57,32	0,00	339,08	557,20	7,53	32,23	0,00	184,88	427,77
0,50	15,53	64,41	0,00	376,59	414,80	18,16	66,99	0,00	348,49	368,95
0,67	24,95	62,36	0,00	330,08	250,00	29,03	72,17	0,00	319,62	248,58
0,83	37,44	66,29	0,00	264,07	177,00	39,14	73,39	0,00	262,22	187,49

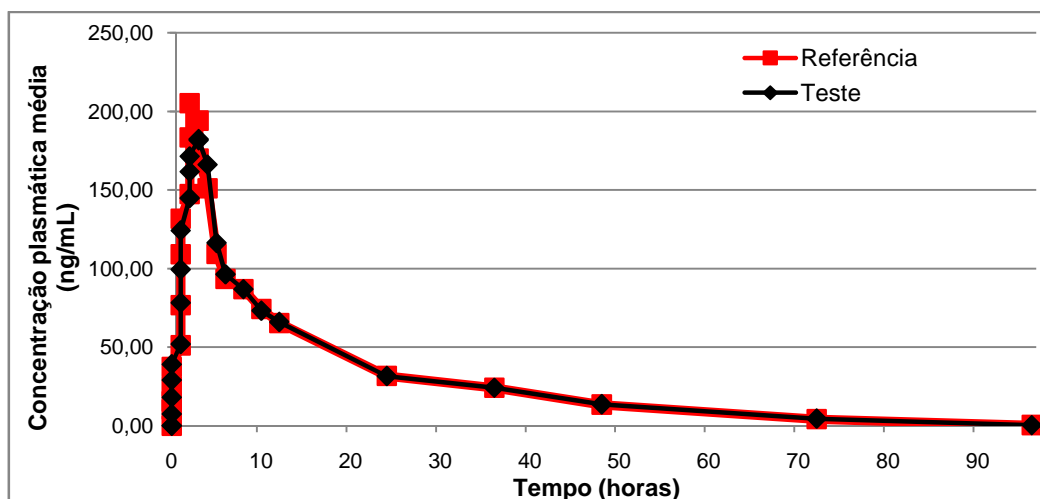
**Tabela 58 (conclusão)**

Tempo (h)	Concentrações plasmáticas médias (ng/mL)									
	Referência (Viread®)					Teste (Fumarato de tenofovir desoproxila/ Funed Tenofovir)				
	Média	DP	Mínimo	Máximo	CV%	Média	DP	Mínimo	Máximo	CV%
1,00	51,21	73,66	0,00	271,68	143,80	52,01	87,48	0,00	290,22	168,18
1,25	76,71	81,19	0,00	287,62	105,80	78,28	104,96	0,00	386,74	134,09
1,50	109,15	98,08	0,00	298,20	89,90	99,50	114,82	0,00	427,18	115,39
1,75	131,70	103,62	0,00	385,86	78,70	124,29	113,76	0,00	381,12	91,53
2,00	147,36	88,82	0,00	310,56	60,30	144,90	107,20	0,00	351,76	73,98
2,25	183,42	89,18	0,00	329,56	48,60	161,70	99,24	7,85	329,60	61,38
2,50	205,20	92,39	6,87	455,68	45,00	171,44	94,63	15,92	355,97	55,19
3,00	194,10	53,54	105,24	310,39	27,60	182,47	63,90	70,60	312,79	35,02
3,50	170,04	44,89	94,52	278,05	26,40	181,80	53,42	81,56	303,32	29,38
4,00	151,11	46,11	88,28	280,11	30,50	166,24	58,73	71,47	292,94	35,33
5,00	109,29	37,14	63,06	246,41	34,00	116,41	43,24	55,81	266,72	37,15
6,00	93,44	24,80	48,21	171,96	26,50	96,43	29,72	41,85	182,26	30,82
8,00	86,85	25,40	44,44	193,35	29,20	86,91	20,64	39,70	135,72	23,75
10,00	74,29	15,05	47,59	115,29	20,30	73,24	15,59	27,33	103,17	21,29
12,00	65,30	14,39	39,81	107,86	22,00	66,06	14,02	28,31	95,63	21,22
24,00	31,69	7,16	18,58	50,63	22,60	31,64	7,19	13,33	47,00	22,74
36,00	24,15	7,07	9,87	47,15	29,30	24,17	5,07	12,53	36,03	20,97
48,00	13,53	2,99	8,18	19,03	22,10	13,69	3,90	7,62	26,48	28,49
72,00	4,22	3,54	0,00	11,01	83,90	4,55	3,75	0,00	11,26	82,47
96,00	0,47	1,55	0,00	6,10	332,80	0,35	1,45	0,00	7,07	417,69

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

Fonte: ICF, 2010



**Figura 36 – Curvas médias de concentração plasmática versus tempo para os medicamentos teste e referência.**

#### 1.8.5 Dados farmacocinéticos

Nas tabelas 59 e 60 estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração dos medicamentos referência e teste, respectivamente.

**Tabela 59 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração do medicamento referência.**

Voluntário	C <sub>max</sub> (ng/mL)	ASC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)	ASC <sub>0-inf</sub> (h*ng/mL)	T <sub>max</sub> (hora)	T <sub>1/2</sub> (hora)
01	291,52	3876,18	4026,76	3,00	15,02
02	215,68	2556,16	2733,65	3,00	17,57
03	234,66	2270,23	2508,06	3,00	14,31
04	295,40	2738,97	2875,61	1,50	16,65
05	271,68	2130,15	2433,01	1,00	15,92
06	138,92	1591,23	1758,77	4,00	13,73
07	312,78	2613,28	2836,30	1,75	13,80
08	197,11	1926,12	2263,13	2,50	12,35
09	268,58	2290,89	2469,53	1,50	20,17
10	338,20	2354,59	2531,59	2,50	22,35
11	220,54	2563,28	2680,52	1,50	16,03
12	254,03	1979,05	2176,38	3,00	14,46
13	385,86	2927,87	3057,63	1,75	16,18
14	172,57	2887,93	3111,76	3,00	19,35
15	381,54	2881,79	3114,35	2,50	32,18

**Tabela 59 (conclusão)**

<b>Voluntário</b>	<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	<b>ASC<sub>0-t</sub> (h*ng/mL)</b>	<b>ASC<sub>0-inf</sub> (h*ng/mL)</b>	<b>T<sub>max</sub> (hora)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (hora)</b>
<b>16</b>	208,70	2409,21	2547,89	1,75	18,96
<b>17</b>	211,43	2180,57	2449,99	3,00	15,13
<b>18</b>	216,06	1349,77	1517,71	3,00	14,23
<b>19</b>	180,30	1825,38	2058,29	2,25	15,35
<b>20</b>	309,53	3296,45	3479,40	2,25	24,53
<b>21</b>	244,69	2705,51	2856,06	3,00	17,28
<b>22</b>	288,06	2574,56	2692,41	2,25	16,08
<b>23</b>	285,63	2362,88	2502,11	2,25	17,33
<b>24</b>	455,68	2880,76	3225,43	2,50	15,61
<b>25</b>	207,75	2541,20	2717,83	4,00	18,55
<b>26</b>	280,11	3099,73	3348,87	4,00	21,89
<b>27</b>	349,91	3074,12	3188,01	2,50	14,84
<b>28</b>	197,58	2217,06	2384,86	2,50	20,99
<b>29</b>	272,26	2064,32	2284,24	2,50	14,50
<b>30</b>	187,62	2031,03	2186,95	3,50	12,30
<b>32</b>	376,59	2759,29	2883,77	0,50	16,19
<b>33</b>	125,77	1784,06	2149,15	3,00	18,22
<b>34</b>	326,81	3149,40	3421,87	2,25	22,19
<b>35</b>	247,65	3826,40	4004,67	4,00	20,26
<b>36</b>	313,95	2348,45	2635,60	1,75	28,15
<b>Média</b>	264,72	2516,22	2717,49	2,52	17,79

C<sub>max</sub> – concentração máxima

ASC<sub>0-t</sub> – Área sobre a curva do tempo zero ao último ponto de coleta

ASC<sub>0-inf</sub> – Área sobre a curva do tempo zero até extrapolação ao infinito

T<sub>max</sub> – tempo para atingir C<sub>max</sub>

T<sub>1/2</sub> – tempo de meia-vida

Fonte: ICF, 2010

**Tabela 60 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração do medicamento teste.**

<b>Voluntário</b>	<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	<b>ASC<sub>0-t</sub> (h*ng/mL)</b>	<b>ASC<sub>0-inf</sub> (h*ng/mL)</b>	<b>T<sub>max</sub> (hora)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (hora)</b>
<b>01</b>	265,89	2904,33	3107,59	4,00	12,00
<b>02</b>	272,34	2748,42	2955,92	1,25	20,23
<b>03</b>	271,53	2252,91	2470,49	2,50	13,91
<b>04</b>	311,56	2560,01	2731,33	2,25	19,37
<b>05</b>	244,70	2049,28	2277,96	2,00	14,90
<b>06</b>	137,46	1217,40	1371,05	3,50	13,98

**Tabela 60 (conclusão)**

<b>Voluntário</b>	<b>C<sub>max</sub></b> <b>(ng/mL)</b>	<b>ASC<sub>0-t</sub></b> <b>(h*ng/mL)</b>	<b>ASC<sub>0-inf</sub></b> <b>(h*ng/mL)</b>	<b>T<sub>max</sub></b> <b>(hora)</b>	<b>T<sub>1/2</sub></b> <b>(hora)</b>
<b>07</b>	290,32	2686,03	3331,08	2,25	24,41
<b>08</b>	303,32	2383,01	2566,55	3,50	21,31
<b>09</b>	149,11	1903,04	2084,80	2,25	19,29
<b>10</b>	260,68	2377,01	2552,77	3,00	20,27
<b>11</b>	215,90	2477,54	2779,53	2,50	18,59
<b>12</b>	351,76	2609,59	2883,17	2,00	14,80
<b>13</b>	332,83	2930,75	3059,02	2,50	15,74
<b>14</b>	270,44	2762,40	2975,29	3,50	19,21
<b>15</b>	289,80	2954,70	3134,93	3,50	18,45
<b>16</b>	278,03	2843,23	2986,18	2,50	15,80
<b>17</b>	200,90	2142,19	2353,15	3,00	13,97
<b>18</b>	145,86	1133,02	1339,77	3,50	17,37
<b>19</b>	182,72	1849,89	2056,44	2,50	14,11
<b>20</b>	290,22	3264,67	3441,63	1,00	17,57
<b>21</b>	210,66	2501,70	2669,40	2,00	19,60
<b>22</b>	355,97	2438,74	2575,88	2,50	16,30
<b>23</b>	348,49	2062,60	2227,56	0,50	20,60
<b>24</b>	427,18	3588,99	3779,17	1,50	16,77
<b>25</b>	292,94	2552,92	2714,84	4,00	16,80
<b>26</b>	266,72	3303,32	3538,93	5,00	31,90
<b>27</b>	418,73	3419,89	3654,22	1,50	18,27
<b>28</b>	268,16	2592,77	2823,88	3,00	17,23
<b>29</b>	263,70	2368,84	2625,86	1,75	15,07
<b>30</b>	183,24	1982,93	2176,34	3,00	13,75
<b>32</b>	323,79	2659,87	2916,17	2,00	14,85
<b>33</b>	187,03	2154,81	2343,15	0,66	20,56
<b>34</b>	312,79	3015,87	3226,74	3,00	18,43
<b>35</b>	287,73	3699,95	3927,57	4,00	22,32
<b>36</b>	254,09	1997,08	2198,18	2,50	14,47
<b>Média</b>	270,47	2525,42	2738,76	2,57	17,78

C<sub>max</sub> – concentração máxima

ASC<sub>0-t</sub> – Área sobre a curva do tempo zero ao último ponto de coleta

ASC<sub>0-inf</sub> – Área sobre a curva do tempo zero até extrapolação ao infinito

T<sub>max</sub> – tempo para atingir C<sub>max</sub>

T<sub>1/2</sub> – tempo de meia-vida

Fonte: ICF, 2010



No estudo descrito por GOMES *et al* (2008), onde os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados em um estudo de bioequivalência com administração única, em jejum, de um comprimido de uma associação em dose fixa combinada contendo 300 mg de tenofovir e 200 mg de emtricitabina, os valores de  $C_{max}$  encontrados para o tenofovir foram de 310,7 ng/mL e 299,8 ng/mL, o  $T_{max}$  de 0,96 h e 0,98 h, a  $ASC_{0-inf}$  de 2486,7 ng.h/mL e 2454,1 ng.h/mL e  $T_{1/2}$  de 18,5 h e 19,2 h, respectivamente para o medicamento referência e o medicamento teste.

No estudo descrito por KEARNEY *et al* (2004), o  $C_{max}$  obtido para o tenofovir após administração de dose única em jejum foi de 240 ng/mL, atingido entre 0,8 e 1,0 h após a administração. O  $C_{max}$  após dose única com alimentação foi de 208 ng/mL e  $ASC_{0-inf}$  de 2730 ng.h/mL.

No estudo relatado por MATHIAS *et al* (2007), os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados com administração em dose única, em jejum, de 600 mg de efavirenz, 200 mg de emtricitabina e 300 mg de TDF em uma associação em dose fixa combinada (tratamento teste) e com os medicamento em comprimidos individuais com a mesma dosagem (tratamento referência). Os resultados encontrados para o tenofovir foram:  $C_{max}$  de 325 ng/mL e 353 ng/mL,  $T_{max}$  de 1,0 h e 0,75 h,  $ASC_{0-t}$  de 1950 ng.h/mL e 1970 ng.h/mL,  $ASC_{0-inf}$  de 2310 ng.h/mL e 2320 ng.h/mL e  $T_{1/2}$  de 18,5 h e 17,2 h, respectivamente para o tratamento teste e referência.

No estudo relatado por KEARNEY *et al* (2006), os parâmetros farmacocinéticos no estado de equilíbrio com administração isolada de TDF foram:  $C_{max}$  de 314 ng/mL,  $T_{max}$  de 1,51 h,  $ASC_{0-t}$  de 2870 ng.h/mL e  $T_{1/2}$  de 14,0 h.

Neste trabalho, os valores encontrados para o parâmetro  $C_{max}$  variaram de 125,77 a 455,68 ng/mL para o medicamento referência e de 137,46 a 427,18 ng/mL para o medicamento teste. A média geométrica obtida pelo método dos mínimos quadrados foi de 254,01 ng/mL para o medicamento referência e 260,65 ng/mL para o medicamento teste. Os valores para o  $C_{max}$  encontrados estão de acordo com o descrito na literatura.

Os valores de  $T_{max}$  variaram de 0,5 a 4,0 h, com média de 2,52 h e mediana de 2,50 h para o medicamento teste e de 0,5 a 5,0 h com média de 2,57 h e mediana de 2,50 para o medicamento referência. Estes dados são um pouco superiores aos relatado na literatura, o que pode ser resultado da característica da

população pesquisada, uma vez que os dados da literatura não se referem a estudos brasileiros. Observou-se que o comportamento foi semelhante para o medicamento teste e referência.

O valor médio de  $T_{1/2}$  foi de 17,79 h para o medicamento referência e 17,78 h para o medicamento teste, valores comparáveis ao relatado na literatura.

As médias geométricas obtidas pelo método dos mínimos quadrados para os parâmetros  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-inf}$  foram de 2452,62 ng.h/mL e 2661,81 ng.h/mL para o medicamento referência e 2450,90 ng.h/mL e 2666,61 ng.h/mL para o medicamento teste. Os valores encontrados estão de acordo com o descrito na literatura.

#### 1.8.6 Análise de variância

A análise de variância (ANOVA) é uma técnica estatística que estuda a contribuição de alguns fatores de interesse na variabilidade dos dados. A variância dos dados é decomposta de acordo com os fatores de interesse e posteriormente verificada a significância estatística de cada fator (ANVISA, 2006; STEIGER, 2004).

Foi realizada ANOVA para verificação dos efeitos da formulação, do período e da sequência, aplicando-se a transformação logarítmica aos dados e os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 61.

**Tabela 61 – Resultados da análise de variância para avaliação dos efeitos da formulação, do período e da sequência.**

Fonte de variação	$C_{max}$	$ASC_{0-t}$	$ASC_{0-inf}$
Sequência	0,0839	0,5244	0,4713
Formulação	0,5265	0,9764	0,9161
Período	0,7420	0,9623	0,5215

$C_{max}$  – concentração máxima

$ASC_{0-t}$  – Área sobre a curva do tempo zero ao último ponto de coleta

$ASC_{0-inf}$  – Área sobre a curva do tempo zero até extrapolação ao infinito

Fonte: ICF, 2010

Considerando os p-valores apresentados na tabela 61, ao nível de significância de 5%, não foram evidenciadas diferenças significativas para os fatores formulação e período nos parâmetros avaliados. Para o parâmetro  $C_{max}$  foi verificado um possível efeito de sequência ao nível de significância de 10%, uma vez que o

valor de p encontrado foi menor que 0,10. Este resultado indica que do ponto de vista estatístico existe uma diferença significativa entre as sequências para o parâmetro avaliado.

O efeito de sequência está associado à ordem em que os medicamentos são administrados aos voluntários. Segundo recomendações da Anvisa (BRASIL, 2003b), para um estudo cruzado 2x2, a presença de efeitos de sequência pode ser aceita desde que alguns critérios sejam observados. O estudo em questão atende a todos os critérios, envolve apenas voluntários sadios, é de dose única, o fármaco não é uma substância endógena, o período de eliminação foi adequado e as amostras de pré-dosagem não apresentam qualquer nível de fármaco detectável em todos os voluntários e o estudo satisfaz todos os critérios científicos e estatísticos adotados no planejamento. De acordo com os parâmetros de delineamento do estudo realizado, o efeito observado pode ser ignorado.

#### **1.8.7 Intervalos de confiança**

Os intervalos de confiança 90% (IC 90%) para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos  $C_{max}$ ,  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-inf}$ , utilizando os dados transformados, foram 95,75 – 109,97; 96,19 – 103,82 e 96,75 – 103,73, respectivamente.

O poder estatístico dos testes utilizados para determinação dos intervalos de confiança foi de 99,97%, para o  $C_{max}$ , 100,00% para a  $ASC_{0-t}$  e 100,00% para a  $ASC_{0-inf}$ . O poder do teste de um estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência é definido como a probabilidade de aceitar a bioequivalência entre produto teste e referência corretamente (BRASIL, 2003b). Os valores obtidos indicam que o número de voluntários utilizados no estudo foi adequado e que o resultado do estudo pode ser considerado válido.

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas ( $ASC_{0-t}$  teste/ $ASC_{0-t}$  referência e  $C_{max}$  teste/ $C_{max}$  referência) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25, ou seja, devem estar compreendidos no intervalo de 80 a 125% (BRASIL, 2006).

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que os medicamentos teste e referência são bioequivalentes.

## 2 CONCLUSÕES

- Um método por CLAE em fase reversa, modo isocrático e detecção por espectrometria de massas, com ionização *eletrospray* no modo positivo foi desenvolvido e validado para quantificação de tenofovir em plasma humano. O método se demonstrou seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 5,00 ng/mL a 600,00 ng/mL.
- O método bioanalítico se demonstrou adequado para aplicação em estudos de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de comprimidos contendo 300 mg de fumarato de tenofovir desoproxila.
- O estudo de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência permitiu a obtenção das curvas de concentração plasmática e dos parâmetros farmacocinéticos do tenofovir em população brasileira.
- O estudo de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência realizado foi submetido à avaliação da Anvisa juntamente com o dossiê de registro do produto registrado pela Fundação Ezequiel Dias, tendo sido aceito como satisfatório para comprovação da bioequivalência do medicamento teste em relação ao medicamento referência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONY PILLAI, C.; GIBBS, J. E.; THOMAS, S. A. The distribution of the anti-HIV drug, tenofovir (PMPA), into the brain, CSF and choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Research*, London, v. 3, n. 1, p 1-10, 2006.

AVERT. HIV types, groups and subtypes. Disponível em <<http://www.avert.org/hiv-types.htm>>. Acesso em: 19 dez 2010.

BARKIL, M.; GAGNIEU, M. C.; GUITTON, J. Relevance of a combined UV and single mass spectrometry detection for the determination of tenofovir in human plasma by CLAE in therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 854, n. 1-2, p. 192–197, 2007.

BENNETTO-HOOD, C.; LONG, M. C.; ACOSTA, E. P. Development of a sensitive and specific liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of tenofovir in human plasma. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, Chichester, v. 21, n. 13, p. 2087-2094, 2007.

BARDITCH-CROVO, P. *et al.* Phase I/II Trial of the Pharmacokinetics, Safety, and Antiretroviral Activity of Tenofovir Disoproxil Fumarate in Human Immunodeficiency Virus-Infected Adults. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 45, n. 10, p. 2733–2739, 2001.

BENTON, T. D. Psychiatric Considerations in Children and Adolescents with HIV/Aids. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 387-400, 2010.

BERG, T *et al.* Tenofovir Is Effective Alone or With Emtricitabine in Adefovir-Treated Patients With Chronic-Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology*, Baltimore, v. 139, n. 4, p. 1207-17, 2010.

BEZY, V.; MORIN, P.; COUERBE, P.; LELEU, G.; AGROFOGLIO, L. Simultaneous analysis of several antiretroviral nucleosides in rat-plasma by high-performance liquid

chromatography with UV using acetic acid/ hydroxylamine buffer. Test of this new volatile medium-pH for CLAE–ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 821, n. 2, p. 132-143, 2005

BHASKARAN, K.; HAMOUDA, O.; SANNES, M.; BOUFASSA, F.; JOHNSON, A. M.; LAMBERT, P. C.; PORTER, K. Changes in the Risk of Death After HIV Seroconversion Compared With Mortality in the General Population. *JAMA*, Chicago, v. 300, n. 1, p. 51-59, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte I. São Paulo, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 898, de 29 de maio de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 24 abr 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 16, de 2 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Genérico. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 mar 2007a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 2 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 mar 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV 7<sup>a</sup> Ed. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://www.Aids.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c\\_2008montado.pdf](http://www.Aids.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c_2008montado.pdf)>. Acesso em: 22 dez 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Aids – Tratamento de HIV e Aids, Medicamentos. Disponível em <<http://www.Aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9DDD0E43PTBRIE.htm>>. Acesso em: 15 maio 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Aids – DST Ano VI nº 01. Brasília, 2009b. Disponível em <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Boletim2010\\_0.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Boletim2010_0.pdf)>. Acesso em: 21 dez 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Aids - DST Ano VII - nº 01 (Versão Preliminar). Brasília, 2010a. Disponível em <[http://www.Aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010\\_preliminar\\_pdf\\_34434.pdf](http://www.Aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010_preliminar_pdf_34434.pdf)>. Acesso em: 21 dez 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aids no Brasil. Disponível em <<http://www.Aids.gov.br/pagina/Aids-no-brasil>>. Acesso em: 26 out 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Medicamentos antirretrovirais. Disponível em <<http://www.Aids.gov.br/pagina/medicamentos-antirretrovirais>>. Acesso em: 27 dez 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Contratos para compra de antirretrovirais ficam R\$ 118 milhões mais baratos. Disponível <<http://www.Aids.gov.br/noticia/contratos-para-compra-de-antirretrovirais-ficam-r-118-milhoes-mais-baratos>>. Acesso em: 27 dez 2010d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Recomendações para realização de ensaios de dissolução para Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/cf7eb38040672857bdc4ff137b78f2dc/recomenda\\_dissolucao2.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/cf7eb38040672857bdc4ff137b78f2dc/recomenda_dissolucao2.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 03 ago 2010e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, volume I. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf)>. Acesso em 04 ago 2010f.

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/Aids pandemic. *Antiviral Research*, Amsterdam, v. 85, n; 1, p. 1-18, 2010.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Center for HIV/Aids, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention 2006. Disease Profile, 2008. Disponível em <[http://www.cdc.gov/nchhstp/Publications/docs/2006\\_Disease\\_Profile\\_508\\_FINAL.pdf](http://www.cdc.gov/nchhstp/Publications/docs/2006_Disease_Profile_508_FINAL.pdf)>. Acesso em: 27 out 2010.

CEDAFAR – Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico. Relatório do perfil de dissolução de fumarato de tenofovir desoproxila 300 mg revestidos. Belo Horiozonte, 2010a. 6 p.

CEDAFAR – Centro de Estudos Biofarmacêuticos. Certificado de equivalência farmacêutica. Belo Horizonte, 2010b. 3 p.

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 307-320, 2009.

DE CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v. 10, n. 5, p. 507–515, 2010.



DECHRISTOFORO, R.; PENZAK, S. R. Tenofovir: A nucleotide analogue reverse-transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection. *American journal of health-system pharmacy*, Bethesda, v. 61, n. 1, p. 86-98, 2004.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B - Analytical technologies in the biomedical and life*, Amsterdam, v. 830, n. 1, p. 6-12, 2006.

DELPECH, V.; GAHAGAN, J. The global epidemiology of HIV. *Medicine*, Baltimore, v. 37, n. 7, p. 317-320, 2009.

EUA. Department of Health and Human Services. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents 2009. Disponível em <<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>>. Acesso em 21 dez 2010.

FDA. Food and Drug Administration. Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. Rockville, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070244.pdf>>. Acesso em: 05 jul 2010.

FDA. Food and Drug Administration. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. Disponível em <<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAidsActivities/ucm118915.htm>>. Acesso em: 07 nov 2010.

FDA. Food and Drug Administration. Dissolution Methods. Disponível em: <[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_SearchResults\\_Dissolutions.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm)>. Acesso em: 29 set 2009.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070237.pdf>. Acesso em: 15 jun 2009.

FOSTER, C.; LYALL, H.; OLMSCHIED, B.; PEARCE, G.; ZHANG, S.; GIBB, D. M. Tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy and prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: is it time to move on from zidovudine? *HIV Medicine*, Oxford, v. 10, n. 7, p. 397-406, 2009.

FUNG, H. B., STONE, E. A, PIACENTI, F. J. Tenofovir Disoproxil Fumarate: A Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor for the Treatment of HIV Infection. *Clinical Therapeutics*, Princeton, v. 24, n. 10, p. 1515-1548, 2002.

GAGNIEU, M. C.; BARKIL, M. E.; LIVROZET, J. M.; COTTE, L.; MIALHES, P.; BOIBIEUX, A.; GUITTON, J.; TOD, M. Population pharmacokinetics of tenofovir in AIDS patients. *The Journal of Clinical Pharmacology*, Stamford, v. 48, n. 11, p. 1282-8, 2008.

GALLANT, J. E.; DERESINSKI, S. Tenofovir Disoproxil Fumarate. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 37, n. 7, p. 944–50, 2003.

GALVÃO, J. A política brasileira de distribuição e produção de medicamentos anti-retrovirais: privilégio ou um direito? *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 213-219, 2002.

GILBERT, M. T. P.; RAMBAUT, A.; WLASIUK, G.; SPIRA, T. J.; PITCHENIK, A. E.; WOROBEY, M. The emergence of HIV/Aids in the Americas and beyond. *PNAS*, Washington, v. 104, n. 47, p. 18566-70, 2007.

GOMES, N. A.; VAIDYAA, V. V.; PUDAGEB, A.; JOSHI, S. S.; PAREKH, S. A. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a

bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, v. 48, p. 918 – 926, 2008.

GONÇALVES, V. F.; KERR, L. R. F.S.; MOTA, R. M. S.; MOTA, J. M. A. Estimativa de subnotificação de casos de aids em uma capital do Nordeste. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 356-64, 2008.

GULICK, R. M. Antiretroviral Management of Treatment-Naive Patients. *Infectious Disease Clinics of North America*, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 71-84, 2007.

HALLIGAN, K. P.; HALLIGAN, T. J.; JESKE, A. H.; KOH, S. H. HIV: Medical Milestones and Clinical Challenges. *Dental Clinics of North America*, Philadelphia, v. 53, n. 2, p. 311-322, 2009.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D.; OSMANOV, S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids*, London, v. 20, n. 16, p. W13-23, 2006.

HOUGHTON, S. R.; MELTON, J.; FORTUNAK, J.; RIPIN, D. H. B.; BODDY, C. N. Rapid, mild method for phosphonate diester hydrolysis: development of a one-pot synthesis of tenofovir disoproxil fumarate from tenofovir diethyl ester. *Tetrahedron*, Oxford, v. 66, n. 41, p. 8137-8144, 2010.

ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas. Relatório do estudo da avaliação da bioequivalência farmacêutica entre duas formulações contendo 300 mg do fármaco fumarato de tenofovir desoproxila sob a forma de comprimido revestido. Goiânia, 2010. 1021 p.

ICH – International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B. 1996. Disponível em <http://private.ich.org/LOB/media/MEDIA412.pdf>. Acesso em: 13 set 2010.

ICH – International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), 2003. Disponível em <http://private.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf>. Acesso em: 13 set 2010.

JULLIEN, V.; TRÉLUYER, J. M.; PONS, G.; REY, E. Determination of tenofovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 785, n. 2, p. 377-81, 2003.

KAKUDA, T. N.; SCHÖLLER-GYÜRE, M.; DE SMEDT, G.; BEETS, G.; AHARCHI, F.; PEETERS, M. P.; VANDERMEULEN, K.; WOODFALL, B. J.; HOETELMANS, R. M. W. Assessment of the steady-state pharmacokinetic interaction between etravirine administered as two different formulations and tenofovir disoproxil fumarate in healthy volunteers. *HIV Medicine*, Oxford, v. 10, p. 173–81, 2009.

KARIM, S. S. A.; KARIM, Q. A.; GOUWS, E.; BAXTER, C. Global Epidemiology of HIV-Aids. *Infectious Disease Clinics of North America*, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 240-6, 2009.

KEARNEY B. P.; FLAHERTY, J. F.; SHAH, J. Tenofovir Disoproxil Fumarate: Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, New York, v. 43, n. 9, p. 613-622, 2004.

KILSZTAJN, S.; LOPES, E. S.; CARMO, M. S. N.; ROCHA, P. A. F. Improvement in Survival Among Symptomatic Aids Patients by Exposure Category in Sao Paulo. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, New York, v. 45, n. 3, p. 342-347, 2007.

KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*, Londres, v. 25, n. 1-2, p. 199-217, 2011.

LEVER, A. M. L. HIV: the virus. *Medicine*, Baltimore, v. 37, n. 7, p. 313-316, 2009.

LE SAUX, T; *et al.* Quantification of seven nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 865, n. 1-2, p. 81-90, 2008.

LEWTHWAITE, P.; WILKINS, E. Natural history of HIV/Aids. *Medicine*, Baltimore, v. 37, n. 7, p. 333-337, 2009.

LOUGH, W.J.; WAINER, I. W. *High Performance Liquid Chromatography. Fundamental principals and practice*. 1 ed. Londres: Chapman & Hall, 1995, 276 p.

MA, J. *et al.* A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC–MS/MS bioanalysis. *Journal of chromatography - B - Analytical technologies in the biomedical and life*, Amsterdam, v. 862, n. 1-2, p. 219-26, 2007.

MAEDA, K.; MITSUYA, H. Development of therapeutics for Aids: Structure-based molecular targeting. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 87, n. s1, p. s31-4, 2007.

MARCELLIN, P. *et al.* Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Adefovir Dipivoxil for Chronic Hepatitis B. *The new England journal of medicine*, Boston, v. 359, n. 23, p. 2442-55, 2008.

NIROGI, R.; BHYRAPUNENI, G.; KANDIKERE, V.; MUDIGONDA, K.; KOMARNENI, P.; ALETI, R.; MUKKANTI, K. Simultaneous quantification of a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor emtricitabine and a nucleotide reverse transcriptase inhibitor tenofovir in plasma by liquid chromatography positive ion electrospray tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, Londres, v. 23, p. 371–381, 2209.

OKIE, S. Fighting HIV — Lessons from Brazil. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 354, n. 19, p. 1977-81, 2006.

PALOMBO, M.S., SINGH, Y., SINKO, P.J. Prodrug and conjugate drug delivery strategies for improving HIV/AIDS therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Paris, v. 19, n. 1, p. 3-14, 2009.

RAJU, N. A.; BEGUM, S. Simultaneous RP-CLAE Method for the Estimation of the Emtricitabine, Tenofovir Disoproxil Fumerate and Efavirenz in Tablet Dosage Forms. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, v. 1, n. 4, p. 522-525, 2008.

REZK, N. L.; CRUTCHLEY, R. D.; KASHUBA, A. D. Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir in human plasma using high-performance liquid chromatography after solid phase extraction. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 822, n. 1-2, p. 201-8, 2005.

RIQUE, J.; SILVA, M. D. P. Estudo da subnotificação dos casos de Aids em Alagoas (Brasil), 1999-2005. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 599-603, 2011.

ROBBINS, B. L.; SRINIVAS, R. V., KIM, C.; BISCHOFBERGER, N.; FRIDLAND, A. Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9-*R*-(2-Phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 42, n. 3, 1998.

SENTENAC, S.; FERNANDEZ, C.; THUILLIER, A.; LECHAT, P.; AYMARD, G. Sensitive determination of tenofovir in human plasma samples using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 793, n. 2, p. 317-24, 2003.

SHIRKHEDKAR, A. A., BHIRUD, C. H.; SURANA, S.J. Application of UV-spectrophotometric methods for estimation of tenofovir disoproxil fumarate in tablets. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Karachi, v. 22, n. 1, p. 27-29, 2009.

SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. 296 p. (Tese doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

SPARIDANS, R. W.; CROMMENTUYN, K. M.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatographic assay for the antiviral nucleotide analogue tenofovir in plasma using derivatization with chloroacetaldehyde. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 791, n. 1-2, p. 227-33, 2003.

STEIGER, J. H. Beyond the *F* Test: Effect Size Confidence Intervals and Tests of Close Fit in the Analysis of Variance and Contrast Analysis. *Psychological Methods*, Washington, v. 9, n. 2, p. 164–182, 2004.

TAKAHASHI, M.; KUDAKA, Y.; OKUMURA, N.; HIRANO, A.; BANNO, K.; KANEDA, T. Determination of plasma tenofovir concentrations using a conventional LC-MS method. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokio, v. 30, n. 9, p. 1784-1786, 2007.

WHO. World Health Organization. United Nations Office on Drugs and Crime, UNAids. Aids epidemic update. Geneva, 2009. Disponível em <[http://data.unAids.org/pub/Report/2009/JC1700\\_Epi\\_Update\\_2009\\_en.pdf](http://data.unAids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf)>. Acesso em: 25 out 2010a.

WHO. World Health Organization. Towards Universal Access. Scaling up priority HIV/Aids interventions in the health sector. Progress Report 2009. Geneva, 2009. Disponível em <[http://www.who.int/hiv/pub/tuapr\\_2009\\_en.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/tuapr_2009_en.pdf)>. Acesso em: 20 dez 2010b.

WHO. World Health Organization. Tenofovir tablets: final text for addition to *The International Pharmacopoeia*. Geneva, 2010. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/safety\\_efficacy/TDFtablets-mono\\_QAS09323FINALJune10.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/TDFtablets-mono_QAS09323FINALJune10.pdf)>. Acesso em: 03 set 2010c.

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



**ANEXO A – Concentrações plasmáticas individuais obtidas a partir do estudo de bioequivalência.**

Voluntário	Concentrações plasmáticas (ng/mL)													
	1		2		3		4		5		6		7	
	T	R	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	T	R
<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,17</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,33</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,94	36,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,50</b>	0,00	0,00	0,00	19,62	0,00	0,00	76,29	62,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,67</b>	0,00	0,00	12,73	129,26	0,00	0,00	121,61	75,73	103,69	17,41	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,83</b>	0,00	0,00	32,09	213,30	0,00	0,00	139,48	68,74	249,17	80,88	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>1,00</b>	0,00	9,95	49,46	253,47	0,00	0,00	171,35	57,04	271,68	84,03	0,00	0,00	7,33	0,00
<b>1,25</b>	0,00	35,03	101,90	272,34	11,10	0,00	287,62	77,43	244,36	173,05	0,00	6,40	39,31	58,14
<b>1,50</b>	12,32	106,81	127,49	249,08	41,56	11,01	295,40	160,74	208,51	193,78	6,96	12,90	114,33	248,00
<b>1,75</b>	36,62	181,67	138,50	224,36	78,94	32,23	276,66	227,84	189,83	224,67	31,24	18,53	259,44	312,78
<b>2,00</b>	59,52	231,19	153,36	229,88	86,53	116,52	257,06	279,31	157,26	244,70	75,89	36,04	286,04	310,56
<b>2,25</b>	67,16	208,65	171,76	196,75	110,02	206,25	243,67	311,56	160,36	200,71	102,98	51,04	290,32	273,64
<b>2,50</b>	104,92	243,95	182,27	167,81	121,53	271,53	226,32	214,18	135,65	155,75	129,20	39,91	287,05	256,86
<b>3,00</b>	160,36	291,52	215,68	126,15	234,66	225,64	174,79	193,47	105,24	162,95	127,85	98,13	260,57	216,44
<b>3,50</b>	217,82	278,05	160,86	116,98	227,95	165,87	154,24	151,42	94,52	140,52	105,61	137,46	199,81	177,29
<b>4,00</b>	265,89	232,89	150,04	108,92	198,17	184,99	146,08	127,90	88,28	121,72	138,92	103,82	169,95	123,37
<b>5,00</b>	198,61	156,99	104,36	85,68	113,32	105,10	100,64	90,59	81,07	78,07	88,30	72,30	123,48	91,22
<b>6,00</b>	152,74	144,62	81,71	76,97	98,08	85,73	86,10	81,82	74,80	72,42	70,10	57,27	91,49	76,91
<b>8,00</b>	127,95	131,54	87,88	83,02	73,04	81,09	83,65	74,28	75,99	66,11	68,05	54,43	109,82	84,78

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b> <b>Tempo (h)</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>	
	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>
<b>10,00</b>	99,73	115,29	74,23	79,06	76,47	83,03	76,27	75,50	63,44	64,17	59,50	27,33	95,10	84,77
<b>12,00</b>	95,63	107,86	62,85	64,37	65,33	66,53	54,40	66,54	58,63	59,74	46,24	42,54	67,08	80,06
<b>24,00</b>	38,43	45,25	32,64	36,00	29,25	27,10	30,45	27,75	28,42	23,69	20,29	13,33	36,22	35,96
<b>36,00</b>	29,04	47,15	24,12	24,45	27,15	25,58	27,48	22,82	21,26	20,10	16,76	12,53	23,93	26,83
<b>48,00</b>	11,74	17,64	13,32	16,08	11,52	10,84	13,92	13,02	13,19	10,64	8,46	7,62	18,32	11,20
<b>72,00</b>	0,00	6,95	7,00	7,11	0,00	0,00	5,69	6,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>96,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b> <b>Tempo (h)</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>8</b>		<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>		<b>12</b>		<b>13</b>		<b>14</b>	
	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>
<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,17</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,33</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,50</b>	0,00	0,00	17,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,96	0,00	0,00	0,00
<b>0,67</b>	0,00	0,00	88,22	0,00	0,00	0,00	0,00	21,48	0,00	0,00	10,60	0,00	0,00	0,00
<b>0,83</b>	0,00	0,00	107,50	0,00	0,00	15,99	5,67	64,86	7,96	0,00	18,71	0,00	0,00	0,00
<b>1,00</b>	0,00	0,00	117,10	0,00	9,77	26,72	13,30	149,88	13,96	0,00	54,58	0,00	0,00	0,00
<b>1,25</b>	0,00	0,00	176,31	0,00	51,22	53,00	42,93	210,35	37,90	0,00	166,86	72,14	0,00	8,47
<b>1,50</b>	0,00	14,73	268,58	0,00	68,76	69,48	66,23	220,54	138,89	6,30	256,40	93,83	0,00	5,23
<b>1,75</b>	0,00	44,75	254,94	20,35	89,07	142,40	100,15	208,70	283,39	45,33	385,86	156,30	0,00	8,37
<b>2,00</b>	6,30	83,38	212,59	129,29	97,52	229,08	135,18	195,78	351,76	84,65	281,14	229,24	5,30	15,66
<b>2,25</b>	23,51	162,77	186,08	149,11	147,53	295,35	181,60	217,59	329,60	119,39	273,62	320,97	10,67	100,98
<b>2,50</b>	30,52	197,11	162,72	133,09	181,05	338,20	215,90	201,16	262,93	230,82	287,73	332,83	27,92	162,04
<b>3,00</b>	70,60	168,83	136,55	107,65	260,68	212,80	208,12	164,99	214,03	254,03	211,46	244,48	159,13	172,57
<b>3,50</b>	303,32	171,15	118,58	127,94	192,32	149,93	198,81	152,58	185,16	198,73	164,33	188,66	270,44	152,80
<b>4,00</b>	254,45	178,66	106,66	136,01	189,04	122,44	159,84	115,77	147,63	160,36	151,40	164,24	209,93	162,12
<b>5,00</b>	141,26	107,59	80,03	101,03	109,73	89,77	113,28	108,71	103,62	88,87	107,51	110,65	127,78	147,25
<b>6,00</b>	104,85	81,84	67,71	67,11	79,75	79,89	97,95	79,46	92,67	81,76	94,98	99,11	98,53	112,87
<b>8,00</b>	91,15	64,94	61,79	52,03	72,65	76,13	93,90	75,54	94,89	73,92	87,94	89,81	87,97	90,31

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b> <b>Tempo (h)</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>8</b>		<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>		<b>12</b>		<b>13</b>		<b>14</b>	
	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>
<b>10,00</b>	82,03	56,08	57,49	50,70	57,01	64,20	67,78	71,29	79,89	51,90	75,18	81,41	74,75	82,57
<b>12,00</b>	63,36	61,08	50,68	51,69	57,32	57,41	57,88	63,87	69,24	53,91	71,13	71,97	69,91	84,18
<b>24,00</b>	28,54	28,00	26,46	24,98	30,14	32,27	29,84	38,65	35,47	25,45	34,96	37,52	34,81	39,73
<b>36,00</b>	19,51	10,20	20,75	18,80	21,83	16,92	21,10	17,24	27,64	23,27	29,11	27,56	24,90	29,34
<b>48,00</b>	13,87	18,91	15,15	10,33	13,31	11,15	11,27	12,95	12,81	9,46	13,92	16,32	26,48	18,42
<b>72,00</b>	5,97	0,00	6,14	6,53	6,01	5,49	11,26	5,07	0,00	0,00	5,56	5,65	7,68	8,02
<b>96,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>15</b>		<b>16</b>		<b>17</b>		<b>18</b>		<b>19</b>		<b>20</b>		<b>21</b>	
	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>
<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,17</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,33</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	41,91	0,00	0,00	0,00
<b>0,50</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	195,76	0,00	0,00	0,00
<b>0,67</b>	0,00	0,00	7,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,71	0,00	212,88	0,00	0,00	5,34
<b>0,83</b>	0,00	0,00	86,77	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	31,54	0,00	262,22	26,74	0,00	44,64
<b>1,00</b>	0,00	0,00	122,17	7,25	0,00	6,16	0,00	0,00	88,19	0,00	290,22	48,77	0,00	120,16
<b>1,25</b>	10,58	0,00	129,00	38,02	6,16	23,01	0,00	0,00	107,52	0,00	245,18	125,87	11,47	180,57
<b>1,50</b>	40,83	0,00	205,34	62,23	13,14	40,55	0,00	0,00	122,71	7,41	259,02	176,01	33,85	179,99
<b>1,75</b>	50,66	9,66	208,70	115,31	34,08	74,67	0,00	0,00	136,98	23,02	244,76	206,80	63,04	202,58
<b>2,00</b>	97,63	18,37	182,86	136,24	56,78	99,60	0,00	35,71	177,60	90,58	198,09	259,94	102,88	210,66
<b>2,25</b>	264,31	34,02	174,59	180,76	77,64	112,63	12,54	173,95	180,30	179,04	244,98	309,53	126,25	198,72
<b>2,50</b>	381,54	72,38	162,22	278,03	82,05	157,60	26,07	196,82	160,78	182,72	209,18	270,68	223,24	165,68
<b>3,00</b>	280,47	285,13	176,51	273,28	211,43	200,90	82,40	216,06	126,22	159,03	193,27	202,70	244,69	135,77
<b>3,50</b>	193,83	289,80	175,27	240,17	203,23	167,03	145,86	120,40	115,44	134,95	158,98	199,89	183,12	132,80
<b>4,00</b>	156,06	279,16	117,47	183,77	153,78	144,91	98,35	88,97	98,59	127,33	163,08	181,02	141,61	124,77
<b>5,00</b>	109,94	177,10	87,17	100,60	105,67	102,88	55,81	63,06	74,55	94,99	106,93	113,60	93,69	97,52
<b>6,00</b>	101,22	124,29	93,26	107,34	88,61	90,39	41,85	48,21	70,58	83,02	93,86	106,92	99,15	87,71
<b>8,00</b>	106,04	101,73	111,44	99,94	83,58	76,03	39,70	44,44	67,80	73,67	98,77	83,16	93,31	84,93

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b> <b>Tempo (h)</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>15</b>		<b>16</b>		<b>17</b>		<b>18</b>		<b>19</b>		<b>20</b>		<b>21</b>	
	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
<b>10,00</b>	76,74	78,72	71,83	76,83	70,84	70,76	45,28	47,59	55,10	60,34	75,57	83,60	92,01	78,52
<b>12,00</b>	68,28	81,27	46,65	77,02	65,76	64,72	28,31	39,81	49,69	53,41	81,83	74,75	71,37	61,87
<b>24,00</b>	28,83	34,97	26,51	36,99	33,28	30,43	16,90	18,58	24,59	23,83	40,37	34,73	36,87	30,77
<b>36,00</b>	25,06	25,98	25,13	25,12	24,92	23,97	16,10	9,87	19,33	21,30	28,80	29,78	25,67	21,12
<b>48,00</b>	14,09	17,18	12,08	13,05	12,34	10,47	8,25	8,18	10,52	10,15	18,18	19,03	15,65	14,01
<b>72,00</b>	8,45	6,77	5,07	6,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,98	11,01	6,04	5,93
<b>96,00</b>	5,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,17	0,00	0,00

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>22</b>		<b>23</b>		<b>24</b>		<b>25</b>		<b>26</b>		<b>27</b>		<b>28</b>	
	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>
<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,17</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,33</b>	0,00	0,00	184,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,50</b>	0,00	7,67	348,49	0,00	0,00	9,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00	0,00	0,00
<b>0,67</b>	0,00	15,70	319,62	0,00	0,00	19,77	0,00	0,00	0,00	0,00	23,86	49,88	0,00	0,00
<b>0,83</b>	0,00	43,92	248,82	0,00	0,00	53,73	0,00	0,00	0,00	0,00	139,37	83,16	0,00	0,00
<b>1,00</b>	0,00	118,38	209,29	7,88	0,00	81,02	0,00	0,00	0,00	0,00	280,52	130,26	0,00	5,06
<b>1,25</b>	11,88	173,42	165,86	50,17	10,55	274,07	0,00	0,00	6,08	0,00	386,74	160,40	0,00	21,82
<b>1,50</b>	33,34	193,77	138,83	103,44	49,50	427,18	0,00	0,00	10,83	0,00	418,73	186,71	5,31	36,16
<b>1,75</b>	77,23	243,23	121,79	153,46	83,30	381,12	10,31	0,00	42,72	11,26	374,96	231,93	11,22	65,40
<b>2,00</b>	154,69	252,61	102,17	207,05	163,27	322,62	12,78	6,06	75,12	22,08	351,41	271,14	30,49	85,80
<b>2,25</b>	257,52	288,06	95,61	285,63	329,56	305,27	40,96	7,85	101,35	26,32	297,26	311,63	55,87	149,12
<b>2,50</b>	355,97	245,23	90,29	266,48	455,68	258,04	71,02	15,92	106,30	82,91	259,53	349,91	137,03	197,58
<b>3,00</b>	234,18	186,81	81,20	193,06	281,99	195,81	168,47	84,82	192,63	162,80	211,11	279,89	268,16	171,90
<b>3,50</b>	175,91	143,36	81,91	171,51	220,67	166,14	182,40	193,05	257,60	236,16	186,13	200,13	195,33	150,18
<b>4,00</b>	112,21	122,07	71,47	113,62	191,23	158,47	207,75	292,94	255,96	280,11	162,82	199,06	156,62	120,42
<b>5,00</b>	95,34	90,23	64,82	86,67	127,74	120,17	148,73	186,06	266,72	207,30	122,00	124,43	119,48	86,51
<b>6,00</b>	90,15	77,79	59,96	70,93	114,34	108,35	111,94	128,26	168,15	132,93	101,45	126,82	111,95	105,03
<b>8,00</b>	85,99	89,96	64,26	69,59	100,35	114,59	78,53	75,10	135,72	122,25	91,89	94,36	103,94	83,09

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b> <b>Tempo (h)</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>22</b>		<b>23</b>		<b>24</b>		<b>25</b>		<b>26</b>		<b>27</b>		<b>28</b>	
	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>R</b>
<b>10,00</b>	66,79	71,01	53,11	68,45	93,81	103,17	70,81	84,18	83,56	100,95	79,17	90,02	79,93	66,18
<b>12,00</b>	63,64	63,41	48,27	57,93	76,57	89,90	69,09	71,58	75,74	82,15	85,20	77,72	68,37	57,96
<b>24,00</b>	25,88	27,82	23,24	29,92	43,54	43,88	33,11	36,54	36,20	41,67	37,96	37,86	32,07	26,93
<b>36,00</b>	25,70	25,37	18,94	22,57	26,52	35,88	25,44	20,38	28,89	26,14	33,15	21,08	24,17	18,80
<b>48,00</b>	11,77	12,79	11,66	12,36	15,30	18,62	15,92	12,42	14,53	16,33	15,89	11,77	13,68	13,19
<b>72,00</b>	5,83	5,08	5,55	5,57	0,00	7,86	6,60	6,68	8,15	9,03	8,89	5,32	9,30	5,54
<b>96,00</b>	0,00	0,00	0,00	3,06	0,00	0,00	0,00	0,00	5,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

R – medicamento referência

T – medicamento teste



**ANEXO A (continuação)**

<b>Voluntário</b>	<b>Concentrações plasmáticas (ng/mL)</b>													
	<b>29</b>		<b>30</b>		<b>32</b>		<b>33</b>		<b>34</b>		<b>35</b>		<b>36</b>	
	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>R</b>
<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,17</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,33</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	339,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,50</b>	0,00	8,29	0,00	0,00	0,00	376,59	31,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,67</b>	18,90	16,42	0,00	0,00	6,33	330,08	88,89	187,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,83</b>	68,71	38,49	0,00	0,00	32,83	264,07	100,89	138,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,07
<b>1,00</b>	80,91	77,39	0,00	0,00	123,98	248,67	80,47	173,09	8,97	0,00	0,00	0,00	0,00	14,35
<b>1,25</b>	252,72	96,34	7,89	9,44	173,81	186,92	57,62	154,18	32,66	96,41	0,00	0,00	12,70	79,69
<b>1,50</b>	257,64	78,93	11,73	45,91	190,37	185,51	78,81	128,61	108,63	129,66	0,00	0,00	46,13	298,20
<b>1,75</b>	263,70	78,50	20,30	105,16	284,20	164,23	102,71	114,45	163,95	130,54	0,00	0,00	66,57	313,95
<b>2,00</b>	207,28	114,28	44,35	178,71	323,79	156,69	98,89	117,06	151,47	183,58	0,00	0,00	90,57	257,43
<b>2,25</b>	203,51	177,06	94,14	173,86	223,74	132,23	116,85	110,33	155,97	326,81	0,00	12,99	208,88	208,00
<b>2,50</b>	169,89	272,26	132,54	132,04	295,75	187,37	106,77	118,60	247,99	255,97	6,87	42,03	254,09	198,56
<b>3,00</b>	154,31	173,09	179,87	183,24	165,30	123,36	125,77	96,91	312,79	310,39	117,60	171,62	212,62	173,16
<b>3,50</b>	141,64	179,16	187,62	171,67	152,09	110,75	104,88	81,56	251,55	278,01	156,82	250,57	191,83	131,85
<b>4,00</b>	121,16	143,42	179,20	127,52	199,32	107,14	90,89	81,53	181,08	165,37	247,65	287,73	143,81	108,23
<b>5,00</b>	88,30	101,50	106,20	92,80	98,77	88,79	67,14	85,55	126,79	142,21	246,41	206,97	103,68	88,15
<b>6,00</b>	76,38	76,10	102,80	75,77	127,65	81,05	66,86	65,81	112,85	113,49	171,96	182,26	79,18	79,41
<b>8,00</b>	90,82	68,55	86,76	79,52	93,37	82,33	69,32	76,76	77,64	105,86	193,35	124,19	74,24	70,31

R – medicamento referência

T – medicamento teste

### ANEXO A (conclusão)

Voluntário	Concentrações plasmáticas (ng/mL)													
	29		30		32		33		34		35		36	
	T	R	R	T	T	R	R	T	T	R	R	T	T	R
<b>10,00</b>	77,82	63,73	74,09	62,97	72,78	77,61	57,89	58,57	79,71	87,68	101,00	97,01	61,22	70,51
<b>12,00</b>	61,96	64,34	59,50	61,05	66,96	63,11	48,48	49,25	81,10	74,31	98,97	86,39	50,61	58,03
<b>24,00</b>	32,91	23,68	26,92	26,07	38,54	29,34	22,27	25,78	35,77	35,89	50,63	47,00	27,42	28,29
<b>36,00</b>	24,91	19,81	20,35	20,16	23,65	31,80	23,46	20,98	29,96	29,68	39,57	36,03	20,92	17,36
<b>48,00</b>	11,82	10,51	8,79	9,75	11,96	13,63	13,89	15,37	15,97	17,21	18,76	22,16	9,63	12,17
<b>72,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,33	0,00	6,35	7,93	8,51	9,24	10,27	0,00	7,07
<b>96,00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,10	7,07	0,00	0,00

R – medicamento referência

T – medicamento teste

**ANEXO B** – Cópia do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP nº 331/2010



CEP, 27/04/10  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 331/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0254.0.146.000-10

## I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** "ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES DE FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA 300MG SOB A FORMA DE COMPRIMIDO REVESTIDO" (PBIO 137/09).

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Leonardo de Souza Teixeira

**INSTITUIÇÃO:** Unidade Clínica do Instituto de Ciências Farmacêuticas

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 22/04/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 27/04/11 (O formulário encontra-se no site acima)

## II - OBJETIVOS

Verificar através de um estudo de dose única, se as duas formulações de Fumarato de Tenofovir Desoproxila são bioequivalentes quando administradas com a mesma concentração e após alimentação padronizada.

## III - SUMÁRIO

Mono-cêntrico, aberto, cruzado, randomizado, prospectivo, dois tratamentos, dois períodos, duas seqüências, utilizando-se de 36 voluntários sadios (masculino e feminino), com idade variando na faixa de 18 – 50 anos de idade, onde os voluntários receberão, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência de acordo com a lista de randomização e após alimentação padronizada. O intervalo entre os períodos (*washout*) deverá ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco e/ou metabólito. O medicamento em questão, Tenofovir, apresenta meia-vida de aproximadamente 17 horas, sendo assim o período de *wash-out* do estudo deverá ser de no mínimo 2 semanas a fim de certificar-se que o medicamento foi eliminado completamente do organismo. Em cada período, os voluntários receberão por via oral uma dose de 300mg de Fumarato de Tenofovir Desoproxila (245mg de tenofovir desoproxila) correspondente a 1 comprimido revestido do medicamento teste ou 1 comprimido revestido do medicamento referência juntamente com 200mL de água após um período de 10 horas de jejum. Após a administração do medicamento os voluntários deverão permanecer sentados (plano de 45°) durante as primeiras quatro horas. O volume total de sangue incluindo os 15mL da triagem e pós-estudo não ultrapassará 450 mL de sangue por voluntário.

## IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar.



do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de abril de 2010.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP