

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

PAULA CRISTINA REZENDE ENÉAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO
DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR
DESOPROXILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA E EM
PLASMA.**

Belo Horizonte - MG

2014

PAULA CRISTINA REZENDE ENÉAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO
DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR
DESOPROXILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA E EM
PLASMA.**

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

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - UFMG
Coorientadora Dra. Sílvia Ligório Fialho – Funed - MG

Belo Horizonte - MG

2014



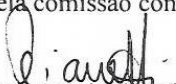
FOLHA DE APROVAÇÃO

“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA E EM PLASMA”.

PAULA CRISTINA REZENDE ENÉAS


Tese submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 06 de junho de 2014, pela comissão constituída pelos membros:

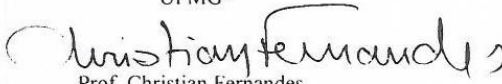

Prof. Gerson Antonio Pianetti - Orientador
UFMG


Profa. Silvia Ligório Fialho - Orientadora
FUNED


Profa. Jacqueline de Souza
UFOP


Prof. Pedro Eduardo Fröhlich
UFRGS


Dr. Ricardo Martins Duarte Byrro
UFMG


Prof. Christian Fernandes
UFMG

Belo Horizonte, 6 de junho de 2014.

E56d Enéas, Paula Cristina Rezende.
Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma / Paula Cristina Rezende Enéas. – 2014.
256 f.

Orientador: Dr. Gerson Antônio Pianetti.
Co-orientadora: Dra. Sílvia Ligório Fialho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Comprimidos – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Espectrometria de massa – Teses. 4. Validação de método - Teses. 5. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. Fialho, Sílvia Ligório. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 615.19

Dedico esse trabalho ao meu marido André por tornar os momentos mais especiais e por me provar que a vida é bela em sua essência.

À minha irmã, Luciana, pelo exemplo de força e dedicação.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pela confiança, pelos exemplos e pelos cuidados constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Gerson Antônio Pianetti, querido orientador, por confiar e valorizar seus alunos, pela dedicação ao LCQ e à Faculdade de Farmácia, pela presença em todos os momentos mais felizes e mais difíceis. Sou eternamente grata a você!

À Sílvia Ligório Fialho por aceitar ser minha coorientadora, por abraçar a proposta do projeto, pelo apoio no desenvolvimento das formulações, pelas contribuições técnicas e pela motivação durante essa caminhada. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo suporte financeiro.

Ao José Antônio por gentilmente ceder seu projeto inicial de doutorado, ponto de início para esse trabalho.

À Cláudia Peixoto pela intermediação para a aquisição da matéria-prima fumarato de tenofovir desoproxila junto ao Laboratório Cristália.

À Fundação Oswaldo Cruz (Farmanguinhos-RJ) pelo fornecimento da matéria-prima efavirenz.

Ao Serviço de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico da Fundação Ezequiel Dias e em especial aos colaboradores e amigos: Milena, Maria Amélia, Manuela, Darilson, Jamile, Estela e Sílvia pela doação da matéria-prima lamivudina, pelos conhecimentos farmacotécnicos valiosos e pela acolhida sempre agradável.

Às alunas Danielle Evangelista e Jéssica de Castro Alves pela colaboração técnica e amizade durante a execução dessa pesquisa.

Ao Ricardo Martins Duarte Byrro agradeço o conhecimento técnico compartilhado no desenvolvimento do método bioanalítico e pela agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade: Ana Gabriela, Camila, Carlos, Écio Geovani, Edna, Fernando, Iara, Isabela, Juliana, Laura, José Hugo, Leonardo, Lúcia, Luciano, Mariana, Mateus, Miriam Leonel, Naialy, Paula Chellini, Pedro, Raquel, Taízia e Vinícius agradeço as contribuições técnicas e a presença alegre em minha vida acadêmica.

Aos professores Antônio Basílio Pereira, Christian Fernandes, Cristina Duarte Vianna Soares, Elzília de Aguiar Nunan, Lígia Maria Moreira de Campos e Renata Barbosa de Oliveira pelos constantes ensinamentos e pela convivência saudável.

À Farmacopeia Brasileira pela oportunidade de aprofundar nos estudos de Controle de Qualidade, por agregar valor à minha formação e por participar do Comitê Técnico Temático de Harmonização de Textos.

À Faculdade de Farmácia da UFMG, seus professores e funcionários, pela recepção sempre calorosa e pelas despedidas sempre dolorosas.

Ao Dr. Roberto Sena Rocha, Vice-Diretor de Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou da Fiocruz-MG pela compreensão e apoio nesse último ano de doutorado.

À Dra. Ana Carolina Peixoto Teixeira, Coordenadora do Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou da Fiocruz-MG pelo apoio na elaboração do protocolo para ser submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais.

Ao André, meu amor e companheiro, pelos momentos inesquecíveis, pela compreensão, pela alegria de viver, por valorizar minhas conquistas, pelo incentivo durante todos esses anos e pelas contribuições técnicas.

Aos meus pais, Jurandi e Lizardo, por não medir esforços para minha educação, por entender minha ausência, pelo orgulho em cada conquista, por serem o grande exemplo em minha vida e pelo amor incondicional.

À Luciana, irmã companheira, obrigada por torcer e acreditar em mim, por ser um grande exemplo de força e dedicação em minha vida!

Aos amigos do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz/MG pelos sorrisos nas manhãs mais difíceis, por entenderem a minha ausência nos eventos e pelas palavras de motivação.

A todos os meus amigos e familiares pelos laços de afeto e união!

À Deus pelas oportunidades de evoluir profissionalmente e como pessoa, pela sabedoria para escolher quando terminar e começar novamente e por colocar em meu caminho pessoas especiais que fazem a vida valer a pena.

“Tua caminhada ainda não terminou...
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita
é quase chegar à perfeição.
A juventude precisa de sonhos
e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios
precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”

Charles Chaplin

RESUMO

A terapia antirretroviral para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana consiste, usualmente, na combinação de três insumos farmacêuticos ativos antirretrovirais, estratégia terapêutica conhecida como terapia antirretroviral de alta potência. Recentes estudos indicam que a combinação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila é imuno e virológicamente eficaz, bem tolerada e segura. Comprimidos contendo efavirenz (66 mg), lamivudina (33 mg) e fumarato de tenofovir desoproxila (33 mg) em dose fixa combinada foram preparados na Fundação Ezequiel Dias considerando a conversão da dose terapêutica de humanos para coelhos e foram submetidos aos testes de controle de qualidade. A granulação por via úmida foi o processo escolhido na produção dos comprimidos, devido à baixa densidade e fluidez do efavirenz na forma micronizada. Os comprimidos cumpriram com os requisitos dos testes de determinação de peso, friabilidade, teor, uniformidade de conteúdo e desintegração. No presente trabalho, método analítico foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada. O método proposto por CLAE em fase reversa utiliza gradiente de fase móvel (metanol e tampão acetato pH 5,4) e detecção em 260 nm foi eficiente na separação e quantificação dos antirretrovirais. O método mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato, robusto e adequado para análises de rotina de controle de qualidade de comprimidos. Um método bioanalítico por CLAE com detecção por espectrometria de massas e ionização por *electrospray* no modo positivo foi desenvolvido para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano. Para extração dos insumos farmacêuticos ativos no plasma empregou-se precipitação de proteínas e padrões internos foram utilizados durante o preparo da amostra. A análise cromatográfica foi realizada utilizando coluna ciano e gradiente de fase móvel (ácido fórmico 0,05% e metanol). O método bioanalítico desenvolvido foi linear (200 a 10000 ng/mL para efavirenz, de 50 a 4000 ng/mL para lamivudina e de 100 a 1000 ng/mL para tenofovir), preciso, exato e não apresentou efeitos residuais e matriciais na quantificação dos antirretrovirais. O método bioanalítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, bem como no monitoramento terapêutico de pacientes em tratamento com a associação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

Palavras-chave: efavirenz, lamivudina, tenofovir, comprimidos, CLAE, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infections usually consists of the combination of at least three antiretroviral drugs, therapeutic strategy known as highly active antiretroviral therapy. In recent studies, efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate proved to be virologically and immunologically effective, well tolerated and safe. Tablets containing efavirenz (66 mg), lamivudine (33 mg) and tenofovir disoproxil fumarate (33 mg) fixed-dose combination were prepared in Fundação Ezequiel Dias considering the conversion of the human therapeutic dose for rabbits and were subjected to quality control tests. The wet granulation process was used in the production of tablets, due to the low density and fluidity of efavirenz in micronized form. The tablets complied with pharmacopoeial requirements for weight variation, friability, assay, uniformity of content and disintegration time. In this work, an analytical method was developed and validated for simultaneous quantification of efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate in a fixed-dose combination tablet. Analysis by reverse phase HPLC with a gradient mobile phase (buffer pH 5.4 and methanol) and detection at λ 260 nm was efficient in the separation and quantification of this antiretrovirals. The developed method showed to be selective, linear, precise, accurate and robust and can be successfully used in for routine quality control analyses. A bioanalytical method by HPLC with detection by mass spectrometry and electrospray ionization in the positive mode was development for the quantification of efavirenz, lamivudine and tenofovir in human plasma. For the extraction of the drugs from plasma, protein precipitation and internal standards were employed. The chromatographic analysis was performed using a cyano column with a gradient mobile phase (formic acid 0.05% and methanol). The method showed to be linear (from 200 to 10000 ng/mL for efavirenz, from 50 a 4000 ng/mL for lamivudina and from 100 to 1000 ng/mL for tenofovir), precise, accurate and showed no residual and matrix effects. The bioanalytical method development can be applied for bioavailability and bioequivalence studies as well as in the therapeutic monitoring of patients treated with the combination antiretroviral of efavirenz, lamivudina and tenofovir disoproxil fumarato.

Keywords: efavirenz, lamivudine, tenofovir, tablets, HPLC, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| 1 Ciclo de vida do vírus da imunodeficiência humana. | 36 |
| 2 Estrutura química do efavirenz..... | 55 |
| 3 Estruturas químicas da lamivudina e da desoxicidina. | 58 |
| 4 Estruturas químicas de tenofovir, adenosina 5' monofosfato e fumarato de tenofovir desoproxila..... | 61 |
| 5 Comprimidos revestidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. | 85 |
| 6 Espectro de absorção no infravermelho de efavirenz substância química de referência (A) e insumo farmacêutico ativo (B) por reflectância atenuada. | 86 |
| 7 Espectro de absorção no infravermelho de lamivudina substância química de referência (A) e insumo farmacêutico ativo (B) por reflectância atenuada. | 87 |
| 8 Espectro de absorção no infravermelho de fumarato de tenofovir desoproxila substância química de referência e insumo farmacêutico ativo por reflectância atenuada. | 88 |
| 9 Espectros no ultravioleta de EFV 10 µg/mL, 3TC 10 µg/mL e TDF 20 µg/mL em metanol e traçado no λ 260 nm escolhido para as análises cromatográficas. | 89 |
| 10 Curva de distribuição média do tamanho de partículas de efavirenz. | 90 |
| 11 Curva de distribuição média do tamanho de partículas de lamivudina..... | 90 |
| 12 Curva de distribuição média do tamanho de partículas de fumarato de tenofovir desoproxila. | 91 |
| 13 Distribuição de frequência do tamanho dos grânulos secos por tamisação. | 97 |
| 14 Distribuição de frequência do tamanho dos grânulos normalizados por tamisação.. | 97 |
| 15 Perfil de dissolução de efavirenz, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm. | 109 |
| 16 Perfil de dissolução de fumarato de tenofovir desoproxila, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm..... | 111 |
| 17 Perfil de dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm..... | 113 |
| 18 Perfil de dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em HCl 0,1 M (pás a 75 rpm) e água purificada (pás a 50 rpm). | 114 |
| 19 Sobreposição dos cromatogramas da <i>Solução placebo</i> e da <i>Solução padrão</i> preparadas com lauril sulfato de sódio a 1% (p/v)..... | 116 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 20 | Cromatogramas obtidos para (A) solução amostra dos comprimidos de dose fixa combinada e para (B) solução padrão de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila nas concentrações de 132,0 µg/mL, 66,0 µg/mL e 66 µg/mL, respectivamente. Método em modo gradiente, utilizando coluna Sunfire® (150 x 4,6 mm; 5 µm), a 30 °C, vazão de 1,0 mL/min e detecção no UV em 260 nm. | 141 |
| 21 | Sobreposição dos cromatogramas das <i>Soluções amostra e placebo</i> obtidos conforme as condições cromatográficas descritas na parte experimental deste estudo. | 142 |
| 22 | Curvas analíticas de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia a líquido de alta eficiência..... | 143 |
| 23 | Ilustração do procedimento de ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo..... | 157 |
| 24 | Descrição esquemática do modelo de carga residual (CRM) e do modelo de evaporação do íon (IEM). | 158 |
| 25 | Esquema ilustrativo para a realização do teste de efeito matriz | 175 |
| 26 | Estruturas químicas e massas moleculares dos insumos farmacêuticos ativos e seus respectivos padrões internos..... | 179 |
| 27 | Espectros ESI(+) de efavirenz. (A) espectro e estrutura do íon precursor <i>m/z</i> 316,4; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para a fragmentação principal <i>m/z</i> 243,8. | 181 |
| 28 | Espectros ESI(+) de lamivudina. (A) espectro e estrutura do íon precursor <i>m/z</i> 231,5; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para a fragmentação principal <i>m/z</i> 111,8..... | 182 |
| 29 | Espectros ESI(+) de tenofovir. (A) espectro e estrutura do íon precursor <i>m/z</i> 288,4; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para a fragmentação principal <i>m/z</i> 175,9. | 183 |
| 30 | Espectro ESI(+) de fragmentação de aciclovir. Fragmentação principal <i>m/z</i> 151,5. . | 184 |
| 31 | Espectro ESI(+) de fragmentação de estavudina. Fragmentação principal <i>m/z</i> 148,6. | 184 |
| 32 | Espectro ESI(+) de fragmentação de sulfato de indinavir. Fragmentação principal <i>m/z</i> 421,3. | 185 |
| 33 | Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS, para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano em modo gradiente, utilizando-se coluna ciano e fase móvel composta por metanol e ácido fórmico 0,05%. Concentrações das soluções CQM: efavirenz 4000 ng/mL, lamivudina 1600 ng/mL e tenofovir 450 ng/mL). | 188 |
| 34 | Esquema ilustrativo da purificação dos insumos farmacêuticos ativos efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano | 192 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 35 | Gráfico de resíduos e curva analítica de efavirenz obtida por regressão no primeiro dia de análise, na faixa de 200 a 10000 ng/mL..... | 196 |
| 36 | Gráfico de resíduos e curva analítica de lamivudina obtida por regressão no primeiro dia de análise, na faixa de 50 a 4000 ng/mL..... | 196 |
| 37 | Gráfico de resíduos e curva analítica de tenofovir obtida por regressão no primeiro dia de análise, na faixa de 100 a 1000 ng/mL. | 197 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----|--|-----|
| 1 | Formulações testadas para os comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. | 68 |
| 2 | Condições de análise para a medida da distribuição de tamanho das partículas de EFV, 3TC e TDF. | 70 |
| 3 | Cálculos das condições <i>sink</i> para efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila. | 76 |
| 4 | Atribuições das principais bandas de absorção de efavirenz no infravermelho. | 87 |
| 5 | Atribuições das principais bandas de absorção de lamivudina no infravermelho. | 87 |
| 6 | Atribuições das principais bandas de absorção de fumarato de tenofovir desoproxila no infravermelho. | 88 |
| 7 | Resultados obtidos de distribuição média dos diferentes tamanhos de partículas para efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila. | 91 |
| 8 | Resultados das determinações das densidades, aparente e compactada, de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila. | 93 |
| 9 | Propriedades de fluxo de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila. | 95 |
| 10 | Distribuição média por frequência do tamanho dos grânulos secos e normalizados, e quantidade (gramas) de grânulos retidos por abertura de malha. | 96 |
| 11 | Resultados das determinações das densidades, aparente e compactada, da mistura final dos pós. | 98 |
| 12 | Propriedades de fluxo para os produtos intermediários. | 99 |
| 13 | Resultados para a determinação de peso das formulações dos comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. | 100 |
| 14 | Resultados do teste de dureza para as formulações dos comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. .. | 101 |
| 15 | Resultados do teste de friabilidade para as formulações dos comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. .. | 102 |
| 16 | Teores de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila para as formulações dos comprimidos em dose fixa combinada. | 103 |
| 17 | Valores de teor de efavirenz para os lotes pilotos dos comprimidos da Formulação 2 contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. | 104 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 18 | Valores de teor de lamivudina para os lotes pilotos dos comprimidos da Formulação 2 contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. | 105 |
| 19 | Valores de teor de fumarato de tenofovir desoproxila para os lotes pilotos dos comprimidos da Formulação 2 contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. | 105 |
| 20 | Solubilidade de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila nas soluções saturadas em água, HCl 0,1 M e lauril sulfato de sódio 1% e 2% p/V. | 107 |
| 21 | Valores médios e desvios padrão da dissolução de efavirenz, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm..... | 109 |
| 22 | Valores médios e desvios padrão da dissolução de fumarato de tenofovir desoproxila, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm. | 112 |
| 23 | Valores médios e desvios padrão da dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm..... | 113 |
| 24 | Valores médios e desvios padrão do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em HCl 0,1 M (pás a 75 rpm) e água purificada (pás a 50 rpm). | 114 |
| 25 | Gradiente da Fase móvel para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada. | 130 |
| 26 | Soluções 1 a 11 para a construção da curva analítica de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila por cromatografia a líquido de alta eficiência | 133 |
| 27 | Esquema das diluições para avaliar a exatidão do método para doseamento de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE | 135 |
| 28 | Parâmetros do método de doseamento simultâneo de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada para a avaliação da robustez do método por CLAE..... | 136 |
| 29 | Matriz dos fatores para determinação da robustez pelo método de Youden. | 137 |
| 30 | Resultados da análise de regressão linear obtidos para o método por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila | 143 |
| 31 | Precisão intra-dia e precisão inter-dias para o doseamento de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila por CLAE..... | 145 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 32 | Exatidão do método de quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila por CLAE: porcentagens de recuperação em três níveis (80, 100 e 120% da concentração de trabalho) e DPR..... | 146 |
| 33 | Combinações dos parâmetros analíticos realizados conforme o teste de Youden para avaliação da robustez do método por CLAE para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila | 148 |
| 34 | Resultados do teste de robustez para quantificação de efavirenz por CLAE em comprimidos de dose fixa combinada nas oito condições analíticas testadas pelo método de Youden para a <i>Solução padrão e amostra</i>..... | 149 |
| 35 | Resultados do teste de robustez para quantificação de lamivudina por CLAE em comprimidos de dose fixa combinada nas oito condições analíticas testadas pelo método de Youden para a <i>Solução padrão e amostra</i>..... | 149 |
| 36 | Resultados do teste de robustez para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila por CLAE em comprimidos de dose fixa combinada nas oito condições analíticas testadas pelo método de Youden para a <i>Solução padrão e amostra</i>..... | 150 |
| 37 | Efeitos das variáveis estudadas em relação aos parâmetros de teor (%), tempo de retenção (min), eficiência da coluna (N) e fator de cauda (Fc)..... | 151 |
| 38 | Valores estimados a partir da curva analítica e valores experimentais para os limites de detecção e de quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila. | 152 |
| 39 | Diluições para avaliação da linearidade do método bioanalítico por LC-MS/MS para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano. | 173 |
| 40 | Parâmetros estabelecidos para a fonte de ionização para detecção dos analitos por espectrometria de massas em ESI(+). | 178 |
| 41 | Parâmetros de detecção dos íons monitorados | 180 |
| 42 | Condição de eluição em gradiente otimizada para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma por LC-MS/MS. | 187 |
| 43 | Sistemas de solventes utilizados para o desenvolvimento do método de purificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano por precipitação de proteínas. | 191 |
| 44 | Equações das retas e coeficientes de correlação correspondentes obtidos por regressão para efavirenz, lamivudina e tenofovir. | 193 |
| 45 | Dados obtidos para a construção das três curvas analíticas de efavirenz pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir. | 193 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 46 | Dados obtidos para a construção das três curvas analíticas de lamivudina pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir. | 194 |
| 47 | Dados obtidos para a construção das três curvas analíticas de tenofovir pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir | 194 |
| 48 | Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o LIQ de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico | 198 |
| 49 | Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQB de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico | 198 |
| 50 | Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQM de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico | 199 |
| 51 | Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQA de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico | 199 |
| 52 | Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQD de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico | 200 |
| 53 | Resultados do efeito matriz para efavirenz, lamivudina e tenofovir para o método bioanalítico por meio do cálculo do FMN. | 202 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|------------|
| 1 Classificação dos antirretrovirais disponibilizados pelo SUS segundo o mecanismo de ação. | 31 |
| 2 Nome comercial, insumo farmacêutico ativo, fabricante, data de aprovação e classe terapêutica dos antirretrovirais aprovados pelo U. S. FDA (2013). | 41 |
| 3 Esquemas antirretrovirais recomendados para terapia inicial pelo Ministério da Saúde - Brasil. | 50 |
| 4 Apresentações farmacêuticas de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila distribuídas pelo Programa Nacional de DST/Aids e as posologias recomendadas | 51 |
| 5 Formulação inovadora de dose fixa combinada de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila | 52 |
| 6 Ângulo de repouso como indicação das propriedades de fluxo | 94 |
| 7 Limites de variação de peso para comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas | 99 |
| 8 Métodos por CLAE com detecção no ultravioleta para quantificação de EFV, 3TC e TDF, isoladamente e em associação | 119 |
| 9 Métodos quantitativos alternativos para quantificação de EFV, 3TC e TDF, isoladamente e em associação. | 122 |
| 10 Condições cromatográficas selecionadas para o doseamento de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada | 132 |
| 11 Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de efavirenz em matrizes biológicas. | 162 |
| 12 Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de lamivudina em matrizes biológicas | 163 |
| 13 Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de tenofovir em matrizes biológicas | 165 |
| 14 Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de associações envolvendo os insumos farmacêuticos ativos efavirenz, lamivudina e tenofovir em matrizes biológicas | 166 |
| 15 Condições cromatográficas selecionadas para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano por LC-MS/MS | 187 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|--|
| Aids | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ARV | Antirretroviral(is) |
| ASC | Área sob a curva |
| AZT | Zidovudina |
| BDDCS | Sistema de Classificação Biofarmacêutica e de Disposição de Fármacos |
| $C_{m\acute{a}x}$ | Concentração plasmática máxima |
| CCR | <i>CC-chemokine receptor</i> |
| CD4 | Grupamento de diferenciação 4 ou <i>cluster of differentiation</i> |
| CLAE | Cromatografia a líquido de alta eficiência |
| CPI | Complexo de pré-integração |
| CQA | Controle de qualidade alto |
| CQB | Controle de qualidade baixo |
| CQD | Controle de qualidade de diluição |
| CQM | Controle de qualidade médio |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DFC | Dose fixa combinada |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| DST | Doenças sexualmente transmissíveis |
| EFV | Efavirenz |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EPR | Erro padrão relativo |
| EUA | Estados Unidos da América |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| FMN | Fator de matriz normalizado |
| Funed | Fundação Ezequiel Dias |
| HAART | <i>Highly active antiretroviral therapy</i> |
| HED | Dose equivalente a humana |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| IC% | Índice de compressibilidade |
| IF | Inibidor(es) da fusão |
| IFA | Insumo farmacêutico ativo |
| INN | Inibidor(es) da integrase |
| INNTR | Inibidor(es) não nucleosídeo(s) da transcriptase reversa |
| INTR | Inibidor(es) nucleosídeo(s) da transcriptase reversa |

| | |
|------------------|--|
| INtTR | Inibidor(es) nucleotídeo(s) da transcriptase reversa |
| IP | Inibidor(es) da protease |
| K_m | Dose em mg/m^2 |
| Lafepe | Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco |
| LPV/r | Lopinavir potencializado com ritonavir |
| LIQ | Limite inferior de quantificação |
| MeOH | Metanol |
| MS | Ministério da Saúde |
| NVP | Nevirapina |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| Opas | Organização Pan-Americana da Saúde |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PI | Padrão interno |
| pKa | Logaritmo do inverso da constante de acidez |
| PN-DST/Aids | Programa Nacional de DST e Aids |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SCA | Solução de contaminação alta |
| SCB | Solução de contaminação baixa |
| SQR | Substância Química de Referência |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TDF | Fumarato de tenofovir desoproxila |
| TEN | Tenofovir |
| $t_{\text{máx}}$ | tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima |
| TR | Transcriptase reversa |
| U. S. FDA | <i>United States Food and Drug Administration</i> |
| Unicef | Fundo das Nações Unidas para a Infância |
| 3TC | Lamivudina |
| λ | Comprimento de onda |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------|-----------|
| INTRODUÇÃO | 27 |
| OBJETIVOS | 33 |
| Objetivo geral | 33 |
| Objetivos específicos | 33 |

CAPÍTULO 1 - TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 35 |
| 1.1 HIV e Aids | 35 |
| 1.2 Terapia antirretroviral | 39 |

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM DOSE FIXA COMBINADA

| | |
|---|-----------|
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 49 |
| 1.1 Efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada..... | 49 |
| 1.2 Efavirenz | 55 |
| 1.3 Lamivudina..... | 57 |
| 1.4 Fumarato de tenofovir desoproxila | 61 |
| 2 MATERIAIS | 64 |
| 2.1 Insumos farmacêuticos ativos, substâncias químicas de referência e excipientes | 64 |
| 2.2 Equipamentos | 64 |
| 3 MÉTODOS | 66 |
| 3.1 Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo EFV, 3TC e TDF em dose fixa combinada..... | 66 |
| 3.2 Caracterização dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF..... | 69 |
| 3.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho | 69 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta..... | 69 |
| 3.2.3 Análise de tamanho de partículas por difração de raio laser | 70 |
| 3.2.4 Determinação da densidade aparente e compactada dos insumos farmacêuticos ativos | 70 |
| 3.2.5 Determinação da fluidez dos insumos farmacêuticos ativos pelo método do ângulo de repouso | 71 |
| 3.3 Caracterização dos pós dos grânulos e da mistura final | 72 |
| 3.3.1 Análise granulométrica por tamisação dos grânulos | 72 |
| 3.3.2 Determinação da densidade aparente e compactada da mistura final de pós..... | 73 |
| 3.3.3 Determinação da fluidez dos grânulos e da mistura final dos pós pelo método do ângulo de repouso | 73 |
| 3.4 Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos preparados | 73 |
| 3.4.1 Determinação de peso..... | 73 |
| 3.4.2 Teste de dureza e friabilidade | 73 |
| 3.4.3 Teste de desintegração | 74 |
| 3.4.4 Teor dos comprimidos | 74 |
| 3.4.5 Uniformidade de doses unitárias | 74 |
| 3.4.6 Teste de dissolução..... | 75 |
| 3.4.6.1 Condições sink..... | 75 |
| 3.4.6.2 Perfis de dissolução dos comprimidos | 76 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 78 |
| 4.1 Desenvolvimento farmacotécnico e controle de qualidade de comprimidos contendo EFV, 3TC e TDF em dose fixa combinada | 78 |
| 4.2 Caracterização dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF | 86 |
| 4.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho | 86 |
| 4.2.2 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta..... | 89 |
| 4.2.3 Análise de tamanho de partículas por difração de raio laser | 89 |
| 4.2.4 Determinação da densidade aparente e compactada dos insumos farmacêuticos ativos | 93 |
| 4.2.5 Determinação da fluidez dos insumos farmacêuticos ativos pelo método do ângulo de repouso | 94 |
| 4.3 Caracterização dos pós dos grânulos e da mistura final | 95 |
| 4.3.1 Análise granulométrica por tamisação dos grânulos | 95 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.3.2 | Determinação da densidade aparente e compactada da mistura final de pós..... | 98 |
| 4.3.3 | Determinação da fluidez dos grânulos e da mistura final dos pós pelo método do ângulo de repouso | 98 |
| 4.4 | Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos preparados | 99 |
| 4.4.1 | Determinação de peso..... | 99 |
| 4.4.2 | Teste de dureza e friabilidade | 100 |
| 4.4.3 | Teste de desintegração | 102 |
| 4.4.4 | Teor dos comprimidos | 103 |
| 4.4.5 | Uniformidade de doses unitárias | 104 |
| 4.4.6 | Teste de dissolução..... | 106 |
| 4.4.6.1 | Condições sink..... | 106 |
| 4.4.6.2 | Perfis de dissolução dos comprimidos | 108 |

CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 118 |
| 1.1 | Métodos analíticos para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada | 118 |
| 2 | MATERIAIS..... | 126 |
| 2.1 | Substâncias químicas de referência, padrões de trabalho e amostras | 126 |
| 2.2 | Reagentes e vidrarias | 126 |
| 2.3 | Equipamentos e suprimentos..... | 127 |
| 3 | MÉTODOS | 128 |
| 3.1 | Desenvolvimento de método analítico para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE. | 128 |
| 3.2 | Condição otimizada para a análise quantitativa dos ARV por CLAE | 130 |
| 3.3 | Validação do método analítico | 132 |
| 3.3.1 | Seletividade | 132 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.2 Linearidade..... | 132 |
| 3.3.3 Precisão..... | 134 |
| 3.3.4 Exatidão..... | 134 |
| 3.3.5 Robustez | 135 |
| 3.3.6 Limite de detecção e de quantificação..... | 138 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 139 |
| 4.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE. | 139 |
| 4.2 Validação do método analítico | 141 |
| 4.2.1 Seletividade | 141 |
| 4.2.2 Linearidade..... | 142 |
| 4.2.3 Precisão..... | 143 |
| 4.2.4 Exatidão..... | 145 |
| 4.2.5 Robustez | 147 |
| 4.2.6 Limites de detecção e de quantificação..... | 152 |

CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E TENOFOVIR EM PLASMA HUMANO

| | |
|--|------------|
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 155 |
| 1.1 Espectrometria de massas..... | 155 |
| 1.1.1 Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> | 155 |
| 1.1.2 Analisador de massas do tipo triplo-quadrupolo | 158 |
| 1.2 Preparo de amostra | 159 |
| 1.3 Métodos bioanalíticos para quantificação de EFV, 3TC e tenofovir | 160 |
| 2 MATERIAIS..... | 167 |
| 2.1 Substâncias químicas de referência e padrões de trabalho..... | 167 |
| 2.2 Padrões internos | 167 |
| 2.3 Plasma | 167 |
| 2.4 Reagentes e vidrarias | 167 |
| 2.5 Equipamentos e materiais..... | 168 |
| 3 MÉTODOS | 170 |

| | |
|--|------------|
| 3.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir em plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas (LC-MS/MS) com ionização por <i>electrospray</i> (ESI) | 170 |
| 3.1.1 Definição dos parâmetros de detecção por espectrometria de massas | 171 |
| 3.1.2 Definição dos parâmetros cromatográficos | 171 |
| 3.1.3 Determinação do preparo da amostra | 171 |
| 3.2 Validação do método bioanalítico | 172 |
| 3.2.1 Linearidade | 172 |
| 3.2.2 Precisão e exatidão | 174 |
| 3.2.3 Efeito residual | 174 |
| 3.2.4 Efeito matriz | 174 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 176 |
| 4.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir em plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas (LC-MS/MS) com ionização por <i>electrospray</i> (ESI) | 176 |
| 4.1.1 Definição dos parâmetros de detecção por espectrometria de massas | 177 |
| 4.1.2 Purificação dos insumos farmacêuticos ativos e análise cromatográfica | 185 |
| 4.2 Validação do método bioanalítico | 192 |
| 4.2.1 Linearidade | 192 |
| 4.2.2 Precisão e exatidão | 197 |
| 4.2.3 Efeito residual | 200 |
| 4.2.4 Efeito matriz | 201 |
| CONCLUSÕES | 203 |

INTRODUÇÃO

Os primeiros pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) foram identificados em 1981. Naquela época, a Aids já se manifestava como uma doença de longa duração, com tempo esporso entre a exposição ao agente etiológico (por meio de contato com sangue infectado ou atividade sexual) e um estado de supressão imune profunda caracterizada pela ocorrência de infecções oportunistas e crônicas. Muitos fatores, como fungos, produtos químicos e até o desenvolvimento de autoimunidade aos leucócitos, foram considerados como causas possíveis (GALLO e MONTAGNIER, 2003).

Em 1982, a equipe de Robert Gallo (*U. S. National Cancer Institute*) previu que o retrovírus poderia ser a causa da Aids e conseguiu realizar o crescimento de células T obtidas de um paciente do sexo masculino com Aids, que continham duas formas virais e, também, desenvolver um teste sanguíneo para detecção do vírus. Em 1983, o grupo de Luc Montagnier do Instituto *Pasteur* relatou o isolamento de um novo retrovírus de um paciente, que mais tarde foi identificado como o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Segundo Gallo, nunca houve uma controvérsia sobre quem descobriu o vírus, a polêmica ocorreu quando foi desenvolvido o teste para detecção sanguínea do HIV e o Instituto *Pasteur* requereu parte dos *royalties*. O prêmio Nobel de 2008 em Fisiologia ou Medicina foi dividido, sendo uma metade para Luc Montagnier e sua colega Françoise Barré-Sinoussi pela descoberta do HIV e outra para Harald zur Hausen pela descoberta do vírus do papiloma humano causador do câncer do colo de útero. Atualmente, Luc Montagnier e Gallo concordam que houve uma codescoberta do HIV (GALLO e MONTAGNIER, 2011).

O desenvolvimento do teste sanguíneo de detecção do HIV, disponibilizado nos centros de transfusão de sangue em 1985, produziu evidências suficientes da associação entre a infecção por HIV e a Aids. O teste sanguíneo também colaborou com a caracterização do material genético do vírus no final de 1984, que provou claramente que o novo vírus pertencia à família *Retroviridae* (subfamília *Lentivirinae*). Essa descoberta abriu caminho para o

desenvolvimento de insumos farmacêuticos ativos específicos (GALLO e MONTAGNIER, 2003).

O HIV, agente etiológico da Aids, já infectou desde os primeiros grupos de casos descritos em 1981 até 2008, aproximadamente 70 milhões de pessoas em todo o mundo (UNAIDS, 2008). Segundo dados do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids, a incidência mundial da infecção se estabilizou e começou a declinar em muitos países com epidemias generalizadas (UNAIDS, 2011).

No final de 2011, constatou-se um total de 2,5 milhões de novos infectados (adultos e crianças) pelo HIV, o que representa uma diminuição de 20% em comparação ao ano de 2001. Atualmente, estima-se que existam 34 milhões de pessoas infectadas pelo HIV. A África subsaariana continua sendo a região mais afetada, com cerca de 1 a cada 20 adultos (4,9%) convivendo com o HIV, representando 69% das pessoas infectadas em todo o mundo. Depois do subsaara africano, as regiões mais afetadas pelo HIV são: Caribe, Europa Oriental e Ásia Central, onde 1% dos adultos são HIV positivos (UNAIDS, 2012).

O número de pessoas que morreram de causas relacionadas à Aids começou a declinar em meados dos anos 2000, após o pico de incidência em 1997, em decorrência da terapia antirretroviral (ARV). Esse número declinou de 2,3 milhões em 2005 para uma estimativa de 1,7 milhões em 2011, o que evidencia uma redução de 24%. Também, estima-se que no mesmo ano, 330.000 crianças menores de 15 anos morreram por causas relacionadas a Aids, um número 43% menor do que em 2003. Esse panorama reflete tanto o surgimento de novos casos de infecções por HIV, que ultrapassam o número de óbitos devido a Aids, quanto a expansão do acesso à terapia ARV, que prolongou o tempo de vida da população (UNAIDS, 2011 e 2012).

No Brasil, a Aids foi incluída na relação de agravos de notificação compulsória pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 542 em 22 de dezembro de 1986 (BRASIL, 1986) e está prevista a notificação universal e compulsória das

gestantes soropositivas e crianças expostas ao HIV de acordo com a Portaria nº 993/2000 do MS (DOURADO *et al.*, 2006).

O Brasil foi um dos primeiros países em desenvolvimento a garantir o acesso universal e gratuito aos medicamentos ARV no Sistema Único de Saúde (SUS), a partir de 1996. Uma importante estratégia da Política de Medicamentos do Programa Nacional de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e Aids (PN-DST/Aids) foi o estabelecimento de recomendações técnicas consensuais por meio de comitês assessores. A política para a assistência aos indivíduos infectados pelo HIV e/ou com Aids inclui também outras modalidades assistenciais que visam à redução das internações hospitalares, tais como assistência ambulatorial especializada, hospital-dia e assistência domiciliar terapêutica (DOURADO *et al.*, 2006; BRASIL, 1996).

A história natural da Aids sofreu uma mudança substancial após a introdução da terapia antirretroviral de alta potência ou *Highly active antiretroviral therapy* (HAART), deixando de ser uma doença terminal, de progressão rápida e elevada letalidade, tornando-se crônica. No Brasil, a mortalidade por Aids passou de 9,7 por 100.000 habitantes, em 1995, para 6,0 por 100.000 em 2005, mostrando o sucesso da política de distribuição universal e gratuita de medicamentos para Aids, adotada em 1996 (BUCHALLA e CAVALHEIRO, 2008).

Conforme o Boletim Epidemiológico HIV/Aids do MS, no período entre 1980 e junho de 2013, foram notificados 686.478 casos de Aids no Brasil, sendo 64,9% no sexo masculino e 35,1% no sexo feminino. Entretanto, existem diferenças regionais na forma como a Aids se distribui, configurando, no país, diversos perfis da epidemia. Dos casos de Aids acumulados de 1980 até junho de 2013, a região Sudeste é a que tem maior percentual (55,2%) do total de notificações no país, com 379.045 registros da doença. O Sul concentra 20,0% dos casos, seguido das regiões Nordeste (13,9%), Centro-Oeste (5,8%) e Norte (5,1%). No mesmo período, foram declarados 265.7698 óbitos classificados como causa básica “doenças pelo HIV”. Entre os anos de 2003 a 2012 foram registrados no Brasil, em média, 37.446 casos de Aids por ano com

tendência de aumento. No ano de 2012, foram notificados 39.185 casos de Aids e 11.896 óbitos por Aids no Brasil (BRASIL, 2013a).

As políticas públicas brasileiras para a provisão de assistência à saúde de pacientes infectados pelo HIV têm tido reconhecimento em âmbito mundial, principalmente em decorrência das ações de garantia do acesso universal e gratuito aos ARV. Atribui-se a essas políticas parte do sucesso do tratamento, com reflexos na redução da mortalidade e internações devido ao HIV em anos recentes (GOMES *et al.*, 2009).

Diante dessas ações governamentais, em 2007 publicou-se a Portaria nº 866, declarando de interesse público os direitos de patente sobre o efavirenz (EFV) (BRASIL, 2007a). Ao final do mesmo mês, foi sancionado o Decreto Presidencial nº 6108, que oficializou o licenciamento compulsório desse ARV para fins de uso público não comercial (BRASIL, 2007b). O licenciamento compulsório foi decretado após sucessivas negociações com a empresa detentora da patente, Merck Sharp & Dohme. Entretanto, o MS não conseguiu redução satisfatória do preço do produto. Posteriormente ao licenciamento compulsório do EFV, o MS passou a importar, por meio de organismos internacionais (Fundo das Nações Unidas para a Infância - Unicef e Organização Pan-Americana da Saúde - Opas), os medicamentos genéricos da Índia, o que provocou impacto imediato de US\$ 30 milhões na economia do país, somente em 2007 (BRASIL, 2008a).

Em 17 de setembro de 2008, o MS por meio do Laboratório Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), deu início ao processo de registro do EFV na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Assim, os laboratórios públicos Farmanguinhos (Instituto de Tecnologia de s) e Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (Lafepe) ficaram responsáveis pelo desenvolvimento e produção final do medicamento e aos Laboratórios privados Globequímica (SP), Cristália (SP) e Nortec (RJ) couberam à fabricação do EFV. Esse foi um importante passo para o desenvolvimento da indústria nacional, a redução significativa dos custos do País na garantia de tratamento

pelo Programa DST/Aids e a diminuição da dependência do Brasil na aquisição de medicamentos do mercado internacional (BRASIL, 2008a).

Em 2010, os gastos do MS com medicamentos tiveram redução de R\$ 118 milhões devido às negociações com os laboratórios multinacionais e ao aumento da produção interna de ARV (BRASIL, 2010). Até o momento, o MS fornece 21 medicamentos ARV, sendo apenas um constituído por uma associação de 3TC e zidovudina em dose fixa combinada. Os 20 insumos farmacêuticos ativos disponíveis para tratamento podem ser classificados em seis tipos de acordo com a atividade biológica exercida (**Quadro 1**).

Quadro 1- Classificação dos antirretrovirais disponibilizados pelo SUS segundo o mecanismo de ação.

| Mecanismo de ação | Insumos farmacêuticos ativos |
|--|--|
| Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa | Abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina e zidovudina |
| Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa | Tenofovir |
| Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa | Efavirenz, nevirapina e etravirina |
| Inibidores da protease | Atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir e tipranavir |
| Inibidores de fusão | Enfuvirtina |
| Inibidores da integrase | Raltegravir |

FONTE: BRASIL, 2014.

De 2003 até o final de 2010, 6,65 milhões de pessoas receberam terapia ARV em países de renda média e baixa, o que representa um aumento de 17 vezes em comparação a 2003. No Brasil, cuja epidemia é considerada concentrada, estima-se um nível de cobertura entre 70% a 79% (UNAIDS, 2011). Em dezembro de 2012, 313 mil pessoas infectadas pelo HIV estavam em tratamento no Brasil (BRASIL, 2013a e 2014).

A grande dificuldade de se obter uma adequada efetividade do tratamento é assegurar a adesão do paciente ao esquema prescrito de ARV, de forma a evitar doses subterapêuticas ou irregulares. O uso inadequado dos ARV possibilita o desenvolvimento de cepas virais resistentes, reduzindo as opções terapêuticas disponíveis e a sobrevida do paciente, bem como aumenta o risco da transmissão para parceiros não infectados (GOMES *et al.*, 2009).

Os ARV são utilizados em vários regimes de combinações, algumas em dose fixa, com intuito de alcançar o máximo benefício e tolerabilidade, além de diminuir o risco de desenvolvimento de resistência do vírus. A combinação de diferentes insumos farmacêuticos ativos anti-HIV no tratamento da Aids é importante devido ao sinergismo entre eles, baixa toxicidade para o paciente e prevenção do desenvolvimento de resistência do HIV (CLERCQ, 2009).

Conforme UNAIDS (2011), a otimização do regime terapêutico ARV consiste em estabelecer doses ideais dos insumos farmacêuticos ativos, reduzir o número de unidades posológicas por meio do desenvolvimento de formulações de dose fixa combinada (DFC) e desenvolver formulações adequadas para crianças. Também, é necessário desenvolver novos insumos farmacêuticos ativos, melhorar a biodisponibilidade dos insumos farmacêuticos ativos ao inovar nas formulações e disponibilizar novas combinações de modo que aumente a eficácia, a conveniência, a estabilidade e a tolerabilidade dos esquemas terapêuticos, bem como diminua a duração e o custo do tratamento.

No presente estudo, uma formulação contendo EFV, lamivudina (3TC) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em comprimidos de DFC foi proposta para administração única diária. Método analítico para controle de qualidade dos comprimidos formulados foi desenvolvido e validado, bem como um método bioanalítico para quantificação simultânea de ARV em plasma humano.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analítico e bioanalítico aplicáveis a estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência de medicamentos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

Objetivos específicos

- Desenvolver formulação de comprimidos em dose fixa combinada de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada.
- Desenvolver e validar método bioanalítico por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em plasma.

CAPÍTULO 1

TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

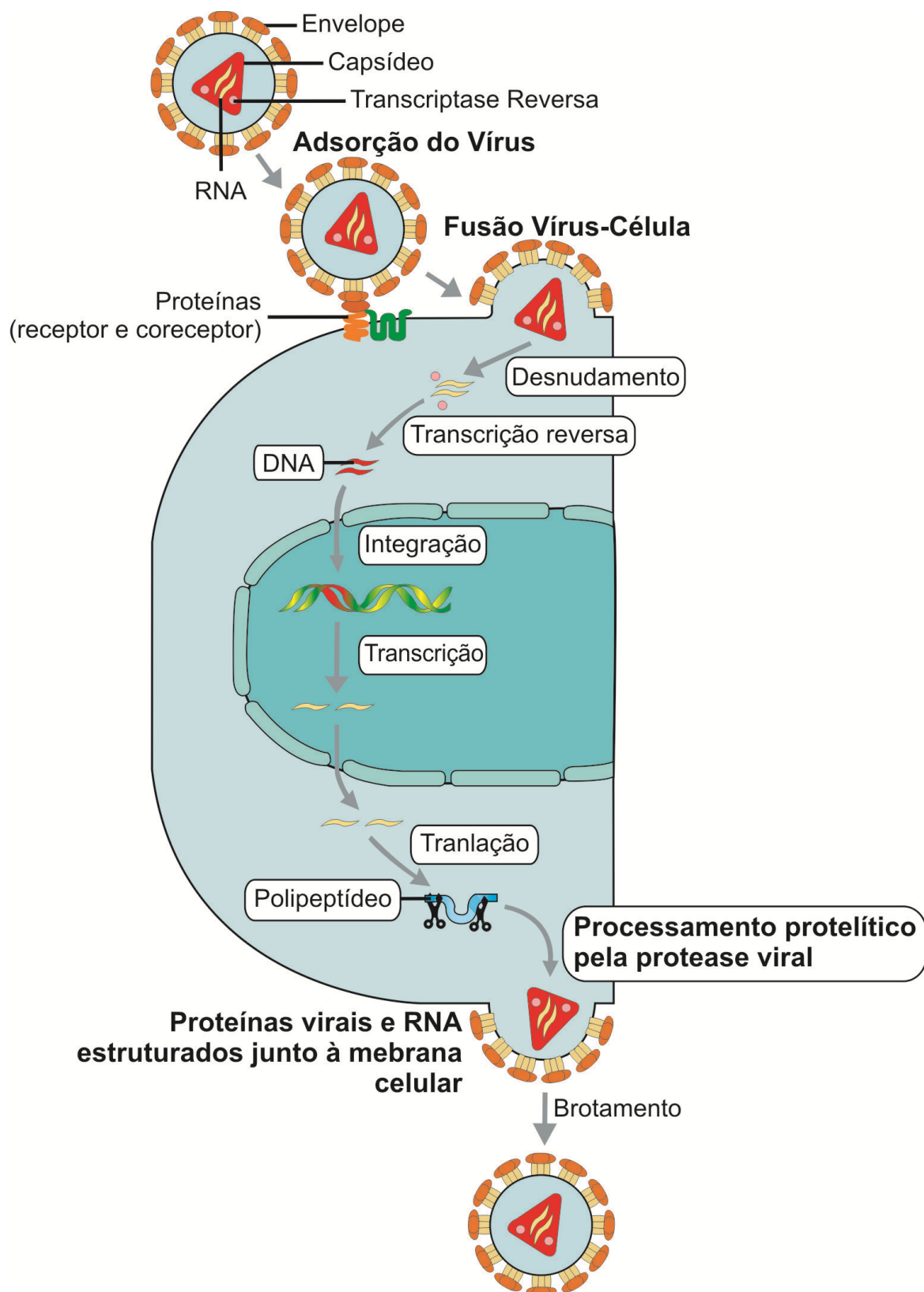
1.1 HIV e Aids

O HIV-1 e o HIV-2 são retrovírus pertencentes ao gênero *Lentivirus*, da família *Retroviridae*. Das duas formas principais do HIV, a infecção pelo tipo 1 é prevalente em todo o mundo, caracterizando-se por uma lenta e progressiva deterioração do sistema imunológico que é invariavelmente fatal. Por sua vez, a infecção pelo HIV-2, prevalente na África Ocidental, geralmente apresenta progressão clínica mais lenta (CONNOR *et al.*, 1997).

O genoma do HIV é constituído de duas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) fita simples. A replicação ocorre por meio de um intermediário ácido desoxirribonucleico (DNA) fita dupla que se integra ao genoma da célula hospedeira, expressando-se para formar RNA e proteínas, com consequente formação de novas partículas virais (**Figura 1**). Por isso, o nome retrovírus, uma vez que a informação genética flui do RNA para o DNA (STRYER, 1995).

O HIV apresenta tropismo natural por células que expressam moléculas do grupamento de diferenciação 4 (CD4) em sua membrana citoplasmática, em especial linfócitos T auxiliares. Os linfócitos T CD4+ são células do sistema imunológico humano que desempenham funções essenciais na imunidade celular e humoral, nas quais as moléculas CD4 atuam como quimiorreceptores (STRYER, 1995).

Figura 1 - Ciclo de vida do vírus da imunodeficiência humana.



FONTE: Adaptado e traduzido de CLERCQ, E. D. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 1, p. 13-25, 2002.

A etapa inicial da infecção implica a fixação do vírus e sua fusão com a membrana. O vírus penetra na célula por meio de interações entre glicoproteínas do envelope (gp41 e gp120) e receptores celulares (receptores CD4 e de quimiocinas). Após a penetração, o complexo ribonucleoprotéico viral é desnudado no citoplasma celular e o genoma convertido em DNA fita dupla por atividades coordenadas de polimerase e ribonuclease da enzima transcriptase reversa (TR). Em seguida, o DNA fita dupla viral é translocado para o núcleo celular onde é integrado ao cromossomo do hospedeiro, levando à formação do pró-vírus. O pró-vírus representa um componente estável do genoma do hospedeiro, podendo permanecer latente ou exibir níveis elevados de expressão gênica, com intensa produção de novas partículas virais (CONNOR *et al.*, 1997; FLEXNER, 2012; SHAW, 2005).

A expressão subsequente do DNA viral é controlada pela atividade coordenada de fatores celulares e virais. A ativação do pró-vírus resulta na transcrição do DNA pró-viral em moléculas de RNA do HIV utilizando-se do maquinário celular. O RNA transcrito pode ser traduzido em poliproteínas ou ser incorporado a vírions imaturos durante a montagem das partículas virais. Os vírions formados passam por um processo de brotamento pela membrana celular e maturação, tornando-se aptos a infectar outras células susceptíveis. A maturação dos vírions depende da clivagem de uma poliproteína essencial catalisada pela protease. A inibição dessa enzima resulta na formação de partículas virais não infecciosas (CONNOR *et al.*, 1997; FLEXNER, 2012; SHAW, 2005).

A principal manifestação da infecção pelo HIV-1 é uma gradual e constante perda de linfócitos T CD4+, com consequente desenvolvimento de disfunção imunológica e de infecções oportunistas que caracterizam a Aids. Na maior parte dos casos, a progressão para Aids ocorre após um prolongado período de estabilidade clínica que dura, em média, de 8 a 10 anos. Entretanto, em aproximadamente 5% dos pacientes a progressão pode ocorrer rapidamente, dentro de 1 a 3 anos após a infecção. Independente da velocidade da progressão clínica, a infecção pelo HIV ocorre em três estágios: (1) infecção

primária ou aguda, (2) infecção clinicamente assintomática e (3) progressão da doença (CONNOR *et al.*, 1997).

A infecção primária pelo HIV-1 é marcada por um período de intensa replicação do vírus, resultando em uma carga viral acima de 10 milhões de partículas de RNA por mililitro de plasma. Apesar da profunda viremia, alguns indivíduos permanecem clinicamente assintomáticos nesse estágio, enquanto a grande maioria apresenta sintomas inespecíficos semelhantes aos de um resfriado comum, incluindo febre, calafrios e mal-estar. A resolução dos sintomas ocorre dentro de poucas semanas, e está relacionada ao desenvolvimento de imunidade específica contra o HIV-1 e à conversão sorológica (CONNOR *et al.*, 1997; SAX e WALKER, 2005).

O controle da viremia pelo sistema imunológico envolve mecanismos humorais, mediados por anticorpos, e celulares, mediados por células de defesa, que mantêm o vírus parcialmente contido e contribuem para o longo estágio assintomático da infecção. A resposta mediada por anticorpos é a base para a detecção e diagnóstico da infecção pelo ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA*). Existe um período de janela, de duração variável, no qual o paciente é negativo para anticorpos contra HIV-1, mas positivo para o vírus sendo, frequentemente, altamente infectante. Na maioria dos casos, esse período dura de duas a seis semanas. O RNA plasmático viral, determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR), é, invariavelmente, o primeiro indicador sorológico da infecção pelo HIV-1 (SAX e WALKER, 2005; SHAW, 2005).

O estágio clinicamente assintomático da infecção caracteriza-se por equilíbrios dinâmicos entre replicação e neutralização de partículas virais, e destruição e reposição de células CD4+. A latência clínica, portanto, não implica em latência viral e, embora esse estágio possa durar muitos anos, o sistema imunológico continua a ser comprometido progressivamente (CONNOR *et al.*, 1997).

Por mais que sejam geradas respostas imunológicas específicas contra HIV-1, na maioria das pessoas o sistema imune acaba falhando na contenção do

vírus. As principais razões da ineficiência imunológica nesse caso incluem a ausência de uma coordenação celular adequada contra o vírus – função primordialmente exercida pelos linfócitos T CD4+ e prejudicada pela patogenia do HIV-1 direcionada a estas células – e a excepcionalmente elevada mutagenicidade do HIV-1, que lhe permite escapar à neutralização por anticorpos e células de defesa (CONNOR *et al.*, 1997; SAX e WALKER, 2005).

A variabilidade genética é uma característica marcante do HIV-1 e deve-se à elevada taxa de erros na atividade catalítica da TR, que carece de um mecanismo de revisão de leitura necessário para corrigir erros de transcrição. Além de driblar os mecanismos de defesa do sistema imune, as mutações no genoma do HIV-1 podem gerar resistência viral a todas as classes de ARV atualmente disponíveis para a terapia, representando, ainda, um grande obstáculo para o desenvolvimento de vacinas (CONNOR *et al.*, 1997; FLEXNER, 2012; SAX e WALKER, 2005; SHAW, 2005).

A progressão para o estágio sintomático da infecção parece estar relacionada à emergência de variantes do HIV-1 com elevada virulência e citopatogenicidade, ou variantes que escapam completamente da detecção pelo sistema imune, replicando-se rapidamente. Os equilíbrios alcançados no estágio assintomático são finalmente rompidos, com elevação significativa da viremia e redução da contagem de células CD4+ a níveis críticos. Clinicamente, pacientes que apresentam contagem de células CD4+ inferior a 200 células/mm³ são diagnosticados como casos de Aids, mesmo na ausência de infecções oportunistas relacionadas ao HIV. Esses pacientes são susceptíveis a infecções graves e potencialmente fatais, incluindo pneumonia por *Pneumocystis carinii*, sarcoma de Kaposi, encefalite por *Toxoplasma* e infecções fúngicas sistêmicas (CONNOR *et al.*, 1997).

1.2 Terapia antirretroviral

Alterações significativas têm ocorrido na terapia da infecção pelo HIV. Em 1984, as estratégias para a conduta terapêutica dos pacientes eram focadas no pronto diagnóstico e no tratamento das infecções oportunistas, o que resultava

em uma sobrevida curta. O tempo médio para o óbito após o primeiro processo oportunista que caracterizava a Aids era de nove meses (MASUR, 2005).

A introdução da terapia ARV com *HAART* resultou em diminuição da taxa de mortalidade relacionada ao HIV e, de forma muito importante, permitiu o resgate da esperança de vida. Os benefícios da HAART incluem aumento da sobrevida, redução da taxa de transmissão, redução das hospitalizações e queda na incidência de Aids e de transmissão perinatal (SCHELD, 2005).

O início do tratamento é recomendado para pessoas assintomáticas com linfócitos T CD4+ abaixo de 500 células/mm³, para pessoas assintomáticas com linfócitos T CD4+ acima de 500 células/mm³ coinfectadas pela hepatite B e C, doença cardiovascular, neoplasias que necessitam de tratamento imunossupressor e carga viral do HIV acima de 100.000 cópias/mL. Também, o tratamento com ARV de sintomáticos é recomendado independentemente da contagem de linfócitos T CD4+ (BRASIL, 2013b).

Os ARV são insumos farmacêuticos ativos que agem em diferentes alvos moleculares, ou seja, nas proteínas da célula hospedeira. Dentre as enzimas importantes para o ciclo de replicação do vírus, pode-se destacar a TR, protease e integrase. A TR e a protease foram os alvos primários para o desenvolvimento de insumos farmacêuticos ativos ARV, que são inibidores dessas enzimas (JOHNSTON e HOTH, 1993; YARCHOAN *et al.*, 1991).

Atualmente, existem seis classes de agentes ARV, sendo composta pelos inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR), inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa (INtTR), inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR), inibidores da protease (IP), inibidores da fusão (IF) e inibidores da integrase (INN). Os grupos recém aprovados pelo *United States Food and Drugs Administration* (U. S. FDA) são os IF, quimiocinas antagonistas do coreceptor *CC-chemokine receptor* (CCR) e INN. Existem moléculas candidatas a insumos farmacêuticos ativos que estão sendo desenvolvidas para atuarem como inibidores da ligação ao CD4+, inibidores de

maturação, inibidores do fator de crescimento derivado do epitélio e inibidores de montagem do capsídio (DESAI, IYER e DIKSHIT, 2012).

O U. S. FDA (2013) já aprovou 37 medicamentos ARV, sendo 29 contendo um único insumo farmacêutico ativo, 4 contendo associação de dois insumos farmacêuticos ativos, apenas 3 de DFC contendo três insumos farmacêuticos ativos e 1 contendo quatro insumos farmacêuticos ativos (**Quadro 2**).

Quadro 2 - Nome comercial, insumo farmacêutico ativo, fabricante, data de aprovação e classe terapêutica dos antirretrovirais aprovados pelo U. S. FDA (2013).

| Nome comercial | IFA | Fabricante | Aprovação | Classe terapêutica |
|--|--|----------------------|-----------|--------------------|
| MEDICAMENTOS DE INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO ÚNICO | | | | |
| Emtriva | emtricitabina | Gilead Science | 02/07/03 | INTR |
| Epivir | lamivudina | GlaxoSmithKline | 17/11/95 | INTR |
| Hivid | zalcitabina | Hoffmann-La-Roche | 19/06/92 | INTR |
| Retrovir | zidovudina | GlaxoSmithKline | 19/03/87 | INTR |
| Videx EC | didanosina revestimento entérico | Bristol-Myers-Squibb | 31/10/00 | INTR |
| Videx | didanosina | Bristol-Myers-Squibb | 9/10/91 | INTR |
| Viread | TDF | Gilead Sciences | 26/10/01 | INtTR |
| Zerit | estavudina | Bristol-Myers-Squibb | 24/06/94 | INTR |
| Ziagen | sulfato de abacavir | GlaxoSmithKline | 17/12/98 | INTR |
| Edurant | rilpivirina | Tibotec-Therapeutics | 20/05/11 | INNTR |
| Intelence | etravirina | Tibotec-Therapeutics | 18/01/08 | INNTR |
| Rescriptor | delavirdina | Pfizer | 04/04/97 | INNTR |
| Sustiva | EFV | Bristol-Myers-Squibb | 17/09/98 | INNTR |
| Viramune | nevirapina | Boehringer-Ingelheim | 21/06/96 | INNTR |
| Viramune XR | nevirapina liberação prolongada | Boehringer-Ingelheim | 25/03/11 | INNTR |
| Agenerase | amprenavir | GlaxoSmithKline | 15/04/99 | IP |
| Aptivus | tipranavir | Boehringer-Ingelheim | 22/06/05 | IP |
| Crixivan | indinavir | Merck | 13/03/96 | IP |

Fonte: FDA, 2013. Legenda: IFA = insumo(s) farmacêutico(s) ativo(s); EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila; INNTR = inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa; INTR = inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa; INtTR = inibidor nucleotídeo da transcriptase reversa; IP = inibidor da protease; IF = inibidor da fusão.

/continua.

Quadro 2 - Nome comercial, nome genérico, fabricante, data de aprovação e classe terapêutica dos antirretrovirais aprovados pelo U. S. FDA (2013). (Conclusão)

| Nome comercial | IFA | Fabricante | Aprovação | Classe terapêutica |
|--|---|--|------------------|---|
| Fortovase (não comercializados) | saquinavir | Hoffmann-La-Roche | 07/11/97 | IP |
| Invirase | mesilato de saquinavir | Hoffmann-La-Roche | 06/12/95 | IP |
| Lexiva | fosamprenavir cálcico | GlaxoSmithKline | 20/10/03 | IP |
| Norvir | ritonavir | Abbott-Laboratories | 01/03/96 | IP |
| Prezista | darunavir | Tibotec | 23/06/06 | IP |
| Reyataz | sulfato de atazanavir | Bristol-Myers Squibb | 20/06/03 | IP |
| Viracept | Mesilato de nelfinavir | Agouron Pharmaceuticals | 14/03/97 | IP |
| Fuzeon | enfuvirtida | Hoffmann-La-Roche | 13/03/03 | IF |
| Selzentry | maraviroque | Pfizer | 06/08/07 | Inibidor de entrada – antagonista coreceptor CCR5 |
| ISENTRESS | raltegravir | Merck & Co., Inc. | 12/10/07 | IIN |
| Tivicay | dolutegravir | GlaxoSmithKline | 13/08/13 | IIN |
| ASSOCIAÇÃO DE DOIS INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS | | | | |
| Combivir | 3TC e zidovudina | GlaxoSmithKline | 27/09/97 | INTR |
| Epzicom | abacavir e lamivudina | GlaxoSmithKline | 02/08/04 | INTR |
| Truvada | TDF e emtricitabina | Gilead Sciences | 02/08/04 | INtTR e INTR |
| Kaletra | lopinavir e ritonavir | Abbott laboratories | 15/09/00 | IP |
| ASSOCIAÇÃO DE TRÊS INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS | | | | |
| Atripla | EFV, emtricitabina e TDF | Bristol-Myers Squibb e Gilead Sciences | 12/07/06 | INNTR, INTR e INtTR |
| Complera | emtricitabina, rilpivirina e TDF | Gilead Sciences | 10/08/11 | INTR, INNTR e INtTR |
| Trizivir | Abacavir, zidovudina e 3TC | GlaxoSmithKline | 14/11/00 | IP, INTR e INTR |
| ASSOCIAÇÃO DE QUATRO INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS | | | | |
| Stribild | elvitegravir, cobicistat, emtricitabina e TDF | Gilead Sciences | 27/08/12 | IIN, inibidor da enzima CYP3A4 que metaboliza os ARV diminuindo a dose diária dos ARV, INTR e INtTR |

Fonte: FDA, 2013. Legenda: IFA = insumo(s) farmacêutico(s) ativo(s); EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desopoxila; INNTR = inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa; INTR = inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa; INtTR = inibidor nucleotídeo da transcriptase reversa; IP = inibidor da protease; IF = inibidor da fusão.

Os INTR pertencem à classe mais antiga de agentes para o tratamento da infecção pelo HIV. Quimicamente, esses insumos farmacêuticos ativos são análogos de nucleosídeos que carecem de um grupo 3'-hidroxila. Todos os agentes dessa classe são substratos da TR. Ao serem incorporados no DNA pró-viral, interrompem prematuramente o alongamento da cadeia, devido à ausência do grupo 3'-hidroxila. Embora tenham sido inicialmente avaliados como monoterapia ou em combinações de duas substâncias, eles são atualmente mais eficazes como componentes de esquemas de três a quatro insumos farmacêuticos ativos (FLEXNER, 2012).

Os INtTR são análogos de nucleotídeos que possuem um grupo fosfonato, requerendo apenas duas etapas de fosforilação para sua ativação, ou seja, impedir a transcrição do RNA em DNA e, portanto, a replicação viral. Inicialmente foram desenvolvidos análogos nucleotídeos tais como cidofovir, adefovir e tenofovir. Cidofovir foi o primeiro análogo de nucleotídeo estudado em humanos e aprovado pelo FDA no tratamento de retinites causada por citomegalovírus em pacientes com Aids (FUNG, STONE e PIACENTI, 2002). Entretanto, a terapia com cidofovir foi associada com nefrotoxicidade, manifestada como disfunção tubular renal (LALEZARI *et al.*, 1997). Adefovir, outro análogo nucleotídeo, foi aprovado pelo FDA para o tratamento de hepatite B, por resultar em significativa redução viral em uma dose não tóxica (10 mg/dia) (SHERMAN, 2006). O TDF é o único representante da classe dos INtTR para tratamento dos portadores de HIV. Trata-se de um pró-, que é metabolicamente convertido na molécula ativa. O tenofovir inibe a TR por mecanismo semelhante ao dos INTR, ou seja, pela incorporação ao DNA pró-viral e interrupção prematura do alongamento da cadeia (CLERCQ, 2004a).

Todos os INTR e INtTR requerem conversão intracelular no anabólito trifosfato, capaz de inibir a TR. Os INTR requerem fosforilação sequencial a mono-, di- e, finalmente, trifosfato para ativação. Os INtTR, como tenofovir, requerem apenas duas etapas pois são análogos monofosfatados e não requerem a reação inicial de fosforilação. O anabólito do trifosfato de tenofovir é referido como tenofovir difosfato, uma vez que possui apenas dois grupos fosfatos. A fosforilação inicial dos INTR é uma etapa limitante em células CD4+ em

repouso e em macrófagos e, tenofovir pode resultar em melhor atividade antiviral em células que possuem capacidade proliferativa e de fosforilação limitada (BAHETI *et al.*, 2011).

Os INNTR constituem uma classe de compostos sintéticos, quimicamente distintos, que bloqueiam a atividade da TR do HIV-1 por meio de sua ligação adjacente ao sítio ativo da enzima. Ao se ligarem à TR, induzem alterações conformacionais no sítio catalítico da enzima, inibindo sua atividade (FLEXNER, 2012).

O sequenciamento peptídico e a elucidação da estrutura cristalina da protease da HIV-1 permitiram o desenvolvimento racional de insumos farmacêuticos ativos direcionados a esta enzima. A protease do HIV-1 é essencial para a infectividade dos vírions, pois cliva uma poliproteína viral em enzimas virais ativas e proteínas estruturais. Todos os inibidores da protease disponíveis atuam por meio de sua ligação reversível ao sítio ativo da enzima, impedindo a clivagem da poliproteína e bloqueando a maturação das partículas virais (FLEXNER, 2012).

A entrada do HIV na célula hospedeira é um processo de múltiplas etapas, que envolve a ligação do vírus aos receptores CD4+ e de quimiocinas (CCR5 ou CXCR4) de linfócitos T. A complexa interação entre os receptores da célula do hospedeiro e as glicoproteínas virais aproximam as membranas de ambos, resultando em fusão. Esse conhecimento resultou no desenvolvimento de novas classes de insumos farmacêuticos ativos ARV como inibidores de fusão e antagonistas dos receptores de quimiocinas (DESAI, IYER e DIKSHIT, 2012). A enfuvirtida foi aprovada em 2003 para a terapia ARV, sendo o primeiro inibidor de fusão desenvolvido. Trata-se de um peptídeo de 36 aminoácidos, correspondendo parcialmente à sequência peptídica da gp41 do HIV-1. A enfuvirtida interage com a gp41 no envelope viral enovelando-se com uma região dessa glicoproteína homóloga à sua estrutura. Esta interação impede a sequência de eventos moleculares necessários para a fusão do HIV-1 à célula susceptível (CLERCQ, 2004a). Maraviroque é o primeiro insumo farmacêutico ativo de uma nova classe de inibidores de fusão do HIV chamados

antagonistas CCR5, agente ARV cujo alvo é um receptor humano. Esse insumo farmacêutico ativo previne a ligação do gp160 do HIV-1 ao CCR5, impedindo a fusão do vírus com a membrana celular humana (DORR *et al.*, 2005). Maraviroque foi aprovado pelo U. S. FDA em 2007, indicado para pacientes multiexperimentados, ou seja, resistentes ou em uso de pelo menos três classes de ARV (HARDY *et al.*, 2010).

A enzima integrase do HIV catalisa a inserção do DNA viral ao genoma da célula hospedeira por meio de um processo de múltiplas etapas que incluem duas reações catalíticas. Primeiramente, forma-se o complexo de pré-integração (CPI) constituído de DNA fita dupla e 50 a 100 moléculas de integrase. Inicia-se, então, a etapa chamada de processamento-3', na qual a integrase remove dois nucleotídeos terminais, guanina e timina, presentes na terminação 3' de cada fita da dupla hélice de DNA. Origina-se, então, uma fita dupla de DNA no qual ambas as terminações 5' encontram-se desemparelhadas. O segundo passo, chamado de transferência de fita, ocorre após a passagem do CPI através da membrana nuclear e compreende a clivagem do DNA hospedeiro pela integrase na extremidade 5' e, posterior, inserção do DNA viral ao genoma do hospedeiro. Esse passo envolve ataque nucleofílico da hidroxila livre da terminação 3' do DNA viral à terminação fosfato-5' do DNA hospedeiro formada previamente, resultando em ligação covalente entre as fitas. As etapas subsequentes de remoção de dois nucleotídeos não pareados na extremidade 5' do DNA viral e reparo das falhas são realizadas por enzimas da célula hospedeira (ASANTE-APPIAH e SKALKA, 1999; JASKOLSKI *et al.*, 2009; SERRAO *et al.*, 2009).

Raltegravir, um derivado do ácido diceto, foi o primeiro insumo farmacêutico ativo aprovado pelo U. S. FDA para uso clínico, em outubro de 2007, como INN para o tratamento do HIV-1. No Brasil, sua aprovação pela Anvisa aconteceu em janeiro de 2008 (SERRAO *et al.*, 2009; SUMMA *et al.*, 2008). Raltegravir foi capaz de inibir a integrase em concentrações nanomolares e exibiu bom perfil de ação em cepas mutantes da enzima do vírus HIV-1 (SUMMA *et al.*, 2008). O insumo foi incorporado ao elenco de ARV disponibilizados pelo SUS, sob critérios de indicação. Devido à constatação de resistência viral em parte da

população sob tratamento ARV, sua utilização está direcionada a esquemas de resgate para pacientes multiexperimentados em terapia ARV (BRASIL, 2008b).

O controle terapêutico incompleto da replicação viral lenta acarreta, invariavelmente, à seleção de mutantes resistentes aos agentes ARV. Os INNTR, por exemplo, são agentes muito eficazes e potentes, mas a ocorrência de uma única mutação na TR confere um alto nível de resistência. Como todos os pacientes infectados pelo HIV tendem a abrigar esses mutantes antes de iniciar o tratamento, a monoterapia com um INNTR provoca um declínio inicial dos níveis plasmáticos de RNA do HIV (inibição dos vírus sensíveis), seguido, dentro de semanas, de falha virológica (proliferação dos vírus resistentes). Por outro lado, os agentes dessa classe podem proporcionar um controle durável da infecção em esquemas de múltiplos insumos farmacêuticos ativos. Como apenas o HIV em replicação pode acumular mutações, a supressão completa da replicação impede o desenvolvimento da resistência. O mesmo princípio é válido para as outras classes de ARV (FLEXNER, 2012).

A eficiência da terapia ARV depende diretamente do comprometimento e capacidade do paciente em aderir ao esquema terapêutico. Estudos demonstraram que há uma relação direta entre a falta de tomada de doses do esquema e o desenvolvimento de resistência pelo HIV (HARRIGAN *et al.*, 2005; ROSENBAACH, ALLISON e NADLER, 2002). Pacientes soropositivos geralmente são indivíduos jovens, assintomáticos, enfrentando o desafio emocional e prático de lidar com uma doença crônica e letal. Não é uma tarefa simples para eles submeter-se a um regime de medicamentos diários, com elevada incidência de reações adversas durante anos. O desenvolvimento de estratégias que promovam o aumento da adesão é um grande desafio para o futuro da terapia ARV (MASUR, 2005).

Dentre as estratégias possíveis, a associação de insumos farmacêuticos ativos em DFC com posologia de um comprimido ao dia vem apresentando resultados promissores ao aumentar a adesão ao tratamento e, conseqüentemente, conduzir a uma menor probabilidade de falha virológica.

Em um estudo publicado em janeiro de 2014, foram selecionados 553 pacientes que iniciaram a terapia ARV com EFV + 2 INTR ou mudaram o tratamento para EFV + 2 INTR para simplificação terapêutica após supressão virológica. Desses pacientes, 38,2% iniciaram o regime terapêutico com mais de dois comprimidos administrados duas vezes ao dia; 44,5% administravam mais de dois comprimidos de ARV uma vez ao dia e 17,4% estavam em tratamento com comprimidos contendo os insumos farmacêuticos ativos em DFC com administração única ao dia. Nesse estudo, os pesquisadores concluíram que a utilização de uma dose única do comprimido contendo insumos farmacêuticos ativos em DFC não aumentava os efeitos adversos, relacionados ao sistema nervoso central, decorrentes da utilização de EFV. Da mesma forma, os pacientes preferiram a administração de uma dose diária única contendo um comprimido em DFC do que a administração de uma dose contendo dois ou mais comprimidos. A administração do EFV + 2 INTR foi associada com menor falha virológica e maior adesão, reduzindo o risco de interrupção do tratamento (FABBIANI *et al.*, 2014).

A melhor adesão ao tratamento ARV após a mudança para regimes com a utilização de doses únicas diárias de um comprimido já foi descrita por outros autores (AIROLDI *et al.*, 2010; BANGSBERG *et al.*, 2010), e essa estratégia terapêutica reduz a probabilidade de falha virológica (HODDER *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 2

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E CONTROLE DE QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EFAVIRENZ,
LAMIVUDINA E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM DOSE
FIXA COMBINADA**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada

A associação de insumos farmacêuticos ativos em DFC tem grande aplicação em doenças infecciosas que exigem a administração de múltiplos insumos farmacêuticos ativos, como a tuberculose, a malária e a Aids. As justificativas para associações de insumos farmacêuticos ativos em DFC incluem aumento da eficácia por atividade sinérgica ou aditiva, cobertura ampla de diferentes tecidos e tipos celulares, redução da emergência de resistência e simplificação da terapia, com diminuição do número de unidades posológicas diárias e aumento na taxa de adesão (ARNAU e LAPORTE, 1989; CONNOR *et al.*, 1997).

Segundo Negredo, Bonjoch e Clotet (2006), o candidato ideal para a simplificação da terapia ARV seria o paciente em regime de HAART que apresenta supressão da carga viral, principalmente aqueles indivíduos que receberam combinações altamente complexas de ARV, ou aqueles que apresentam efeitos tóxicos associados ao ARV, fatores que podem diminuir a adesão ao tratamento e a qualidade de vida do paciente.

As estratégias correntes da terapia ARV são direcionadas na determinação de como desenvolver um esquema individualizado para um paciente que tenha eficiência e segurança duradouras e comprovadas. Esquemas que podem ser administrados uma ou duas vezes ao dia têm maior probabilidade de adesão daqueles que exigem administrações mais frequentes. O esquema deve ser compatível com o estilo de vida e aceito pelo paciente. Caso o paciente não seja capaz de engolir formas farmacêuticas grandes, ou se estiver convencido de que os medicamentos produzirão muitos efeitos adversos, provavelmente não manterá a adesão e não alcançará os resultados terapêuticos responsáveis por uma longa sobrevivência sem a manifestação da doença (MASUR, 2005).

Maggiolo e Suter (2003), em estudo observacional conduzido com 550 pacientes, concluíram que a terapia ARV ideal seria constituída de não mais que duas formas farmacêuticas por dia, de pequenas dimensões, em administração diária única, sem interferência com a alimentação. Outras pesquisas conduzidas por diferentes autores demonstraram que, de modo geral, quanto mais simples o regime, maior a probabilidade de adesão ao tratamento (AMBERBIR *et al.*, 2008; BARTLETT, 2002; CHESNEY, 2003; LANIÈCE *et al.*, 2003; MOLINA, 2008; PARIENTI *et al.*, 2009; ROSENBACH, ALLISON e NADLER, 2002; STONE *et al.*, 2004; TASHIMA e MITTY, 2006; VERVOORT *et al.*, 2007; VICIANA *et al.*, 2008).

Periodicamente, o MS publica consensos com tratamentos para a terapia inicial com base na experiência médica e nos resultados de estudos clínicos. A primeira linha de tratamento recomenda a utilização de um INTR em associação com um INtTR e um INNTR, bem como a utilização de dois INTR em associação com um INNTR. Como tratamento de segunda linha, recomenda-se a substituição do INNTR por um IP potencializado com ritonavir (BRASIL, 2013b) (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Esquemas antirretrovirais recomendados para terapia inicial pelo Ministério da Saúde - Brasil.

| Tratamentos | Associações |
|----------------|-------------------|
| Primeira linha | TDF + 3TC + EFV |
| Segunda linha | TDF + 3TC + LPV/r |

Fonte: BRASIL, 2013b. Legenda: TDF (INtTR): fumarato de tenofovir desoproxila; 3TC (INTR): lamivudina; EFV (INNTR): efavirenz; LPV/r (IP): lopinavir potencializado com ritonavir.

Devido aos efeitos colaterais em longo prazo associados com a utilização de IP, como lipodistrofia, diabetes e distúrbios cardiovasculares, há uma tendência de não iniciar a terapia ARV com IP (CLERCQ, 2004a).

Observando-se as recomendações de terapia ARV do MS para adultos, TDF é o insumo farmacêutico ativo de primeira escolha em associação com 3TC e EFV na apresentação de DFC sempre que possível (BRASIL, 2013b). As

apresentações de EFV, 3TC e TDF distribuídas pelo PN–DST/Aids e respectivas posologias recomendadas são apresentadas no **Quadro 4** (BRASIL, 2008c). Uma vez que essa apresentação de DFC contendo os insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF não está disponível pelo MS, os pacientes em tratamento com esse esquema devem ingerir, diariamente, um total de quatro unidades posológicas (dois comprimidos de 3TC, um de EFV e um de TDF).

Quadro 4 - Apresentações farmacêuticas de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila distribuídas pelo Programa Nacional de DST/Aids e as posologias recomendadas.

| Antirretroviral | Apresentação | Posologia |
|-----------------------------------|--|---|
| Efavirenz | Comprimidos revestidos com 600 mg e cápsulas de 200 mg | ≥ 40 kg de peso corporal: 600 mg 1 x/dia |
| Lamivudina | Comprimidos com 150 mg | 150 mg 2x/dia ou 300 mg 1 x/dia < 50 kg de peso corporal: 2 mg/kg 2x/dia |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | Comprimidos com 300 mg | 300 mg 1x/dia |

Fonte: BRASIL, 2008c.

Esse número pode ser reduzido para uma unidade posológica/dia por meio da inovadora proposta de formulação desses insumos farmacêuticos ativos em DFC, prevista neste trabalho, conforme representado no **Quadro 5**.

Quadro 5 - Formulação inovadora de dose fixa combinada de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Composição | Dosagem | Posologia |
|-----------------------------------|---------|----------------------------------|
| Efavirenz | 600 mg | Uma unidade administrada à noite |
| Lamivudina | 300 mg | |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 300 mg | |

Recomenda-se a administração de EFV à noite com o intuito de minimizar os efeitos adversos relacionados ao sistema nervoso central (SKEIE e MAELAND, 2006), como as desordens neuropsiquiátricas e a síndrome de abstinência de opióide em pacientes em uso de metadona (SÁNCHEZ-CONDE *et al.*, 2007).

Formulações de comprimidos para administração oral com massa teórica acima de 1 g são encontrados no mercado para tratamentos crônicos como o anti-hiperglicêmico cloridrato de metformina 1000 mg (equivalente a 780 mg de metformina base) (POWERS e D'ALESSIO, 2012), carbonato de cálcio 500 mg (1282 mg de carbonato de cálcio de pó de concha de ostras) para tratamento da hipocalcemia e prevenção da osteoporose (OS-CAL[®] ..., 2011) e amoxicilina tri-hidratada 1004,4 mg (equivalente a 875 mg de amoxicilina) associado a 148,908 mg de clavulanato de potássio (equivalente a 125 mg de ácido clavulânico) para o tratamento de infecções bacterianas (WILLIAM e PETRI, 2012). O medicamento Stribild[®] aprovado pelo FDA em 2012 (U. S. FDA, 2013) para o tratamento da Aids, contém 150 mg de elvitegravir, 150 mg de cobicistat, 200 mg de emtricitabina e 300 mg de TDF associados em um comprimido, constituindo 800 mg de insumos farmacêuticos ativos (STRIBILD[®] ..., 2012). O medicamento Atripla[®] (Bristol-Myers Squibb e Gilead Sciences), usado no tratamento da Aids, possui 1,1 gramas apenas de insumos farmacêuticos ativos (600 mg de EFV, 200 mg de emtricitabina e 300 mg de TDF) em sua formulação.

Sabe-se que comprimidos com maior tamanho possuem a desvantagem da difícil administração, o que impossibilita a utilização por crianças e idosos

(HOLODNIY, 1999; GIR, VAICHULONIS e OLIVEIRA, 2005). Entretanto, possuem a vantagem de permitir a administração de apenas uma unidade posológica por dia, característica importante para os pacientes com dificuldade de aderir a um tratamento que requer várias unidades posológicas diárias (BANGSBERG *et al.*, 2010; LANGEBEEK *et al.*, 2013; FABBIANI *et al.*, 2014).

A associação proposta é coerente com as estratégias previamente estabelecidas para promoção da adesão à terapia ARV, e está entre as apresentações em DFC cujo desenvolvimento é aprovado pelo FDA (U. S. FDA, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda como primeira escolha para pacientes adultos ou adolescentes, que estão iniciando o tratamento com ARV, a utilização de regimes contendo TDF ou zidovudina (AZT) + 3TC ou emtricitabina + EFV ou nevirapina (NVP). A formulação proposta de TDF + 3TC + EFV também é indicada como primeira escolha para a coinfeção de HIV e Hepatite B ou de HIV e tuberculose (WHO, 2010).

Dentre os esquemas terapêuticos possíveis, a combinação de comprimidos contendo os insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF isoladamente tem demonstrado eficácia e segurança em diversos estudos clínicos como descrito a seguir.

Gallant *et al.* (2004) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego, paralelo, para avaliar a eficácia, segurança e tolerabilidade de um regime terapêutico composto por TDF em combinação com 3TC e EFV versus estavudina, 3TC e EFV. A fase duplo-cega do estudo durou três anos e os pesquisadores verificaram que a eficácia foi similar entre os dois regimes de tratamento, entretanto houve alta incidência de hiperlipidemia e lipodistrofia no grupo tratado com a combinação contendo estavudina. Os resultados do estudo levaram à recomendação da associação de TDF + 3TC + EFV como regime preferencial para a terapia inicial anti-HIV. Casseti *et al.* (2007) continuaram o acompanhamento dos pacientes que estavam recebendo a associação TDF + 3TC + EFV por mais três anos, em uma fase aberta do estudo clínico. As doses diárias totais administradas de cada ARV eram de 300 mg TDF (1 vez ao dia), 300 mg 3TC (2 vezes ao dia) e 600 mg EFV (1 vez ao dia). Após seis anos de

tratamento dos pacientes com a associação, o regime aberto da combinação de TDF + 3TC + EFV demonstrou potência contínua e eficácia virológica duradoura. O benefício imunológico também foi demonstrado pelo aumento da contagem de células CD4+ durante os seis anos de tratamento. Não foi evidenciada qualquer toxicidade clínica relacionada ao uso de TDF.

Arrizabalaga *et al.* (2007), realizaram um estudo clínico, multicêntrico para avaliar a eficácia e a segurança de um esquema terapêutico simplificado baseado na combinação de EFV, 3TC e TDF em dose única diária. Para o estudo, foram selecionados pacientes adultos com supressão viral sustentada por um regime de doses duplas ou triplas de uma combinação de dois INTR mais um IP ou dois INTR mais um INNTR. A combinação EFV, 3TC e TDF resultou em diminuição da carga viral (83% em seis meses de tratamento e 75% em 12 meses de tratamento), aumento na contagem de células T CD4+ e diminuição dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos.

Uma combinação em comprimidos de DFC genérico contendo 300 mg TDF, 300 mg 3TC e 600 mg EFV foi avaliada em um estudo clínico aberto de fase II. A pesquisa envolveu 100 pacientes que já estavam em tratamento com comprimidos isolados de TDF, 3TC e EFV por seis meses com carga viral indeterminada e, também, pacientes que nunca tinham sido tratados com ARV. Esses pacientes foram tratados com a DFC por vinte meses com a medicação genérica e a mesma foi bem tolerada e eficaz. Foram relatados eventos no sistema nervoso central relacionados ao EFV, mas que ocorreram apenas nos primeiros dias ou semanas de tratamento (MAEK-A-NAHTAWAT *et al.*, 2012).

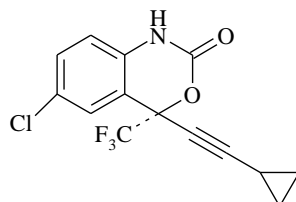
Diop *et al.* (2012), conduziram um estudo para avaliar a eficácia e a segurança de um regime de DFC de EFV, 3TC e TDF em 100 pacientes durante 27 meses e 19 dias. No final do experimento, constatou-se aumento médio no peso corporal cerca de 8 kg/ano, aumento médio na contagem de células CD4+ de 100/mm³ e redução da carga viral em 71% dos pacientes. Efeitos adversos foram observados em 96,36% dos pacientes, tais como distúrbios neurológicos e digestivos. Desses, quatro apresentaram insuficiência renal e treze faleceram. A mortalidade foi particularmente elevada, mas não foi diretamente

relacionada com a utilização da associação avaliada, considerando que as mortes ocorreram durante os primeiros meses de tratamento, quando o sistema imune dos pacientes ainda não estava recuperado. Os autores concluíram que a combinação é eficiente, mas um rigoroso acompanhamento deve ser feito devido aos significativos efeitos adversos.

1.2 Efavirenz

O efavirenz (**Figura 2**) é uma benzoxazinona pertencente à classe dos INNTR do HIV-1, aprovado pelo U. S. FDA em 1998 e incorporado ao SUS em 1999 (DUARTE, RAMOS e PEREIRA, 2011). Ao difundir-se na célula, o EFV liga-se à TR do HIV-1 em um local adjacente ao sítio ativo, o que produz uma alteração na configuração da enzima e inibição de sua função. A atividade baseia-se, portanto, na inibição não-competitiva da TR (FLEXNER, 2012).

Figura 2 - Estrutura química do efavirenz.



Após administração oral, o EFV é bem absorvido no trato gastrointestinal e atinge a concentração máxima plasmática ($C_{máx}$) dentro de 3 a 5 horas. A biodisponibilidade oral absoluta do EFV ainda não foi determinada em humanos, devido à falta de uma formulação intravenosa adequada (MATHIAS *et al.*, 2007; SMITH, DICENZO e MORSE, 2001).

O EFV é completamente distribuído, com um volume de distribuição em torno de 280-500 L, consistente com sua alta lipossolubilidade (BEST e GOICOECHEA, 2008). Contudo, apresenta elevada taxa de ligação às proteínas plasmáticas (>99%), primariamente à albumina (SMITH, DICENZO e MORSE, 2001) e é capaz de penetrar no sistema nervoso central a baixas

concentrações (em média 35,1 nM) em pacientes HIV positivos sob tratamento a longo prazo com 600 mg por dia (TASHIMA *et al.*, 1999). Desse modo, é capaz de reduzir a replicação do HIV no sistema nervoso central, contribuindo para minimizar a incidência de desordens neurológicas, como prejuízo cognitivo e demência, decorrentes da infecção pelo HIV (CUSINI *et al.*, 2013; LANGFORD *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que EFV é metabolizado por isoformas do citocromo P450, primariamente pelas isoformas CYP3A4 e CYP2B6, em metabólitos hidroxilados inativos, os quais sofrem subsequente glicuronidação, sendo os conjugados glicuronídeos excretados na urina (menos de 1%) e na bile. As enzimas do citocromo P450 são induzidas pelo EFV, o que resulta em indução de seu próprio metabolismo (SMITH, DICENZO e MORSE, 2001; WARD *et al.*, 2003).

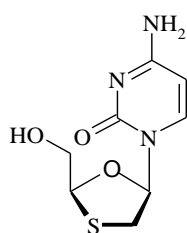
O EFV exibe farmacocinética linear, ou seja, a área sob a curva (ASC) aumenta proporcionalmente com o aumento da dose administrada. A meia-vida de eliminação varia de 52 a 76 horas após doses únicas e de 40 a 55 horas após doses múltiplas. A meia-vida longa permite a administração de uma dose diária única de 600 mg, o que beneficia a adesão ao tratamento (SMITH, DICENZO e MORSE, 2001).

O sistema de classificação biofarmacêutica e de disposição de insumos farmacêuticos ativos (BDDCS), que categoriza os insumos farmacêuticos ativos de acordo com as suas propriedades metabólicas, classifica EFV como pertencente à classe 2, uma vez que possui baixa solubilidade em água, alta permeabilidade e sua rota de eliminação é, predominante, por meio do metabolismo hepático pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP2B6 (WU e BENET, 2005; BENET e BROCCATELLI, 2011). Entretanto, devido a ausência de dados conclusivos sobre a definição da permeabilidade intestinal de EFV, atualmente ele tem sido classificado pelo sistema de classificação biofarmacêutica como pertencente à classe 2 ou 4 (CRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; LINDENBERG, KOPP e DRESSMAN, 2004).

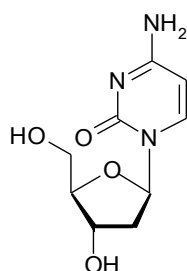
O EFV apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, com faixa de fusão entre 136 °C e 141 °C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). É um insumo farmacêutico ativo hidrofóbico (coeficiente de partição octanol/água = $2,51 \times 10^5$), com solubilidade aquosa de 9,2 µg/mL a 25 °C sendo classificado como praticamente insolúvel em água (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; MAURIN *et al.*, 2002). O logaritmo do inverso da constante de acidez (pKa) de EFV é igual a 10,2 (MOFFAT, OSSELTON e WIDDOP, 2004) e a solubilidade em água aumenta substancialmente em potencial hidrogeniônico (pH) acima de 9 em função da ionização da molécula, consistente com a perda de um próton no nitrogênio do grupo carbamato (MAURIN *et al.*, 2002). O EFV é praticamente insolúvel em ácido clorídrico 0,1 M (ALVES *et al.*, 2010) e é solúvel em metanol (MeOH) e diclorometano (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.3 Lamivudina

A lamivudina é um INTR análogo da desoxicidina (**Figura 3**). Após penetrar na célula por difusão passiva, é metabolizado por reações de fosforilação a lamivudina 5'-monofosfato, lamivudina 5'-difosfato e lamivudina 5'-trifosfato. A etapa limitante é a conversão de lamivudina difosfato para trifosfato, uma vez que o processo enzimático é saturável. A atividade antiviral de 3TC é dependente de seu metabólito ativo 5'-trifosfato, que compete com o trifosfato de desoxicidina endógeno pela ligação com a TR e incorporação ao DNA do HIV (JOHNSON *et al.*, 1999). A 3TC trifosfato não possui o grupo 3'-hidroxila necessário para replicação do ácido nucléico, o que interrompe o alongamento da cadeia de DNA viral e, conseqüentemente, a replicação do HIV é impedida. O insumo farmacêutico ativo destaca-se entre os agentes dessa classe pela ausência de reações adversas significativas (FLEXNER, 2012; HAMMER e INOUE, 1997; PERRY e FAULDS, 1997).

Figura 3 - Estruturas químicas da lamivudina e da desoxicitidina.

Lamivudina



Desoxicitidina

A 3TC tem elevada biodisponibilidade oral (em torno de 86%), e atinge níveis plasmáticos máximos dentro de 1 a 1,5 horas. Cerca de 70% de uma dose oral é eliminada de forma inalterada na urina, sendo necessário o ajuste da dose em pacientes com disfunção renal. A meia-vida plasmática média é de 2 a 4 horas, mas a meia-vida intracelular varia de 10,5 a 15,5 horas (CAMMACK *et al.*, 1992; FLEXNER, 2012; HAMMER e INOUE, 1997) ou de 15 a 19 horas (MOORE *et al.*, 1999; YUEN *et al.*, 2004). A administração oral ou intravenosa de 3TC demonstrou ser linear, com perfil farmacocinético dose-dependente, ou seja, com valores de $C_{máx}$ e ASC correlacionando com a magnitude da dose (JOHNSON *et al.*, 1999).

A meia-vida intracelular de 3TC trifosfato para regime de 150 mg duas vezes ao dia e 300 mg uma vez ao dia não difere significativamente (15,3 e 16,1 h, respectivamente). A dose de 300 mg administrada uma vez ao dia tende a produzir concentrações intracelulares mais altas de lamivudina 5'-monofosfato e lamivudina 5'-trifosfato. Entretanto, não há evidências de toxicidade associada ao aumento nas concentrações dos metabólitos (MOORE *et al.*, 1999).

Um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado, duplo-simulado e controlado foi realizado envolvendo 554 adultos infectados pelo HIV (HIV-1,

nível de RNA ≥ 400 cópias/mL e contagem de células CD4+ igual a 1100 células/mm³) com o intuito de comparar o regime terapêutico contendo 300 mg de 3TC administrada uma vez ao dia com o regime de 150 mg de 3TC administrado duas vezes ao dia, ambos associados a EFV (600 mg) e AZT (300 mg), durante um período de 48 semanas. Os resultados desse estudo, revelaram que 300 mg de 3TC administrado uma vez ao dia produz supressão virológica equivalente em magnitude e durabilidade ao observado com o regime de 150 mg de 3TC administrado duas vezes ao dia. Após 48 semanas de terapia, foi evidenciado que o regime de 300 mg de 3TC uma vez ao dia não aumenta a incidência ou o tempo para emergir vírus com a mutação M184V ou com resistência aos outros insumos farmacêuticos ativos em estudo. Desse modo, houve equivalência na eficácia virológica e no aumento da contagem das células CD4+ nos dois tipos de regimes terapêuticos. Outra conclusão dos autores foi que o regime de dose a ser administrado de 3TC parece ter pouca influência em relação aos efeitos adversos, isso porque a segurança do insumo farmacêutico ativo não difere significativamente entre 300 mg uma vez ao dia e 150 mg duas vezes ao dia (DEJESUS *et al.*, 2004).

YUEN *et al.* (2004) realizaram um estudo em um único centro, *two-way*, cruzado conduzido com 60 voluntários sadios para comparar a farmacocinética de 3TC no plasma no estado de equilíbrio e o metabólito ativo de 3TC, lamivudina 5-trifosfato, em células mononucleares do sangue periférico por um período de 7 dias do tratamento com 300 mg de 3TC administrado uma vez ao dia e com 150 mg de 3TC administrado duas vezes ao dia. Os resultados do estudo demonstraram que as concentrações plasmáticas em estado de equilíbrio de 3TC e as concentrações intracelulares de 3TC-trifosfato foram equivalentes entre os dois grupos de tratamento.

Diante do exposto, a administração de uma dose diária de 300 mg de 3TC permite manter o nível terapêutico do insumo farmacêutico ativo, uma vez que a meia-vida intracelular do metabólito ativo 3TC trifosfato é extensa. Por isso, o tratamento com 3TC é preconizado com a administração de 3TC uma vez ao dia na dose de 300 mg ou duas vezes ao dia na dose de 150 mg.

O BDDCS classifica um insumo farmacêutico ativo como de baixa permeabilidade, quando ele é principalmente eliminado na forma inalterada por via renal e/ou excreção biliar. Dessa forma, 3TC é classificada como um insumo farmacêutico ativo de baixa permeabilidade, pois cerca de 70% da dose é excretada na urina na forma inalterada (WU e BENET, 2005).

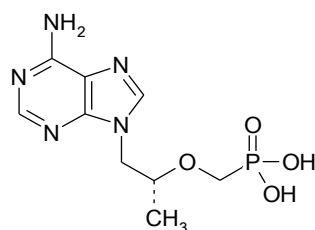
Pelo sistema de classificação biofarmacêutico, alguns autores descrevem a 3TC como pertencente à classe 1 (PATEL e BARVE, 2012; SINGH *et al.*, 2011), enquanto outros descrevem quanto pertencente à classe 3 (APPARAO *et al.*, 2011; SHIVHARE, TAPAS e MATHUR, 2012). Strauch *et al.* (2011) discutiram essa divergência com base nas características de solubilidade e permeabilidade. Para eles, a 3TC é classificada como classe 3 (alta solubilidade e baixa permeabilidade), mas considerando que suas características de permeabilidade não estão bem descritas e que existem publicações científicas com valores próximos ao limite para considerá-la um insumo com alta permeabilidade (biodisponibilidade absoluta > 90%), alguns autores a descreverem como pertencente à classe 1 (alta solubilidade e alta permeabilidade).

A 3TC constitui-se de um pó branco a branco-amarelado e funde-se entre 176 °C e 178 °C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A 3TC é facilmente solúvel em água (70 mg/mL a 20 °C), ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M, ligeiramente solúvel em MeOH e etanol e insolúvel em acetona (REMINGTON e BERINGER, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O pKa do ácido conjugado é igual a 4,3 (protonação do grupo NH₂) e permanece primariamente na forma não-ionizada quando dissolvida em água. A 3TC é muito estável à luz e à temperatura, tanto no estado sólido quanto em soluções aquosas (JOZWIAKOWSKI *et al.*, 1996; MOFFAT, OSSELTON e WIDDOP, 2004; SOUZA e STORPIRTIS, 2004).

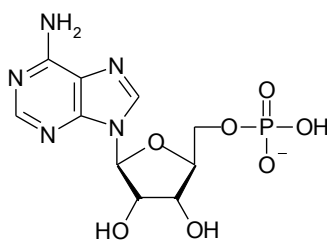
1.4 Fumarato de tenofovir desoproxila

O fumarato de tenofovir desoproxila (**Figura 4**) pertence à classe dos INtTR do HIV, e é um pró- lipofílico oralmente biodisponível na forma de tenofovir (CIHLAR *et al.*, 2002; GALLANT e DERESINSKI, 2003).

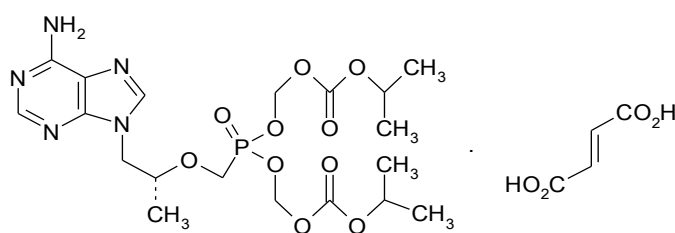
Figura 4 - Estruturas químicas de tenofovir, adenosina 5' monofosfato e fumarato de tenofovir desoproxila.



Tenofovir



Adenosina 5' monofosfato



Fumarato de tenofovir desoproxila

O Tenofovir é um análogo da adenosina 5' monofosfato (**Figura 4**) e seu metabólito ativo, tenofovir difosfato, compete naturalmente com desoxiadenosina trifosfato pelo sítio ativo da TR do HIV. A incorporação do difosfato de tenofovir no DNA viral resulta na terminação da cadeia, uma vez que carece do grupo hidroxila na posição 3', que agiria como ponto de ligação

para o próximo desoxiribonucleosídeo trifosfato (FUNG, STONE e PIACENTI, 2002).

Trata-se do primeiro análogo nucleotídeo aprovado pelo U. S. FDA, em 2001, e incorporado ao SUS em 2004 para o tratamento do HIV (DUARTE, RAMOS e PERREIRA, 2011). O TDF constitui-se de um sal de tenofovir disoproxil com ácido fumárico, sendo sintetizado para melhorar a estabilidade no estado sólido. É uma base fraca que é susceptível à hidrólise pela água e esterases celulares (FARDIS e OLIYAI, 2008).

Os parâmetros farmacocinéticos para uma dose simples de 300 mg de TDF são: 25% de biodisponibilidade oral, tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima ($t_{máx}$) de $1,0 \pm 0,4$ h, $C_{máx}$ de 296 ± 90 ng/mL e ASC de 2287 ± 685 ng x h/mL. Para multidoses (300 mg TDF), observa-se $C_{máx}$ 326 ± 119 ng/mL e ASC 3324 ± 1370 ng x h/mL. O volume de distribuição é igual a $1,3 \pm 0,6$ L/kg, a ligação às proteínas plasmáticas 0,7% e às proteínas séricas 7,2%. A meia vida sérica é de 17 h e intracelular de 10 a 50 h (GALLANT e DERESINSKI, 2003).

A eliminação de TDF ocorre principalmente por via renal, filtração glomerular e secreção tubular, com *clearance* de 510 mL/hora por kg, sendo 70 a 80% recuperado na urina como tenofovir (BARDITCH-CORVO *et al.*, 2001; FUNG, STONE e PIACENTI, 2002; GALLANT *et al.*, 2005). O insumo farmacêutico ativo não sofre metabolismo hepático, portanto, não interage com o sistema citocromo P450 (GALLANT e DERESINSKI, 2003).

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, tenofovir pertence à classe 3 por possuir alta solubilidade em meio aquoso e baixa permeabilidade. O BDDCS classifica o tenofovir como classe 3 em decorrência de sua baixa permeabilidade, por ser pouco metabolizado e por sua eliminação ocorrer por meio de processos absorptivos e ser modulada por transportadores de efluxo (BENET e BROCCATELLI, 2011). A secreção tubular é mediada por absorção específica e por transportadores de efluxo que estão localizados,

respectivamente, nas membranas basolaterais e apicais dos túbulos renais próximos (BONATE, REITH e WEIR, 1998).

O TDF possui solubilidade de 13,4 mg/mL em água destilada a 25 °C (DECHRISTOFORO e PENZAK, 2004), é solúvel em MeOH e muito pouco solúvel em diclorometano (THE INTERNATIONAL..., 2013). Constitui-se de um pó cristalino branco ou quase branco, com coeficiente de partição igual a 1,25 em tampão fosfato pH 6,5 a 25 °C (REMINGTON e BERINGER, 2006) e pka igual a 3,75 (VIREAD[®] ..., 2006).

2 MATERIAIS

2.1 Insumos farmacêuticos ativos, substâncias químicas de referência e excipientes

- Efavirenz SQR USP 200 mg, lote F0G376, teor 99,8%.
- Lamivudina SQR USP 200 mg, lote H0I378, teor 99,7%.
- Fumarato de tenofovir desoproxila SQR USP 200 mg, lote F0J134, teor 99,1%.
- Efavirenz matéria-prima, Nortec Química S.A., Rio de Janeiro, Brasil. Lote 57270, teor 99,94%.
- Lamivudina matéria-prima, Fundação Ezequiel Dias (Coben Pharmaceutical Co., China), lote interno 2011050113, teor 99,09%.
- Fumarato de tenofovir desoproxila, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil. Lote 12809, teor 99,43%.
- Celulose MC 102, Blanver Farmoquímica Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil.
- Amido parcialmente pré-gelatinizado, Colorcon do Brasil Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil.
- Croscarmelose sódica, Colorcon do Brasil Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil.
- Laurilsulfato de sódio, Cognis Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.
- Estearato de magnésio, Magnesia, Luneburg, Alemanha.
- Álcool etílico 96 °GL grau farmacêutico, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil.
- Água purificada Rios 200, Millipore, Massachusettes, EUA.
- Polivinilpirrolidona K30, Nanhang Industrial Co., Ltd, Hong Kong, China.
- Opadry 7006, Colorcon do Brasil Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil.
- Dióxido de titânio, Kronos International, Inc., Texas, EUA.

2.2 Equipamentos

- Agitador HEIDOLPH, modelo RZR2021, Alemanha.
- Agitador ULTRA TURRAX®, IKA, modelo T50, Alemanha.
- Agitador de tamises Retsch, modelo AS 200 control, Alemanha.

- Analisador de tamanho de partícula por difração de raio laser, Malvern Instruments Mastersizer 2000, Worcestershire, Inglaterra.
- Aparelho de densidade compactada Vankel, modelo Top density Double, Carolina do Norte, EUA.
- Aparelho de fluidez Erweka, modelo GWF, Hamburg, Alemanha.
- Balança semi-analítica Gehaka, modelo BG 440, São Paulo, Brasil.
- Coluna cromatográfica de fase reversa Sun Fire[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), Waters, Massachusetts, EUA.
- Compressora, Riva, modelo Piccola FR-U1205-0, Buenos Aires, Argentina.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200, com forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD), Waldbronn, Alemanha.
- Desintegrador Erweka ZT3, Hamburg, Alemanha.
- Dissolutor Varian, modelo VK 7025, Carolina do Norte, EUA.
- Drageadora Erweka, modelo AR402, Hamburg, Alemanha.
- Durômetro Erweka TBH 30 MD, Hamburg, Alemanha.
- Espectrofotômetro infravermelho Perkin Elmer Precisely Spectrum One B, Beaconsfield, Inglaterra.
- Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo UV1800, Japão.
- Estufa modelo 520, Fanen, São Paulo, Brasil.
- Friabilômetro Erweka TA3R, Hamburg, Alemanha.
- Paquímetro digital Mitutoyo, modelo 500-144B, São Paulo, Brasil.
- Normalizador Granulador Oscilante Erweka, modelo FGS, Hamburg, Alemanha.
- Tamis malha 20, Bronzinox, São Paulo, Brasil.

3 MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo EFV, 3TC e TDF em dose fixa combinada

Os comprimidos foram desenvolvidos na Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico da Fundação Ezequiel Dias. Diante da ausência de punção disponível para a compressão da quantidade dos pós (EFV, 3TC e TDF e excipientes), da aquisição de quantidade insuficiente dos insumos farmacêuticos ativos ARV e do custo elevado envolvido na realização de um estudo de biodisponibilidade relativa em voluntários humanos saudáveis, as formulações propostas foram produzidas visando à realização do estudo farmacocinético em coelhos.

Na literatura científica encontram-se descritos alguns estudos farmacocinéticos após administração de formas farmacêuticas sólidas contendo EFV e 3TC para coelhos. Artigos científicos com estudos farmacocinéticos de TDF em coelhos não foram encontrados na literatura.

Em 2012, Singh *et al.* realizaram um estudo farmacocinético utilizando coelhos com o objetivo de comparar o medicamento industrializado Lamivir comprimidos contendo 300 mg de 3TC com duas formulações farmacêuticas sólidas orais de liberação controlada (bioadesivas flutuantes) contendo 3TC desenvolvidas pelo grupo de pesquisa. Para o estudo, os coelhos foram divididos em três grupos de 6 animais: um grupo recebeu Lamivir e os outros dois as formulações desenvolvidas. Amostras sanguíneas de 1 mL foram coletadas da veia marginal da orelha dos coelhos nos tempos 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 24 horas após a administração oral da dose.

No mesmo ano, Chowdary e Annamma, realizaram uma avaliação farmacocinética pré-clínica de EFV em uma formulação oral de complexo de inclusão do insumo farmacêutico ativo com ciclodextrina e polivinilpirrolidona. Os pesquisadores compararam a farmacocinética de liberação do insumo farmacêutico ativo sozinho e quando presente no complexo de inclusão na

dose de 10 mg/kg de coelho. O estudo foi realizado em um modelo *crossover* com 6 animais. O complexo de inclusão foi administrado oralmente em cápsulas gelatinosas duras e amostras de sangue de 2 mL foram coletadas na veia marginal da orelha dos coelhos nos tempos 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas após administração.

Em 2013, foi publicado outro estudo avaliando a biodisponibilidade de 50 mg de EFV complexado com ciclodextrinas e tensoativo (solutol HS15). O estudo foi realizado em um modelo *crossover* com 6 coelhos. Para a realização do experimento, as formulações foram administradas oralmente por meio de cápsulas gelatinosas duras e 3 mL de sangue foram coletados nos tempos 0 (branco), 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas após administração (YOGANANDA e CHOWDARY, 2013).

Neste estudo, o desenvolvimento farmacotécnico de EFV, 3TC e TDF em comprimidos DFC foi realizado levando em consideração a conversão da dose dos ARV de humanos para coelhos. A determinação da dose equivalente para coelhos foi realizada com base na equação a seguir, em que HED é a dose equivalente à humana e o fator K_m representa a dose em mg/m^2 . O fator K_m para coelhos é igual a 12 e para humanos é igual a 37 (REAGAN-SHAW, NIHAL e AHMAD, 2007).

$$Dose\ Animal\ (mg/kg) = \frac{HED\ (mg/kg)}{K_m\ Animal/K_m\ Humano}$$

Os valores HED para cada insumo farmacêutico ativo, destinados a um homem de 70 kg, são: 600 mg de EFV e 300 mg de 3TC e TDF (BRASIL, 2008c). Considerando o peso de 2,5 kg para os coelhos, a conversão das doses resultam em 66 mg de EFV e 33 mg de 3TC e de TDF. Assim, o comprimido revestido contém 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF. O placebo foi manipulado conforme as técnicas descritas para o comprimido, excetuando-se os insumos farmacêuticos ativos.

Para o desenvolvimento de uma formulação de comprimidos contendo os ARV em estudo, foram produzidos quatro lotes piloto a partir de duas formulações (**Tabela 1**), utilizando a técnica de granulação por via úmida e, posterior, compressão. As condições de preparo foram otimizadas de modo que os comprimidos apresentassem parâmetros de controle de qualidade (determinação de peso, friabilidade, teor, uniformidade de conteúdo e teste de desintegração) satisfatórios. O procedimento final de preparo encontra-se descrito a seguir.

Tabela 1 - Formulações testadas para os comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Componente | Formulações (% p/p) | | Função na formulação |
|-------------------------------------|---------------------|------|----------------------|
| | 1 | 2 | |
| Efavirenz | 26,4 | 26,4 | IFA |
| Lamivudina | 13,2 | 13,2 | IFA |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 13,2 | 13,2 | IFA |
| Lactose monohidratada mesh 200 | 15,2 | - | Diluyente |
| Celulose MC 101 | 11,5 | - | Diluyente/Adsorvente |
| Celulose MC 102 | 11,5 | 30,2 | Diluyente/Adsorvente |
| Polivinilpirrolidona K-30 | 3,0 | - | Aglutinante |
| Croscarmelose sódica | 3,0 | 5,0 | Desintegrante |
| Laurilsulfato de sódio | 2,0 | 2,0 | Tensoativo |
| Estearato de magnésio | 1,0 | 1,0 | Lubrificante |
| Amido parcialmente pré-gelatinizado | - | 9,00 | Aglutinante |
| Total | 100 | 100 | |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; MC = celulose microcristalina.

Preparo da formulação. Os insumos farmacêuticos ativos 3TC e TDF e os excipientes foram pesados e tamisados. EFV foi pesado na sua forma micronizada. O granulado foi preparado utilizando EFV, lauril sulfato de sódio, croscarmelose sódica (3%), amido pré-gelatinizado e água purificada. A massa obtida foi granulada em malha 3 e seca em estufa a 60 °C. O granulado foi normalizado em granulador oscilante com malha 1,5 e, posteriormente, 3TC,

TDF, celulose microcristalina e croscarmelose sódica (2%) foram acrescentados ao granulado. Após a homogeneização, adicionou-se o estearato de magnésio. A compressão foi realizada utilizando punção de 9 mm e os núcleos foram revestidos com mistura de Opadry 7600 (hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol 400, polietilenoglicol 8000), dióxido de titânio, álcool etílico e água. O envase foi realizado em frasco de plástico de polietileno.

3.2 Caracterização dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF

A identificação dos insumos farmacêuticos ativos foi realizada por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho e do ultravioleta. Os pós dos insumos farmacêuticos ativos foram caracterizados em relação ao tamanho de partículas, densidade e fluidez.

3.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF e substância química de referência (SQR) foram obtidos por reflectância atenuada total na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} .

3.2.2 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Os espectros de absorção na região do ultravioleta do EFV, 3TC e TDF foram obtidos na faixa de comprimento de onda (λ) de 200 nm a 400 nm e os comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorção foram determinados. As concentrações das soluções de cada insumo farmacêutico ativo foram escolhidas de modo a resultar em valores intermediários de absorvância (MOFFAT, OSSELTON e WIDDOP, 2004). Como diluente foi utilizado MeOH e obteve-se as soluções nas concentrações de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para EFV, 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para 3TC e 20,0 $\mu\text{g/mL}$ para TDF.

3.2.3 Análise de tamanho de partículas por difração de raio laser

A técnica de difração de raio laser, utilizada para determinar a distribuição do tamanho das partículas, baseia-se na análise do padrão de dispersão produzido quando as partículas são expostas a um feixe de luz monocromática. A distribuição do tamanho de partículas dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF foi realizada pela técnica de difração de raio laser pelo método ótico de Fraunhofer. As condições de análise estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Condições de análise para a medida da distribuição de tamanho das partículas de EFV, 3TC e TDF.

| Condições de análise | Descrição e limites utilizados |
|-----------------------------|---|
| Sensibilidade | Normal |
| Faixa de tamanho analisada | 0,02 a 2000,00 µm |
| Obscuração | Entre 2% a 6% |
| Dispersante | Ar sintético analítico 4.7 com pressão de 3,0 bar |
| Tempo de análise | 12 segundos |

Para a realização do teste foram pesados, aproximadamente, 5 g da amostra que, posteriormente, foi colocada no interior do acessório Scirocco 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), cuja bandeja vibratória introduz o pó no sistema e o dispersa por uma corrente de ar seco. Os resultados da análise de tamanho de partículas foram expressos como a média de duas determinações sucessivas da mesma amostra.

3.2.4 Determinação da densidade aparente e compactada dos insumos farmacêuticos ativos

As determinações das densidades, aparente (antes da compactação) e compactada (após a compactação), dos insumos farmacêuticos ativos foram realizadas com o objetivo de conhecer as propriedades dos pós e auxiliar no planejamento da formulação.

As densidades, aparente e compactada, foram calculadas conforme a equação (THE UNITED..., 2012):

$$d_a = \frac{M}{V_o}$$

$$d_c = \frac{M}{V_f}$$

em que,

M = massa (g) utilizada do pó;

V_o = volume inicial (mL) do pó na proveta (volume aparente);

V_f = volume final (mL) do pó na proveta (volume compactado);

d_a = densidade aparente (g/mL);

d_c = densidade compactada (g/mL).

O teste foi realizado em duplicata utilizando um equipamento específico dotado de duas provetas. A densidade aparente foi determinada, individualmente, transferindo livremente uma massa conhecida do pó para proveta de vidro de 100 mL, de modo que a massa pesada ocupasse no mínimo o volume de 50 mL da proveta (50% do volume interno) e calculada a partir do volume obtido. Em seguida, a densidade compactada foi determinada submetendo o pó a uma velocidade de 300 batidas por minuto.

3.2.5 Determinação da fluidez dos insumos farmacêuticos ativos pelo método do ângulo de repouso

A fluidez é interpretada como a resistência que as partículas se opõem ao movimento. A técnica utilizada para a medida de fluidez dos pós foi a determinação do ângulo de repouso (α), que é uma característica relacionada à fricção interparticular, ou seja, à resistência ao movimento entre partículas (BRITISH..., 2011; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001; STANIFORTH, 2005). O ângulo de repouso foi determinado de acordo com o método da altura fixa do funil e do cone de base. Deixou-se cair uma quantidade padronizada de pó (45 g), o mais regularmente possível e com vibração, a partir do orifício de um funil com diâmetro de 1,2 cm. A distância entre o funil e a base para a

análise da fluidez foi mantida constante durante todo o procedimento. Posteriormente, o ângulo de repouso foi calculado com as medidas do raio (R) e da altura (H) do cone de pó formado, de acordo com a equação:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{H}{R}$$

em que,

α = ângulo de repouso;

$\operatorname{tg} \alpha$ = tangente do ângulo de repouso;

H = altura do cone formado (cm);

R = raio do plano horizontal formado pelo cone (cm).

3.3 Caracterização dos pós dos grânulos e da mistura final

Os grânulos e a mistura final dos pós, antes da compressão, do lote piloto 3 da Formulação 2 foram caracterizados. Os grânulos contendo EFV foram caracterizados quanto à sua granulometria e a mistura final dos pós em relação à densidade e a fluidez.

3.3.1 Análise granulométrica por tamisação dos grânulos

A distribuição dos tamanhos de partícula dos grânulos normalizados e dos grânulos secos foi determinada por tamisação a partir de 25 g de amostra e utilizando sucessivos tamises com abertura de malha (nº Mesh) de 74 μm (200), 149 μm (100), 177 μm (80), 250 μm (60), 420 μm (40), 500 μm (35) e 710 μm (25) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A análise foi realizada em duplicata e a porcentagem de granulometria individual foi calculada pela razão entre a quantidade da amostra retida em cada tamis e a massa total da amostra pesada. As médias dos tamanhos dos grânulos foram calculadas de forma individual e acumulada a cada abertura de malha.

3.3.2 Determinação da densidade aparente e compactada da mistura final de pós

As determinações das densidades, aparente e compactada, foram realizadas para a mistura final de pós, anteriormente ao processo de compressão, conforme procedimento descrito no item **3.2.4**.

3.3.3 Determinação da fluidez dos grânulos e da mistura final dos pós pelo método do ângulo de repouso

A fluidez da mistura final dos pós foi determinada pelo método do ângulo de repouso, conforme descrito no item **3.2.5**.

3.4 Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos preparados

Os comprimidos contendo EFV 66 mg, 3TC 33 mg e TDF 33 mg em DFC foram analisados quanto aos testes de determinação de peso, dureza, friabilidade, teor, uniformidade de conteúdo e teste de desintegração com o intuito de avaliar sua qualidade e a eficiência do processo de produção. As análises de controle de qualidade foram realizadas para os lotes pilotos das formulações preparadas.

3.4.1 Determinação de peso

O peso médio foi obtido a partir de 20 comprimidos. A massa individual de cada comprimido foi determinada, bem como os desvios percentuais das unidades em relação ao peso médio (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

3.4.2 Teste de dureza e friabilidade

O teste de dureza foi executado, mecanicamente, com 10 comprimidos não revestidos, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Os comprimidos foram testados individualmente e obedecendo à mesma orientação ao serem colocados no equipamento automático. O

resultado foi expresso pelo valor médio das determinações, sendo meramente informativo (FARMACOPEIA BRASILEIRA..., 2010).

Para o teste de friabilidade, 20 comprimidos não revestidos foram submetidos à rotação de 25 rpm durante 4 minutos, totalizando 100 rotações. Determinou-se a friabilidade em função da porcentagem de perda de pó a partir da diferença entre o peso inicial e final. Consideram-se aceitáveis as perdas inferiores a 1,5% do peso (FARMACOPEIA BRASILEIRA..., 2010).

3.4.3 Teste de desintegração

O tempo de desintegração foi determinado com seis unidades de comprimidos revestidos com filme utilizando um disco em cada tubo e água a 37 ± 1 °C como líquido de imersão. O limite de tempo máximo especificado para que ocorra a desintegração da forma farmacêutica sólida é de 30 minutos (FARMACOPEIA BRASILEIRA..., 2010).

3.4.4 Teor dos comprimidos

O teor dos comprimidos contendo EFV, 3TC e TDF foi determinado utilizando o método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) desenvolvido e validado nesse estudo (Capítulo 3). Vinte comprimidos foram pulverizados e pesou-se o equivalente a um peso médio para balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 40 mL de MeOH, submeteu-se ao ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Da solução anterior, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com *Fase móvel* e homogeneizou-se. Paralelamente, prepararam-se *Solução padrão* para EFV, 3TC e TDF a 66,0 µg/mL, 33 µg/mL e 33 µg/mL, respectivamente (Capítulo 3).

3.4.5 Uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de doses unitárias dos comprimidos foi determinada pelo método de uniformidade de conteúdo. Determinou-se o teor de 10 unidades

dos comprimidos, utilizando-se o método por CLAE validado para a determinação do teor dos insumos farmacêuticos ativos em estudo (Capítulo 3).

No preparo da amostra, transferiu-se um comprimido inteiro para balão volumétrico de 50 mL e adicionaram-se 40 mL de MeOH. Submeteu-se ao ultrassom, por no mínimo 20 minutos, até completa desintegração dos comprimidos e solubilização dos insumos farmacêuticos ativos. Em seguida, o volume foi completado com o mesmo solvente, homogeneizou-se e filtrou-se, desprezando os primeiros mililitros do filtrado. Transferiram-se 5 mL para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com a *Fase móvel* e homogeneizou-se. O valor de aceitação (VA) foi calculado.

3.4.6 Teste de dissolução

Atualmente, não existem métodos de dissolução publicados para a quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC. O objetivo de realizar o teste foi verificar o desempenho *in vitro* da liberação dos insumos farmacêuticos ativos a partir da forma farmacêutica sólida preparada.

3.4.6.1 Condições sink

As condições *sink* de EFV, 3TC e TDF foram verificadas a partir da solubilidade dos ARV em água, ácido clorídrico 0,1 M (HCl 0,1 M) e lauril sulfato de sódio 1,0 e 2,0% (p/v). Adotou-se o critério da condição correspondente ao volume três vezes superior ao obtido em solução saturada de cada insumo farmacêutico ativo (BRITISH..., 2011). Por exemplo, considerando a dose de 66 mg de EFV por comprimido e o volume de 500 mL, a condição *sink* para o insumo farmacêutico ativo é alcançada em meios com capacidade de solubilizar, no mínimo, 0,40 mg/mL de EFV. Assim, a quantidade de EFV presente na formulação (66 mg) deve ser solúvel em 1/3 do volume do meio utilizado na dissolução (167 mL) (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Cálculos das condições *sink* para efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Insumo farmacêutico ativo | Dose por comprimido | Volume de meio de dissolução | Concentração na condição <i>sink</i> |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Efavirenz | 66 mg | | 0,4 mg/mL |
| Lamivudina | 33 mg | 500 mL | 0,2 mg/mL |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 33 mg | | 0,2 mg/mL |

Para a realização do teste foram adicionados, separadamente, em *erlenmeyers* cerca de 75 mg de EFV, 50 mg de TDF e 50 mg de 3TC em 50 mL de cada meio de dissolução (água, HCl 0,1 M e lauril sulfato de sódio 1 e 2% p/v). O ensaio foi realizado em duplicata. Os *erlenmeyers* foram mantidos tampados, sob agitação magnética, a 25 °C por um período de 24 horas. Após esse período, alíquotas de cada *erlenmeyer* foram retiradas, filtradas em membrana de 0,45 µm de porosidade e diluídas até concentração adequada (concentração que esteja dentro da faixa linear) com os meios de dissolução. As soluções foram analisadas pelo método analítico por CLAE, conforme descrito no Capítulo 3.

As *Soluções padrão* de EFV a 132 µg/mL, 3TC a 66 µg/mL e TDF a 66 µg/mL foram preparadas, sendo primeiramente diluídas com MeOH e em seguida com o meio de dissolução. As solubilidades dos insumos farmacêuticos ativos foram calculadas em cada meio com o objetivo de verificar o alcance da condição *sink*.

3.4.6.2 Perfis de dissolução dos comprimidos

Os perfis de dissolução foram realizados para o lote piloto 3 da Formulação 2 em água purificada, HCl 0,1 M, lauril sulfato de sódio 1 e 2% (p/v). O estudo do perfil de dissolução foi conduzido em 500 mL de meio com agitação por pás em velocidade de 100 rpm para todos os meios testados. Alíquotas de 5 mL foram retiradas, sem reposição, nos tempos de coleta de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, filtradas em filtro 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo. A quantificação

dos insumos farmacêuticos ativos em solução foi realizada por CLAE, no λ máximo de 260 nm, de acordo com o método desenvolvido e descrito no Capítulo 3.

A seletividade em relação ao placebo e aos meios de dissolução utilizados foi verificada com o intuito de garantir a ausência de interferentes nas respostas dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF. Para isso, injetaram-se no cromatógrafo *Solução placebo* e *Solução padrão*, conforme descrito a seguir.

A *Solução placebo* foi preparada transferindo-se 128,09 mg de placebo (quantidade presente em um peso médio) para balão volumétrico de 50 mL e diluindo-se com MeOH. Em seguida, transferiram-se 5 mL da solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com meio de dissolução.

A *Soluções padrão* foi preparada transferindo-se 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF para balão volumétrico de 50 mL e diluindo-se com MeOH. Transferiram-se 5 mL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com meio de dissolução.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento farmacotécnico e controle de qualidade de comprimidos contendo EFV, 3TC e TDF em dose fixa combinada

Insumos farmacêuticos ativos altamente permeáveis, mas praticamente insolúveis em água, frequentemente demonstram baixa absorção gastrointestinal em decorrência da inadequada solubilidade nos fluidos gastrointestinais (AUNGST *et al.*, 2002). O EFV sendo um insumo farmacêutico ativo com alta permeabilidade e baixa solubilidade, apresenta problemas de biodisponibilidade. Sua velocidade de dissolução intrínseca é consideravelmente baixa ($0,037 \text{ g/min/cm}^2$), o que sugere problemas de absorção limitados pela taxa de dissolução (SATHIGARI *et al.*, 2009). Uma velocidade de dissolução intrínseca menor que $0,1 \text{ mg/min/cm}^2$ pode ser um fator limitante da taxa de absorção de um insumo farmacêutico ativo (KAPLAN, 1972; YU *et al.*, 2004). Assim, a realização de um estudo farmacocinético preliminar em animais com a administração da formulação proposta contendo EFV é primordial para evitar insucessos em estudos de biodisponibilidade em voluntários humanos, cujo custo é elevado.

Os coelhos foram os animais escolhidos para a realização do experimento pelo fato de cada animal possuir volume sanguíneo suficiente para as coletas necessárias na construção do perfil de biodisponibilidade dos insumos farmacêuticos ativos após administração única de um comprimido e por gerar características farmacocinéticas básicas que podem ser extrapoladas para humanos (BRASIL, 2008d; ETTE, GARG e JAYARAJ, 2004; MORRIS e DARRIS, 1993). Também, são animais de experimentação de fácil obtenção, manuseio, cuidado e são capazes de deglutir inteiramente o comprimido desenvolvido, mantendo as características da forma farmacêutica. A raça Nova Zelândia, branca, é a mais utilizada entre os coelhos como modelo experimental (DAMY *et al.*, 2010).

O desenvolvimento farmacotécnico foi realizado em conjunto com os testes de controle de qualidade. Assim, cada formulação desenvolvida foi avaliada e

caso não cumprisse com os parâmetros de controle de qualidade estabelecidos, mudanças eram propostas para otimizar a formulação ou o processo até obtenção de uma com características adequadas.

A compressão direta é um processo em que o insumo farmacêutico ativo e os excipientes são misturados secos e, após, compactados. Entretanto, para que esse processo seja bem sucedido, a mistura de pós a ser comprimida precisa possuir certas propriedades como alta fluidez, baixa tendência à segregação e alta compactabilidade (GOHEL e JOGANI, 2005).

O aumento na densidade dos pós, muitas vezes, é necessário para melhorar as propriedades das partículas (como, por exemplo, fluxo dos pós e compressão) que são parâmetros importantes para a produção de medicamentos. Também, permite minimizar o volume dos pós para a produção de formas farmacêuticas com tamanhos aceitáveis pelos pacientes (HANCOCK *et al.*, 2013).

O EFV caracteriza-se por ser um pó fino, 90% das partículas possuem tamanho menor ou igual a $4,721 \mu\text{m}$ [$d(0,9) = 4,721 \mu\text{m}$], de baixa densidade ($0,362 \text{ mg/mL}$), o que, conseqüentemente, resulta em maior volume de pó. Esses resultados corroboram com dados já publicados que descrevem EFV como um insumo farmacêutico ativo hidrofóbico com baixa densidade e alta resistência ao fluxo (VIANA *et al.*, 2006).

Pós cuja fluidez é muito baixa, uma etapa possível de pré-tratamento, antes da compressão, é a granulação por via úmida (PATEL, KAUSHAL e BANSAL, 2006). Para aumentar a densidade do pó de EFV e melhorar as propriedades de fluxo, optou-se por essa técnica.

A granulação por via úmida é um processo muito utilizado na indústria farmacêutica, pois permite melhorar o controle da uniformidade de conteúdo do insumo farmacêutico ativo quando presente em baixa concentração, bem como o controle da densidade da massa obtida e, finalmente, para a

compactabilidade do insumo farmacêutico ativo quando estiver presente em altas proporções na formulação (FAURE, YORK e ROWE, 2001).

Ao iniciarmos o preparo da Formulação 1, EFV foi submetido à granulação por via úmida utilizando como solução aglutinante polivinilpirrolidona K30 e água. Entretanto, em decorrência da hidrofobicidade do insumo farmacêutico ativo, o pó não tinha molhabilidade suficiente o que tornava impossível a formação de uma massa coesa, restando apenas o líquido separado do pó. Para resolver o problema de molhabilidade, acrescentou-se na formulação lauril sulfato de sódio. O lauril sulfato de sódio é um surfactante aniônico, utilizado como agente solubilizador em proporções maiores que 0,0025% p/p e como agente lubrificante entre 1,0 a 2,0% p/p (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). Após essa ação, foi obtida uma massa coesa contendo EFV capaz de ser submetida à granulação.

A polivinilpirrolidona foi utilizada na formulação como agente aglutinante na proporção de 3% p/p, estando em conformidade com a faixa recomendada de 0,5 a 5% p/p. Como adjuvante farmacotécnico, a lactose foi utilizada como aglutinante e diluente, com o intuito de melhorar a mistura com os componentes da formulação e auxiliar a ação da polivinilpirrolidona (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

A celulose microcristalina é um excipiente de ampla utilização e, em termos de tecnologia de compressão, é empregada como diluente e aglutinante, que melhora as propriedades de compactabilidade quando adicionada às formulações (EDGE *et al.*, 2000). A celulose microcristalina 101 foi acrescentada durante a etapa de granulação por via úmida para possibilitar a formação do granulado e agir como agente desintegrante na concentração recomendada entre 5 a 15% p/p (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). A celulose microcristalina 102 foi utilizada extra-granulado na formulação e, por possuir partículas de maior tamanho, sua presença favorece o escoamento dos pós, porém prejudica a compactação em relação à celulose microcristalina 101 (RAMÍREZ e ROBLES, 2011).

A croscarmelose sódica foi utilizada nas formulações dos comprimidos como desintegrante, proporção recomendada de 0,5% a 5,0% p/p. Como seu uso foi destinado à granulação por via úmida, ela foi adicionada no estágio úmido e seco do processo, ou seja, intra e extra-granulado, respectivamente (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). A croscarmelose sódica é um sal de sódio de ligação cruzada de carboximetilcelulose, altamente hidrofílico, de modo a possuir alta capacidade de inchamento ao entrar em contato com a água. Por isso, produz rápida desintegração quando utilizada em formas farmacêuticas orais (TANUWIJAYA e KARSONO, 2013).

O estearato de magnésio foi utilizado como lubrificante na concentração de 1,0% p/p, quantidade em conformidade com o limite recomendado pela literatura (0,25% a 5,0% p/p). Devido às características hidrofóbicas do excipiente, sua concentração na formulação deve ser a menor possível para evitar o retardo na dissolução dos insumos farmacêuticos ativos a partir da forma farmacêutica sólida (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

O tamanho médio dos grânulos obtidos está diretamente relacionado à molhabilidade da matéria-prima. Isso porque quanto maior a hidrofobicidade da mistura, menor é o crescimento do grânulo durante o processo de granulação por via úmida (BELOHLAV *et al.*, 2007). A granulação de EFV em conjunto com os outros excipientes melhorou a fluidez da mistura final em relação aos fluxos dos insumos farmacêuticos ativos isolados. A formulação obtida não apresentou os teores dos insumos farmacêuticos ativos no intervalo estabelecido de 90,0 a 110,0% da quantidade teórica, sendo menor que 90,0% para EFV (74,31%) e maior que 110,0% para 3TC (137,32%) e TDF (125,18%).

Uma segunda formulação (Formulação 2) foi preparada usando amido parcialmente pré-gelatinizado como agente aglutinante. O amido pré-gelatinizado é utilizado como agente aglutinante na formulação quando presente na proporção de 5 a 10% p/p e possui como vantagens melhorar as características de fluxo e de compressão (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

Rahman *et al.* (2008) estudaram os efeitos do amido parcialmente pré-gelatinizado e da polivinilpirrolidona como agentes aglutinantes em duas formulações diferentes de comprimidos contendo 3TC preparados pelo método de granulação por via úmida. Como resultado, o amido parcialmente pré-gelatinizado atuou como um excelente aglutinante ao produzir granulados compressíveis e comprimidos com dureza e friabilidade adequadas quando comparado com aqueles preparados com polivinilpirrolidona. Além disso, contribuiu positivamente no desempenho da formulação nos testes de desintegração e dissolução, por possuir ação desintegrante.

Na Formulação 2, a proporção de croscarmelose sódica foi aumentada para 5%, sendo 3% utilizada no estágio úmido e 2% extra-granulado. A adição do amido pré-gelatinizado contribuiu para reduzir a complexidade da formulação ao substituir a polivinilpirrolidona, a lactose e a celulose microcristalina 101 utilizados na Formulação 1.

Outra diferença nos componentes da Formulação 2 foi o aumento na quantidade de celulose microcristalina 102 de 11,50% para 30,20% p/p. A celulose microcristalina 102 possui como função farmacotécnica as propriedades de diluente (20 a 90% p/p) e adsorvente (20 a 90% p/p) (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). Além disso, possui uma forma mais granular, apresentando maior fluidez em relação à celulose microcristalina 101. Lahdenpaa, Antikeinen e Yliruusi (2001) demonstraram que comprimidos contendo porcentagens mais altas de celulose microscristalina 101 exibiam alta dureza e baixo tempo de desintegração, enquanto comprimidos contendo celulose microcristalina 102 possuíam menor dureza, menor tempo de desintegração e pequena variação de peso.

O primeiro lote piloto da Formulação 2 foi submetido aos testes de controle de qualidade e o resultado para o teor de EFV foi insatisfatório (80,81%), sendo menor do que 90,0% do valor rotulado. Entretanto, os teores de 3TC e TDF foram satisfatórios (98,53% e 93,81% para 3TC e TDF, respectivamente). Os resultados obtidos para o teste de uniformidade de conteúdo foram

insatisfatórios no primeiro estágio para os três insumos farmacêuticos ativos ARV.

Uma possível justificativa para o baixo teor de EFV é a retenção do insumo farmacêutico ativo no processo de tamisação inicial. A utilização do insumo farmacêutico ativo na forma micronizada, em alta dosagem (presente em alta concentração na formulação) e com característica de baixa fluidez favorece a adesão das partículas à superfície dos instrumentos utilizados durante o processo, em decorrência da formação de carga estática em sua superfície (ENÉAS, 2008). Os pós farmacêuticos são, principalmente, compostos por partículas finas de material isolante que estão em contato uns com os outros ou com as diferentes superfícies que os rodeiam. Esses contatos causam a doação ou recepção de elétrons durante os vários processos. A troca de elétrons ocorre devido à diferença de potencial entre as superfícies dos corpos que estão em contato, bem como pode ser influenciado por diferenças no tamanho de partículas e na rugosidade da superfície (KARNER e URBANETZ, 2011). Cargas opostas tendem a se atraírem, aumentando a coesão entre as partículas isolantes e superfícies metálicas ou entre as partículas isolantes em si o que, conseqüentemente, diminui a fluidez dos pós.

Considerando que a Formulação 2 apresentou melhores resultados no teste de teor dos ARV quando comparada à Formulação 1, ela foi escolhida como ponto de partida para a realização das modificações pertinentes para que os comprimidos fossem satisfatórios quanto aos testes de controle de qualidade.

Dessa forma, um segundo lote piloto da Formulação 2 foi preparado com a supressão da etapa de tamisação inicial do EFV. A modificação do processo teve como objetivo minimizar a perda de EFV que, por estar na forma micronizada, adquire eletricidade estática com o atrito entre as partículas e entre as partículas e o metal do tamis, o que resulta na retenção do insumo farmacêutico ativo na malha do tamis. Os teores obtidos no segundo lote piloto da Formulação 2 foram satisfatórios para todos os ARV. Na análise da uniformidade de conteúdo, o teste foi insatisfatório no primeiro estágio para

3TC, atingindo valores limítrofes ao VA máximo tolerado. Por isso, foi realizado o segundo estágio previsto no teste e o resultado continuou insatisfatório.

Preparou-se um terceiro lote piloto da Formulação 2 mantendo o mesmo procedimento do segundo lote piloto, porém em quantidade superior de comprimidos. A qualidade foi atestada pelos resultados satisfatórios em todos os testes de controle de qualidade realizados.

Durante o preparo do terceiro lote piloto da Formulação 2, a umidade residual dos grânulos, determinada pelo método de Karl Fischer, foi controlada e considerada aceitável entre os valores de 1,5% a 2,5%. Conforme Lachman, Lieberman e Kanig (2001), grânulos que contêm 2% a 4% de umidade produzem comprimidos menos friáveis. O controle da umidade dos grânulos resultou na obtenção de comprimidos com friabilidade dentro dos limites aceitáveis (item 4.4.2).

Uma mistura excessivamente úmida proporciona maior resistência à passagem da massa pela malha do granulador e a obtenção de grânulos mais duros após a secagem. A secagem excessiva pode interferir na eficiência de coesão entre as partículas, principalmente, se o agente aglutinante necessitar de umidade residual e, dessa forma, podendo afetar a friabilidade dos grânulos (COUTO, ORTEGA e PETROVICK, 2000). Por isso, é necessário o controle da umidade dos grânulos durante e após o processo de secagem. A temperatura de secagem, o tempo de secagem e a umidade dos grânulos são importantes parâmetros do processo para obtenção de grânulos com características aceitáveis e compressíveis.

Após a compressão, os comprimidos foram revestidos com o intuito de melhorar o aspecto visual e mascarar o sabor desagradável dos insumos farmacêuticos ativos. Utilizou-se o revestimento pelicular com o polímero Opadry[®] 7006 (hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol 400, polietilenoglicol 8000) disperso em uma mistura de água purificada (19,8 g) e etanol (115,7 g), sob agitação mecânica, por 45 minutos. Paralelamente, dióxido de titânio foi disperso em etanol (15 g) com auxílio do agitador Ultra-Turrax[®] (IKA,

Alemanha) por 5 minutos. A suspensão de revestimento foi obtida misturando os sistemas contendo o Opadry® 7006 e o dióxido de titânio. Acrescentou-se mais 15 g de etanol e submeteu-se ao agitador Ultra-turrax® por 5 minutos.

O revestimento foi realizado em drageadeira rotativa. Os núcleos foram aquecidos previamente a 47 °C em uma velocidade rotacional de 60 rpm. Após o aquecimento, a velocidade foi aumentada para 130 rpm até o final do processo e a temperatura dos núcleos foi mantida entre 35 °C a 45 °C. O fluxo de aspersão da suspensão de revestimento foi mantido constante durante todo o processo.

As dimensões dos comprimidos preparados foram medidas com auxílio de paquímetro. Os comprimidos obtidos são revestidos, brancos e bicôncavos. Possuem diâmetro médio de 9,12 mm e as faces convexas com espessura no ponto mais alto de 3,92 mm e no ponto mais baixo de 1,97 mm (**Figura 5**).

Figura 5 – Comprimidos revestidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.



Apesar da elevada massa de insumos farmacêuticos ativos, a formulação proposta neste trabalho é viável em termos tecnológicos e pode ser útil para melhorar a adesão de pacientes à terapia ARV.

4.2 Caracterização dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF

4.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho para os insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF e SQR foram determinados por reflectância atenuada na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} (**Figuras 6 a 8**). As atribuições das principais bandas para cada insumo farmacêutico ativo foram coincidentes com as principais bandas das SQR e estão descritas nas **Tabelas 4 a 6**.

Figura 6 - Espectro de absorção no infravermelho de efavirenz substância química de referência (A) e insumo farmacêutico ativo (B) por reflectância atenuada.

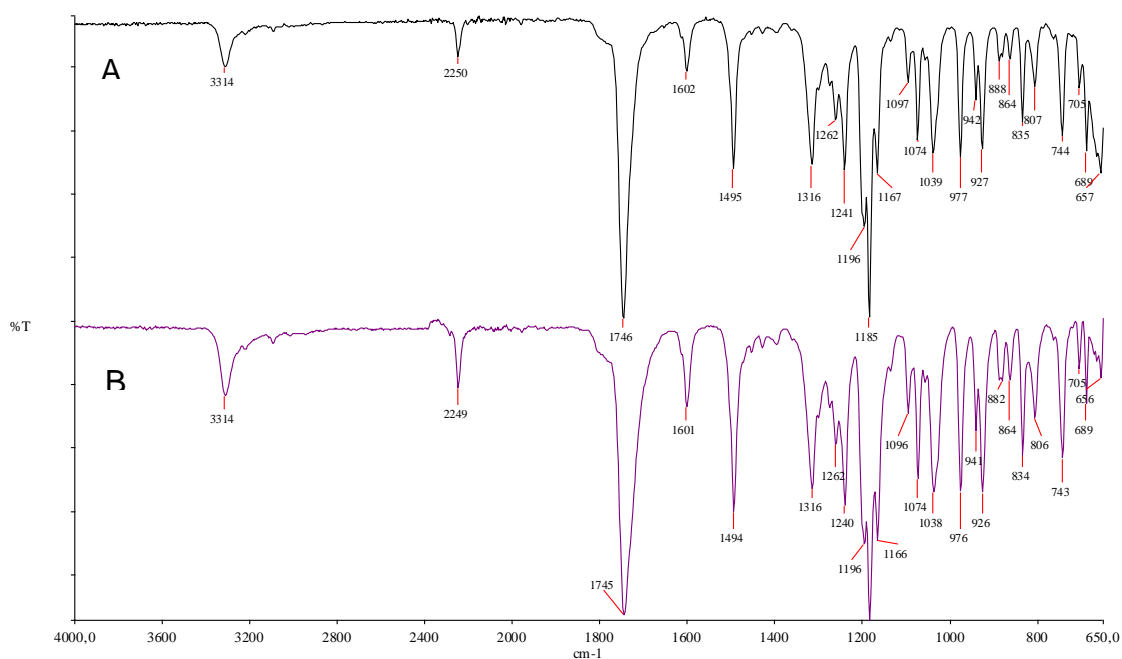


Tabela 4 - Atribuições das principais bandas de absorção de efavirenz no infravermelho.

| Número de onda (cm ⁻¹) | Atribuição |
|------------------------------------|--|
| 3314 | estiramento N-H |
| 2250 | estiramento de ligação tripla típica de exociclo |
| 1746 | estiramento C=O |
| 1495 | estiramento C=C de anel aromático |
| 1196 | estiramento de éster |
| 1185 | estiramento C-F |
| 1074 | deformação C-H |
| 977 | deformação C-H |
| 835 | anel benzênico substituído |
| 744 | estiramento C-Cl |

Figura 7 - Espectro de absorção no infravermelho de lamivudina substância química de referência (A) e insumo farmacêutico ativo (B) por reflectância atenuada.

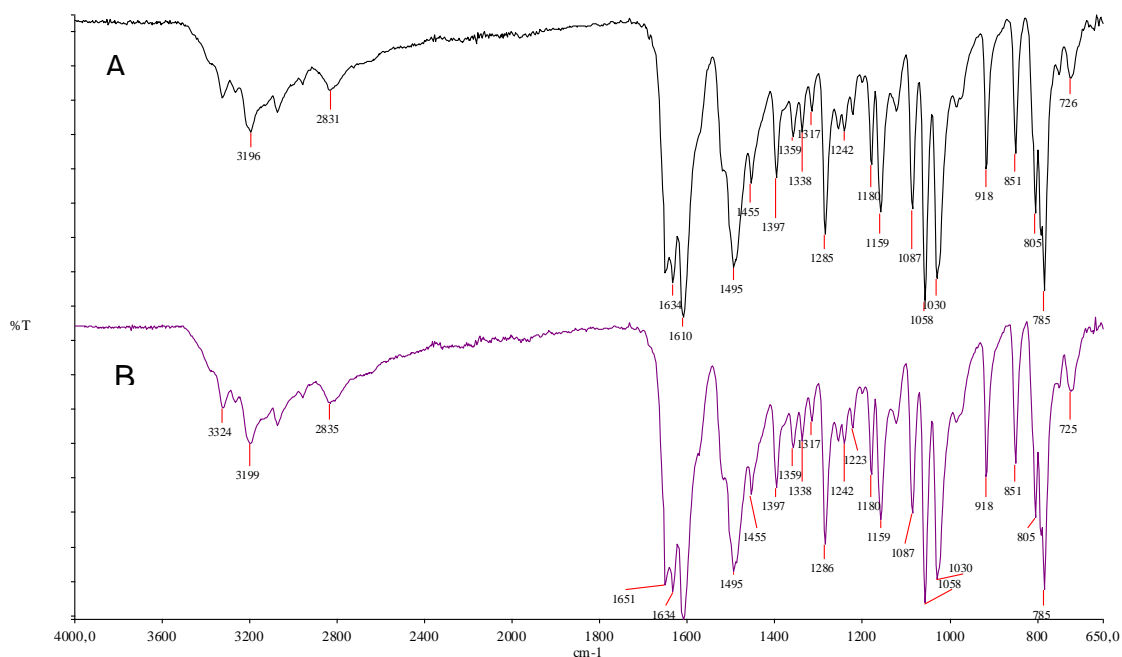


Tabela 5 - Atribuições das principais bandas de absorção de lamivudina no infravermelho.

| Número de onda (cm ⁻¹) | Atribuição |
|------------------------------------|-----------------------|
| 3324 | estiramento N-H |
| 3196 | estiramento O-H |
| 1634 | estiramento C=N |
| 1651 | estiramento C=O |
| 1610 | estiramento C=C + C=N |
| 1397 | deformação O-H |
| 1087 | estiramento R-O-R |
| 726 | estiramento C-S |

Figura 8 - Espectro de absorção no infravermelho de fumarato de tenofovir desoproxila substância química de referência e insumo farmacêutico ativo por reflectância atenuada.

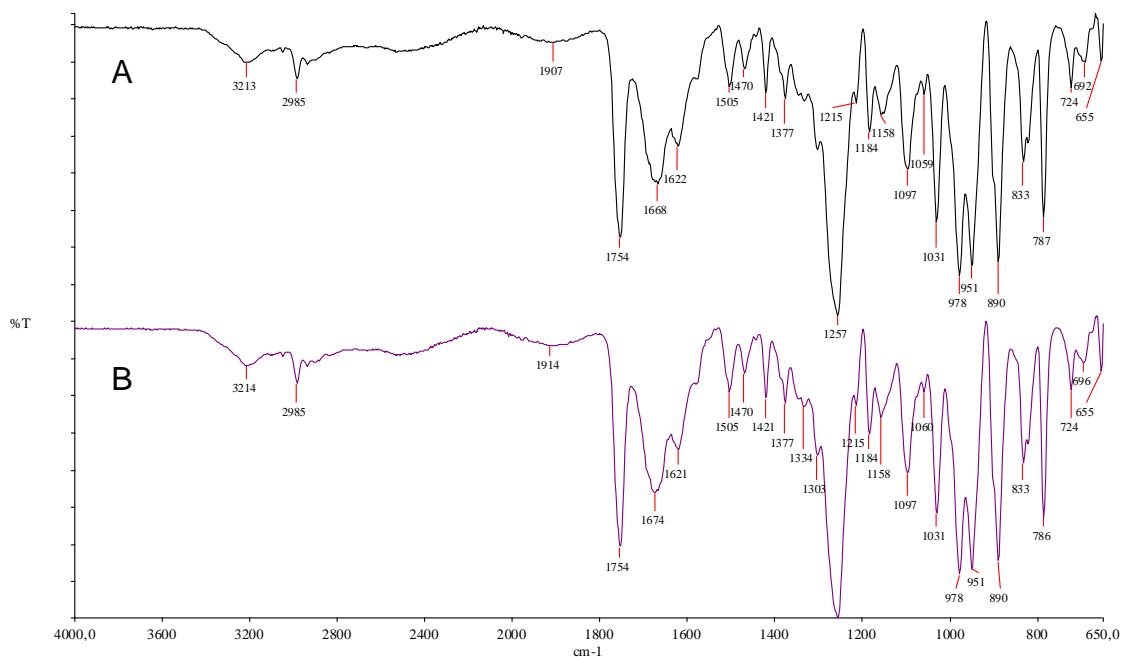


Tabela 6 - Atribuições das principais bandas de absorção de fumarato de tenofovir desoproxila no infravermelho.

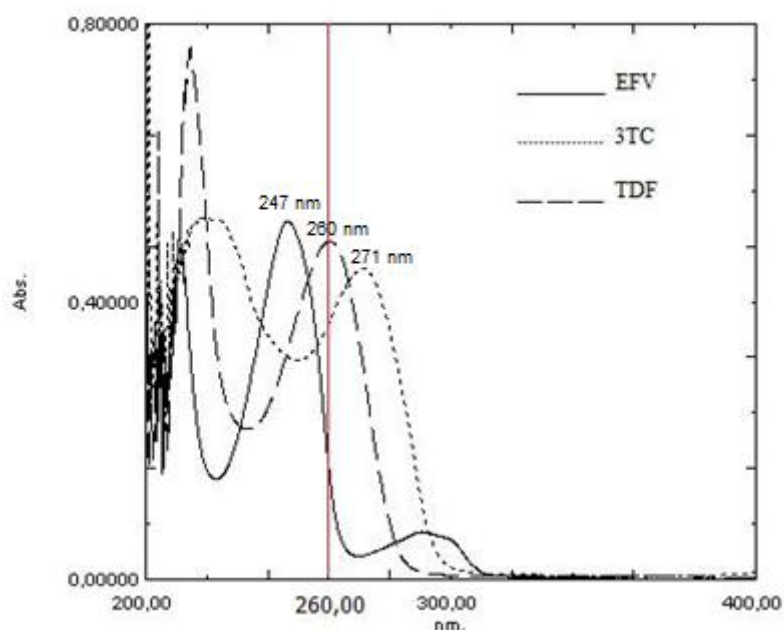
| Número de onda (cm^{-1}) | Atribuição |
|-------------------------------------|-----------------|
| 3213 | estiramento O-H |
| 2985 | estiramento N-H |
| 1031 | estiramento C-N |
| 1257 | estiramento P=O |
| 1668 | estiramento C=N |
| 1754 | estiramento C=O |

No infravermelho por reflectância atenuada, o espectro é obtido diretamente da amostra em contato com a superfície do cristal óptico (elemento de reflexão interno do equipamento). As medidas de espectrofotometria de absorção realizadas na região do infravermelho no modo de reflexão fornecem informações espectrais equivalentes às obtidas pelo modo de transmissão (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.2 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Os espectros de absorção na região do ultravioleta de solução de EFV (10,0 µg/mL), 3TC (10,0 µg/mL) e TDF (20,0 µg/mL) foram traçados utilizando MeOH como diluente e determinaram-se os máximos de absorvância (**Figura 9**).

Figura 9 - Espectros no ultravioleta de EFV 10 µg/mL, 3TC 10 µg/mL e TDF 20 µg/mL em metanol e traçado no λ 260 nm escolhido para as análises cromatográficas.



Os λ máximos identificados para EFV foram 212 nm, 247 nm e 291 nm, para 3TC foram 220 nm e 271 nm e para TDF foram iguais a 215 nm e 260 nm. O traçado no espectro demonstra que os ARV absorvem consideravelmente os raios ultravioleta em λ igual a 260 nm. Esse comprimento de onda foi selecionado para a determinação de EFV, 3TC e TDF nas análises cromatográficas (Capítulo 3), pois possui intensidade adequada para quantificação simultânea dos insumos farmacêuticos ativos.

4.2.3 Análise de tamanho de partículas por difração de raio laser

Conhecer o tamanho das partículas é importante para a caracterização dos insumos farmacêuticos ativos e das formulações farmacêuticas (THE

UNITED..., 2012). As distribuições do tamanho das partículas para cada insumo farmacêutico ativo estão demonstradas nas **Figuras 10 a 12**.

Figura 10 - Curva de distribuição média do tamanho de partículas de efavirenz.

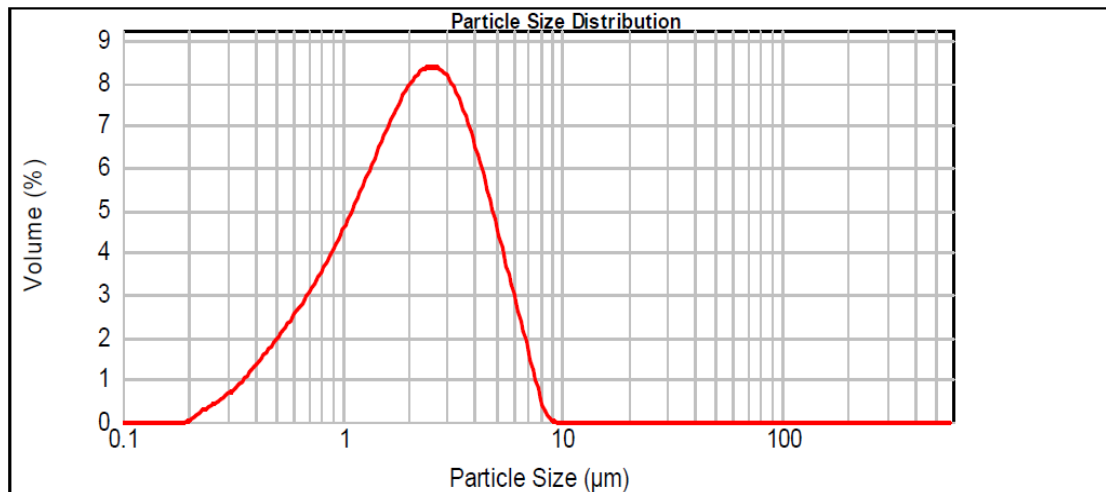


Figura 11 - Curva de distribuição média do tamanho de partículas de lamivudina.

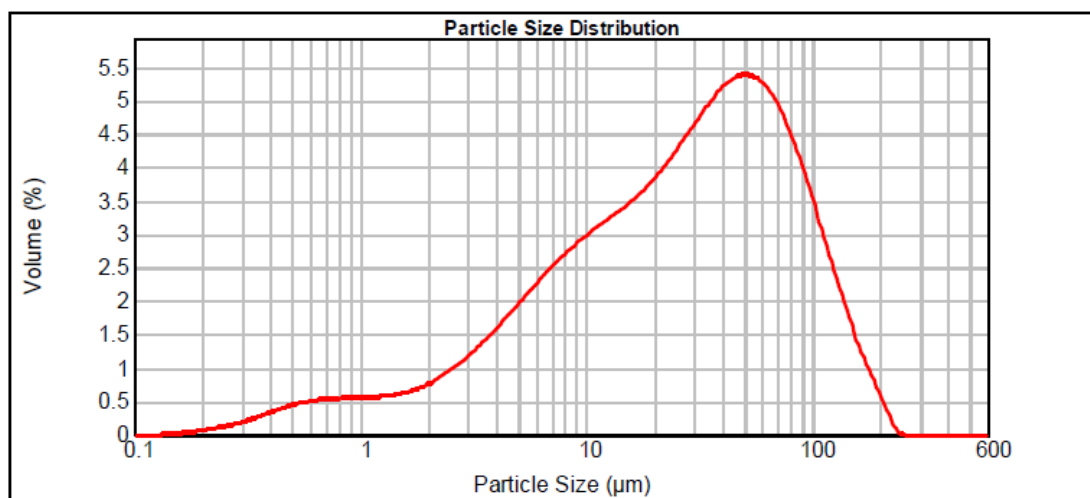
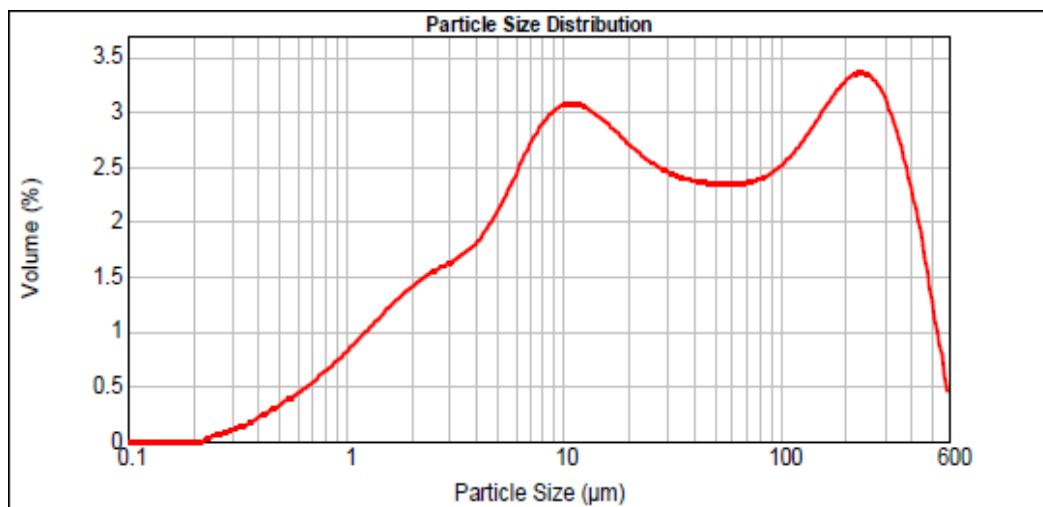


Figura 12 - Curva de distribuição média do tamanho de partículas de fumarato de tenofovir desoproxila.



Os valores dos percentis da distribuição de tamanho [d(0,1), d(0,5) e d(0,9)] foram calculados, pelo software Mastersizer 2000™ versão 5,60 e referem-se, respectivamente, à média dos diâmetros de partículas nos intervalos abaixo de 10, 50 e 90% na curva de distribuição de tamanho. A partir desses dados, calculou-se o índice de polidispersão para o tamanho das partículas dos insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF (**Tabela 7**). O cálculo é realizado pela diferença entre d(0,9) e d(0,1), seguido de divisão por d(0,5). Esse índice representa a variação do tamanho de partícula de determinada matéria-prima em relação a sua média. Isso indica o quão dispersos os tamanhos das partículas estão em relação ao valor central (PINTO, 2012).

Tabela 7 - Resultados obtidos de distribuição média dos diferentes tamanhos de partículas para efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Insumo farmacêutico ativo | d(0,1) ^a | d(0,5) ^a | d(0,9) ^a | Índice de polidispersão |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| Efavirenz | 0,681 | 2,093 | 4,721 | 1,930 |
| Lamivudina | 3,320 | 27,826 | 96,193 | 3,338 |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 2,366 | 28,757 | 283,607 | 9,780 |

^a d(0,1) µm, d(0,5) µm e d(0,9) µm correspondem a 10, 50 e 90% da distribuição acumulada do diâmetro da partícula, respectivamente; $n = 2$.

A distribuição média do tamanho das partículas de EFV é representada por uma curva que se aproxima de uma normal (curva de Gauss). O EFV foi o que

apresentou menor tamanho médio de partículas nos percentis 10 [d(0,1)], 50 [d(0,5)] e 90 [d(0,9)]. Como 90% das partículas analisadas possuem tamanho menor ou igual a 4,721 μm , pode-se sugerir que o insumo farmacêutico ativo está na forma micronizada.

Tipicamente, partículas com diâmetro inferior a 10 μm são consideradas micronizadas (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001). Conforme Costa *et al.* (2013), atualmente, EFV é disponível comercialmente em forma micronizada.

Pelo fato de EFV ser praticamente insolúvel em água (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), o tamanho reduzido das partículas aumenta a área superficial e, conseqüentemente, aumenta a velocidade de dissolução do insumo farmacêutico ativo (KIPPAX, 2009). O baixo índice de polidispersão de EFV demonstra a pequena variação no diâmetro das partículas, ou seja, elas são consideradas mais homogêneas.

Para 3TC, a curva da distribuição média do tamanho das partículas possui sua maior frequência (moda) na faixa de partículas de maior tamanho. O alongamento da cauda no sentido das partículas menores caracteriza a assimetria negativa da curva. Apesar de possuir uma assimetria negativa, o valor do índice de polidispersão é relativamente baixo para o insumo farmacêutico ativo, o que demonstra que as partículas possuem uma distribuição de tamanho regular.

A distribuição média do tamanho das partículas de TDF possui mais de uma moda, sendo denominada distribuição bimodal. Observa-se na **Figura 12** que existe uma moda na região das partículas de maior tamanho e outra na região das partículas de menor tamanho. O índice de polidispersão mais alto (9,780) foi encontrado para TDF, demonstrando que a homogeneidade de suas partículas encontra-se menor em relação aos outros insumos farmacêuticos ativos. A distribuição não Gaussiana do diâmetro das partículas de TDF e seu índice de polidispersão elevado são características intrínsecas do pó de TDF e não interferiram no desenvolvimento da formulação.

Verifica-se que existe discrepância entre os valores de $d(0,9)$ dos ARV. Apenas o EFV encontra-se na forma micronizada, enquanto 3TC e TDF apresentam 90% de suas partículas com tamanho inferior a 96,193 μm e 283,607 μm , respectivamente.

4.2.4 Determinação da densidade aparente e compactada dos insumos farmacêuticos ativos

O teste foi realizado conforme o método geral <616> da Farmacopeia Americana 35 ed., em que os volumes finais devem ser avaliados nas primeiras 500 batidas e, posteriormente, nas 750 batidas subsequentes. Se a diferença entre os dois volumes for inferior a 2%, o volume final após 1250 batidas é utilizado para o cálculo da densidade compactada. Devem ser repetidos incrementos de 1250 batidas até que a diferença entre os volumes seja inferior a 2% (THE UNITED..., 2012). As densidades, aparente e compactada, de EFV, 3TC, TDF foram determinadas em duplicata e os resultados obtidos foram expressos em relação à média (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Resultados das determinações das densidades, aparente e compactada, de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Amostra | Determinação | Massa pesada (g) | Volume (mL) | | Densidade (g/mL) | |
|---------|--------------|------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|
| | | | inicial (V0) | final (Vf) | aparente | compactada |
| EFV | 1 | 15,0 | 82,0 | 42,0 | 0,183 | 0,357 |
| | 2 | 15,0 | 82,0 | 41,0 | 0,183 | 0,366 |
| | Média | 15,0 | 82,0 | 41,5 | 0,183 | 0,362 |
| 3TC | 1 | 32,0 | 52,0 | 34,5 | 0,615 | 0,928 |
| | 2 | 31,0 | 51,0 | 33,0 | 0,620 | 0,939 |
| | Média | 31,5 | 51,5 | 33,75 | 0,617 | 0,933 |
| TDF | 1 | 30,0 | 59,0 | 37,5 | 0,510 | 0,800 |
| | 2 | 30,0 | 57,0 | 37,0 | 0,530 | 0,810 |
| | Média | 30,0 | 58,0 | 37,25 | 0,520 | 0,850 |

Legenda: EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila.

O pó de EFV precisou ser submetido mais três vezes ao procedimento de 1250 batidas para que a diferença entre os volumes fosse inferior a 2%. 3TC e TDF

foram submetidos apenas uma vez a 1250 batidas, para que a diferença entre os volumes antes e depois fosse inferior a 2%.

Os resultados apresentados na **Tabela 8** demonstram que o pó de EFV apresenta baixa densidade (0,362 g/mL), o que reflete diretamente nas propriedades de fluidez do pó. Dos três insumos farmacêuticos ativos, a 3TC é o que apresenta maior densidade (0,933 g/mL).

4.2.5 Determinação da fluidez dos insumos farmacêuticos ativos pelo método do ângulo de repouso

A fluidez dos pós foi caracterizada conforme a escala padronizada no método geral, apêndice XVIII, da Farmacopeia Britânica (BRITISH..., 2011) e no método geral <1174> da Farmacopéia Americana 35 ed. (THE UNITED..., 2012). No **Quadro 6** estão descritas as classificações do fluxo de acordo com o ângulo de repouso. Quanto maior o ângulo de repouso obtido experimentalmente, mais baixa é a propriedade do fluxo do pó em análise.

Quadro 6 - Ângulo de repouso como indicação das propriedades de fluxo.

| Propriedades do Fluxo | Ângulo de repouso (α) |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Excelente | 25-30° |
| Bom | 31-35° |
| Razoável – não necessita ajuste | 36-40° |
| Passável – necessita de ajuste | 41-45° |
| Pobre – tem que agitar, vibrar | 46-55° |
| Muito baixa | 56-65° |
| Muito, muito baixa | > 66° |

Fonte: BRITISH..., 2011; THE UNITED..., 2012.

Os resultados do estudo das propriedades de fluxo dos insumos farmacêuticos ativos pelo método do ângulo de repouso estão demonstrados na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Propriedades de fluxo de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Insumo farmacêutico ativo | Altura média (H) cm | Raio (R) cm | Tang α | α° |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|---------------|----------------|
| Efavirenz | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Lamivudina | 1,8 | 5,01 | 0,36 | 19,80 |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Como se pode observar, 3TC apresenta alta fluidez e é classificada em relação às propriedades do fluxo como “excelente”. EFV e TDF não apresentaram fluidez ficando retidos no funil.

4.3 Caracterização dos pós dos grânulos e da mistura final

As propriedades dos pós influenciam o desempenho do processo de produção de formas farmacêuticas sólidas, incluindo a compressibilidade. Essas propriedades são inter-relacionadas e uma mudança em uma propriedade do pó afeta diretamente a outra (PATEL, KAUSHAL e BANSAL, 2006). No contexto da tecnologia analítica de processo é necessário primeiro conhecer a amostra para, posteriormente, projetar o método de monitoramento das partículas (BURGESS *et al.*, 2004).

4.3.1 Análise granulométrica por tamisação dos grânulos

Tamisação é um dos métodos mais antigos para classificação de pós e granulados pela distribuição do tamanho das partículas (UNITED..., 2012). A determinação da distribuição granulométrica dos grânulos secos e normalizados é uma etapa importante para a indústria de medicamentos, influenciando diretamente nos processos de mistura e de enchimento das matrizes, bem como influencia na velocidade de dissolução do insumo farmacêutico ativo granulado e, conseqüentemente, em sua biodisponibilidade (BRANDÃO *et al.*, 2008).

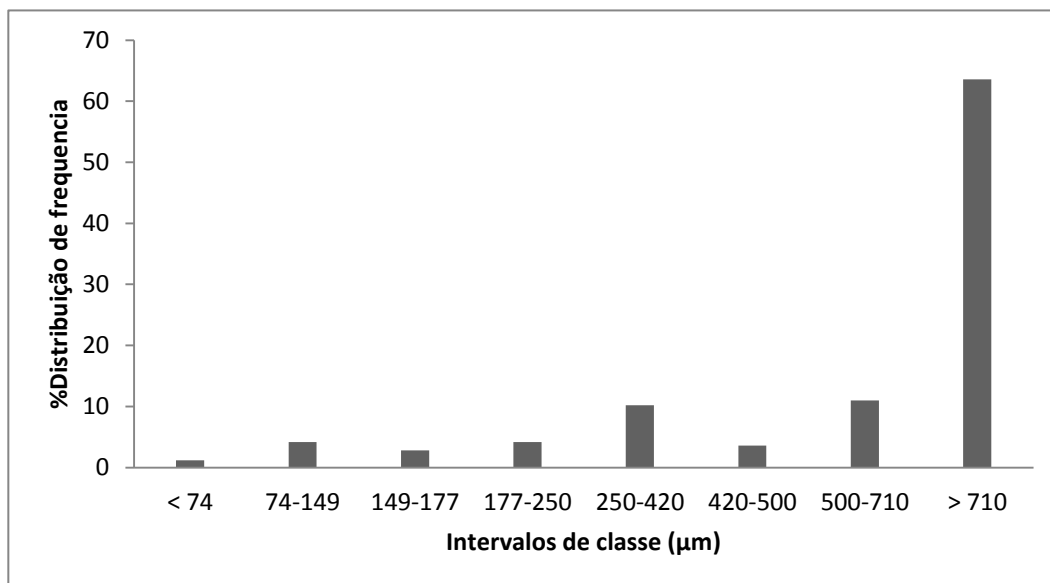
O método para determinar a distribuição dos tamanhos de partícula por tamisação envolve o uso de um conjunto de tamises sobrepostos em ordem decrescente em que o pó é colocado no tamis situado acima e, após agitação, a quantidade de pó retida sobre cada um deles é pesada (ALLEN, POPOVICH e ANSEL, 2007). Os dados de tamisação dos grânulos secos e normalizados estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Distribuição média por frequência do tamanho dos grânulos secos e normalizados, e quantidade (gramas) de grânulos retidos por abertura de malha.

| Distribuição por frequência | | Grânulos secos (valores em média) | | | Grânulos normalizados (valores em média) | | |
|-----------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------|-----------|---|-------------------|-----------|
| Abertura de malha | | Retido (g) | Granulometria (%) | | Retido (g) | Granulometria (%) | |
| μm | nº Mesh | | individual | acumulada | | individual | acumulada |
| < 74 | > 200 | 0,30 | 1,20 | 100,8 | 0,90 | 3,60 | 99,8 |
| 74 – 149 | 100 - 200 | 1,05 | 4,20 | 99,60 | 2,55 | 10,20 | 96,20 |
| 149 – 177 | 80-100 | 0,70 | 2,80 | 95,40 | 1,20 | 4,80 | 86,00 |
| 177 – 250 | 60-80 | 1,05 | 4,20 | 92,60 | 1,80 | 7,20 | 81,20 |
| 250 – 420 | 40-60 | 2,55 | 10,20 | 88,40 | 3,95 | 15,80 | 74,00 |
| 420 – 500 | 35-40 | 0,90 | 3,60 | 78,20 | 1,50 | 6,00 | 58,20 |
| 500 - 710 | 25-35 | 2,75 | 11,0 | 74,60 | 4,55 | 18,20 | 52,20 |
| > 710 | < 25 | 15,90 | 63,60 | 63,60 | 8,50 | 34,00 | 34,00 |

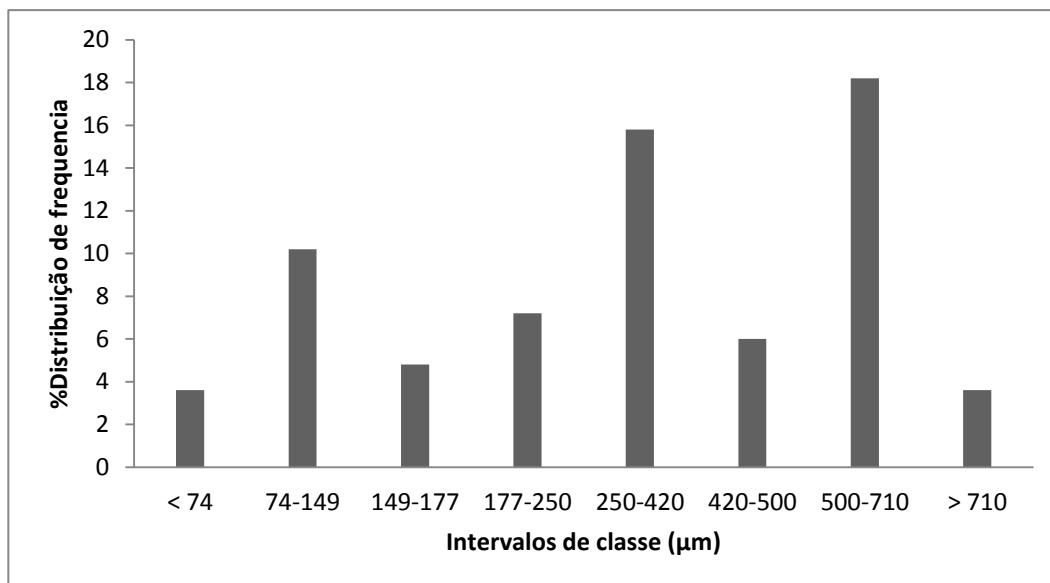
A distribuição do tamanho dos grânulos secos evidenciou que 63,60% dos grânulos possuem tamanho maior que 710 μm , o que resulta na obtenção de grânulos mais homogêneos (**Figura 13**).

Figura 13 – Distribuição de frequência do tamanho dos grânulos secos por tamisação.



Conforme se observa no histograma dos grânulos normalizados (**Figura 14**), a distribuição do tamanho dos grânulos não é uniforme.

Figura 14 – Distribuição de frequência do tamanho dos grânulos normalizados por tamisação.



A distribuição do tamanho dos grânulos normalizados é menos homogênea. Isso já era esperado uma vez que os grânulos são normalizados após a secagem e ocorre a formação de partículas finas decorrentes da quebra dos granulados secos.

A caracterização dos grânulos produzidos para o lote piloto 3 da Formulação 2, estabelece um padrão de qualidade até essa fase do processo, uma vez que mudanças na distribuição do tamanho dos grânulos, no conteúdo final da mistura, na friabilidade e na compressibilidade dos grânulos podem influenciar fortemente as propriedades dos comprimidos finais, tais como dureza, friabilidade, tempo de desintegração, % de dissolução do insumo farmacêutico ativo, etc. (LEUENBERGER, 2001).

4.3.2 Determinação da densidade aparente e compactada da mistura final de pós

As densidades, aparente e compactada, da mistura final dos pós foram determinadas em duplicata utilizando 25 g da amostra e os resultados obtidos foram expressos em relação à média (**Tabela 11**).

Tabela 11 – Resultados das determinações das densidades, aparente e compactada, da mistura final dos pós.

| Amostra | Determinação | Massa pesada (g) | Volume (mL) | | Densidade (g/mL) | |
|--------------|--------------|------------------|--------------|-------------|------------------|--------------|
| | | | inicial (V0) | final (Vf) | aparente | compactada |
| Mistura | 1 | 25,0 | 55,0 | 38,0 | 0,450 | 0,660 |
| final | 2 | 25,0 | 57,0 | 39,0 | 0,440 | 0,640 |
| Média | | 25,0 | 56,0 | 38,5 | 0,445 | 0,650 |

O pó da mistura final foi submetido a mais 1250 batidas, totalizando 2500 batidas, para que a diferença entre os volumes antes e depois fosse inferior a 2%. Conforme os resultados apresentados, o pó da mistura final apresenta densidade compactada praticamente duas vezes maior que a densidade de EFV (0,362 g/mL), significando que a granulação do insumo farmacêutico ativo contribuiu para melhorar a densidade final.

4.3.3 Determinação da fluidez dos grânulos e da mistura final dos pós pelo método do ângulo de repouso

Os resultados do estudo das propriedades de fluxo para os grânulos normalizados e para a mistura final dos pós estão demonstrados na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Propriedades de fluxo para os produtos intermediários.

| Produtos intermediários | Altura média (H) cm | Raio (R) cm | Tang α | α° |
|-------------------------|---------------------|-------------|---------------|----------------|
| Grânulo normalizado | 2,5 | 5,01 | 0,50 | 26,56 |
| Mistura final | 2,6 | 5,01 | 0,52 | 27,47 |

Os ângulos de repouso dos grânulos normalizados e da mistura final dos pós estão compreendidos entre 25-30°, sendo ambos classificados quanto às propriedades de fluxo como “excelente” (BRITISH..., 2011; THE UNITED..., 2012).

O bom fluxo de um pó é essencial para garantir o completo preenchimento da matriz durante a compressão. O aumento na proporção de finos, mistura em excesso, lubrificantes e carga eletrostática podem contribuir para tornar os fluxos dos pós mais pobres (PATEL, KAUSHAL e BANSAL, 2006).

4.4 Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos preparados

4.4.1 Determinação de peso

Nesse ensaio, pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados (**Quadro 7**) e nenhuma unidade poderá estar acima ou abaixo do dobro da porcentagem do limite de variação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Quadro 7 – Limites de variação de peso para comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas.

| Peso médio | Limites de variação |
|-----------------------------------|---------------------|
| 80 mg ou menos | $\pm 10,0\%$ |
| Mais que 80 mg e menos que 250 mg | $\pm 7,5\%$ |
| 250 mg ou mais | $\pm 5,0\%$ |

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

Os resultados da determinação de peso dos comprimidos preparados estão apresentados na **Tabela 13**. Considerando o valor de peso médio dos comprimidos, o limite de variação permitido para Formulação 1 foi de $\pm 7,5\%$ e para as outras foi de $\pm 5,0\%$. Para o lote piloto 3 da Formulação 2, a determinação de peso foi realizada para os comprimidos revestidos e não revestidos, com intuito de conhecer o ganho de massa do comprimido após o revestimento. O ganho de massa em decorrência do revestimento pelicular foi de 9,24 mg. Todas as formulações cumpriram com os requisitos do teste.

Tabela 13 – Resultados para a determinação de peso das formulações dos comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Formulação / Lote piloto | Comprimido | Peso médio (mg) <i>n</i> = 20 | %DPR | Desvio observado (%) | |
|-----------------------------|----------------|-------------------------------------|------|-------------------------|--------|
| | | | | mínimo | máximo |
| 1 | não revestidos | 248,32 | 1,71 | -2,57 | 2,73 |
| 2 / 1 | não revestidos | 250,75 | 1,41 | -2,95 | 2,33 |
| 2 / 2 | não revestidos | 252,60 | 1,33 | -3,78 | 2,33 |
| 2 / 3 | não revestidos | 250,85 | 1,36 | -2,67 | 2,30 |
| | revestidos | 260,09 | 1,37 | -3,10 | 2,60 |

4.4.2 Teste de dureza e friabilidade

Os comprimidos devem possuir resistência ao esmagamento e não serem frágeis para suportarem os choques mecânicos durante o manuseio, produção, embalagem ou transporte. Um comprimido com uma dureza adequada e uma friabilidade reduzida são requisitos necessários para que seja aceito pelos pacientes (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001).

A relação entre dureza e desintegração com a velocidade de dissolução do insumo farmacêutico ativo é particularmente importante para comprimidos contendo insumos farmacêuticos ativos que apresentam problemas de biodisponibilidade (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001). O teste de dureza consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho que meça a força, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. Esse teste permite

determinar a resistência ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial (FARMACOPEIA BRASILEIRA..., 2010).

Os resultados do teste de dureza são apenas de caráter informativo conforme recomendação farmacopeica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os valores obtidos no teste de dureza estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Resultados do teste de dureza para as formulações dos comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Formulação / Lote piloto | Valor médio (N) <i>n</i> = 10 | Valor mínimo observado (N) | Valor máximo observado (N) |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 / 1 | 106,1 | 89 | 129 |
| 2 / 1 | 105,3 | 87 | 117 |
| 2 / 2 | 154,0 | 136 | 167 |
| 2 / 3 | 112,7 | 104 | 119 |

Legenda: N = Newton

As variações na dureza e na espessura de um comprimido estão relacionadas ao enchimento da matriz e à força de compressão empregada (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001). Comprimidos destinados à liberação imediata de insumos farmacêuticos ativos devem ser suficientemente duros para resistir à ruptura durante o manuseio e frágeis o bastante para se desintegrarem após a ingestão (ALLEN, POPOVICH e ANSEL, 2007). O teste de dureza dos comprimidos é importante durante o processo de produção, pois, uma vez especificado, constitui um parâmetro de controle em processo e influencia nas características de friabilidade, desintegração e dissolução da forma farmacêutica sólida.

Comprimidos que tendem a liberar pó, lascas ou fragmentar-se quando manuseados, produzidos, revestidos ou embalados, podem apresentar problemas nos testes de determinação de peso e uniformidade de conteúdo. O teste de friabilidade permite determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica (FARMACOPEIA BRASILEIRA..., 2010).

Os resultados obtidos no teste de friabilidade estão demonstrados na **Tabela 15**. O teste de friabilidade não foi realizado para a Formulação 1 devido a quantidade insuficiente de comprimidos. Para os lotes pilotos da Formulação 2, os comprimidos cumpriram com a especificação do teste, uma vez que a porcentagem de perda de peso foi inferior a 1,5% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Tabela 15 – Resultados do teste de friabilidade para as formulações dos comprimidos contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Formulação / Lote piloto | Peso* (g) | Peso após (g) | Diferença entre os pesos (g) | Perda de peso (%) |
|--------------------------|-----------|---------------|------------------------------|-------------------|
| 2 / 1 | 5,043 | 5,042 | 0,001 | 0,02 |
| 2 / 2 | 5,243 | 5,242 | 0,001 | 0,02 |
| 2 / 3 | 5,016 | 5,013 | 0,003 | 0,06 |

* equivalente a 20 comprimidos.

A determinação da friabilidade é um parâmetro importante durante o preparo da formulação, uma vez que no processo de revestimento os comprimidos rolam e sofrem queda no interior da drageadeira e a integridade deles deve ser mantida nessa última etapa.

4.4.3 Teste de desintegração

O teste de desintegração se faz necessário para verificar a capacidade da forma farmacêutica de desintegrar-se no meio de imersão, disponibilizando os insumos farmacêuticos ativos para serem solubilizados no fluido biológico para, posteriormente, serem absorvidos.

O teste de desintegração foi realizado para os comprimidos não revestidos das formulações 1 e 2 (lotes pilotos 1, 2 e 3) e para os comprimidos revestidos do lote piloto 3 da Formulação 2. Os valores encontrados para o tempo de desintegração foram inferiores a 10 minutos, o que cumpre com a especificação do teste cujo limite máximo é de 30 minutos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.4.4 Teor dos comprimidos

O teste de teor de cada insumo farmacêutico ativo no comprimido foi realizado utilizando o método de quantificação desenvolvido e validado para determinação de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC (Capítulo 3). Os resultados de teor para EFV, 3TC e TDF nas formulações preparadas estão apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Teores de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila para as formulações dos comprimidos em dose fixa combinada.

| Formulação / Lote piloto | %Teor (%DPR) | | |
|--------------------------|---------------|---------------|-----------------------------------|
| | Efavirenz | Lamivudina | Fumarato de tenofovir desoproxila |
| 1 / 1 | 74,31 (1,34) | 137,32 (2,49) | 125,18 (2,14) |
| 2 / 1 | 80,81 (1,21) | 98,53 (0,67) | 93,81 (1,08) |
| 2 / 2 | 106,54 (1,25) | 91,71 (0,82) | 94,79 (0,97) |
| 2 / 3 | 102,28 (0,54) | 96,05 (0,44) | 94,03 (0,99) |

A especificação de 90,0% a 110,0% para teor de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC, foi adotada com base no limite de perda estabelecido para o teste de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005) e monografias farmacopeicas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; THE INTERNATIONAL..., 2013; THE UNITED..., 2012).

Os comprimidos da Formulação 1 tiveram os teores dos insumos farmacêuticos ativos fora dos limites estabelecidos, sendo para EFV menor que 90,0% e para 3TC e TDF maior que 110,0%. O lote piloto 1 da Formulação 2 foi reprovado pois o teor de EFV foi abaixo de 90,0%. Os teores dos lotes pilotos 2 e 3 da Formulação 2 apresentaram valores dentro do limite de 90,0% a 110,0% para todos os insumos farmacêuticos ativos e, portanto, foram as formulações aprovadas pela análise de teor dos insumos farmacêuticos ativos nos comprimidos em DFC.

4.4.5 Uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de doses unitárias foi realizada pelo método de uniformidade de conteúdo. Conforme o método oficial, apenas o EFV poderia ser analisado tanto por variação de peso quanto por uniformidade de conteúdo. O método por uniformidade de conteúdo foi utilizado por permitir determinar o teor real dos insumos farmacêuticos ativos nas 10 unidades de comprimidos testados.

Os valores individuais dos teores de EFV, 3TC e TDF para os lotes pilotos de comprimidos da Formulação 2 estão apresentados nas **Tabelas 17 a 19**, respectivamente.

Tabela 17 – Valores de teor de efavirenz para os lotes pilotos dos comprimidos da Formulação 2 contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Unidade | Teor de efavirenz (%) | | |
|----------------------|-----------------------|---------------|---------------|
| | Lote piloto 1 | Lote piloto 2 | Lote piloto 3 |
| 1 | 82,36 | 102,77 | 106,63 |
| 2 | 87,09 | 102,95 | 107,26 |
| 3 | 83,81 | 105,59 | 101,25 |
| 4 | 82,20 | 103,74 | 106,97 |
| 5 | 81,00 | 107,92 | 102,32 |
| 6 | 89,00 | 105,20 | 113,34 |
| 7 | 79,13 | 111,14 | 102,01 |
| 8 | 80,66 | 98,48 | 104,63 |
| 9 | 82,88 | 100,06 | 107,19 |
| 10 | 88,36 | 114,19 | 100,76 |
| Média | 83,87 | 103,76 | 105,24 |
| s | 3,39 | 4,81 | 3,85 |
| VA (n = 10) | 22,77 | 13,8 | 12,99 |
| VA (n = 30) 2º passo | - | 16,3 | - |

Legenda: s = desvio padrão; VA = valor de aceitação

Tabela 18 – Valores de teor de lamivudina para os lotes pilotos dos comprimidos da Formulação 2 contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Unidade | Teor de lamivudina (%) | | |
|----------------------|------------------------|---------------|---------------|
| | Lote piloto 1 | Lote piloto 2 | Lote piloto 3 |
| 1 | 102,38 | 105,92 | 99,14 |
| 2 | 100,28 | 100,93 | 102,09 |
| 3 | 103,79 | 101,46 | 102,36 |
| 4 | 98,61 | 103,75 | 100,51 |
| 5 | 103,00 | 98,87 | 102,49 |
| 6 | 96,87 | 100,84 | 93,19 |
| 7 | 103,37 | 96,01 | 101,46 |
| 8 | 102,17 | 111,24 | 85,84 |
| 9 | 103,74 | 108,31 | 99,49 |
| 10 | 100,06 | 90,36 | 105,28 |
| Média | 101,27 | 103,01 | 99,18 |
| s | 2,37 | 6,03 | 5,65 |
| VA (n = 10) | 5,68 | 16,0 | 13,57 |
| VA (n = 30) 2º passo | - | 17,0 | - |

Legenda: s = desvio padrão; VA = valor de aceitação

Tabela 19 – Valores de teor de fumarato de tenofovir desoproxila para os lotes pilotos dos comprimidos da Formulação 2 contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.

| Unidade | Teor de fumarato de tenofovir desoproxila (%) | | |
|----------------------|---|---------------|---------------|
| | Lote piloto 1 | Lote piloto 2 | Lote piloto 3 |
| 1 | 101,84 | 99,12 | 98,24 |
| 2 | 104,03 | 97,33 | 94,22 |
| 3 | 98,78 | 103,21 | 104,09 |
| 4 | 95,08 | 95,84 | 94,64 |
| 5 | 104,57 | 103,18 | 100,52 |
| 6 | 100,79 | 101,23 | 102,22 |
| 7 | 102,61 | 97,61 | 103,23 |
| 8 | 109,38 | 102,72 | 97,01 |
| 9 | 100,63 | 97,03 | 91,26 |
| 10 | 100,86 | 93,25 | 98,38 |
| Média | 99,93 | 98,87 | 98,38 |
| s | 3,78 | 3,43 | 4,21 |
| VA (n = 10) | 9,06 | 8,2 | 10,10 |
| VA (n = 30) 2º passo | - | 9,7 | - |

Legenda: s = desvio padrão; VA = valor de aceitação

Os comprimidos cumprem com o teste de uniformidade de conteúdo se o valor de aceitação calculado para as 10 unidades testadas não for maior que 15 (L1). Se o valor de aceitação for maior que L1, mais 20 unidades deverão ser testadas e o valor de aceitação é calculado para 30 unidades. O produto cumpre o teste se o valor de aceitação para as 30 unidades testadas não for maior que L1 e se a quantidade de insumo farmacêutica ativo de nenhuma unidade individual for menor que $(1 - L2 \times 0,01)M$ ou maior que $(1 + L2 \times 0,01)M$, em que L2 é igual a 25 e M refere-se ao valor de referência descrito no método geral e dependente da média dos conteúdos individuais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A uniformidade de conteúdo não foi realizada para a Formulação 1, uma vez que não havia comprimidos suficientes para a execução do teste. O lote piloto 1 da Formulação 2 não foi aprovado no teste, pois o VA para EFV foi superior a 15,0 e para o lote piloto 2, 3TC não passou na análise de uniformidade de conteúdo no primeiro passo. Como o valor do VA para 3TC estava no limite, o segundo passo do teste foi realizado. Desse modo, quantificou-se os insumos farmacêuticos ativos em mais 20 comprimidos e um VA para 30 comprimidos foi calculado. No segundo passo do teste, o VA para 3TC foi maior que L1 reprovando a formulação. O lote piloto 3 da Formulação 2 foi aprovado para o teste de uniformidade de conteúdo para EFV, 3TC e TDF no primeiro passo.

4.4.6 Teste de dissolução

4.4.6.1 Condições sink

No desenvolvimento de um procedimento de dissolução, é desejável alcançar as condições *sink* do insumo farmacêutico ativo no meio. As condições *sink* normalmente ocorrem em um volume de meio de dissolução três a dez vezes superior ao volume necessário para obter solução saturada do insumo farmacêutico ativo (BRITISH..., 2011). Quando alcançada, os resultados da dissolução refletem melhor as propriedades da formulação (THE UNITED STATES..., 2012).

O uso de aparatos como cestas, pás e cilindros recíprocos, geralmente, baseia-se no princípio de operação em condições *sink*, isto é, em condições tais que o material que já está solubilizado não exerça uma modificação significativa na taxa de dissolução do material remanescente. Sob condições *sink*, a concentração de um insumo farmacêutico ativo pouco solúvel no meio de dissolução é essencialmente constante.

As solubilidades de EFV em lauril sulfato de sódio 1 e 2% (p/v) foram superiores a concentração correspondente à condição *sink* (Tabela 20). Ao contrário, a condição não foi alcançada em água e em HCl 0,1 M, devido a baixa solubilidade do insumo farmacêutico ativo nesses meios.

Tabela 20 – Solubilidade de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila nas soluções saturadas em água, HCl 0,1 M e lauril sulfato de sódio 1% e 2% p/v.

| Insumo farmacêutico ativo | Concentração na condição <i>sink</i> (mg/mL) | Concentração experimental (mg/mL) | | | |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-----------|------------|------------|
| | | Água | HCl 0,1 M | LSS 1% p/V | LSS 2% p/V |
| Efavirenz | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 1,5 | 1,5 |
| Lamivudina | 0,2 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 0,2 | 0,6 | 1,0 | 0,6 | 1,0 |

Em todos os meios, a concentração experimental de 3TC foi superior àquela mínima para se atingir a condição *sink* (0,2 mg/mL). Apesar de não ter alcançado a concentração máxima em água e em lauril sulfato de sódio a 1% (p/v), a condição *sink* também esteve presente para TDF nos quatro meios testados.

Dessa forma, o volume de 500 mL de meio, proposto para a construção do perfil de dissolução, é capaz de garantir a solubilização completa de 3TC e TDF em água, HCl 0,1 M e lauril sulfato de sódio nas concentrações de 1 e 2% (p/v). Como esperado, o EFV não foi completamente solúvel em água e em HCl 0,1 M devido à sua característica hidrofóbica e seu comportamento ácido, que

mantém a molécula do insumo farmacêutico ativo na forma não ionizada quando presente em soluções de pH reduzido.

4.4.6.2 Perfis de dissolução dos comprimidos

Os testes de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas de liberação imediata, cápsulas ou comprimidos, são empregados para assegurar a qualidade do produto lote a lote; guiar o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas; garantir a qualidade contínua do produto e seu desempenho após modificações nas formulações, no processo de fabricação, no local de fabricação e no aumento da escala do processo industrial (U.S. FOOD..., 1997).

Perfis de dissolução de formas farmacêuticas de liberação imediata demonstram tipicamente um aumento gradual de dissolução, alcançando 85% a 100% em cerca de 30 a 45 minutos. Assim, os pontos de coleta nos tempos de 15, 20, 30, 45 e 60 minutos são usuais para comprimidos de liberação imediata (SHARMA, NEERAJ e JAIN, 2012). Normalmente, o volume do meio de dissolução é de 500 mL a 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais comum (THE UNITED..., 2012). O teste de dissolução deve ser realizado a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C (U.S. FOOD..., 1997).

Os perfis de dissolução foram obtidos a partir de seis unidades dos comprimidos do lote piloto 3 da Formulação 2 e traçados com os valores médios das quantidades liberadas de EFV, 3TC e TDF nos intervalos de tempo de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. As análises foram realizadas em 500 mL dos seguintes meios: água purificada (pH = 6,1), HCl 0,1 M e lauril sulfato de sódio a 1% e 2% (p/v). Todos os meios foram mantidos a $37 \pm 0,5$ °C e com sistema de agitação por pás a 100 rpm.

Os perfis de dissolução de EFV (**Figura 15**) demonstraram a rápida liberação e dissolução do insumo farmacêutico ativo nos meios contendo lauril sulfato de sódio, atingindo patamares máximos em aproximadamente 15 min de teste. Ao contrário, a dissolução não foi eficiente em água e em HCl 0,1 M. Após 60

minutos, a quantidade dissolvida foi nula em água e abaixo de 10% em HCl 0,1 M (Tabela 21), devido a baixa solubilidade do insumo farmacêutico ativo nesses meios.

Figura 15 – Perfil de dissolução de efavirenz, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm.

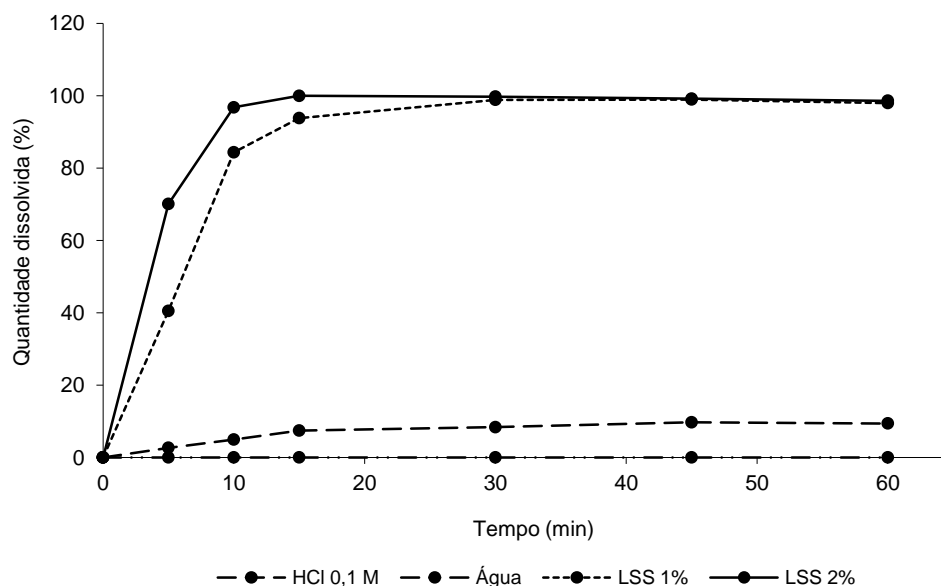


Tabela 21 - Valores médios e desvios padrão da dissolução de efavirenz, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm.

| Tempo (min) | % Média da quantidade dissolvida (\pm desvio padrão) | | | |
|-------------|---|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | Água ($n = 6$) | HCl 0,1 M ($n = 6$) | LSS 1% p/v ($n = 6$) | LSS 2% p/v ($n = 6$) |
| 5 | 0,00 | 2,66 (0,40) | 40,48 (10,62) | 70,05 (9,92) |
| 10 | 0,00 | 4,93 (1,31) | 84,32 (4,71) | 96,74 (2,80) |
| 15 | 0,00 | 7,42 (0,80) | 93,77 (1,34) | 99,92 (1,55) |
| 30 | 0,00 | 8,35 (1,68) | 98,84 (1,99) | 99,72 (1,87) |
| 45 | 0,00 | 9,70 (0,04) | 98,93 (2,25) | 99,15 (1,72) |
| 60 | 0,00 | 9,40 (0,33) | 97,95 (3,04) | 98,59 (1,75) |

O EFV é lipofílico e sua liberação é o principal fator limitante do processo de absorção oral. *In vivo*, o processo de dissolução depende de parâmetros físico-químicos, que podem ser afetados pelas condições intraluminais do trato gastrointestinal. *In vitro*, a dissolução depende do insumo farmacêutico ativo

contido no produto e das condições do teste de dissolução, tais como a composição e o volume do meio de dissolução, o pH, o tipo de aparato e a velocidade de agitação (NOORY *et al.*, 2000).

O uso de tensoativos em meios de dissolução para insumos farmacêuticos ativos insolúveis em água pode ser mais fisiologicamente significativo devido à presença natural de tensoativos no trato gastrointestinal humano, como os ácidos biliares, os sais biliares e a lecitina. O lauril sulfato de sódio é um tensoativo aniônico sintético, solúvel em água e amplamente utilizado em testes de dissolução, em substituição aos tensoativos naturais que são mais caros. Quando presente em meio aquoso ele se dissocia e reduz a tensão superficial, agindo como ativo agente de superfície (GANDER *et al.*, 1985; SHAH *et al.*, 1989).

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) possui monografia para EFV comprimidos, cujo teste de dissolução é realizado utilizando 900 mL de lauril sulfato de sódio 1% (p/v), pás a 100 rpm e tolerância de, no mínimo, 80% (Q) da quantidade declarada em 45 minutos. Balasubramaniam e Bee (2009) e U. S. FDA (2007) recomendam o uso de 1000 mL de lauril sulfato de sódio a 2% (p/v) como meio de dissolução para EFV 600 mg comprimidos, pás a 50 rpm. Na monografia de comprimidos contendo a associação de EFV, TDF e emtricitabina, publicada na Farmacopeia Internacional 4ª edição (2013), a dissolução dos insumos farmacêuticos ativos é analisada simultaneamente em 1000 mL de lauril sulfato de sódio a 2% (p/v), com pás a 100 rpm e tolerância de, no mínimo, 80% (Q) das quantidades declaradas em 30 minutos.

Os perfis de dissolução de EFV obtidos em lauril sulfato de sódio a 1 e 2% p/v demonstraram a liberação superior a 85% (Q + 5%) do insumo farmacêutico ativo em 15 minutos (**Tabela 21**). Os resultados são considerados satisfatórios diante dos critérios de controle de qualidade estabelecidos na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) e na Farmacopeia Internacional 4ª edição (2013).

Recomenda-se a utilização da menor quantidade possível de tensoativo como meio de dissolução, pois concentrações maiores aumentam o distanciamento

da possível correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV) de formas farmacêuticas contendo insumos farmacêuticos ativos pouco solúveis (U. S. FDA, 1997). Desse modo, o uso de lauril sulfato de sódio a 1% p/v é preferível, ao compararmos com a concentração de 2% p/v, na avaliação da liberação de EFV em comprimidos de dose fixa combinada. Entretanto, a avaliação da liberação do insumo farmacêutico ativo em concentrações mais baixas de lauril sulfato de sódio é desejável. Diante da rápida liberação e dissolução do insumo farmacêutico ativo nos meios contendo tensoativo, a tolerância de 80% (Q) em 30 minutos pode ser utilizada como critério do controle de qualidade de EFV nos comprimidos preparados.

Nos perfis de dissolução de TDF (**Figura 16**), a quantidade dissolvida do insumo farmacêutico ativo é maior que 85% em 15 min do teste em água e em lauril sulfato de sódio 2% p/v (**Tabela 22**). Para lauril sulfato de sódio 1% p/v, essa condição é atingida após 30 min do início do teste.

Figura 16 – Perfil de dissolução de fumarato de tenofovir desoproxila, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm.

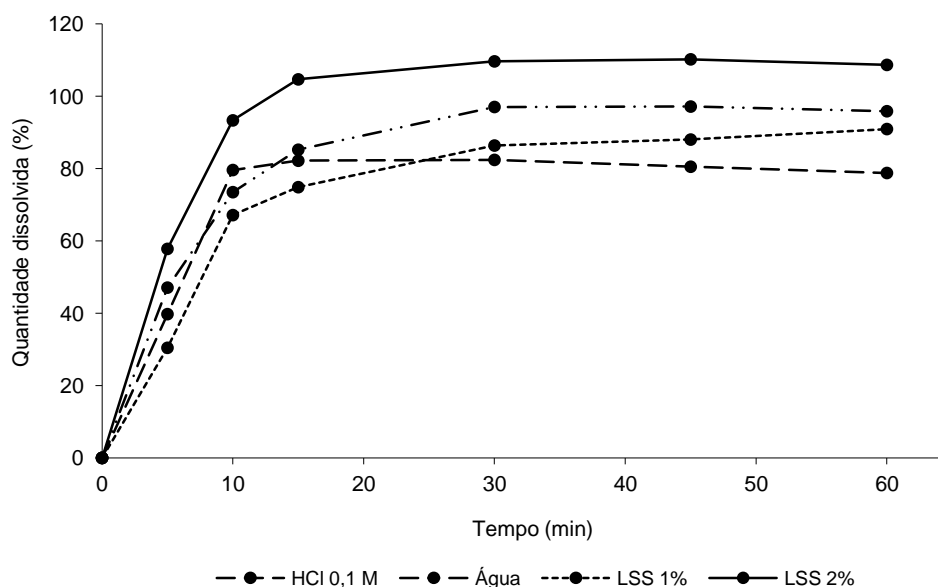


Tabela 22 - Valores médios e desvios padrão da dissolução de fumarato de tenofovir desoproxila, contido nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm.

| Tempo (min) | %Média da quantidade dissolvida (\pm desvio padrão) | | | |
|-------------|--|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Água ($n = 6$) | HCl 0,1 M ($n = 6$) | LSS 1% p/v ($n = 6$) | LSS 2% p/v ($n = 6$) |
| 5 | 47,06 (4,33) | 39,74 (6,08) | 30,43 (9,02) | 57,77 (9,05) |
| 10 | 73,44 (2,84) | 79,56 (2,95) | 67,10 (5,57) | 93,29 (3,58) |
| 15 | 85,17 (2,18) | 82,14 (2,08) | 74,82 (2,95) | 104,62 (3,55) |
| 30 | 96,99 (2,81) | 82,37 (2,19) | 86,33 (2,93) | 109,60 (3,63) |
| 45 | 97,10 (2,85) | 80,48 (1,91) | 87,98 (2,60) | 110,16 (3,56) |
| 60 | 95,81 (3,15) | 78,75 (1,91) | 90,89 (5,83) | 109,69 (3,33) |

Após 60 minutos, a quantidade dissolvida de TDF em HCl 0,1 M foi inferior a 85% do valor rotulado. Considerando que o insumo farmacêutico ativo atende às condições *sink*, conforme demonstrado experimentalmente, a dissolução reduzida pode ser atribuída às características intrínsecas da formulação, cuja liberação do insumo farmacêutico ativo é modulada na associação com EFV, 3TC e excipientes.

A Farmacopeia Internacional 4ª edição (2013) e o U. S. FDA (2007) recomendam o uso de 900 mL de HCl 0,1 M e agitação por pás a 50 rpm no teste de dissolução aplicado aos comprimidos de TDF. Nessas condições, o TDF nos comprimidos preparados não é capaz de alcançar a quantidade mínima dissolvida de 80%(Q) em 45 min. Entretanto, quando em associação com EFV e emtricitabina, a monografia publicada na Farmacopeia Internacional 4ª edição (2013) estabelece o lauril sulfato de sódio a 2% (p/v) como meio de dissolução, conforme relatado anteriormente. Nesse caso, a dissolução é considerada satisfatória e atende ao critério de tolerância de, no mínimo, 80% (Q) da quantidade declarada dissolvida em 30 minutos.

A 3TC apresentou rápida dissolução em todos os meios testados (**Figura 17**). Em 15 min de teste, mais de 85% da quantidade do insumo farmacêutico ativo foram dissolvidos nos meios

Tabela 23). Isso demonstra a liberação imediata da 3TC e sua rápida solubilização, uma vez que o insumo farmacêutico ativo é facilmente solúvel em água e em HCl 0,1 M (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 17– Perfil de dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm.

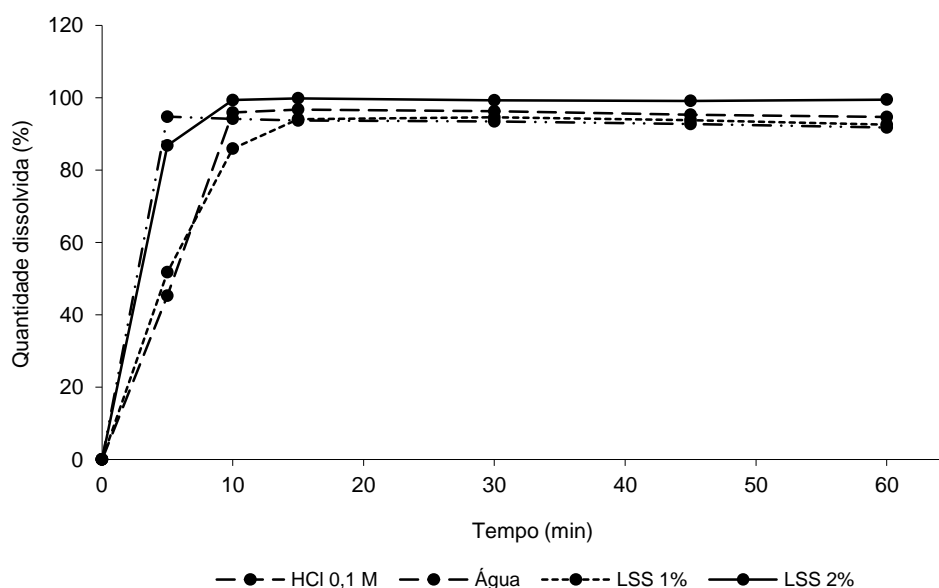


Tabela 23 - Valores médios e desvios padrão da dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em diferentes meios com agitação por pás a 100 rpm.

| Tempo (min) | %Média da quantidade dissolvida (\pm desvio padrão) | | | |
|-------------|--|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | Água ($n = 6$) | HCl 0,1 M ($n = 6$) | LSS 1% p/v ($n = 6$) | LSS 2% p/v ($n = 6$) |
| 5 | 94,71 (8,51) | 45,24 (8,20) | 51,75 (20,59) | 86,78 (13,31) |
| 10 | 94,15 (2,71) | 95,86 (2,54) | 85,91 (18,78) | 99,31 (4,31) |
| 15 | 93,66 (2,55) | 96,73 (1,68) | 94,07 (3,72) | 99,82 (4,05) |
| 30 | 93,42 (2,63) | 96,22 (1,40) | 94,52 (2,56) | 99,25 (2,37) |
| 45 | 92,70 (2,62) | 95,27 (1,55) | 93,78 (2,50) | 99,11 (2,09) |
| 60 | 91,73 (2,46) | 94,64 (1,40) | 92,54 (2,62) | 99,46 (2,11) |

A Farmacopeia Americana 35 ed., possui monografia para comprimidos de 3TC em associação com zidovudina, cujo teste de dissolução é realizado com 900 mL de HCl 0,1 M, pás a 75 rpm e tolerância de, no mínimo, 80% (Q) da quantidade dissolvida em 30 minutos (THE UNITED..., 2012). Na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), a monografia para 3TC comprimidos estabelece o

procedimento de dissolução com 900 mL de água, pás a 50 rpm e tolerância de, no mínimo, 80% (Q) de dissolução em 30 minutos. Essas condições foram experimentalmente reproduzidas, utilizando 500 mL de meio, para avaliar a liberação de 3TC nos comprimidos preparados (**Figura 18**). Os pontos dos perfis correspondem à média de seis determinações e as barras representam os respectivos desvios padrão. Na **Tabela 24** estão demonstrados os valores médios e os desvios padrão obtidos.

Figura 18– Perfil de dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em HCl 0,1 M (pás a 75 rpm) e água purificada (pás a 50 rpm).

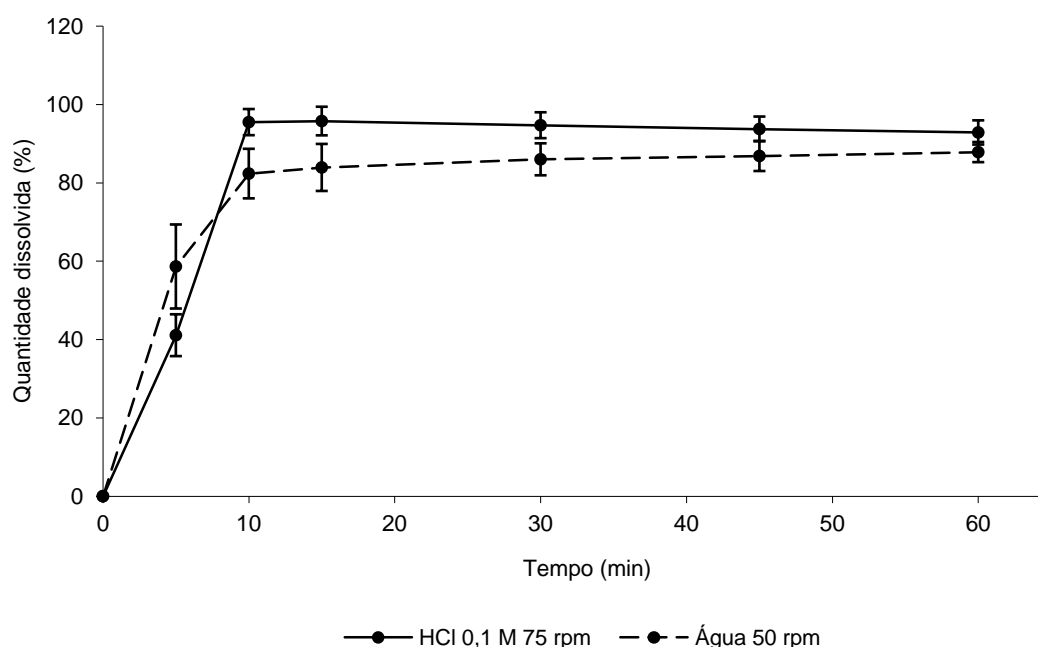


Tabela 24 - Valores médios e desvios padrão do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos comprimidos de dose fixa combinada, em HCl 0,1 M (pás a 75 rpm) e água purificada (pás a 50 rpm).

| Tempo (min) | %Média da quantidade dissolvida (\pm desvio padrão) | |
|-------------|--|--------------------|
| | HCl 0,1 M, pás a 75 rpm | Água, pás a 50 rpm |
| 5 | 41,08 (5,34) | 58,62 (10,73) |
| 10 | 95,47 (3,34) | 82,33 (6,32) |
| 15 | 95,75 (3,65) | 83,90 (6,00) |
| 30 | 94,68 (3,30) | 85,98 (4,08) |
| 45 | 93,73 (3,16) | 86,83 (3,85) |
| 60 | 92,83 (3,09) | 87,82 (2,57) |

Em 30 min do teste, observa-se mais de 85% de dissolução do insumo farmacêutico ativo em ambos os meios (**Tabela 24**). Portanto, tanto as condições descritas na Farmacopeia Americana 35 ed. (2012) quanto àquelas preconizadas na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) são adequadas para verificar o desempenho da 3TC nos comprimidos. Fernandes *et al.* (2006) compararam o uso de água purificada pH 6,2 e HCl pH 1,2 na dissolução de comprimidos de 3TC 150 mg e não verificaram diferenças significativas entre os meios.

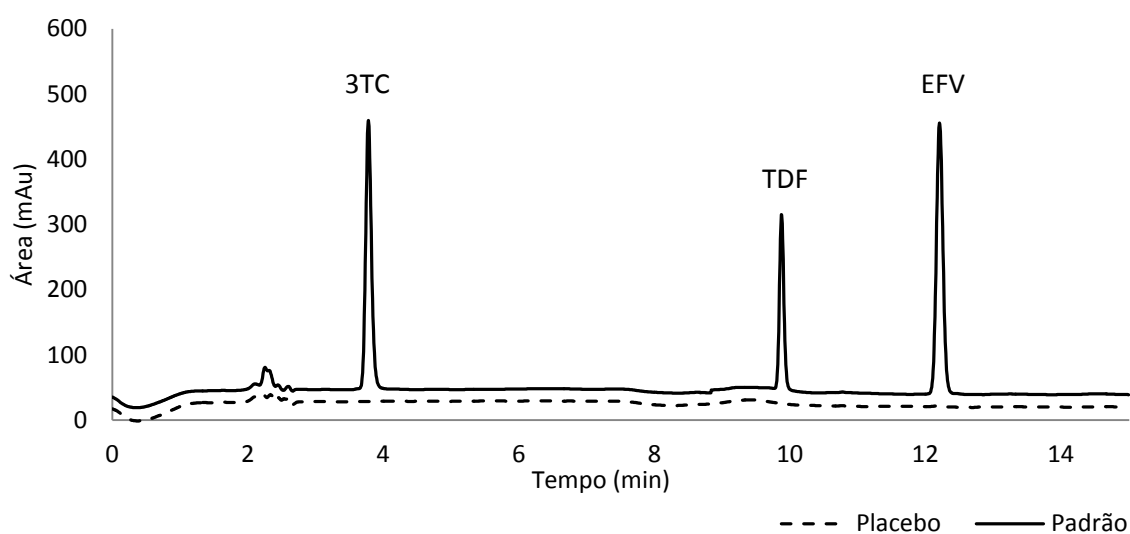
A água purificada é frequentemente utilizada como meio de dissolução, mas possui como desvantagens o fato da possível variação de sua qualidade em função da fonte de obtenção e da variação no valor de pH. Deve-se considerar também que o pH pode variar dia a dia e durante o procedimento, dependendo do insumo farmacêutico ativo e dos excipientes (SHARMA, NEERAJ e JAIN, 2012; THE UNITED..., 2012). Em contrapartida, a água é de baixo custo, facilmente disponível e eliminada, ecologicamente correta e adequada para insumos farmacêuticos ativos cuja liberação independe do pH (THE UNITED..., 2012). Por sua vez, o ácido clorídrico 0,1 M é considerado um meio típico para o teste de dissolução por simular o pH estomacal em jejum (KOZIOLEK *et al.*, 2013).

Um método para avaliação concomitante dos insumos farmacêuticos ativos no comprimido é ideal, uma vez que reduz o número de unidades testadas, otimiza o tempo de análise e o gasto de reagentes. Diante das condições testadas, a dissolução simultânea de EFV, 3TC e TDF nos comprimidos de DFC realizada em lauril sulfato de sódio 1% p/v com pás a 100 rpm resultou em condições experimentais promissoras. Testes utilizando lauril sulfato de sódio em concentrações inferiores a 1% p/v podem tornar o método mais indicativo do desempenho da liberação dos insumos farmacêuticos ativos do comprimido de DFC.

As *Soluções placebo* e *padrão*, em cada meio de dissolução, foram injetadas no cromatógrafo para verificar possíveis interferências na quantificação dos ARV. Não foram detectados picos no mesmo tempo de retenção dos insumos

farmacêuticos ativos na *Solução* placebo. Portanto, o método é seletivo para quantificar EFV, 3TC e TDF nos meios testados. Na **Figura 19** está representada a sobreposição dos cromatogramas das *Soluções placebo* e *padrão* em lauril sulfato de sódio 1% p/v, meio indicado para a análise da dissolução de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada.

Figura 19 – Sobreposição dos cromatogramas da *Solução placebo* e da *Solução padrão* preparadas com lauril sulfato de sódio a 1% (p/v).



Legenda: EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desopoxila.

CAPÍTULO 3

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO DE
TENOFVIR DESOPROXILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA
COMBINADA**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Métodos analíticos para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada

A quantificação analítica simultânea de EFV, 3TC e TDF foi descrita em poucos trabalhos científicos publicados até o momento e não foram encontradas monografias oficiais para produtos farmacêuticos, como comprimidos de DFC para a quantificação simultânea desses insumos farmacêuticos ativos. No entanto, determinações isoladas dos insumos farmacêuticos ativos e, também, conjuntamente com outros ARV por cromatografia a líquido e métodos alternativos já foram descritos por diversos autores (**Quadros 8 e 9**).

Na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) estão publicadas monografias para quantificação de EFV e 3TC matéria-prima, mas não é disponibilizada monografia para controle de qualidade de TDF matéria-prima. A quantificação de EFV e 3TC matéria-prima é realizada por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e, alternativamente, por CLAE em modo isocrático.

Na Farmacopeia Britânica (BRITISH..., 2011) existe monografia para 3TC matéria-prima cujo método de doseamento é realizado por CLAE em modo isocrático. A Farmacopeia Americana (THE UNITED..., 2012), dispõe de monografias para controle de qualidade de EFV e 3TC matéria-prima em que a quantificação é realizada por CLAE em modo gradiente para EFV e em modo isocrático para 3TC. Também, possui monografia de EFV cápsulas na qual a quantificação do insumo farmacêutico ativo é realizada por CLAE em modo gradiente. Monografias de comprimidos de 3TC e AZT em dose fixa, cujo método de quantificação é realizado por CLAE em modo gradiente, estão presentes em ambas as farmacopeias.

Quadro 8 - Métodos por CLAE com detecção no ultravioleta para quantificação de EFV, 3TC e TDF, isoladamente e em associação.

| Referências | IFA | Fase móvel | Eluição | Vazão (mL/min) | Coluna | Matriz | Detecção | T _c / t _R |
|---|--------------------------------------|---|------------|----------------|---|------------------------------|-------------|---|
| MONTGOMERY, E. R. <i>et al.</i> , 2001 | <u>EFV</u> | A (90% água com 0,05% ácido trifluoroacético + 10% MeOH) e B (90% MeOH + 10% água com 0,05% ácido trifluoroacético) | Gradiente | 1,5 | Zorbax SB-CN (150 mm x 4,6 mm); 40 °C | Cápsulas | UV, 250 nm | T _c = 40 min |
| KAPPELHOFF, B. S. <i>et al.</i> , 2003 | <u>EFV</u> e nevirapina | Trietilamina 25 mM em água: ACN (65:35, v/v; pH 11,7) | Isocrática | 0,2 | Zorbax Extend C18 (150 mm x 2,1 mm; 5 µm) | Plasma humano | UV, 275 nm | T _c = 10 min, t _R EFV = 7,8 min |
| KUMAR, R.; SHARMA, M.; VERMA, G., 2011 | <u>EFV</u> | Fosfato de amônio monobásico 0,86% p/p pH 3,0 (ajustado com ácido ortofosfórico) e ACN (1:1, v/v) | Isocrática | 1,5 | Zorbax RX C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | Matéria-prima | DAD, 252 nm | ND |
| KAPOOR, KHANDEVILLI e PANCHAGNULA, 2006 | <u>3TC</u> e nevirapina | MeOH: H ₂ O (20:80, v/v) | Isocrática | 0,6 | Symmetry C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | Comprimidos | UV, 270 nm | TC = 12 min, t _R 3TC = 8 min |
| SARKAR, KHANDEVILLI e PANCHAGNULA, 2006 | <u>3TC</u> , estavudina e nevirapina | MeOH: H ₂ O (70:30, v/v) | Isocrática | 0,75 | Symetry C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | Comprimidos | UV, 270 nm | TC = 8 min, t _R 3TC = 4,9 min |
| PAULA, N. C. <i>et al.</i> , 2006 | <u>3TC</u> | MeOH: H ₂ O (50:50, v/v) | Isocrática | 0,8 | Lichrospher [®] 100 C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); 25 °C | Matéria-prima e solução oral | UV, 270 nm | t _R 3TC = 2,5 min |

Legenda: IFA = Insumos farmacêuticos ativos; T_c = tempo de corrida; t_R = tempo de retenção; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila; DAD = detector de arranjo de diodos; ND = não declarado. /continua

Quadro 8 - Métodos por CLAE com detecção no ultravioleta para quantificação de EFV, 3TC e TDF, isoladamente e em associação. (Continuação)

| Referências | IFA | Fase móvel | Eluição | Vazão (mL/min) | Coluna | Matriz | Deteção | T _c / t _R |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---|------------|----------------|---|------------------------|------------|--|
| REBIERE, H. <i>et al.</i> , 2007 | 1º método: 8 INTR (3TC) | Tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,0 (ajustado com ácido acético) e MeOH | Gradiente | 1,0 | YMC-pack ODS-AM C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | Matéria-prima | UV, 270 nm | T _c = 60 min , t _R 3TC = 18,2 min |
| | 2º método: 11 INNTR (EFV) e IP | Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 5,65 (ajustado com NaOH) e ACN | | 1,5 | Symmetry C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | | UV, 260 nm | T _c = 50 min, t _R EFV = 27,2 min |
| PENDELA, M. <i>et al.</i> , 2009 | 3TC, zidovudina e TMC278.H Cl | ACN: 0,2 MKH ₂ PO ₄ : H ₂ O. A (10:5:85, v/v/v) e B (70:5:25, v/v/v) | Gradiente | 1,0 | Hypersil BDS C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); 30 °C | Comprimidos | UV, 270 nm | T _c = 13 min, t _R 3TC = 4,0 min |
| ASHENAFI, D. <i>et al.</i> , 2010 | TDF | ACN: tampão fosfato de tetrabutilamônio, pH 6: H ₂ O. A (2:20:78, v/v/v) e B (65:20:15, v/v/v) | Gradiente | 1,0 | Hypersil BDS C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); 30° C | Matéria-prima | UV, 260 nm | T _c = 80 min |
| KUMAR, A. K. H. <i>et al.</i> , 2010 | 3TC, nevirapina e estavudina | Tampão fosfato 10 mM, pH 6,9: ACN (96:04, v/v) | Isocrática | 1,0 | C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); TA | Cápsulas e comprimidos | UV, 260 nm | TC = 10 min, t _R 3TC = 3,0 min |

Legenda: IFA = insumos farmacêuticos ativos; T_c = tempo de corrida; t_R = tempo de retenção; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desopoxila; ND = não declarado. /continua.

Quadro 8 - Métodos por CLAE com detecção no ultravioleta para quantificação de EFV, 3TC e TDF, isoladamente e em associação. (Conclusão)

| Referências | IFA | Fase móvel | Eluição | Vazão (mL/min) | Coluna | Matriz | Deteção | T _c / t _R |
|--|-------------------------|---|------------|----------------|--|-------------|------------|---------------------------------|
| HUANG, W. <i>et al.</i> , 2011 | <u>3TC</u> e zidovudina | Tampão fosfato: MeOH (77:23, v/v) | Isocrática | 1,0 | Inertsil C 18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | Comprimidos | UV, 270 nm | ND |
| VIANA, O. S. <i>et al.</i> , 2011 | <u>EFV</u> | ACN: H ₂ O: 85% H ₃ PO ₄ (70:30:0,1, v/v/v) | Isocrática | 1,0 | C18 (250 mm x 4,0 mm; 10 µm); 30 °C | Comprimidos | UV, 252 nm | t _R = 5,08 min |
| REDDIAH, C. H. V. <i>et al.</i> , 2012 | <u>EFV, 3TC e TDF</u> | A: 1,54 g de acetato de amônio diluído em 1 L de água, pH 3,8 B: ACN:MeOH (40:60, v/v) | Gradiente | 1,5 | ACE C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), 30 °C | Comprimidos | UV, 265 nm | T _c = 120 min |
| SHARMA, T. <i>et al.</i> , 2012 | <u>TDF</u> | Tampão dihidrogeno ortofosfato pH 2,3 e MeOH (49:51, v/v) | Isocrática | 1,0 | Inertsil ODS-3 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) | Comprimidos | UV, 260 nm | T _c = 13 min |

Legenda: IFA = insumos farmacêuticos ativos; T_c = tempo de corrida; t_R = tempo de retenção; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila; ND = não declarado.

Quadro 9 - Métodos quantitativos alternativos para quantificação de EFV, 3TC e TDF, isoladamente e em associação.

| Referências | IFA | Diluyente | Método | Parâmetros | Matriz |
|---|--------------------------------------|--|--|---|-----------------------------|
| KAUL, N. <i>et al.</i> , 2004 | <u>3TC</u> | Tetracloroeto de carbono: MeOH: clorofórmio: ACN (7,0: 3,0: 2,0: 1,5, v/v/v/v) | Cromatografia em camada delgada | Cromatoplaca sílica-alumina 60 F-254 (20 cm x10 cm); λ leitura: 275 nm; Rf = 0,36 \pm 0,02. | Matéria-prima e comprimidos |
| KAPOOR, KHANDEVILLI e PANCHAGNULA, 2006 | <u>3TC</u> e nevirapina | HCl 0,1 M | Espectrofotometria no UV, 1ª derivada | λ leitura: 300 nm 3TC | Comprimidos |
| PAULA, N. C. <i>et al.</i> , 2006 | <u>3TC</u> | Azul de timol: etanol (9:1, v/v; pH 5,0) | Espectrofotometria no UV com complexação | λ leitura: 270 nm | Matéria-prima |
| SARKAR, KHANDEVILLI e PANCHAGNULA, 2006 | <u>3TC</u> , estavudina e nevirapina | HCl 0,1 M | Espectrofotometria no UV | λ leitura: 270 nm | Comprimidos |
| KUMAR, A. K. H. <i>et al.</i> , 2010 | <u>3TC</u> , nevirapina e estavudina | MeOH (1ª diluição) e H ₂ O (2ª diluição) | Espectrofotometria no UV | λ leitura: 285 nm 3TC | Cápsulas e comprimidos |
| SHARMA e MEHTA, 2010 | <u>EFV, 3TC e TDF</u> | MeOH: H ₂ O (50:50, v/v) | Espectrofotometria no UV, 1ª derivada | λ leitura: 305,6 nm (EFV), 271,4 nm (3TC) e 291,4 nm (TDF). | Comprimidos |
| ONAH e AJIMA, 2011 | <u>TDF</u> | 1º método: molibdato de amônio 2º método: ácido pícrico | Espectrofotometria no UV com complexação | λ leitura: 495 nm λ leitura: 400 nm | Comprimidos |

Legenda: IFA = Insumos farmacêuticos ativos; λ = comprimento de onda; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila.

Na Farmacopeia Internacional 4ª edição (2013) estão publicadas monografias para controle de qualidade de EFV e 3TC matéria-prima por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. Também, possui monografia de TDF matéria-prima cujo método de quantificação é realizado por titulação em meio não aquoso.

Monografias de EFV cápsulas e solução oral, 3TC comprimidos e solução oral e TDF comprimidos também estão disponíveis. O método de doseamento para EFV cápsulas é realizado por CLAE com detecção na região do ultravioleta (250 nm), utilizando coluna empacotada com cianopropil dimetilsilano e fase móvel composta de ácido trifluoroacético e MeOH em modo gradiente. A 3TC em comprimidos pode ser quantificado por CLAE e, como método alternativo, por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. O método cromatográfico utiliza coluna de fase reversa empacotada com sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilanos, detecção na região do ultravioleta (277 nm) e fase móvel composta por tampão acetato de amônio pH 3,8 (ajustado com ácido acético) e MeOH. O método para TDF comprimidos é realizado por CLAE com detecção na região do ultravioleta (260 nm), utilizando coluna de fase reversa empacotada com sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilanos e fase móvel composta de acetonitrila, tampão fosfato e água em modo gradiente. Atualmente, o compêndio está preparando para publicação as monografias de comprimidos de DFC de 3TC e estavudina; de 3TC, estavudina e NVP; de TDF e emtricitabina; de TDF, emtricitabina e EFV; bem como comprimidos de EFV.

Desse modo, constata-se que não existem monografias oficiais para quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC. Até o momento, foram encontrados três artigos científicos para a quantificação simultânea dos insumos farmacêuticos ativos em comprimidos de dose fixa, sendo um método por espectrofotometria derivada no ultravioleta (SHARMA e MEHTA, 2010) e dois outros por CLAE (REDDIAH *et al.*, 2012; ANANDAKUMAR *et al.*, 2013).

Sharma e Mehta (2010) descreveram método por espectrofotometria derivada pela técnica do ponto de anulação (*zero crossing*) para a quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos. O método foi desenvolvido utilizando espectrofotômetro ultravioleta de duplo feixe, diluente composto de água e MeOH (50:50, v/v) e os insumos farmacêuticos ativos foram quantificados por

espectrofotometria de primeira derivada nos λ 291,4 nm para EFV, 305,6 nm para 3TC e 271,4 nm pra TDF. Não houve interferência da matriz de excipientes e o método cumpriu com os parâmetros de validação para análise de rotina de comprimidos de DFC de EFV, 3TC e TDF.

Reddiah *et al.* (2012) desenvolveram e validaram um método indicador de estabilidade para comprimidos contendo EFV, 3TC e TDF. A separação cromatográfica foi alcançada utilizando método em gradiente de 120 minutos, coluna cromatográfica de fase reversa (ACE C18 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) a 30 °C e como fase móvel utilizou-se duas misturas. A mistura A era composta de tampão acetato de amônio pH 3,8 (ajustado com ácido acético), enquanto a mistura B consistiu de ACN e MeOH (40:60, v/v). A detecção foi realizada em comprimento de onda de 265 nm, volume de injeção igual a 10 μ L e vazão da fase móvel de 1,5 mL/min. O diluente para a amostra foi preparado com ácido ortofosfórico e MeOH na proporção de 20:80 %v/v. O método foi específico, preciso, exato, linear e robusto para quantificação de EFV, 3TC e TDF e de suas impurezas.

Anandakumar *et al.* (2013) publicaram um método para quantificação de EFV, 3TC E TDF por CLAE em comprimidos de DFC. O método utiliza coluna C18 (150 mm x 4,6; 5 μ m), como fase móvel ACN, MeOH e água (30:45:25, v/v/v), vazão da fase móvel de 0,5 mL/min e injeção igual a 20 μ L. A detecção é realizada no λ de 258 nm.

A quantificação dos ARV por espectrometria derivada realizada pela técnica do ponto de anulação proposta por Sharma e Mehta (2010), apresenta como desvantagens o fato de não possuir alto nível de especificidade e sensibilidade como o obtido por CLAE (EL-SAYED e EL-SALEM, 2005; THE UNITED..., 2012), uma vez que não separa os componentes da amostra para posterior quantificação. Já o método de Reddiah *et al.* (2012) possui como desvantagem o tempo de corrida longo (120 min), o que inviabiliza as análises de rotina de controle de qualidade, quando grandes quantidades de amostras são preparadas, e aumenta-se a probabilidade de degradação dos analitos durante o tempo de espera para a injeção das amostras. Somado a isso, o método proposto proporciona um gasto excessivo de solvente orgânico, o que impacta negativamente no custo das análises e constitui uma prática não ecologicamente consciente. A proposta de Anandakumar *et al.*

(2013) não informa a temperatura do forno da coluna, são utilizados dois solventes orgânicos na fase móvel e no teste de robusto para a validação do método analítico não é demonstrada o grau de interferência do tempo de agitação da amostra para a extração eficiente dos insumos farmacêuticos ativos do pó dos comprimidos.

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de um método analítico simples, rápido, confiável e eficiente, aplicável ao controle de qualidade de comprimidos com associação dos ARV. Assim, o objetivo foi desenvolver e validar um método analítico por CLAE para quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC.

2 MATERIAIS

2.1 Substâncias químicas de referência, padrões de trabalho e amostras

- Efavirenz SQR USP 200 mg, lote F0G376, teor 99,8%.
- Lamivudina SQR USP 200 mg, lote H0I378, teor 99,7%.
- Fumarato de tenofovir desoproxila SQR USP 200 mg, lote F0J134, teor 99,1%.
- Efavirenz matéria-prima, Nortec Química S. A., Rio de Janeiro, Brasil. Lote 57270, teor 99,94%.
- Lamivudina matéria-prima, Fundação Ezequiel Dias (Coben Pharmaceutical Co., China), lote interno 2011050113, teor 99,09%.
- Fumarato de tenofovir desoproxila matéria-prima, Blanver, lote 107027, teor 99,65%.
- Comprimidos de dose fixa combinada contendo efavirenz (66 mg), lamivudina (33 mg) e fumarato de tenofovir desoproxila (33 mg) desenvolvidos e produzidos na Fundação Ezequiel Dias (Funed).
- Placebo contendo mistura de excipientes farmacotécnicos em quantidades equivalentes às contidas no medicamento teste, excetuando-se os insumos farmacêuticos ativos, fornecido pela Funed.

2.2 Reagentes e vidrarias

- Água ultrapurificada em sistema Direct-Q3 Millipore® (Bedford, MA, USA).
- Reagentes grau cromatográfico e analítico: metanol (J. T. Baker, México, lote L31C08); acetonitrila (J. T. Baker, México, lote L10C70); ácido acético (Sigma-Aldrich, Alemanha, lote SZBC0810V); acetato de amônio (Sigma-Aldrich, Alemanha, lote SZBB0310V); ácido trifluoroacético (Tedia, EUA, lote 401056R).
- Balões volumétricos, pipetas e buretas calibradas.
- Béqueres, erlenmeyers, provetas e kit de filtração de fase móvel.

2.3 Equipamentos e suprimentos

- Agitador magnético e aquecedor Solab Científica®, modelo SL91, São Paulo, Brasil.
- Aparelho de ultrassom Maxiclean 1400, Unique®, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D com precisão de 0,01 mg, São Paulo, Brasil.
- Coluna cromatográfica de fase reversa Sun Fire® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), Waters, Massachusetts, EUA.
- Coluna cromatográfica de fase reversa Zorbax Eclipse® XDB-C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), Agilent, Massachusetts, EUA.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP 1100 e Agilent 1200, com forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD), Waldbronn, Alemanha.
- Filtro de papel Unifil C41, faixa preta, lote 17578.1110, Alemanha.
- Membranas de celulose regenerada 0,45 µm, Millipore, Massachusetts, EUA.
- Potenciômetro Metrohm 827 pH Lab, Alemanha.
- Unidades filtrantes Millex HV 0,45 µm, Millipore, Massachusetts, EUA.

3 MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE.

O método de quantificação de EFV, 3TC e TDF foi desenvolvido com base nos dados e informações obtidos sobre as características físico-químicas e grupos funcionais dos insumos farmacêuticos ativos. Também, foram consideradas as concentrações das curvas analíticas correspondentes às dosagens dos ARV calculadas para coelhos (66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF). O objetivo foi desenvolver um método capaz de quantificar os ARV em estudo com resolução adequada entre os picos; com tempo de corrida curto capaz de viabilizar análises de rotina de controle de qualidade, que cumpram com os parâmetros de validação e cuja utilização de solvente orgânico na fase móvel fosse a menor possível.

Em cada condição testada (variação da composição e da vazão da fase móvel), foram avaliados parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico, como tempo de retenção (t_R), resolução entre os analitos (R_s), pratos teóricos (N) e assimetria de picos, de modo a obter uma condição otimizada para quantificação simultânea dos ARV.

Considerando que a amostra analisada é regular, ou seja, constituída da mistura de pequenas moléculas (< 2000 Da), que possui componentes hidrofílicos (3TC e TDF) e hidrofóbicos (EFV) com diferentes constantes de acidez (pK_a iguais a 4,3, 3,75 e 10,2, respectivamente, para 3TC, TDF e EFV) e que a coluna cromatográfica de fase reversa resiste à faixa de pH entre 2 e 8, optou-se por uma análise exploratória inicial no modo gradiente utilizando como fase móvel água e MeOH (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

O gradiente exploratório iniciou-se com 5% MeOH e estendeu-se até 95% do mesmo solvente orgânico durante 45 min. A coluna cromatográfica empregada foi de fase reversa empacotada com sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilanos C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m); temperatura da coluna de 30 °C e vazão da fase móvel

igual a 1,0 mL/min. A detecção foi realizada utilizando DAD e as leituras das áreas sob os picos foram realizadas no λ máximo de cada insumo farmacêutico ativo conforme informações prévias obtidas na literatura e confirmadas no laboratório: 250 nm para EFV, 260 nm para TDF e 270 nm para 3TC (MONTGOMERY, E. R. *et al.*, 2001; ASHENAFI, D. *et al.*, 2010; PAULA, N. C. *et al.*, 2006). Nessas condições, os picos de 3TC e TDF coeluíram e o pico de EFV eluiu no t_R em torno de 30 min.

Em sequência, testou-se como fase móvel alternativa uma mistura de ACN e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) em modo gradiente de 60 min, iniciando-se com 5% ACN. Nessas condições, obtiveram-se picos bem definidos e simétricos para EFV e TDF, entretanto, o pico de 3TC separou-se em três partes.

Testaram-se também outros métodos descritos em artigos. O método proposto por Montgomery *et al.* (2001), foi reproduzido para análise dos insumos farmacêuticos ativos. Para isso, utilizou-se coluna ciano (150 mm x 4,6 mm), fase móvel constituída por duas misturas A (90% água com ácido trifluoroacético: 10% MeOH) e B (90% MeOH: 10% água com ácido trifluoroacético) em modo gradiente variando as proporções das fases móveis. A vazão utilizada foi 1,5 mL/min, volume de injeção de 35 μ L e a temperatura da coluna de 40 °C. Como resultado, o pico de 3TC dividiu-se.

Considerando-se que os insumos farmacêuticos ativos EFV, 3TC e TDF possuem características físico-químicas diferentes, o desenvolvimento do método analítico foi um desafio. Optou-se por utilizar tampão acetato de amônio e MeOH como fase móvel. O ácido acético quando presente na fase móvel é capaz de melhorar o formato dos picos, aumentar o número de pratos teóricos da coluna cromatográfica e minimizar a existência de grupos silanóis livres. O efeito da existência de grupos silanóis livres, principalmente para análise de compostos básicos, pode aumentar a retenção de analitos na coluna, resultar em picos com cauda e tornar irreproduzível a corrida cromatográfica (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

A otimização da porcentagem de solvente orgânico para o início da corrida foi realizada apenas com a injeção de uma solução contendo 3TC, primeiro insumo farmacêutico ativo a eluir. Em sequência, preparou-se outra solução contendo 3TC e TDF para adequar o tempo de eluição e a porcentagem de MeOH para o segundo

analito. Por fim, foi injetada uma solução contendo os três analitos (3TC, TDF e EFV), de modo a adequar a corrida em gradiente para que o pico de EFV eluísse em menor tempo possível mantendo as características adequadas para o formato do pico.

Para a análise cromatográfica optou-se pela detecção em λ 260 nm (item 4.2.2, Capítulo 2). Apesar de não ser o λ máximo de EFV e 3TC, foi possível a quantificação com sensibilidade e seletividade adequadas no comprimento de onda selecionado.

3.2 Condição otimizada para a análise quantitativa dos ARV por CLAE

A condição otimizada (**Tabela 25**) para a análise quantitativa dos ARV em modo gradiente foi estabelecida utilizando coluna cromatográfica Sun Fire C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) a 30 °C. A vazão da *Fase móvel* foi de 1,0 mL/min e o volume injetado foi de 20 μ L. A detecção foi realizada por UV no comprimento de onda de 260 nm e eluição no modo gradiente da *Fase móvel* (mistura de MeOH e tampão acetato de amônio).

Tabela 25 - Gradiente da *Fase móvel* para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada.

| Tempo (min) | MeOH | Tampão acetato | Eluição |
|-----------------------------------|-----------|----------------|------------------|
| T ₀ – T ₄ | 30% | 70% | isocrática |
| T ₄ – T ₆ | 30% → 85% | 70% → 15% | gradiente linear |
| T ₆ – T ₁₃ | 85% | 15% | isocrática |
| T ₁₃ – T ₁₄ | 85% → 30% | 15% → 70% | gradiente linear |
| T ₁₄ – T ₁₅ | 30% | 70% | isocrática |

O tampão acetato e as soluções foram preparados como descrito a seguir.

Tampão acetato de amônio pH 5,4: dissolveram-se 7,7 g de acetato de amônio em ácido acético diluído 0,1% (v/v) para 1 L. O pH foi ajustado para 5,4 com ácido acético, quando necessário.

Fase móvel: mistura de *Tampão acetato de amônio pH 5,4* e MeOH (70:30).

Soluções padrão estoque: aproximadamente 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF foram transferidos separadamente para balões volumétricos de 50 mL. Adicionaram-se 40 mL de MeOH em cada balão, submeteu-se ao ultrassom por 20 minutos e os volumes foram completados com o mesmo solvente.

Solução padrão diluída: transferiram-se 5 mL de cada *Solução padrão estoque* para um único balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com a *Fase móvel* inicial (mistura de MeOH e tampão acetato 30:70, v/v). As concentrações finais foram 132 µg/mL para EFV e 66 µg/mL para 3TC e TDF, correspondendo a 100% da concentração de trabalho.

Solução amostra: vinte comprimidos revestidos foram pesados e triturados a pó fino e uma quantidade de pó equivalente a um peso médio foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 40 mL de MeOH e, após agitação em ultrassom por 20 minutos, o volume foi completado com o mesmo solvente e filtrado em papel de filtro quantitativo. A solução obtida foi diluída com *Fase móvel* inicial até a concentração de 132 µg/mL para EFV e 66 µg/mL para 3TC e TDF. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm.

Solução placebo: quantidade de pó de placebo equivalente a um peso médio (128,09 mg) foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 40 mL de MeOH e, após agitação em ultrassom por 20 minutos, o volume foi completado com o mesmo solvente e filtrado em papel de filtro quantitativo. Transferiram-se 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com *Fase móvel* inicial e, em seguida, a solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm.

As condições cromatográficas otimizadas para a análise de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC estão resumidas no **Quadro 10**.

Quadro 10 - Condições cromatográficas selecionadas para o doseamento de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada.

| | |
|------------------------------|---|
| Coluna cromatográfica | octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) |
| Temperatura do forno | 30 °C |
| Detector | UV, 260 nm |
| Fase Móvel | MeOH: tampão acetato de amônio pH 5,4 |
| Eluição | modo gradiente |
| Vazão | 1,0 mL/min |
| Volume de injeção | 20 µL |

3.3 Validação do método analítico

O método analítico foi validado segundo a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003) e pelo Guia ICH Q2 (R1) (INTERNATIONAL..., 2005). Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

3.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela análise de possíveis interferentes presentes na mistura de excipientes da formulação (placebo) sujeitos à coeluição com os analitos de interesse. Para isso, o cromatograma proveniente da *Solução amostra* foi comparado ao da *Solução placebo* (SHABIR, 2003). Além disso, a pureza espectral dos picos de EFV, 3TC e TDF foram avaliadas no cromatograma da *Solução amostra* com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD).

3.3.2 Linearidade

As curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF foram estabelecidas a partir de três soluções padrão estoque de EFV 660 µg/mL, 3TC 330 µg/mL e TDF 330 µg/mL preparadas em MeOH. Alíquotas dessas soluções foram diluídas em *Fase móvel*, de

forma a obter onze concentrações diferentes, na faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho de EFV (132 µg/mL), 3TC (66 µg/mL) e TDF (66 µg/mL).

Preparo das soluções 1 a 11: transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL os volumes de *Solução padrão estoque* indicados na **Tabela 26**. Completou-se o volume do balão volumétrico com *Fase móvel*.

Tabela 26 - Soluções 1 a 11 para a construção da curva analítica de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila por cromatografia a líquido de alta eficiência.

| Solução | % | Concentração (µg/mL) | | Volume solução estoque (mL) |
|---------|-----|----------------------|-----------|-----------------------------|
| | | EFV | 3TC e TDF | |
| 1 | 50 | 66,0 | 33,0 | 2,5 |
| 2 | 60 | 79,2 | 39,6 | 3,0 |
| 3 | 70 | 92,4 | 46,2 | 3,5 |
| 4 | 80 | 105,6 | 52,8 | 4,0 |
| 5 | 90 | 118,8 | 59,4 | 4,5 |
| 6* | 100 | 132,0 | 66,0 | 5,0 |
| 7 | 110 | 145,2 | 72,6 | 5,5 |
| 8 | 120 | 158,4 | 79,2 | 6,0 |
| 9 | 130 | 171,6 | 85,8 | 6,5 |
| 10 | 140 | 184,8 | 92,4 | 7,0 |
| 11 | 150 | 198,0 | 99,0 | 7,5 |

* Concentração de trabalho

Legenda: EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila.

As relações entre as áreas dos picos cromatográficos e as concentrações dos analitos foram submetidas à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O ajuste dos dados ao modelo de regressão, o coeficiente de correlação (r), o intercepto, a inclinação da curva e a aleatoriedade dos resíduos foram verificados pelo software estatístico Minitab[®], versão 14.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes e o critério aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser maior que 0,99 (BRASIL, 2003).

3.3.3 Precisão

A precisão foi definida pelas análises de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), a partir da quantificação dos insumos farmacêuticos ativos na concentração de trabalho (132 µg/mL para EFV e 66 µg/mL para 3TC e TDF) em seis *Soluções* amostras e em três dias consecutivos ($n=18$). A precisão intra-dia foi avaliada pelos teores médios de EFV, 3TC e TDF e os desvios padrão relativos (DPR) calculados das determinações diárias ($n = 6$). Enquanto a precisão inter-dias foi avaliada calculando-se a média e o DPR de todos os resultados em três dias consecutivos ($n = 18$). Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 2,00% (GREEN, 1996).

3.3.4 Exatidão

A exatidão foi realizada pelo método do placebo contaminado, em que quantidades conhecidas do padrão foram adicionadas a misturas dos componentes da formulação (excipientes) com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação do padrão. A exatidão foi avaliada a partir de nove determinações contemplando os níveis de 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho da *Solução amostra* dos comprimidos em triplicata para cada nível de concentração.

Preparo da *Solução padrão estoque dos insumos farmacêuticos ativos*: pesaram-se, exatamente, cerca de 66 mg de EFV SQR, 33 mg de 3TC SQR e 33 mg de TDF SQR para um mesmo balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 40 mL de MeOH, submeteu-se ao ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. A solução foi preparada em triplicata.

Para o preparo das concentrações finais de 80%, 100% e 120%, 50 mg de placebo da formulação dos comprimidos e o volume correspondente da *Solução estoque* dos insumos farmacêuticos ativos foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, conforme **Tabela 27**. Em seguida, completou-se o volume com *Fase móvel*.

Tabela 27 - Esquema das diluições para avaliar a exatidão do método para doseamento de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE.

| IFA | Quantidade de placebo (mg) | Nível de concentração | Massa do IFA (mg) | Volume transferido | Concentração final (µg/L) |
|------|----------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|
| 80% | 50 | EFV | 66 | 4 mL | 105,6 |
| | | 3TC | 33 | | 52,8 |
| | | TDF | 33 | | 52,8 |
| 100% | 50 | EFV | 66 | 5 mL | 132,0 |
| | | 3TC | 33 | | 66,0 |
| | | TDF | 33 | | 66,0 |
| 120% | 50 | EFV | 66 | 6 mL | 158,4 |
| | | 3TC | 33 | | 79,2 |
| | | TDF | 33 | | 79,2 |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila.

A recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, utilizando-se a equação a seguir.

$$\%Recuperação = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Segundo Green (1996), o critério de aceitação para a média de recuperação, em um método analítico de doseamento, deve ser de $100 \pm 2\%$, ou seja, a recuperação deve estar compreendida na faixa 98% a 102% em cada nível. Em paralelo a essa análise, realizou-se o teste *t* de Student para verificar se existe ou não diferença significativa entre o teor médio e o valor de recuperação de 100% (ASOCIACIÓN..., 2001).

3.3.5 Robustez

A robustez permite avaliar a capacidade do método analítico em permanecer inalterado quando pequenas e deliberadas variações ocorrem em certos parâmetros do mesmo. A robustez foi realizada conforme o método proposto por Youden e

Steiner (1975), que consiste na análise multivariada de sete variáveis críticas para o método analítico. Esse teste permite verificar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual é o tipo de influência no método (INMETRO, 2010).

Os parâmetros variados para a avaliação da robustez do método de doseamento dos ARV foram: temperatura do forno da coluna, pH do tampão acetato, vazão da *Fase móvel*, comprimento de onda de leitura, marca da coluna, modelo do cromatógrafo e tempo de agitação da amostra no ultrassom. Os parâmetros nominais foram identificados pelas letras maiúsculas e os parâmetros variados foram identificados pelas letras minúsculas (**Tabela 28**).

Tabela 28 - Parâmetros do método de doseamento simultâneo de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada para a avaliação da robustez do método por CLAE.

| Parâmetros | Nominal | Valor do fator nominal | Variação | Valor do fator variação |
|---|--|------------------------|--|-------------------------|
| Temperatura do forno da coluna | 30 °C | A | 25 °C | a |
| pH tampão acetato | 5,4 | B | 5,7 | b |
| Vazão da fase móvel | 1,0 mL/min | C | 1,2 mL/min | c |
| λ leitura | 260 nm | D | 262 nm | d |
| Tempo de agitação da amostra no ultrassom | 20 min | E | 15 min | e |
| Marca da coluna | Sun Fire® C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) | F | Zorbax Eclipse® XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) | f |
| Modelo do HPLC | 1100 | G | 1200 | g |

Legenda: λ : comprimento de onda.

Realizaram-se oito experimentos de forma aleatória conforme demonstrado na matriz dos fatores (**Tabela 29**).

Tabela 29 - Matriz dos fatores para determinação da robustez pelo método de Youden.

| Valor do fator | Combinação ensaiada | | | | | | | |
|-------------------|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A ou a | A | A | A | A | a | a | a | a |
| B ou b | B | B | b | b | B | B | b | b |
| C ou c | C | c | C | c | C | c | C | c |
| D ou d | D | D | d | d | d | d | D | D |
| E ou e | E | e | E | e | e | E | e | E |
| F ou f | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G ou g | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Resultados | s | t | u | v | w | x | y | z |

Fonte: YOUTDEN e STEINER, 1975.

Realizaram-se três injeções da *Solução amostra* (pó dos comprimidos) e três da *Solução padrão diluída* de EFV, 3TC e TDF na mesma condição analítica e calculou-se a média. Os resultados de cada experimento foram avaliados em relação ao teor, tempo de retenção, eficiência da coluna (representada pelo número de pratos teóricos, N) e fator de cauda.

Para cada fator estimou-se o efeito do parâmetro variado pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com letra minúscula. Assim, estimou-se, por exemplo, o efeito em variar o valor do parâmetro de “A” por “a” conforme equação:

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

As diferenças mais relevantes indicam que os fatores correspondentes têm maior influência que os outros sobre a precisão do método. Para definir se a influência do fator é relevante, deve-se comparar o valor do efeito com a expressão $s\sqrt{2}$, em que s é o desvio padrão obtido no ensaio de repetibilidade do método. As diferenças superiores em valor absoluto ao resultado da expressão são consideradas significativas (ASOCIACIÓN..., 2001).

3.3.6 Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde a menor quantidade do analito que se pode detectar nas condições experimentais do método. E o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito que se pode quantificar com adequada precisão e exatidão (INTERNACIONAL, 2005). Esses parâmetros foram estimados pelo desvio padrão do intercepto (δ) e inclinação da curva analítica (S) dos insumos farmacêuticos ativos conforme equações abaixo:

$$LD = 3,3 \frac{\delta}{S}$$

$$LQ = 10 \frac{\delta}{S}$$

em que,

δ = desvio-padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

Em seguida, *Soluções padrão* de cada insumo farmacêutico ativo foram preparadas nas concentrações de LQ e de LD estimadas e diluições sucessivas foram realizadas até a obtenção de uma relação entre sinal e ruído (s/r) próxima de 3 para o LD e próxima de 10 para o LQ (INTERNATIONAL..., 2005; SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997). Ao encontrar a relação sinal/ruído esperada para o LQ e LD, a solução foi injetada cinco vezes no cromatógrafo e o DPR das áreas obtidas foi determinado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE.

A retenção cromatográfica de espécies químicas ionizáveis é fortemente dependente do pH da fase móvel. Na cromatografia líquida de fase reversa, espécies químicas neutras são mais retidas do que as ionizáveis. Para um analito ionizável, ou seja, um analito com propriedades ácido-base na faixa de pH de trabalho, a relação entre as concentrações das formas neutras e iônicas e a retenção cromatográfica depende do pH da fase móvel e do pKa do analito (ROSÉS, SUBIRATS e BOSCH, 2009). Essa relação pode ser calculada pela equação de Handerson Hasselbalch que define matematicamente a relação entre o pH do meio aquoso e o pka das espécies químicas, como se segue (HARRIS, 2005):

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

em que,

pka é logaritmo do inverso da constante de acidez.

pH (potencial hidrogeniônico) é o logaritmo negativo da concentração de H⁺.

[HA] é a concentração do ácido monoprótico.

[A⁻] é a concentração da base conjugada do ácido.

Um método que opera próximo ao valor de pka de um ou mais analitos, é provável que seja menos robusto. Por essa razão, é normalmente desejável escolher um valor de pH da fase móvel que seja maior ou menor que 2 unidades em relação ao valor do pka dos analitos (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997; SNYDER e DOLAN, 2013).

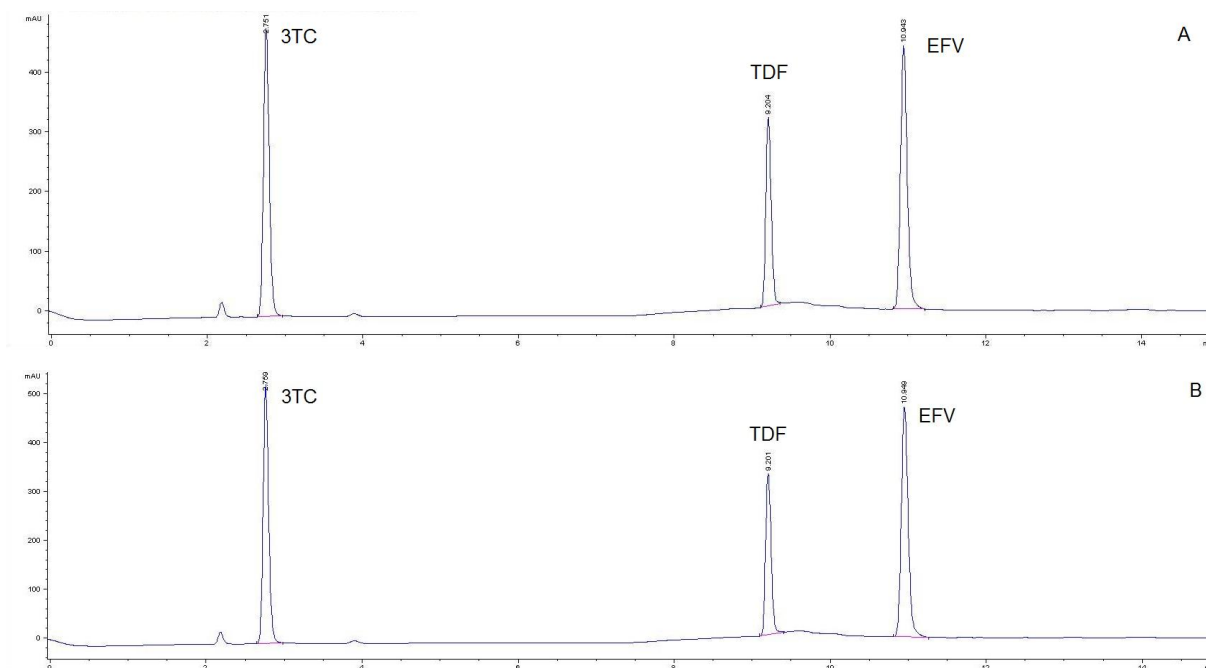
O EFV é um ácido fraco, pka = 10,2 (MOFFAT, OSSELTON e WIDDOP, 2004), em que o grupo carbamato sofre desprotonação em altos valores de pH (GALLICANO, 2000; CRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). A 3TC é uma base fraca (GALLICANO, 2000),

pKa = 4,3 (JOZWIAKOWSKI *et al.*, 1996; MOFFAT, OSSELTON e WIDDOP, 2004; SOUZA e STORPIRTIS, 2004) e, quando em meio ácido, sua protonação ocorre no grupo amino primário (NH₂). O TDF é um base fraca de tenofovir e possui pKa = 3,75 (VIREAD[®]..., 2006). No pH da *Fase móvel* estabelecida (pH = 5,4), EFV encontra-se 99,99% na forma não ionizada, 3TC encontra-se 92,64% na forma não ionizada e TDF possui 97,81% de suas moléculas na forma não ionizada. Os valores de pKa de 3TC e TDF estão mais próximos do pH da *Fase móvel*. A diferença entre o pH da *Fase móvel* e o pKa de TDF é de 1,65 e para 3TC é de 1,1, ambos os valores são menores que 2,0. Para verificar se o pH da *Fase móvel* interfere na robustez do método, essa variável foi avaliada no teste de robustez da validação do método analítico.

Os cromatogramas representativos das condições cromatográficas desenvolvidas para a *Solução padrão* e *Solução amostra* estão representados nas **Figura 20**. O tempo morto foi definido nas condições cromatográficas propostas utilizando solução de uracila a 100 µg/mL preparada em *Fase móvel*. O t_R da molécula foi igual a 2,561 min.

Na análise cromatográfica dos ARV, 3TC foi o primeiro insumo farmacêutico ativo a ser eluído, seguido de TDF e EFV. A menor afinidade de 3TC pela fase estacionária resultou em menor fator de retenção ($k = 0,09$) quando comparada aos insumos farmacêuticos ativos mais hidrofóbicos TDF ($k = 2,59$) e EFV ($k = 3,29$). Todos os picos, para as soluções amostra e padrão, apresentaram resolução maior que 1,5 (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997) e simetria adequada.

Figura 20 – Cromatogramas obtidos para (A) solução amostra dos comprimidos de dose fixa combinada e para (B) solução padrão de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila nas concentrações de 132,0 µg/mL, 66,0 µg/mL e 66 µg/mL, respectivamente. Método em modo gradiente, utilizando coluna Sunfire® (150 x 4,6 mm; 5 µm), a 30 °C, vazão de 1,0 mL/min e detecção no UV em 260 nm.



Legenda: EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila.

Mesmo com as características físico-químicas distintas dos insumos farmacêuticos ativos, a seleção do pH da *Fase móvel* e o esquema de gradiente proposto neste estudo permitiram que a análise simultânea de EVF, 3TC e TDF em comprimidos de DFC fosse desenvolvida em condições satisfatórias e em curto tempo de corrida cromatográfica (15 min).

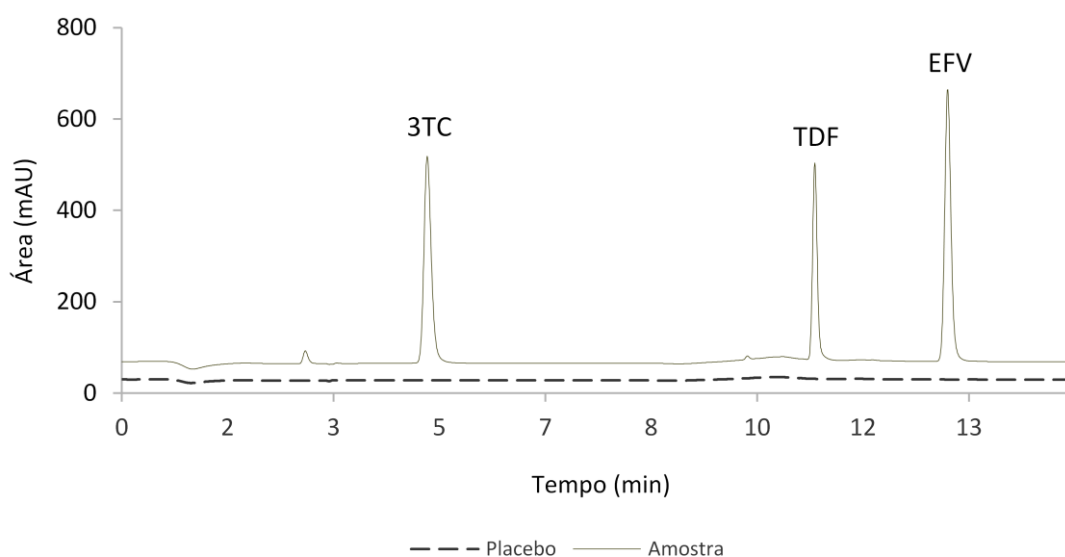
4.2 Validação do método analítico

4.2.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de avaliar, de forma inequívoca, o analito na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma matriz complexa como, por exemplo, excipientes da formulação e substâncias relacionadas (INTERNATIONAL..., 2005).

O estudo da seletividade do método proposto foi realizado por verificação da resposta da matriz (placebo) na detecção dos insumos farmacêuticos ativos. O cromatograma da *Solução placebo* não apresentou interferências nos picos dos ARV (**Figura 21**), o que demonstra a seletividade do método em relação aos componentes presentes na formulação estudada. Adicionalmente, as purezas espectrais dos picos da *Solução amostra* foram avaliadas com o detector DAD (3TC = 99,95%, TDF = 99,86% e EFV = 99,27%). Os valores de pureza obtidos, próximos a 100%, evidenciam ausência de coeluição de substâncias junto aos insumos farmacêuticos ativos.

Figura 21 - Sobreposição dos cromatogramas das Soluções amostra e placebo obtidos conforme as condições cromatográficas descritas na parte experimental deste estudo.



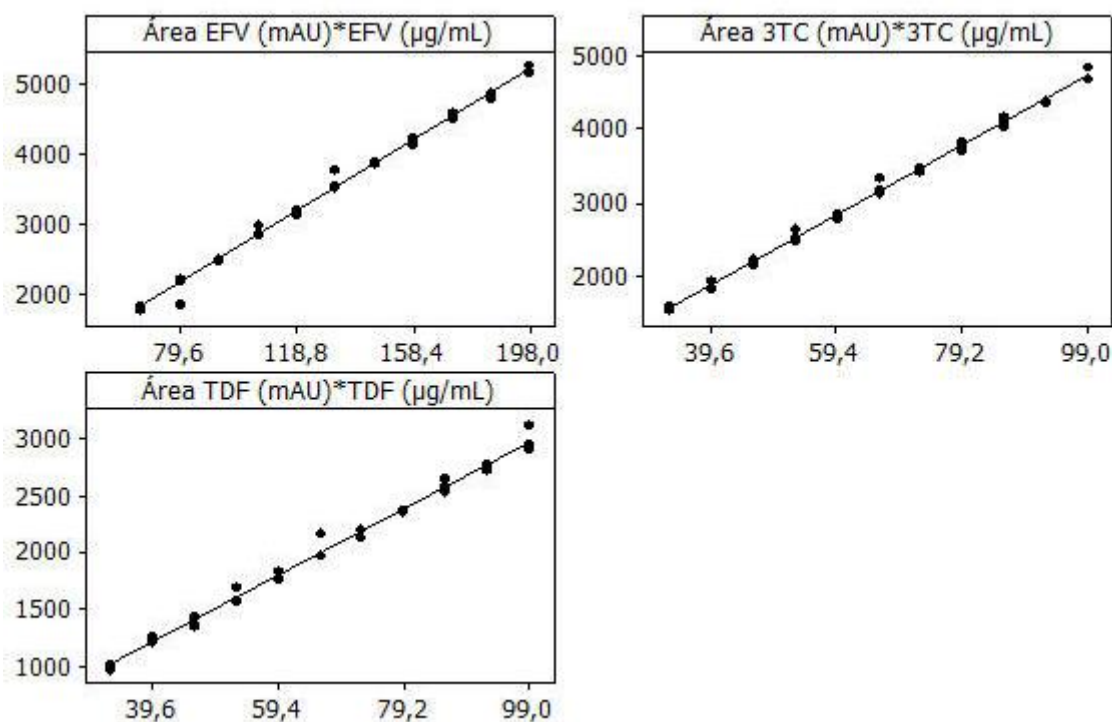
Legenda = 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desopoxila; EFV = efavirenz

4.2.2 Linearidade

As curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF (**Figura 22**) indicaram correlação linear adequada entre as concentrações e as áreas dos picos no intervalo de 50% a 150% da concentração de trabalho (EFV na faixa de 66,0 a 198,0 $\mu\text{g/mL}$ e 3TC e TDF na faixa de 33,0 a 99,0 $\mu\text{g/mL}$). As regressões lineares foram significativas ($p < 0,05$) e os coeficientes de correlação (EFV = 0,9971, 3TC = 0,9983 e TDF = 0,9962) foram superiores a 0,99 (BRASIL, 2003). O intercepto não foi diferente de zero ($p > 0,05$) e os resíduos apresentaram distribuição aleatória sem tendência (

Tabela 30).

Figura 22 - Curvas analíticas de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia a líquido de alta eficiência.



Legenda = 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila; EFV = efavirenz

Tabela 30 - Resultados da análise de regressão linear obtidos para o método por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

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

Legenda: EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila.

4.2.3 Precisão

A precisão da determinação de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC por CLAE foi determinada em três dias consecutivos de análises e expressa em valores de DPR, obtendo-se valores de precisão intra-dia e inter-dias. Os valores dos teores de cada ARV e os valores de DPR (%) para avaliar as precisões estão apresentados na **Tabela 31**.

Na análise de EFV, 3TC e TDF nos comprimidos de DFC, os valores de DPR para a precisão intra-dia ($n=6$) foram 1,16%, 1,12% e 1,32%, respectivamente. Para a precisão inter-dias, os valores de DPR ($n=18$) para EFV, 3TC e TDF foram 1,40%, 1,36% e 1,98%, respectivamente. Em todos os casos, os desvios foram menores que 2,0%, o que garante precisão satisfatória do método para doseamento dos ARV (GREEN, 1996).

Tabela 31 - Precisão intra-dia e precisão inter-dias para o doseamento de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila por CLAE.

| Insumo farmacêutico ativo | Replicatas | Precisão intra-dia (%) | | | Precisão inter-dias (%) | |
|-----------------------------------|------------------|------------------------|----------------|----------------|-------------------------|------|
| | | 1º dia (n = 6) | 2º dia (n = 6) | 3º dia (n = 6) | Média (n = 18) | DPR |
| Efavirenz | 1 | 102,84 | 99,36 | 104,26 | 101,97 | 1,40 |
| | 2 | 102,82 | 101,61 | 104,83 | | |
| | 3 | 102,19 | 100,33 | 103,17 | | |
| | 4 | 103,16 | 100,81 | 102,41 | | |
| | 5 | 101,55 | 101,75 | 101,31 | | |
| | 6 | 99,98 | 100,88 | 102,25 | | |
| | Média (%) | 102,09 | 100,79 | 103,04 | | |
| | DPR (%) | 1,16 | 0,87 | 1,28 | | |
| Lamivudina | 1 | 95,26 | 97,29 | 94,09 | 96,34 | 1,36 |
| | 2 | 95,80 | 97,25 | 93,91 | | |
| | 3 | 95,98 | 96,69 | 96,43 | | |
| | 4 | 96,59 | 94,27 | 95,99 | | |
| | 5 | 97,69 | 97,29 | 95,89 | | |
| | 6 | 97,97 | 98,16 | 97,51 | | |
| | Média (%) | 96,55 | 96,83 | 95,64 | | |
| | DPR (%) | 1,12 | 1,38 | 1,46 | | |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 1 | 93,24 | 95,14 | 96,42 | 94,60 | 1,98 |
| | 2 | 94,30 | 95,09 | 94,84 | | |
| | 3 | 92,04 | 94,86 | 96,75 | | |
| | 4 | 92,43 | 92,73 | 95,28 | | |
| | 5 | 95,36 | 92,86 | 98,73 | | |
| | 6 | 93,07 | 92,52 | 97,21 | | |
| | Média (%) | 93,41 | 93,87 | 96,54 | | |
| | DPR (%) | 1,32 | 1,37 | 1,45 | | |

Legenda: DPR = desvio padrão relativo.

4.2.4 Exatidão

Para a realização da exatidão foi empregado o método do placebo contaminado, utilizando a mistura de excipientes constituintes da formulação dos comprimidos de EFV, 3TC e TDF em DFC. A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação de cada insumo farmacêutico ativo nos níveis 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho da *Solução amostra* dos comprimidos (EFV 132,0 µg/mL,

3TC e TDF 66,0 µg/mL), em triplicata. Os valores de recuperação obtidos para cada insumo farmacêutico ativo em estudo estão apresentados na **Tabela 32**.

As recuperações médias ($n=9$) obtidas para os ARV (EFV = 99,77%, 3TC = 100,09% e TDF = 100,24%) estão compreendidas no intervalo recomendado de 98% a 102% e os valores de DPR foram inferiores a 2,0% (GREEN, 1996). Alternativamente, o resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando estatística t ao nível de significância de 0,05 e 8 graus de liberdade. O valor de t calculado (EFV = 0,66; 3TC = 0,68 e TDF = 0,89) foi menor que o valor crítico de $t_{0,05;8} = 2,31$, o que indica que não existe diferença significativa entre o valor médio de recuperação ($n = 9$) e o valor de recuperação de 100%. Assim, concluiu-se que o método por CLAE apresenta exatidão adequada para quantificação dos ARV em comprimidos de DFC.

Tabela 32 - Exatidão do método de quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila por CLAE: porcentagens de recuperação em três níveis (80, 100 e 120% da concentração de trabalho) e DPR.

| Insumos farmacêuticos ativos | Níveis | | |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|
| | 80% | 100% | 120% |
| Efavirenz | 100,08 | 99,09 | 101,06 |
| | 99,76 | 100,91 | 99,98 |
| | 99,27 | 100,22 | 97,54 |
| Média | 99,70 | 100,07 | 99,53 |
| DPR | 0,41 | 0,92 | 1,81 |
| Lamivudina | 100,76 | 100,27 | 100,26 |
| | 99,67 | 100,27 | 99,32 |
| | 99,97 | 100,25 | 100,06 |
| Média | 100,13 | 100,26 | 99,88 |
| DPR | 0,56 | 0,01 | 0,49 |
| Fumarato de tenofovir desoproxila | 100,13 | 99,05 | 100,83 |
| | 99,66 | 99,23 | 100,76 |
| | 100,21 | 101,34 | 100,91 |
| Média | 100,00 | 99,87 | 100,83 |
| DPR | 0,30 | 1,28 | 0,08 |

4.2.5 Robustez

A robustez do método de quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de DFC foi avaliada por meio do teste de Youden. Os resultados das oito análises realizadas no ensaio de robustez foram utilizados para calcular o efeito de cada variável em relação ao teor, área, tempo de retenção, fator de cauda e número de pratos teóricos. Na **Tabela 33** estão descritas as oito combinações avaliadas, conforme a matriz dos fatores do teste de Youden.

Nas **Tabelas 34 a 36**, estão demonstrados os resultados do teste de robustez para a quantificação de EFV, 3TC e TDF, respectivamente, obtidos nas oito condições analíticas testadas. Os valores representam a média de três injeções de cada solução.

Tabela 33 - Combinações dos parâmetros analíticos realizados conforme o teste de Youden para avaliação da robustez do método por CLAE para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Cromatógrafo | Combinações analíticas | |
|--------------|------------------------|---|
| HP 1100 | 1 | Temperatura do forno da coluna: 30 °C pH tampão acetato: 5,4 Vazão da fase móvel: 1,0 mL/min λ leitura: 260 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 20 min Marca da coluna: SunFire® |
| | 4 | Temperatura do forno da coluna: 30 °C pH tampão acetato: 5,7 Vazão da fase móvel: 1,2 mL/min λ leitura: 262 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 15 min Marca da coluna: SunFire® |
| | 6 | Temperatura do forno da coluna: 25 °C pH tampão acetato: 5,4 Vazão da fase móvel: 1,2 mL/min λ leitura: 262 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 20 min Marca da coluna: Zorbax Eclipse® |
| | 7 | Temperatura do forno da coluna: 25 °C pH tampão acetato: 5,7 Vazão da fase móvel: 1,0 mL/min λ leitura: 260 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 15 min Marca da coluna: Zorbax Eclipse® |
| Agilent 1200 | 2 | Temperatura do forno da coluna: 30 °C pH tampão acetato: 5,4 Vazão da fase móvel: 1,2 mL/min λ leitura: 260 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 15 min Marca da coluna: Zorbax Eclipse® |
| | 3 | Temperatura do forno da coluna: 30 °C pH tampão acetato : 5,7 Vazão da fase móvel: 1,0 mL/min λ leitura: 262 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 20 min Marca da coluna: Zorbax Eclipse® |
| | 5 | Temperatura do forno da coluna: 25°C pH tampão acetato : 5,4 Vazão da fase móvel: 1,0 mL/min λ leitura: 262 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 15 min Marca da coluna: SunFire® |
| | 8 | Temperatura do forno da coluna: 25 °C pH tampão acetato : 5,7 Vazão da fase móvel: 1,2 mL/min λ leitura: 260 nm Tempo de agitação da amostra no ultrassom: 20 min Marca da coluna: SunFire® |

Legenda: λ = comprimento de onda.

Tabela 34 - Resultados do teste de robustez para quantificação de efavirenz por CLAE em comprimidos de dose fixa combinada nas oito condições analíticas testadas pelo método de Youden para a *Solução padrão e amostra*.

| Condições | Teor (%) | Área | | Tempo de retenção | | Fator de cauda | | N | |
|-----------|----------|------|------|-------------------|-------|----------------|------|-------|-------|
| | | Pa | Am | Pa | Am | Pa | Am | Pa | Am |
| 1 | 107,15 | 3097 | 3338 | 12,63 | 12,04 | 1,08 | 1,12 | 68729 | 68780 |
| 2 | 103,26 | 2320 | 2411 | 10,21 | 10,11 | 1,13 | 1,11 | 88860 | 96782 |
| 3 | 105,43 | 1691 | 1793 | 10,71 | 11,03 | 1,13 | 1,15 | 95366 | 92859 |
| 4 | 105,38 | 1614 | 1711 | 11,02 | 11,01 | 1,15 | 1,14 | 70928 | 71427 |
| 5 | 105,34 | 1707 | 1809 | 12,21 | 12,16 | 1,08 | 1,09 | 72938 | 73036 |
| 6 | 105,57 | 1570 | 1667 | 10,23 | 10,23 | 1,16 | 1,14 | 78304 | 77375 |
| 7 | 105,33 | 3036 | 3218 | 11,13 | 11,14 | 1,17 | 1,17 | 73027 | 72248 |
| 8 | 107,17 | 2305 | 2485 | 11,24 | 11,24 | 1,07 | 1,07 | 72613 | 72874 |

Legenda: Pa = padrão; Am = amostra; N = número de pratos teóricos.

Tabela 35 - Resultados do teste de robustez para quantificação de lamivudina por CLAE em comprimidos de dose fixa combinada nas oito condições analíticas testadas pelo método de Youden para a *Solução padrão e amostra*.

| Condições | Teor (%) | Área | | Tempo de retenção | | Fator de cauda | | N | |
|-----------|----------|------|------|-------------------|------|----------------|------|------|------|
| | | Pa | Am | Pa | Am | Pa | Am | Pa | Am |
| 1 | 97,10 | 2530 | 2534 | 3,57 | 3,69 | 1,15 | 1,19 | 5464 | 7192 |
| 2 | 95,14 | 2074 | 2035 | 2,54 | 2,52 | 1,17 | 1,23 | 3708 | 5928 |
| 3 | 95,34 | 2615 | 2572 | 2,85 | 3,06 | 1,20 | 1,26 | 4459 | 6609 |
| 4 | 95,17 | 2220 | 2179 | 3,07 | 3,09 | 1,14 | 1,17 | 4546 | 6479 |
| 5 | 95,23 | 2577 | 2531 | 3,64 | 3,64 | 1,15 | 1,16 | 5327 | 7679 |
| 6 | 97,44 | 2234 | 2245 | 2,68 | 2,69 | 1,19 | 1,24 | 3704 | 5349 |
| 7 | 94,72 | 2567 | 2509 | 3,24 | 3,25 | 1,21 | 1,28 | 3925 | 5968 |
| 8 | 96,61 | 2064 | 2057 | 3,09 | 3,12 | 1,15 | 1,17 | 4697 | 6612 |

Legenda: Pa = padrão; Am = amostra; N = número de pratos teóricos.

Tabela 36 - Resultados do teste de robustez para quantificação de fumarato de tenofovir desoproxila por CLAE em comprimidos de dose fixa combinada nas oito condições analíticas testadas pelo método de Youden para a *Solução padrão e amostra*.

| Condições | Teor (%) | Área | | Tempo de retenção | | Fator de cauda | | N | |
|-----------|----------|------|------|-------------------|------|----------------|------|--------|--------|
| | | Pa | Am | Pa | Am | Pa | Am | Pa | Am |
| 1 | 97,58 | 1665 | 1680 | 9,82 | 9,79 | 1,10 | 1,10 | 95170 | 98469 |
| 2 | 94,65 | 1356 | 1327 | 8,78 | 8,75 | 1,18 | 1,15 | 128644 | 139177 |
| 3 | 94,92 | 1569 | 1599 | 9,24 | 9,40 | 1,20 | 1,23 | 135245 | 133882 |
| 4 | 94,81 | 1378 | 1350 | 9,09 | 9,09 | 1,10 | 1,10 | 107440 | 106748 |
| 5 | 94,61 | 1587 | 1553 | 9,81 | 9,80 | 1,12 | 1,12 | 107143 | 107991 |
| 6 | 96,73 | 1391 | 1391 | 8,83 | 8,83 | 1,20 | 1,20 | 102948 | 102458 |
| 7 | 93,02 | 1681 | 1617 | 9,48 | 9,48 | 1,25 | 1,25 | 92995 | 93097 |
| 8 | 96,40 | 1334 | 1329 | 9,13 | 9,13 | 1,12 | 1,12 | 114744 | 114648 |

Legenda: Pa = padrão; Am = amostra; N = número de pratos teóricos.

O efeito de cada variável foi calculado pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com letra minúscula. Na **Tabela 37** estão os resultados para os sete parâmetros analisados para EFV, 3TC e TDF. As diferenças superiores, em valor absoluto, ao valor crítico ($s\sqrt{2}$, em que s é o desvio padrão obtido nas oito determinações) foram consideradas significativas nas análises.

O parâmetro que mais influenciou a determinação do teor dos ARV foi o tempo de agitação da amostra no ultrassom. A solubilização do insumo farmacêutico ativo é condição essencial para a análise cromatográfica e constitui-se em um parâmetro crítico na determinação do teor. A redução do tempo de agitação para 15 min prejudicou a extração dos insumos farmacêuticos ativos no solvente orgânico e, por conseguinte, os teores foram significativamente inferiores quando comparados aos resultados do procedimento normal de agitação em 20 min. Assim, recomenda-se que a pulverização dos comprimidos seja feita cuidadosamente até a obtenção de partículas finas e homogêneas e o tempo de extração em MeOH seja padronizado e seguido conforme o procedimento descrito no preparo das amostras.

Tabela 37 - Efeitos das variáveis estudadas em relação aos parâmetros de teor (%), tempo de retenção (min), eficiência da coluna (N) e fator de cauda (Fc).

| Variável | EFV | | | | 3TC | | | | TDF | | | |
|--|-------|----------------|--------|-------|-------|----------------|------|-------|-------|----------------|--------|-------|
| | Teor | t _R | N | Fc | Teor | t _R | N | Fc | Teor | t _R | N | Fc |
| Forno da coluna (°C) A: 30; a: 25 | -0,54 | -0,15 | 8579 | 0,01 | -0,31 | -0,09 | 150 | 0,00 | 0,30 | -0,05 | 15020 | -0,03 |
| pH do tampão B: 5,4 ; b: 5,7 | -0,50 | 0,03 | 1641 | -0,01 | 0,77 | 0,00 | 120 | -0,02 | 1,10 | 0,02 | -70 | -0,02 |
| Vazão (mL) C: 1,0; c: 1,2 | 0,46 | 0,94 | -2728 | 0,01 | -0,49 | 0,56 | 770 | 0,02 | -0,62 | 0,67 | -7398 | 0,03 |
| λ detecção (nm) D: 260; d: 262 | 0,30 | 0,03 | -1003 | -0,01 | 0,09 | 0,02 | -104 | 0,01 | 0,14 | 0,01 | -1422 | -0,01 |
| Tempo ultrassom (min) E: 20 min; e: 15 min | 1,50 | 0,03 | -11274 | -0,01 | 1,55 | 0,01 | -72 | 0,00 | 2,14 | 0,01 | 611 | 0,01 |
| Coluna F: SunFire; f: Eclipse | 1,36 | 0,98 | -13287 | -0,04 | 0,37 | 0,50 | 1028 | -0,08 | 1,02 | 0,34 | -10189 | -0,09 |
| Modelo equipamento G: HP1100; g: Agilent1200 | 0,56 | -0,03 | -11430 | 0,04 | 0,53 | 0,10 | -460 | 0,02 | 0,39 | 0,03 | -23731 | 0,01 |
| Valor crítico (s√2) | 1,24 | 0,73 | 12372 | 0,04 | 1,06 | 0,39 | 777 | 0,05 | 1,31 | 0,40 | 18299 | 0,06 |

Legenda: N = número de pratos teóricos.

Apesar de possuir a mesma fase estacionária, diâmetro interno e tamanho de partículas, a mudança do fabricante da coluna provocou alterações no tempo de retenção, no número de pratos teóricos e no fator de cauda dos picos. Essas alterações são esperadas devido à diferença no processo de fabricação de cada coluna, da sílica utilizada como suporte e da manutenção e condições de uso, o que pode promover alterações abruptas da seletividade da fase estacionária em relação ao analito (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997; DOLAN *et al.*, 2002).

O aumento do fator de cauda em consequência da alteração da marca da coluna decorre da menor porcentagem de cobertura de carbono da coluna Zorbax Eclipse, igual a 10% (ZORBAX, 2002), comparada com a coluna Sunfire, igual a 16% (SUNFIRE, 2008). Quanto maior for a porcentagem de carbono da coluna maior é o t_R e menor é o alargamento da banda.

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

A temperatura do forno da coluna, o λ de leitura e o pH do tampão não apresentaram influência significativa nos parâmetros avaliados. Entretanto, sabe-se que mudanças no pH da fase móvel podem alterar a seletividade do método e quando o valor de pH está próximo do valor de pka dos analitos, pequenas mudanças no pH (como 0,1 unidade) têm maior efeito no alargamento do pico e na resolução (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997). A variação do pH não influenciou nos parâmetros de teor, t_R , N e Fc para a 3TC.

A mudança do modelo de cromatógrafo influencia na separação dos analitos, principalmente pela diferença que existe no volume morto (*dwell volume*) nas separações em gradiente, que é capaz de deslocar o t_R dos analitos (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997). Entretanto, a mudança do modelo do cromatógrafo não influenciou o t_R dos ARV, mas aumentou o N para TDF.

4.2.6 Limites de detecção e de quantificação

Os valores dos LD e de LQ foram estimados a partir das curvas analíticas e determinados experimentalmente por diluições sucessivas (

Tabela 38).

Tabela 38 - Valores estimados a partir da curva analítica e valores experimentais para os limites de detecção e de quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila.

| Insumo farmacêutico ativo | Limite de detecção | | Limite de quantificação | |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | Estimado ($\mu\text{g/mL}$) | Experimental ($\mu\text{g/mL}$) | Estimado ($\mu\text{g/mL}$) | Experimental ($\mu\text{g/mL}$) |
| EFV | 45,29 | 2,78 | 137,23 | 9,28 |
| 3TC | 34,86 | 0,29 | 105,64 | 0,78 |
| TDF | 52,07 | 0,99 | 157,78 | 6,90 |

Para a determinação dos limites experimentais, prepararam-se *Soluções padrão* dos insumos farmacêuticos ativos (45 µg/mL EFV, 25 µg/mL 3TC e 25 µg/mL TDF) e, em seguida, diluições sucessivas foram realizadas até obter a relação s/r = 3 para o limite de detecção e s/r = 10 para o limite de quantificação. Os limites experimentais foram inferiores ao estimado pela curva analítica em todos os casos.

De acordo com os dados experimentais, o método proposto para a quantificação simultânea dos insumos farmacêuticos ativos pode ser utilizado para detectar EFV a 2,78 µg/mL (DPR = 0,66%), 3TC a 0,29 µg/mL (DPR = 1,08%) e TDF a 0,99 µg/mL (DPR = 1,27%). A quantificação pode ser realizada na concentração de 9,28 µg/mL EFV (DPR = 0,66%), 0,78 µg/mL 3TC (DPR = 0,69%) e 6,90 µg/mL TDF (DPR = 0,45%). Consideram-se válidos os resultados experimentais de LD e LQ, uma vez que os valores de DPR de cinco injeções consecutivas foram inferiores a 2,0% para os ARV, o que demonstra a reprodutibilidade das respostas nas concentrações experimentais de detecção e quantificação dos insumos farmacêuticos ativos.

Os limites de detecção e quantificação foram avaliados como informação adicional ao método de análise, não sendo um requisito obrigatório para a validação de métodos analíticos quantitativos para a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

CAPÍTULO 4

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E TENOFOVIR
EM PLASMA HUMANO**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Espectrometria de massas

Cromatografia a líquido acoplada a uma fonte de ionização à pressão atmosférica em espectrometria de massas sequencial (MS/MS) é atualmente considerada como um método de escolha para análises quantitativas de compostos em matrizes biológicas. As vantagens em utilizar MS/MS no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) são, principalmente, aumento da seletividade e sensibilidade (MATUSZEWSKI, CONSTANZER e CHAVEZ-ENG, 2003; TAYLOR, 2005; XU *et al.*, 2007). A seletividade inerente aos métodos por cromatografia a líquido acoplada a MS/MS resultam em cromatogramas que não apresentam interferentes aparentes, embora concentrações relativamente altas dos componentes da matriz estejam presentes (HERNÁNDEZ, SANCHO e POZO, 2005).

Espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica para separação de moléculas ionizadas pela diferença do movimento dos íons com base em sua massa. Os íons formados na fonte de ionização são acelerados pela energia acrescentada e transportados para o analisador de massa. Eles são separados pela movimentação característica de acordo com a razão massa/carga (m/z) (MANO e GOTO, 2003).

O uso da detecção por espectrometria de massas no modo de monitoramento do íon único (SIM) ou MRM utilizando instrumentos do tipo triplo-quadrupolo praticamente substituíram a detecção por ultravioleta (UV) para bioanálises. A detecção por MS oferece muitas vantagens sobre a detecção por ultravioleta e tem permitido resolver muitos dos problemas analíticos tais como sensibilidade, seletividade e velocidade de recuperação das condições iniciais (WILSON, 2003).

1.1.1 Espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

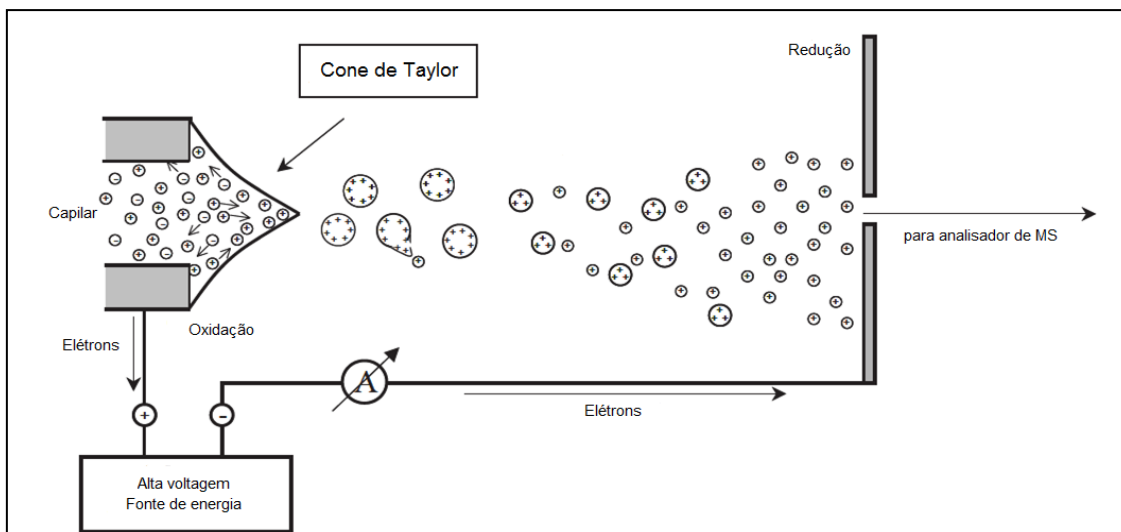
Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) tem se difundido nas mais diversas áreas da ciência, seja para simples determinação da massa molar e/ou quantificação de uma substância ou mesmo em estudos de

determinação estrutural (CROTTI, 2006). ESI-MS tornou-se popular como um detector de analitos por sua especificidade, sensibilidade e capacidade de gerar informações estruturais (HENRIKSEN e JUHLER, 2005), bem como uma alternativa para geração de íons a partir de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida (MORAES e LAGO, 2003). Essa é uma das técnicas analíticas mais empregadas, devido à sua ampla aplicabilidade para detectar pequenas (por exemplo, metabólitos) e grandes (por exemplo, proteínas) moléculas, bem como o possível acoplamento com cromatografia a líquido (CROTTI, SERAGLIA e TRALDI, 2011).

ESI-MS envolve a formação de um *spray* eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e dessas são liberados os íons (MORAES e LAGO, 2003). Uma solução diluída do analito é bombeada através de um capilar a um baixo fluxo (0,1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$) e uma alta voltagem (2-5 kV) aplicada ao capilar, podendo ser negativa ou positiva, dependendo do analito de escolha. A voltagem aplicada provê o campo elétrico necessário para a separação da carga produzida na superfície do líquido. Como resultado, o líquido é liberado na extremidade do capilar formando o conhecido “Cone de Taylor” (CECH e ENKE, 2001). A eficiência de ionização é baseada na relação entre as propriedades dos grupos iônicos na molécula alvo e o valor de pKa dos componentes ácidos dos sais adicionados à fase móvel (IKEGAWA *et al.*, 1997).

A aplicação de um alto campo elétrico na ponta do capilar metálico do *electrospray* leva à separação parcial dos íons positivos em relação aos eletrólitos negativos em solução, isso porque o campo penetra parcialmente a superfície do líquido na extremidade do capilar. No modo íon positivo, por exemplo, a densidade dos íons positivos aumenta na superfície do líquido na ponta do capilar em forma de gota, enquanto que os íons negativos orientam-se em direção às laterais. A repulsão dos íons positivos na superfície e a força do campo elétrico sobre os mesmos vencem a tensão superficial do líquido e expande-se formando o “Cone de Taylor”, cuja ponta se alonga em um filamento de líquido. Esse filamento rompe-se em partículas individuais carregadas (KEBARLE, 2000), conforme representado na **Figura 23**.

Figura 23 - Ilustração do procedimento de ionização por *electrospray* no modo positivo.

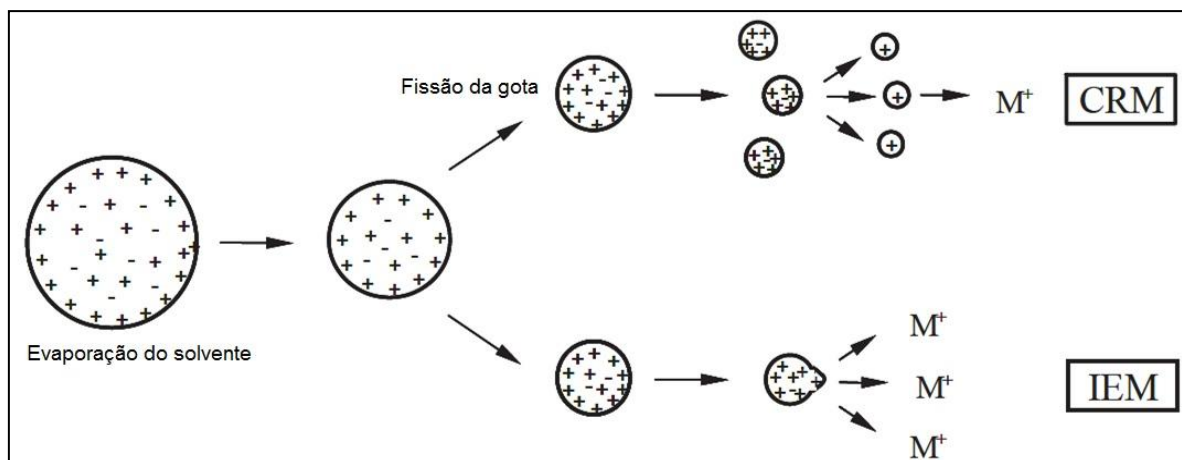


Fonte: adaptado de BLADES, IKONOMOU e KEBARLE, 1991.

A formação dos íons na fase gasosa pode ser explicada por dois mecanismos denominados de modelo de carga residual (*charged residue model*, CRM) e modelo da evaporação do íon (*ion evaporation model*, IEM). No primeiro modelo, considera-se que ocorre aumento da densidade de carga devido à evaporação do solvente resultando na divisão da gota em pequenas gotículas, que eventualmente consistem em um único íon (explosão de Coulomb). O segundo modelo sugere que o aumento da densidade de carga devido à evaporação do solvente, ocasiona repulsão entre as cargas aumentando a tensão superficial do líquido, o que resulta na liberação dos íons da superfície da gota (MORAES e LAGO, 2003; CECH e ENKE, 2001). A **Figura 24** ilustra os dois modelos de formação dos íons na fase gasosa.

Após a formação dos íons, eles alcançam uma região de baixa pressão, onde há um conjunto de lentes que os conduzem ao analisador de massas. Nessa região, podem ocorrer dissociações induzida por colisão (CID), em que ocorre a colisão entre os íons e as moléculas do gás secante (nitrogênio) (MORAES e LAGO, 2003).

Figura 24 - Descrição esquemática do modelo de carga residual (CRM) e do modelo de evaporação do íon (IEM).



Fonte: adaptado de CROTTI, SERAGLIA e TRALDI, 2011.

Como o método por ESI-MS é muito sensível, concentrações baixas do analito podem ser usadas mantendo a linearidade na faixa de concentração de 10^{-7} a 10^{-3} mol/L (KEBARLE e VERKERK, 2009). Consideráveis variações na resposta da ionização por *electrospray* é observada para pequenas moléculas polares e muito tempo é frequentemente requerido para otimizar as condições analíticas específicas para um analito particular (HENRIKSEN e JUHLER, 2005).

1.1.2 Analisador de massas do tipo triplo-quadrupolo

Um analisador de massas do tipo triplo-quadrupolo realiza análises MS/MS com a dissociação induzida por colisão. No primeiro quadrupolo, o íon precursor é selecionado e o segundo quadrupolo funciona como um espaço para a fragmentação com CID. Os íons fragmentados são separados pela razão m/z no terceiro quadrupolo (MANO e GOTO, 2003). Triplo-quadrupolo tem a vantagem de permitir experimentos utilizando espectrometria de massas sequencial, mas são limitados a uma faixa máxima de aproximadamente 4000 m/z (HILTON e BENESCH, 2012). O espectro MS/MS é capaz de discriminar entre a molécula alvo e impurezas, que são eluídas simultaneamente, e pode identificar facilmente o composto de interesse (MANO e GOTO, 2003). LC/MS/MS em comparação com CLAE-UV requer um menor preparo da amostra por ser uma técnica altamente seletiva e, por isso, a separação cromatográfica dos analitos não é necessária (ANNESLEY, 2003).

1.2 Preparo de amostra

O isolamento das moléculas de interesse do fluido biológico é uma etapa primordial para obter sucesso na quantificação por LC-MS/MS. Amostras introduzidas no espectrômetro de massas sem tratamento prévio podem causar supressão iônica (VOGESER, 2003). A supressão iônica pode acontecer, por exemplo, em decorrência dos componentes da matriz da amostra e de compostos coeluídos, sendo as principais causas as mudanças nas propriedades da solução a ser pulverizada pela presença de solutos não voláteis ou menos voláteis. Esses solutos não voláteis (por exemplo, sais e compostos endógenos) podem alterar a eficiência na formação ou evaporação das gotículas que, por sua vez, afeta a quantidade de íons carregados na fase gasosa que alcançam o detector (ANNESLEY, 2003).

O preparo típico de amostra inclui as etapas de isolamento do composto de interesse de uma matriz complexa, pré-concentração do analito e reconstituição da amostra em solvente compatível com a separação e detecção por LC-MS/MS (BOZOVIC e KULASINGAM, 2013). As técnicas de preparo de amostra mais utilizadas em bioanálises são extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE) e precipitação de proteínas.

O preparo de amostras por ELL baseia-se na solubilidade relativa do analito em dois diferentes solventes imiscíveis. Esse método pode originar extratos limpos com evidência de baixo efeito matriz e pouca tendência de entupimento da coluna cromatográfica (JEMAL e XIA, 2006). ELL não é um método amplamente utilizado, pois requer muito tempo para seu adequado desenvolvimento (ACKERMANN, BERNA e MURPHY, 2002). Como vantagem, ELL é uma técnica simples, possibilitando o uso de grande variedade de solventes disponíveis comercialmente, os quais fornecem ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas. Por outro lado, podem-se citar algumas desvantagens como, por exemplo, extração parcial de analitos polares pelo solvente orgânico resultando em perdas dos analitos; formação de emulsões e utilização de volumes maiores de amostras e solventes para a execução do método (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2001).

SPE constitui um método de extração e pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. Esse método utiliza sorventes recheados em cartuchos e os mecanismos de retenção são similares àqueles envolvidos na cromatografia a líquido em coluna (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2001).

A precipitação de proteínas constitui uma técnica simples de preparação de amostras em bioanálise e, também, universal uma vez que pode ser aplicada para extrair praticamente qualquer analito (JEMAL e XIA, 2006). Essa técnica é comumente utilizada para uma rápida “limpeza” da amostra e rompimento da ligação insumo farmacêutico ativo-proteína. Assim, para quantificar insumo farmacêutico ativo em plasma é frequentemente necessário romper as ligações insumo farmacêutico ativo-proteína de modo que a quantidade total de insumo farmacêutico ativo seja extraída para análise. As diferentes técnicas de precipitação de proteínas (solvente orgânico, ácido, sal e íon metálico) possuem diferentes modos de precipitação, sendo os solventes orgânicos os precipitantes mais amplamente utilizados em análises (POLSON *et al.*, 2003).

Para a quantificação apropriada de insumo farmacêutico ativo usando precipitação de proteínas por ESI-MS/MS, deve haver um balanço adequado entre o grau de supressão de ionização ou aprimoramento de uma dada fase móvel, eficácia do precipitante de proteína, adequado tempo de retenção do analito e formato do pico. Recomendações devem ser seguidas no desenvolvimento do método analítico, tais como: estabilidade do analito em relação ao pH, solubilidade e compatibilidade com o sistema LC-MS/MS (POLSON *et al.*, 2003). A precipitação de proteínas não resulta na obtenção de um extrato muito limpo, o que pode ocasionar supressão iônica em ESI, quando esse método falha na remoção de compostos endógenos como lipídios, fosfolipídeos, ácidos graxos, etc. (EECKHAUT *et al.*, 2009; JEMAL e XIA, 2006).

1.3 Métodos bioanalíticos para quantificação de EFV, 3TC e tenofovir

Atualmente, métodos bioanalíticos para quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir em plasma humano e animal ainda não foram descritos na literatura científica. Métodos bioanalíticos para quantificação isolada desses insumos farmacêuticos ativos ou em associação com outros ARV em diversas matrizes

biológicas estão disponíveis. Nos **Quadros 11 a 14** estão descritos os métodos bioanalíticos e o método de extração do analito da amostra biológica. Os métodos encontrados para a preparação da matriz biológica para a quantificação dos insumos farmacêuticos ativos foram diversificados. Para EFV existem métodos por SPE, precipitação de proteínas e ELL. Para 3TC foram encontrados métodos para tratamento da amostra por SPE, ultrafiltração, precipitação de proteínas e ELL. Para tenofovir houve a descrição de dois métodos: SPE e precipitação de proteínas. Quantificações simultâneas de dois insumos farmacêuticos ativos foram relatadas: precipitação de proteínas e SPE para EFV+3TC, SPE para EFV + tenofovir e precipitação de proteínas, SPE e ELL para associação de 3TC + tenofovir.

Quadro 11 - Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de efavirenz em matrizes biológicas.

| Referência | IFA | Matriz | Método de preparação da amostra | Fase móvel | Coluna | Vazão (mL/min) | Eluição | Deteção | Padrão interno | Faixa linear |
|-----------------------------------|--|----------------------------|---------------------------------|---|---|----------------|------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| VILLANI <i>et al.</i> , 2001 | <u>EFV</u> + 7 ARV | Plasma humano | Extração líquido-líquido | ACN:H ₂ O | Supelcosil LC-18-DB (7,5 cm x 4,6 mm; 3 µm); TA | 0,8 | Gradiente | MS | 6,7-dimetil-quinoxalina | 20-10000 ng/mL |
| RENTSCH, 2003 | <u>EFV</u> + 7 ARV | Plasma humano | Extração em fase sólida | A: ACN + 30% MeOH e tampão carbonato de amônio pH 9,3 (5:95, v/v) B: ACN + 30% MeOH e acetato de amônio pH 9,3 (95:5, v/v) | Nucleosil C18 Hd (125 mm x 2 mm; 5 µm) | 0,2 | Gradiente | MS | A-86093 | 200-6000 µg/L |
| TURNER <i>et al.</i> , 2003 | <u>EFV</u> + 8 ARV | Plasma humano | Precipitação de proteínas | Tampão fosfato de potássio 25 mM pH 3,1: ACN: MeOH | Supelco Discovery C8 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); 27 °C | 1,5 | Gradiente | UV, 210 nm | A-86093 | 50-10000 ng/mL |
| RAMACHANDRAN <i>et al.</i> , 2006 | <u>EFV</u> | Plasma humano | Precipitação de proteínas | Tampão fosfato 10 mM (pH 2,4 ajustado com HCl 0,1 M): ACN (55:45, v/v) | C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) | 2,4 | Isocrática | UV, 245 nm | Nefazodona | 0,0625-10,0 µg/mL |
| CHOI, REZK e KASHUBA, 2007 | <u>EFV</u> + 9 ARV | Plasma humano | Extração líquido-líquido | ND | Coluna de fase reversa | ND | Gradiente | UV, 210 nm | Clozapina | 10-10000 ng/mL |
| DOGAN-TOPAL, OZKAN e USLU, 2007 | <u>EFV</u> , abacavir e valganciclovir | Soro humano | Precipitação de proteínas | ACN: MeOH: KH ₂ PO ₄ pH 5,00 (40:20:40, v/v/v) | Waters Spherisorb (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | 1,0 | Isocrática | UV, 210 nm | Fluvastatina | 50-30000 ng/mL |
| HEINE <i>et al.</i> , 2007 | <u>EFV</u> + 11 ARV | Plasma humano | Precipitação de proteínas | A: MeOH + tampão acetato de amônio 10 mM, pH 5,0 (35:65, v/v) B: MeOH | C18 (150 mm x 2,0 mm; 5 µm) | 0,25 | Gradiente | MS/MS | ¹³ C6-efavirenz | 0,1-20 µg/mL |
| SAILAJA <i>et al.</i> , 2007 | <u>EFV</u> | Plasma humano | Extração líquido-líquido | ACN: tampão fosfato pH 3,5 (50:50, v/v) | Zorbax C18 (750 mm x 4,6 mm; 3,5 µm) | 0,8 | Isocrática | UV, 247 nm | Nelfinavir | 0,1-10 µg/mL |
| ELENS <i>et al.</i> , 2009 | <u>EFV</u> + 9 ARV | Plasma humano | Extração em fase sólida | A: acetato de amônio 50 mmol/L e ácido fórmico 50 mmol/L B: ACN | C8 (100 mm x 2,1 mm); 60 °C | 0,45 | Gradiente | UPLC-UV, 240 nm (EFV) | A-86093 | 0,025-10 mg/L |
| AVERY <i>et al.</i> , 2010 | <u>EFV</u> | Plasma sanguíneo e seminal | Ultrafiltração | A: ácido fórmico 0,1% em H ₂ O B: ácido fórmico 0,1% em MeOH | Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm; 1,7 µm) | 0,5 | Gradiente | UPLC-MS/MS | 6-fluoro análogo de EFV | 0,5-10000 ng/mL |
| D'AVOLIO <i>et al.</i> , 2010 | <u>EFV</u> + 8 ARV | Plasma humano | Extração líquido-líquido | A: H ₂ O + 0,05% ácido fórmico B: ACN + 0,05% ácido fórmico | Atlantis T3 C18 (150 mm x 2,1 mm; 3 µm); 35 °C | ND | Gradiente | MS | Quinoxaline | ND |
| ANTUNES <i>et al.</i> , 2011 | <u>EFV</u> + 7 ARV | Plasma humano | Extração líquido-líquido | ACN: tampão fosfato trietilamônio 5 mmol/L pH 3,0 | Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm; 1,7 µm); 55 °C | 0,45 | Gradiente | UPLC-UV, 240 nm (EFV) | Clomipramina | 0,1-10,0 µg/mL |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; EFV = efavirenz; ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; UV = ultravioleta; MS = massas; MS/MS = espectrometria de massas sequencial; UPLC: cromatografia a líquido ultra-alto desempenho; ND = não descrito.

Quadro 12 - Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de lamivudina em matrizes biológicas.

| Referência | IFA | Matriz | Método de preparação da amostra | Fase móvel | Coluna | Vazão (mL/min) | Eluição | Deteção | Padrão interno | Faixa linear |
|----------------------------------|---|--|---------------------------------|--|--|----------------|------------|-----------------------------|-----------------|---|
| HOETELMANS <i>et al.</i> , 1998 | 3TC | Plasma, saliva e fluido cerebrospinal humano | Extração em fase sólida | Tampão hidrogenofosfato dipotássio 0,005 M pH 6,8 (ajustado com ácido fosfórico): MeOH (92:8, v/v) | µBondapack phenyl (300 mm x 3,9 mm; 10 µm) | 1,0 | Isocrática | UV, 270 nm | ND | 10-5000 ng/mL |
| KENNEY <i>et al.</i> , 2000 | 3TC e zidovudina | Soro humano | Ultrafiltração | ACN:H ₂ O (15:85, v/v) | Keystone Aquasil C18 (150 mm x 2 mm; 5 µm) | 0,3 | Isocrática | MS/MS | Isótopo da 3TC | 2,5-5000 ng/mL |
| | | | Extração em fase sólida | MeOH: ACN: Ácido acético: Acetato de amônio 0,1 M (8:1:0,1:90,9, v/v/v/v) | Hypersil BDS (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | 1,0 | | UV, 270 nm | ND | ND |
| YUEN <i>et al.</i> , 2001 | 3TC, abacavir e zidovudina | Soro humano | Ultrafiltração | ND | Coluna de fase reversa | ND | ND | MS/MS | GR109714M (3TC) | 2,5-5000 ng/mL |
| REZK, TIDWELL e KASHUBA, 2003 | 3TC, zalcitabina, didanosina, estavudina, zidovudina, abacavir e nevirapina | Plasma humano | Extração em fase sólida | A: tampão acetato de amônio 10 mM (pH 6,5 ajustado com ácido acético diluído) B: 200 mL de fase móvel A (pH 6,5) + 500 mL ACN + 300 mL MeOH | Polarity dC C18 (150 mm x 3,9 mm; 5 µm); 40 °C | 1,1 | Gradiente | UV, 271 nm (3TC) | Hexobarbital | 10-10000 ng/mL |
| KANO <i>et al.</i> , 2005 | 3TC | Plasma humano | Precipitação de proteínas | Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado (10 mM): MeOH: ACN (93:3:3, v,v,v; pH 4,8) | Shim-pack CLC-C8 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); 40 °C | 1,2 | Isocrática | UV, 270 nm | Estavudina | 0,05-3,00 µg/mL |
| WISSEN, AARNOUTSE e BURGER, 2005 | 3TC, didanosina, estavudina, zidovudina e abacavir | Plasma humano | Extração de fase sólida | Tampão acetato (acetato de potássio 20 mM pH 4,6 ajustado com ácido acético): ACN A: tampão acetato: ACN (95:5, v/v). B: tampão acetato: ACN (76:24, v/v) | Symmetry Shield C18 (150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm); 30 °C | 1,0 | Gradiente | UV, 260 nm | ND | 0,015-5 mg/L |
| MISTRI <i>et al.</i> , 2007 | 3TC, estavudina e nevirapina | Plasma humano | Extração em fase sólida | Ácido acético 0,5%: ACN (20:80, v/v) | Symmetry C18 (150 mm x 3,9 mm; 5 µm); 25 °C | 0,4 | Isocrática | MS/MS | Metaxalona | 25-3000 ng/mL |
| CHECA <i>et al.</i> , 2008 | 3TC + 12 ARV | Plasma bovino e suíno | Extração em fase sólida | Ácido acético 1%: acetato de amônio pH 4,5: ACN | Synergy Hydro-RP C18 (150 mm x 4,6 mm; 4 µm) | ND | Gradiente | UV, 280 nm | ND | 10-10000 ng/mL |
| SUZUKI <i>et al.</i> , 2009 | 3TC, abacavir, didanosina e zidovudina | Plasma humano | Extração em fase sólida | ACN: tampão fosfato monobásico de potássio 25 mM pH 8,0 (ajustado com NaOH 0,5 mol/L) (1:9, v/v) | CapcellPak C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) | 0,6 | Isocrática | Eletroquímico/Fluorescência | Vidarabina | Eletroquímico: 2 ng/mL-10 µg/mL Fluorescência: 5 pg/mL-5 µg/mL |
| LI <i>et al.</i> , 2010 | 3TC, estavudina e nevirapina | Plasma humano | Precipitação de proteínas | A: MeOH: H ₂ O contendo acetato de amônio 10 mM (80:20, v/v) B: H ₂ O contendo acetato de amônio 10 mM (80:20, v/v) | Shiseido C8 (150 mm x 2,0 mm; 5 µm); 35 °C | 0,2 | Gradiente | MS/MS | Zidovudina | 25-5000 ng/mL |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; 3TC = lamivudina; ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; UV = ultravioleta; MS/MS = espectrometria de massas sequencial; ND = não descrito. /continua.

Quadro 12 - Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de lamivudina em matrizes biológicas.

(Conclusão)

| Referência | IFA | Matriz | Método de preparação da amostra | Fase móvel | Coluna | Vazão (mL/min) | Eluição | Deteção | Padrão interno | Faixa linear |
|--|------------------|------------------------------|---------------------------------|--|--------------------------------------|----------------|------------|------------|----------------|---------------|
| JOSHI <i>et al.</i> , 2010 | 3TC e zidovudina | Plasma humano e medicamentos | Extração líquido-líquido | MeOH: KH ₂ PO ₄ (35:65, v/v; pH 6,5 ajustado com trietilamina) | Luna C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) | 1,0 | Isocrática | UV, 245 nm | Aprobarbital | 50-2400 ng/mL |
| WATTANANAT, PRASANCHAIMON TRI e AKARAWUT, 2010 | 3TC e estavudina | Plasma humano | Extração em fase sólida | A: tampão acetate de amônio 10 mM pH 6,5 B: ACN | Apollo C18 (150 mm x 4,6 mm); 30 ° C | 1,0 | Gradiente | UV, 265 nm | Zidovudina | 50-5000 ng/mL |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; 3TC = lamivudina; ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; UV = ultravioleta; MS/MS = espectrometria de massas sequencial; ND = não descrito.

Quadro 13 - Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de tenofovir em matrizes biológicas.

| Referência | IFA | Matriz | Método de preparação da amostra | Fase móvel | Coluna | Vazão (mL/min) | Eluição | Deteção | Padrão interno | Faixa linear |
|-------------------------------------|--|-------------------------|---------------------------------|--|--|----------------|------------|-----------------|--------------------------------|-------------------|
| REZK, CRUTCHLEY e KASHUBA, 2005 | Tenofovir e emtricitabina | Plasma humano | Extração em fase sólida | A: tampão fosfato monobásico 20 mM e sulfato de hidrogênio tetrabutilamônio 4 mM pH 5,7 B: MeOH | Atlantis™ dC-18 (150 mm x 3,9 mm; 5 µm); 25 °C | 1,0 | Gradiente | UV, 259 nm | 2',3' didoxiuridina | 10-10000 ng/mL |
| DELAHUNTY, BUSHMAN e FLETCHER, 2006 | Tenofovir | Plasma humano | Precipitação de proteínas | ACN: ácido acético (3:1, v/v) | Polar-RP Synergi (150 mm x 2,0 mm; 4 µm) | 0,2 | Isocrática | MS/MS | Adenofovir | 10-750 ng/mL |
| BARKIL, GAGNIEU e GUITTON, 2007 | Tenofovir | Plasma humano | Extração em fase sólida | Tampão acetato de amônio (pH 2,5 ajustado ácido fórmico): MeOH (98,5:1,5, v/v) | Atlantis® dC18 (150 mm x 3,0 mm; 3 µm); 30 °C | 0,6 | Isocrática | UV, 260 nm e MS | 3-metilcitolina | 10-1000 ng/mL |
| BENNETTO-HOOD, LONG e ACOSTA, 2007 | Tenofovir | Plasma humano | Extração em fase sólida | Hidroxilamina/tampão ácido acético (pH 6,75): MeOH (93:7, v/v) | Atlantis® dC18 (100 mm x 2,0 mm; 3 µm) | 0,2 | Isocrática | MS | Zalcitabina | 1-750 ng/mL |
| TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2007 | Tenofovir | Plasma humano | Precipitação de proteínas | Ácido trifluoroacético 0,3%: ACN: acetato de amônio 100 mM | Sunfire C18 (50 mm x 2,1 mm; 3,5 µm); 40 °C | 0,2 | Gradiente | MS | Atenolol | 0,019-1,567 µg/mL |
| GOMES <i>et al.</i> , 2008 | Tenofovir e emtricitabina | Plasma humano | Extração em fase sólida | ACN: acetato de amônio (pH 3,0, 40 mM) (20:80, v/v) | Chromolith Speed Rod C18 (50 mm x 4,6 mm); 25 °C | 0,7 | Isocrática | MS/MS | 3TC | 10-600 ng/mL |
| BENNETTO-HOOD <i>et al.</i> , 2009 | Tenofovir, nevirapina, atazanavir, lopinavir e ritonavir | Secreção cervicovaginal | Extração em fase sólida | Hidroxilamina 52,2 mM/ácido acético 4,9 mM: MeOH (93:7, v/v) | Atlantis® dC18 (100 mm x 2,1 mm; 3 µm) | 0,2 | Isocrática | MS | ND | 1-750 µg/L |
| DELAHUNTY <i>et al.</i> , 2009 | Tenofovir e emtricitabina | Plasma humano | Precipitação de proteínas | ACN: ácido acético (3:1, v/v) | Synergi Polar-RP (150 mm x 2,0 mm; 4 µm); 25 °C | 0,2 | Isocrática | MS/MS | Isótopo de tenofovir | 10-1500 ng/mL |
| PRUVOST <i>et al.</i> , 2009 | TDF | Plasma humano | Extração em fase sólida | H ₂ O: ácido fórmico (99,5: 0,5, v/v) | Synergi Polar RP (50 mm x 2 mm; 4 µm); 40 °C | 0,3 | Gradiente | MS/MS | 2-cloroadenosina e 2-cloro-ATP | 5-1500 ng/mL |
| YADAV <i>et al.</i> , 2009 | Tenofovir | Plasma humano | Extração em fase sólida | Ácido fórmico 0,5%: ACN (90:10, v/v) | Chromolith C18 (100 mm x 4,6 mm; 5 µm) | 1,5 | Isocrática | MS/MS | Adefovir | 3,1-1002,0 ng/mL |
| CHOI <i>et al.</i> , 2010 | Tenofovir | Tecido vaginal humano | Extração em fase sólida | A: ácido fórmico 0,1% em H ₂ O, pH 2,5 B: ácido fórmico 0,1% em ACN | Polaris 3C18A (150 mm x 2 mm; 3 µm) | 0,2 | Gradiente | MS | Tolbutamida | 1-1000 ng/mL |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila; ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; UV = ultravioleta; MS = massas; MS/MS = espectrometria de massas sequencial; ND = não descrito.

Quadro 14 - Métodos de preparação da amostra e condições cromatográficas para quantificação de associações envolvendo os insumos farmacêuticos ativos efavirenz, lamivudina e tenofovir em matrizes biológicas.

| Referência | IFA | Matriz | Método de preparação da amostra | Fase móvel | Coluna | Vazão (mL/min) | Eluição | Deteção | Padrão interno | Faixa linear |
|-------------------------------|---|---|---------------------------------|--|---|----------------|------------|---------|---|--|
| FAN, BARTLETT e STEWART, 2002 | EFV, 3TC e estavudina | Soro humano | Extração em fase sólida | ACN: tampão acetato de amônio 20 mM pH 4,5 (ajustado com ácido acético) | Phenomenex Spherclone hexilsilano (150 mm x 2,0 mm; 3 µm) | 0,2 e 0,3 | Gradiente | MS/MS | Aprobarbital | 1,1-540 ng/mL (3TC) e 1,0-519 ng/mL (EFV) |
| VOLOSOV <i>et al.</i> , 2002 | EFV, 3TC + 13 ARV | Plasma humano | Precipitação de proteínas | MeOH | Supelco LC-18-DB (3,3 mm x 3,0 mm; 3,0 µm) | 1,0 | Isocrática | MS/MS | Cimetidina | 10-10000 ng/mL |
| PRUVOST <i>et al.</i> , 2008 | 3TC trifosfato, tenofovir difosfato e carbovir trifosfato | Células mononucleares de sangue periférico humano | Extração líquido-líquido | A: formato de amônio 6 mM (pH 5) e 1,5 dimetilhexilamina 20 mM; H ₂ O (1:1, v/v; pH 10,5) B: formato de amônio 6 mM (pH 5) e 1,5 dimetilhexilamina 20 mM; ACN (1:1, v/v) | Supelcogel ODP-50 (50 mm x 2,1 mm; 5 µm); 40 °C | 0,3 | Gradiente | MS/MS | 2-cloroadenosina 5'-trifosfato | 1,0-250 pmol/amostra (3TC) 0,1-6,0 pmol/amostra (Tenofovir difosfato) |
| SAUX <i>et al.</i> , 2008 | 3TC, TDF + 5 ARV | Plasma humano | Precipitação de proteínas | A: H ₂ O contendo 0,05% ácido fórmico B: MeOH contendo 0,05% ácido fórmico | Atlantis T3 (100 mm x 2,1 mm; 3 µm); 10 °C | 0,25 | Gradiente | MS/MS | 6-beta-hidroxi-teofilina | ND |
| NIROGI <i>et al.</i> , 2009 | EFV, tenofovir e emtricitabina | Plasma humano | Extração em fase sólida | Ácido fórmico 0,1%: ACN | Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm); 25 °C | 1,5 | Gradiente | MS/MS | Propranolol (tenofovir) e rosuvastatina (EFV) | 20-2000 ng/mL |
| YADAV <i>et al.</i> , 2010 | 3TC, tenofovir e emtricitabina | Plasma humano | Extração em fase sólida | Ácido fórmico 0,5%: ACN (55:45, v/v) | ACE 5 CN (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); 40 °C | 1,0 | Isocrática | MS/MS | Aciclovir | 20,1-4023 ng/mL (3TC) 4,0-802 ng/mL (TEN) |

Legenda: IFA = insumo farmacêutico ativo; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina; TDF = fumarato de tenofovir desoproxila; ARV = antirretrovirais; ACN = acetona; MeOH = metanol; UV = ultravioleta; MS/MS = espectrometria de massas sequencial; ND = não descrito.

2 MATERIAIS

2.1 Substâncias químicas de referência e padrões de trabalho

- Efavirenz SQR USP 200 mg, lote FOG376.
- Lamivudina SQR USP 200 mg, lote HOI378.
- Tenofovir SQR USP 15 mg, lote FOJ005.
- Efavirenz matéria-prima, Nortec Química S. A., Rio de Janeiro, Brasil. Lote 57270.
- Lamivudina matéria-prima, Fundação Ezequiel Dias (Coben Pharmaceutical Co., China), lote interno 2011050113, teor 99,09%.
- Tenofovir matéria-prima, Blanver, Lote 080901.

2.2 Padrões internos

- Sulfato de indinavir matéria-prima, Lote 0540600.
- Aciclovir SQR Farmacopéia Brasileira, Lote 1021.
- Estavudina matéria-prima para estudo interlaboratorial da Farmacopéia Brasileira (sem identificação do lote).

2.3 Plasma

- Plasma humano proveniente de coleta interna (nº protocolo de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG: ETIC 0525.0.203.000-10).

2.4 Reagentes e vidrarias

- Solventes e reagentes grau analítico: ácido fórmico (Fluka Analytical, MO, EUA) e hidróxido de amônio (Sigma Aldrich, MO, EUA).
- Solventes e reagentes grau cromatográfico: acetonitrila (J.T.Baker, NJ, EUA) e metanol (J.T.Baker, NJ, EUA).
- Água destilada e ultrapurificada.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.

- Béqueres, provetas, *erlenmeyers* e *kit* de filtração de fase móvel.

2.5 Equipamentos e materiais

- Agitador tipo vórtex IKA, modelo MS1 Minishaker, São Paulo, Brasil.
- Aparelho de ultrassom Branson, modelo 1510, Connecticut, EUA.
- Aparelho para infusão direta KD Scientific, Massachusetts, EUA.
- Balança analítica Sartorius modelo BP210D com precisão de 0,01 mg, Goettingen, Alemanha.
- Centrífuga refrigerada Jouan, modelo MR23i, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA.
- Coluna cromatográfica ciano Zorbax® SB-CN (150 mm x 4,6 mm; 5 µm), Agilent Technologies, EUA.
- Coluna cromatográfica ciano Zorbax SB-CN Rapid Resolution (150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm), Agilent Technologies, EUA.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters (Massachusetts, EUA), composto por bomba binária 1525 µ, auto injetor 2777, forno de colunas DCM/CHM, acoplado a espectrômetro de massas Waters modelo Quattro LC com fonte de ionização *electrospray*, *software* Masslynx® 4.1.
- Cronômetro Classe, modelo CLA-613A.
- Freezer REVCO -70 °C, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA.
- *Inserts* de 200 µL.
- Membranas de celulose regenerada 0,45 µm, Millipore, Massachusetts, EUA.
- Microtubos de 1,5 mL e 2 mL (tipo Eppendorf).
- Pipeta eletrônica HandyStep®, Brand, Connecticut, EUA.
- Pipetas automáticas Gilson monocal modelos P20, P200 e P1000, Wisconsin, EUA.
- Refrigerador Cònsul 240, Paraná, Brasil.
- Sistema de purificação de água Millipore, modelo Direct-Q3, Massachusetts, EUA.
- Tubos de centrífuga com fundo cônico (tipo Falcon) de 15 mL e 50 mL.

- *Vials* de vidro âmbar Waters de 2 mL com tampa e septos de teflon, Massachusetts, EUA.

3 MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir em plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas (LC-MS/MS) com ionização por *electrospray* (ESI)

O método bioanalítico para a quantificação de EFV, 3TC e tenofovir foi desenvolvido utilizando plasma humano obtido de voluntários sadios e as amostras de plasma foram coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante.

O tenofovir não é suficientemente biodisponível pela via oral, por isso é administrado oralmente como pró-fármaco na forma de fumarato de tenofovir desoproxila (CLERCQ, 2004b). No organismo, TDF sofre hidrólise por esterases em tenofovir, que é fosforilado pela nucleosídeo difosfato quinase na sua forma ativa difosfato. Diferentemente dos análogos de nucleosídeos, tenofovir não requer a reação inicial de fosforilação permitindo rápida e completa conversão no metabólito ativo (FUNG, STONE e PIACENTI, 2002). Desse modo, nos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, o analito a ser quantificado no plasma é o tenofovir e não o insumo farmacêutico ativo na forma de sal (fumarato de tenofovir desoproxila). Os insumos farmacêuticos ativos EFV e 3TC são administrados oralmente em sua forma ativa e, por isso, a quantificação no plasma é feita em sua forma inalterada (BRASIL, 2006).

A validação parcial é realizada quando são feitas determinadas modificações no método bioanalítico validado que não necessitam de revalidações completas, como transferência de métodos bioanalíticos entre laboratórios ou analistas, troca do equipamento ou *software*; troca da matriz de uma mesma espécie (por exemplo, plasma humano para urina humana) e do sexo de uma espécie; mudança no preparo da amostra, etc.. Dentre as alterações em métodos bioanalíticos que requerem a validação parcial está a mudança na matriz da espécie, por exemplo, a transferência de um método bioanalítico de plasma humano para plasma de coelho (LIN, LI e WENG, 2011; SHAH *et al.*, 2000).

3.1.1 Definição dos parâmetros de detecção por espectrometria de massas

O desenvolvimento do método bioanalítico foi iniciado com os parâmetros de detecção por MS/MS. Para isso, foram realizadas infusões isoladas e diretas no espectrômetro de massas das soluções dos insumos farmacêuticos ativos (EFV, 3TC e tenofovir) e dos candidatos a padrão interno a um fluxo de 600 µL/hora, no modo positivo [ESI(+)]. Soluções a 500 ng/mL foram preparadas diluindo-se, primeiramente, o analito em MeOH e, posteriormente, em uma segunda diluição utilizando mistura de tampão acetato de amônio 2 mM contendo ácido fórmico 0,025% e MeOH na proporção 1:1. Os principais parâmetros otimizados para obtenção de íons fragmento de alta intensidade foram voltagem do cone e voltagem de colisão, com o objetivo de alcançar baixos limites de quantificação para os analitos.

3.1.2 Definição dos parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas para a quantificação de EFV, 3TC e tenofovir em plasma humano foram definidas após testar diversas composições de fase móvel, em condições isocráticas e em gradiente, em diferentes colunas cromatográficas. A otimização das condições de análise foi realizada de forma a obter uma maior área sob os picos, minimizar os efeitos dos interferentes da matriz e obter tempo de corrida reduzido.

A vazão da fase móvel utilizada durante o desenvolvimento e validação do método foi de 1 mL/min. Como a fonte de ionização não suporta esse fluxo, foi feita uma divisão do fluxo (*split*) de forma que apenas 20% fosse introduzido no espectrômetro de massas.

3.1.3 Determinação do preparo da amostra

Para o preparo da amostra foram realizados métodos por precipitação de proteínas. O método de ELL não foi testado, uma vez que os insumos farmacêuticos ativos em estudo possuem diferentes características de solubilidade, o que inviabilizaria obter uma extração adequada e o método por SPE não foi utilizado por requerer

suprimentos de alto custo. No método de precipitação de proteínas, vários solventes e misturas foram testados tais como ACN, em diferentes proporções, adicionada de ácidos ou bases e MeOH com o objetivo de aumentar a eficiência da purificação e minimizar o efeito matriz.

Para a realização dos testes foram preparadas soluções estoque em MeOH de EFV a 500 µg/mL, 3TC a 500 µg/mL e tenofovir a 100 µg/mL. Os padrões internos 100 µg/mL aciclovir, 500 µg/mL estavudina e 100 µg/mL sulfato de indinavir, preparados em MeOH, foram experimentalmente escolhidos, respectivamente, para tenofovir, 3TC e EFV.

3.2 Validação do método bioanalítico

O método desenvolvido foi validado conforme a RDC nº 27 da Anvisa (BRASIL, 2012). Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, precisão, exatidão, efeito residual e efeito matriz. Os cálculos foram realizados com auxílio dos softwares Masslynx[®] 4.1 e Microsoft Office Excel[®] 2007.

3.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela análise de três curvas de calibração incluindo duas amostras branco, duas amostras zero (plasma branco apenas adicionado de solução padrão interno), seis amostras de diferentes concentrações dos analitos adicionadas do padrão interno, cinco pontos correspondentes ao limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD) (**Tabela 39**). Os dados obtidos para o LIQ e para os controles de qualidade foram utilizados para determinar a precisão e a exatidão do método bioanalítico. As faixas de concentrações plasmáticas foram definidas com base em estudos farmacocinéticos publicados na literatura, sendo de 200 a 10000 ng/mL para EFV, 50 a 4000 ng/mL para 3TC e de 100 a 1000 ng/mL para tenofovir (DROSTE, 2005; GOMES *et al.*, 2008; GOUNDEN *et al.*, 2008; GOUNDEN *et al.*, 2010; KANO *et al.*, 2005; MATHIAS *et al.*, 2007; PRUVOST *et al.*; 2009; RAMACHANDRAN *et al.*,

2006; YADAV *et al.*; 2010). As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo desenvolvido.

Prepararam-se, separadamente, *Soluções padrão estoque* de EFV (2 mg/mL), 3TC (1 mg/mL) e tenofovir (0,5 mg/mL). A diluição dos analitos foi realizada com MeOH. Para a *solução padrão estoque* de tenofovir acrescentaram-se 20 µL de hidróxido de amônio para solubilizar o insumo farmacêutico ativo antes de completar o volume do balão volumétrico com solvente orgânico.

As *Soluções padrão estoque* para os padrões internos foram preparadas realizando as diluições, separadamente, de cada analito até obter as concentrações de 100 µg/mL para sulfato de indinavir, 100 µg/mL para aciclovir e 500 µg/mL para estavudina.

Tabela 39 - Diluições para avaliação da linearidade do método bioanalítico por LC-MS/MS para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano.

| Ponto da curva de linearidade | | Volume da solução estoque (µL) | Balão volumétrico (mL) | Volume transferido para plasma (mL) | Volume final de plasma contaminado (mL) | Concentração final plasma (ng/mL) |
|-------------------------------|-----------|--------------------------------|------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 (LIQ) | EFV | 50 | 10 | 0,2 | 10 | 200 |
| | 3TC | 25 | | | | 50 |
| | tenofovir | 100 | | | | 100 |
| 2 | EFV | 250 | 10 | 0,1 | 5 | 1000 |
| | 3TC | 125 | | | | 250 |
| | tenofovir | 200 | | | | 200 |
| 3 | EFV | 500 | 10 | 0,1 | 5 | 2000 |
| | 3TC | 500 | | | | 1000 |
| | tenofovir | 400 | | | | 400 |
| 4 | EFV | 1250 | 10 | 0,1 | 5 | 5000 |
| | 3TC | 1000 | | | | 2000 |
| | tenofovir | 600 | | | | 600 |
| 5 | EFV | 1750 | 10 | 0,1 | 5 | 7000 |
| | 3TC | 1500 | | | | 3000 |
| | tenofovir | 900 | | | | 900 |
| 6 (LSQ) | EFV | 2500 | 10 | 0,1 | 5 | 10000 |
| | 3TC | 2000 | | | | 4000 |
| | tenofovir | 1000 | | | | 1000 |
| CQB | EFV | 150 | 10 | 0,2 | 10 | 600 |
| | 3TC | 75 | | | | 150 |
| | tenofovir | 300 | | | | 300 |
| CQM | EFV | 1000 | 10 | 0,1 | 5 | 4000 |
| | 3TC | 800 | | | | 1600 |
| | tenofovir | 450 | | | | 450 |
| CQA | EFV | 2000 | 10 | 0,2 | 10 | 8000 |
| | 3TC | 1600 | | | | 3200 |
| | tenofovir | 800 | | | | 800 |
| CQD | EFV | 4000 | 10 | 0,1 | 5 | 16000 |
| | 3TC | 3200 | | | | 6400 |
| | tenofovir | 1600 | | | | 1600 |

Legenda: LIQ = limite inferior de quantificação; LSQ = limite superior de quantificação; CQB = controle de qualidade baixo; CQM = controle de qualidade médio; CQA = controle de qualidade alto; CQD = controle de qualidade de diluição.

3.2.2 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão, intracorrída e intercorrídas, do método foram realizadas pela análise de replicatas das amostras de plasma contendo EFV, 3TC e tenofovir. A precisão e a exatidão foram avaliadas em três dias distintos de análise mediante os resultados obtidos nas injeções das amostras das curvas de calibração e de cinco replicatas de cada controle de qualidade (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD).

A exatidão foi expressa pelo erro padrão relativo (EPR), conforme a equação a seguir. Para a exatidão intra e intercorrídas o ERP deve estar compreendido na faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal (BRASIL, 2012).

$$EPR = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

A precisão foi avaliada pelo cálculo do DPR utilizando todos os valores obtidos. Como critério de aceitação, o DPR não deve ser superior a 15%, exceto para o LIQ cujo valor de DPR admitido é $\leq 20\%$ (BRASIL, 2012).

3.2.3 Efeito residual

Para sua avaliação realizaram-se três injeções da mesma amostra branco (plasma branco extraído), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada do LSQ. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ (BRASIL, 2012).

3.2.4 Efeito matriz

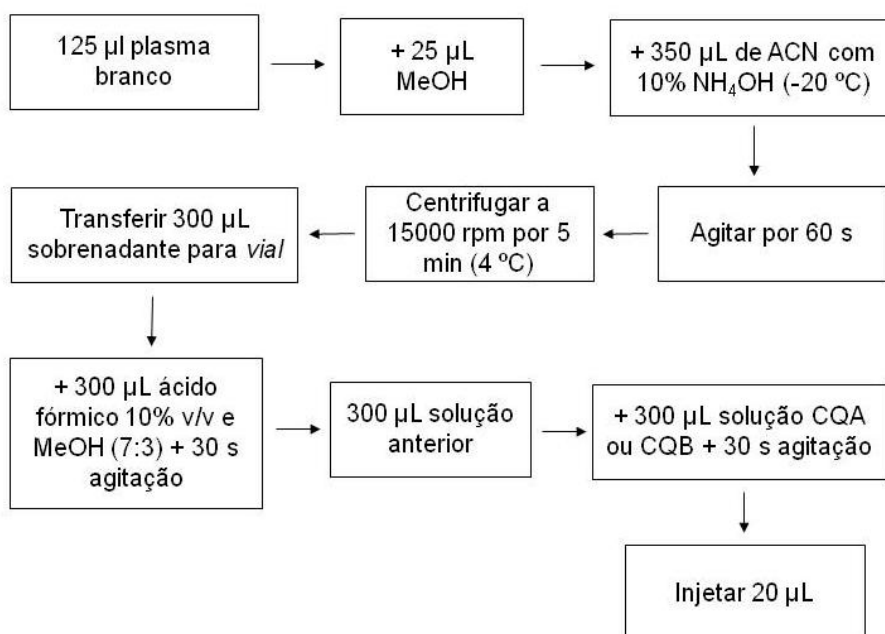
O efeito matriz foi avaliado analisando-se a amostra de plasma extraído adicionada do analito e do padrão interno e, também, as soluções contendo os analitos e os padrões internos nas mesmas concentrações da amostra contendo plasma (**Figura 25**). Para isso, utilizaram-se dois *pool* contendo cada plasma de quatro voluntários

diferentes realizando o experimento com o CQA. Calculou-se o fator de matriz normalizado (FMN) por padrão interno (PI) para cada amostra, conforme a equação:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}}$$

Avaliaram-se os resultados e calcularam-se o DPR (%) dos FMN obtidos. O DPR deve ser inferior a 15% (BRASIL, 2012).

Figura 25 - Esquema ilustrativo para a realização do teste de efeito matriz



Legenda: MeOH = metanol; ACN = acetonitrila; CQA = controle de qualidade alto; CQB = controle de qualidade baixo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir em plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas (LC-MS/MS) com ionização por *electrospray* (ESI)

O método desenvolvido pode ser empregado nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, bem como na monitorização terapêutica. Nos estudos de monitorização terapêutica, o conhecimento das concentrações plasmáticas dos ARV é importante para controlar a adesão do paciente ao tratamento e evitar doses subterapêuticas que resultam em resistência do vírus aos ARV e, conseqüentemente, na redução das opções de insumos farmacêuticos ativos eficazes para o tratamento da Aids.

Os insumos farmacêuticos ativos que são candidatos à monitorização terapêutica devem apresentar as seguintes características: alta variabilidade interindividual, estreita faixa terapêutica e correlação entre concentração plasmática e efeito terapêutico. Os ARV são insumos farmacêuticos ativos passíveis do controle terapêutico, pois possuem alta variabilidade interindividual (GAI *et al.*, 2011). Adicionalmente, o conhecimento da concentração plasmática dos insumos farmacêuticos ativos ARV é relevante para a prevenção mais cedo ou mais tarde de falha virológica, que pode ser devido a razões virológicas ou imunológicas bem como a adesão ou fatores farmacocinéticos (BOFFITO *et al.*, 2005).

Apesar da eficácia comprovada da terapia antirretroviral de alta potência, uma expressiva proporção de pacientes que vivem com HIV/Aids em tratamento com ARV não alcançam ou não mantêm a supressão virológica adequada. Por isso, a monitorização tem sido utilizada para melhorar os resultados do tratamento. A realização da monitorização terapêutica de rotina para pacientes portadores de HIV é importante pela relação existente entre a exposição ao insumo farmacêutico ativo e sua eficácia ou toxicidade, a elevada variabilidade farmacocinética entre os pacientes e a existência de um método seletivo, preciso e rápido para a

determinação das concentrações plasmáticas dos insumos farmacêuticos ativos (LIU, MA e ZHANG, 2010).

Marval *et al.* (1992) avaliaram as taxas normais dos parâmetros hematológicos, de coagulação e de fibrinólise de coelhos Nova Zelândia, brancos, e compararam todos os testes com amostras de plasma humano. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que os coelhos possuem valores para hemoglobina, hematócrito e fibrinogênio similares aos dos humanos. Entretanto, os fatores de coagulação V, X e XIII e o plasminogênio estão em maior concentração. O fator de coagulação III está presente no plasma de coelho na metade da concentração existente em humanos. Métodos bioanalíticos únicos para a quantificação de um ou mais analitos em plasma de diferentes espécies, incluindo plasma humano, utilizando cromatografia a líquido por detecção MS-MS com ionização por ESI estão presentes na literatura científica (HEINIG e WIRZ, 2009; SLAWSON *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012). Desse modo, o método proposto neste trabalho para plasma humano pode ter suas condições adaptadas para o plasma de coelho e ser útil na determinação da biodisponibilidade dos insumos farmacêuticos ativos no comprimido elaborado para esses animais.

4.1.1 Definição dos parâmetros de detecção por espectrometria de massas

A definição dos parâmetros de detecção por ionização *electrospray* no modo positivo (ESI+) foi realizada por meio de infusão direta de solução de cada analito na concentração de 500 ng/mL. Os parâmetros do detector do espectrômetro de massas para todos os analitos foram os mesmos (**Tabela 40**), com exceção das energias de colisão e voltagem do cone que foram parâmetros otimizados, separadamente, para cada insumo farmacêutico ativo .

Os padrões internos foram utilizados com o intuito de minimizar os erros na medição analítica, uma vez que a perda da amostra é compensada pela perda de uma quantidade equivalente de padrão interno. Assim, para a construção da curva analítica ao invés de utilizar o valor da área do pico do analito, utilizou-se a razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno (HAEFELFINGER, 1981). Conforme Ribani *et al.* (2004), a substância usada como padrão interno deve

ser similar à substância a ser quantificada; possuir o tempo de retenção próximo ao do analito; não reagir com o analito ou outro componente da matriz e não fazer parte da amostra.

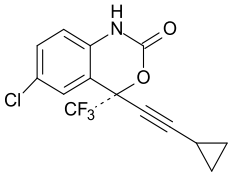
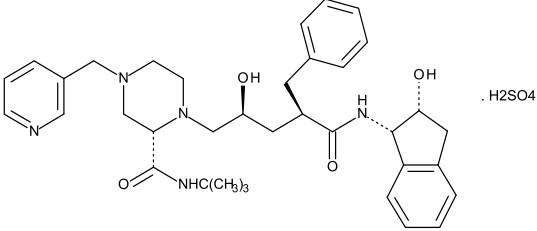
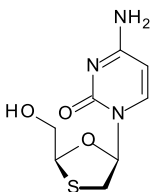
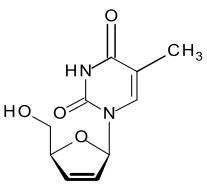
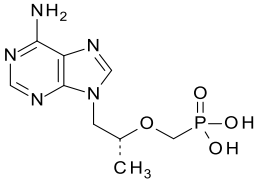
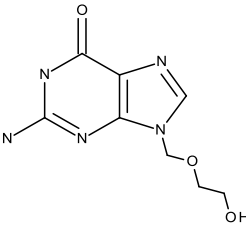
Tabela 40 - Parâmetros estabelecidos para a fonte de ionização para detecção dos analitos por espectrometria de massas em ESI(+).

| Parâmetros | Descrição |
|---|-----------|
| Voltagem do capilar (kV) | 3,0 |
| Tensão do extrator (V) | 3,0 |
| Lentes RF (V) | 0,5 |
| Temperatura da fonte (°C) | 100 |
| Temperatura de dessolvatação (°C) | 350 |
| Fluxo do gás N ₂ (L.hora ⁻¹) | 500 |

O uso de padrões internos em número igual ao dos analitos é recomendado em métodos de análise simultânea (EECKHAUT *et al.*, 2009). A escolha dos padrões internos para tenofovir e 3TC foi realizada pela similaridade estrutural e pelos dados experimentais obtidos para a construção da curva de calibração e para os controles de qualidade (**Figura 26**). Desse modo, aciclovir foi escolhido como padrão interno de tenofovir e estavudina como de 3TC. A estavudina foi determinada como aduto de sódio [M+Na⁺], sendo sua MM de 247,7.

O EFV possui uma estrutura química peculiar em que a busca de padrões internos estruturalmente semelhantes torna-se inviável uma vez que a única possibilidade seria a obtenção de análogos de EFV como o padrão interno deuterado de EFV ([¹³C₆ - efavirenz]) cujo custo é elevado, 1 mg custa em média 150 dólares, o que impacta no valor da análise (ISOSCIENCES, 2014). Na literatura, os padrões internos que já foram utilizados para EFV são: os análogos, nefazodona (antidepressivo), clozapina (antipsicótico), fluvastatina (hipocolesterolêmico) nelfinavir (antirretroviral inibidor de protease), quinolaxine (precursor de síntese orgânica) e clomipramina (antidepressivo) (ANTUNES *et al.*, 2011; CHOI, REZK e KASHUBA, 2007; D'AVOLIO *et al.*, 2010; DOGAN-TOPAL, OZKAN e USLU, 2007; HEINE *et al.*, 2007; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006; SAILAJA *et al.*, 2007; VILLANI *et al.*, 2001).

Figura 26 - Estruturas químicas e massas moleculares dos insumos farmacêuticos ativos e seus respectivos padrões internos.

| | |
|---|--|
| <p style="text-align: center;">Efavirenz</p>  <p style="text-align: center;">MM = 315,67 g/mol</p> | <p style="text-align: center;">Indinavir, sulfato de</p>  <p style="text-align: center;">MM = 711,87 g/mol</p> |
| <p style="text-align: center;">Lamivudina</p>  <p style="text-align: center;">MM = 229,26 g/mol</p> | <p style="text-align: center;">Estavudina</p>  <p style="text-align: center;">MM = 224,21 g/mol</p> |
| <p style="text-align: center;">Tenofovir</p>  <p style="text-align: center;">MM = 287,21 g/mol</p> | <p style="text-align: center;">Aciclovir</p>  <p style="text-align: center;">MM = 225,20 g/mol</p> |

Legenda: MM = massa molar.

Nos experimentos realizados testaram-se estavudina e aciclovir como padrões internos de EFV, entretanto os padrões de calibração foram reprovados por possuírem desvios > 20% para o LIQ e > 15% para os outros padrões de calibração. O sulfato de indinavir foi adequado para a realização da análise, uma vez que permitiu obter resultados reprodutíveis, cujos padrões de calibração cumpriram com os requisitos estabelecidos (BRASIL, 2012). Considerando essas premissas, sulfato

de indinavir foi experimentalmente selecionado como padrão interno de EFV (**Figura 26**).

Os parâmetros de detecção para os analitos estão descritos na **Tabela 41**. O íon precursor $[M+H]^+$ de EFV foi correspondente a relação massa/carga (m/z) igual a 316,4 e o fragmento m/z 243,8 (**Figura 27**). Para 3TC, o íon precursor foi aquele com relação m/z igual a 231,5 e fragmento principal m/z 111,8 (**Figura 28**). O íon precursor com relação m/z igual a 288,4 foi escolhido para tenofovir e fragmento principal m/z 175,9 (**Figura 29**).

Tabela 41 - Parâmetros de detecção dos íons monitorados.

| Analito | Íon precursor | Íon fragmento | Voltagem do cone (V) | Energia de colisão (eV) |
|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Efavirenz | 316,4 | 243,8 | 25 | 25 |
| Lamivudina | 231,5 | 111,8 | 10 | 10 |
| Tenofovir | 288,4 | 175,9 | 30 | 25 |
| Aciclovir | 225,8 | 151,5 | 30 | 15 |
| Estavudina | 247,7 | 148,6 | 15 | 15 |
| Sulfato de Indinavir | 614,7 | 421,3 | 30 | 40 |

Para os padrões internos foram selecionadas as seguintes transições: íon precursor m/z 226 e fragmento m/z 151,5 para aciclovir (**Figura 30**), íon precursor m/z 247 e fragmento m/z 148,6 para estavudina (**Figura 31**) e íon precursor m/z 614,8 e fragmento m/z 421,3 para indinavir (**Figura 32**). As estruturas dos íons fragmentos para EFV, 3TC e tenofovir foram propostos por GEHRIG *et al.* (2007).

Figura 27 - Espectros ESI(+) de efavirenz. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 316,4; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para a fragmentação principal m/z 243,8.

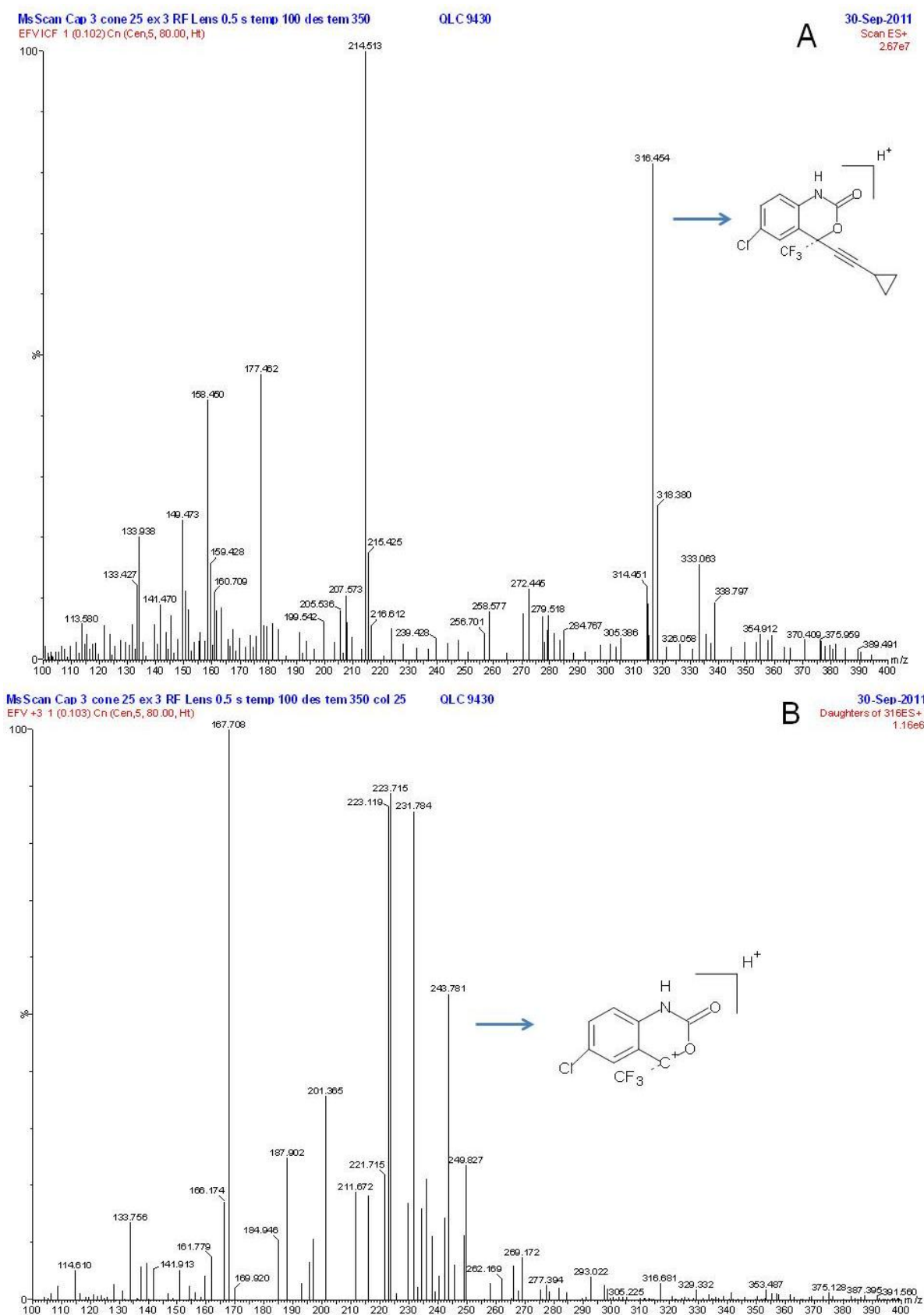


Figura 28 - Espectros ESI(+) de lamivudina. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 231,5; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para a fragmentação principal m/z 111,8.

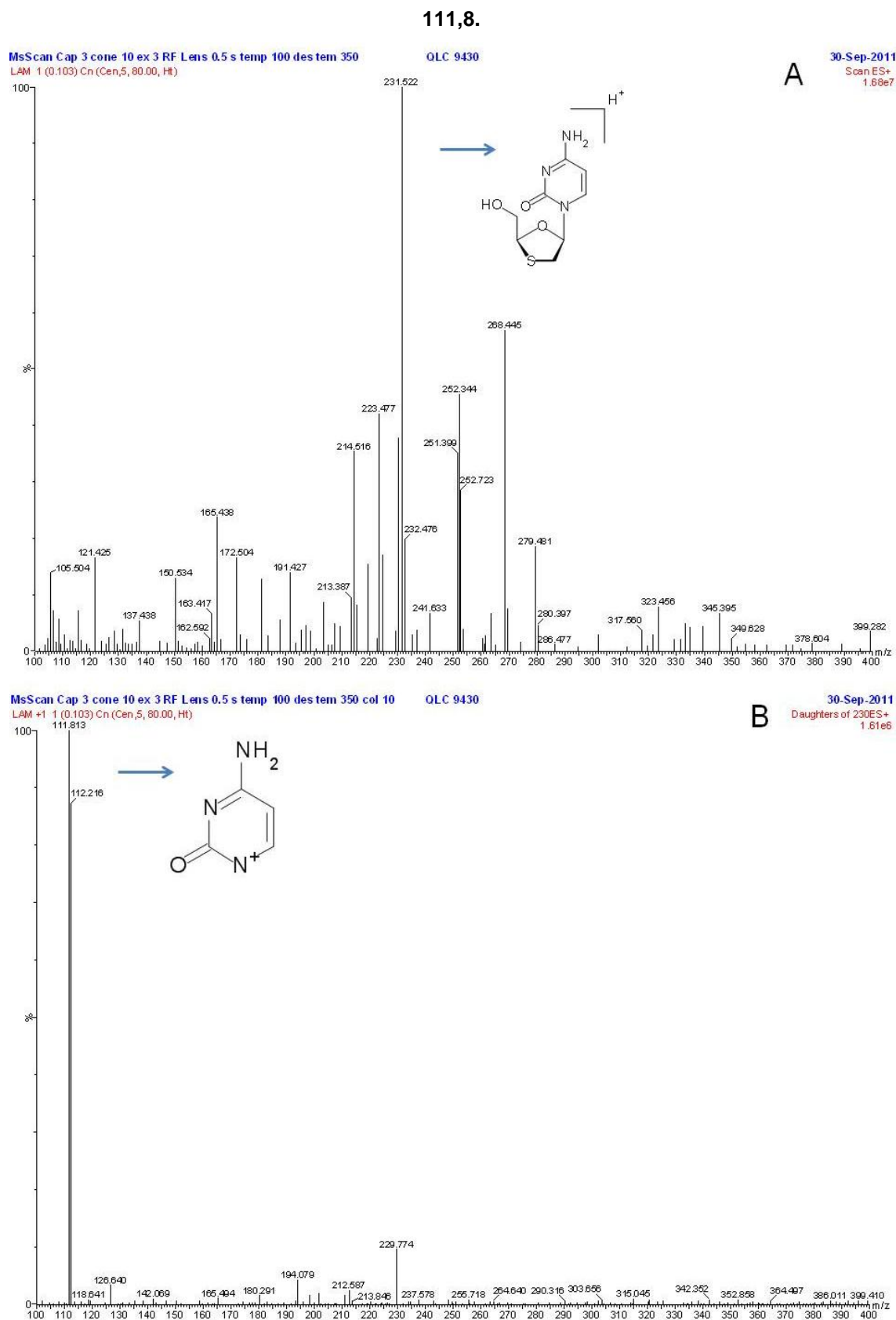


Figura 29 - Espectros ESI(+) de tenofovir. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 288,4; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para a fragmentação principal m/z 175,9.

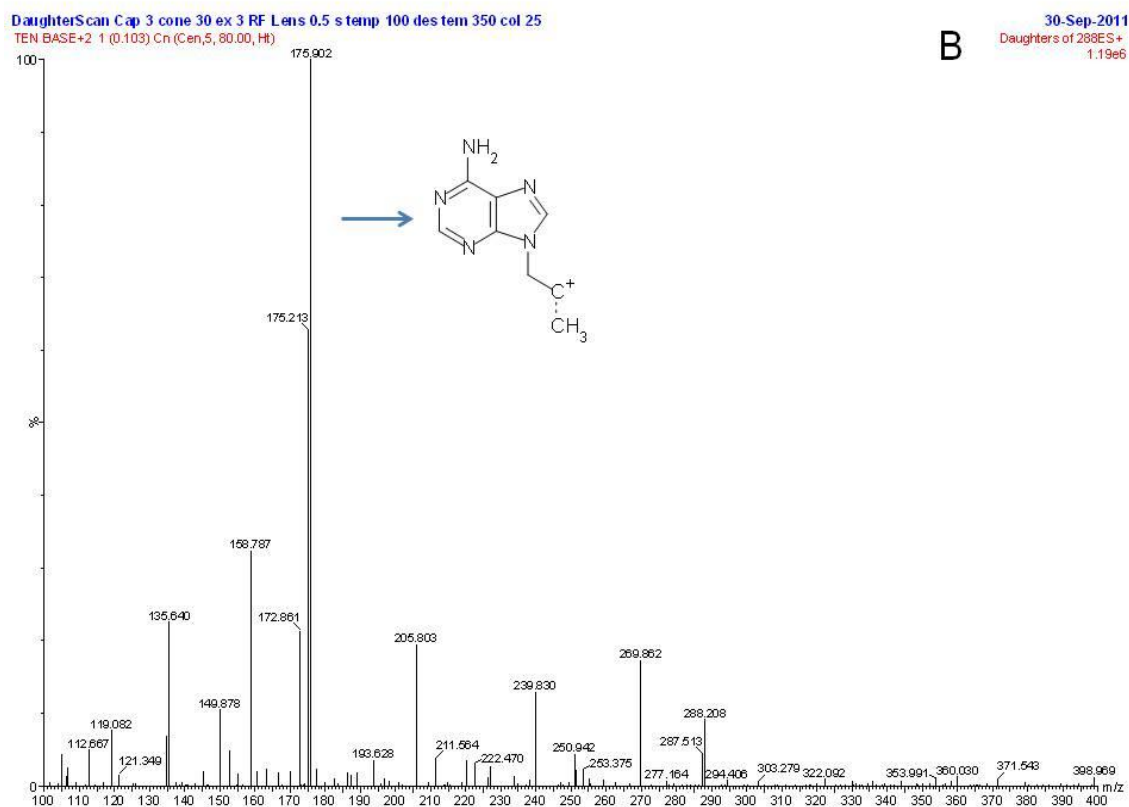
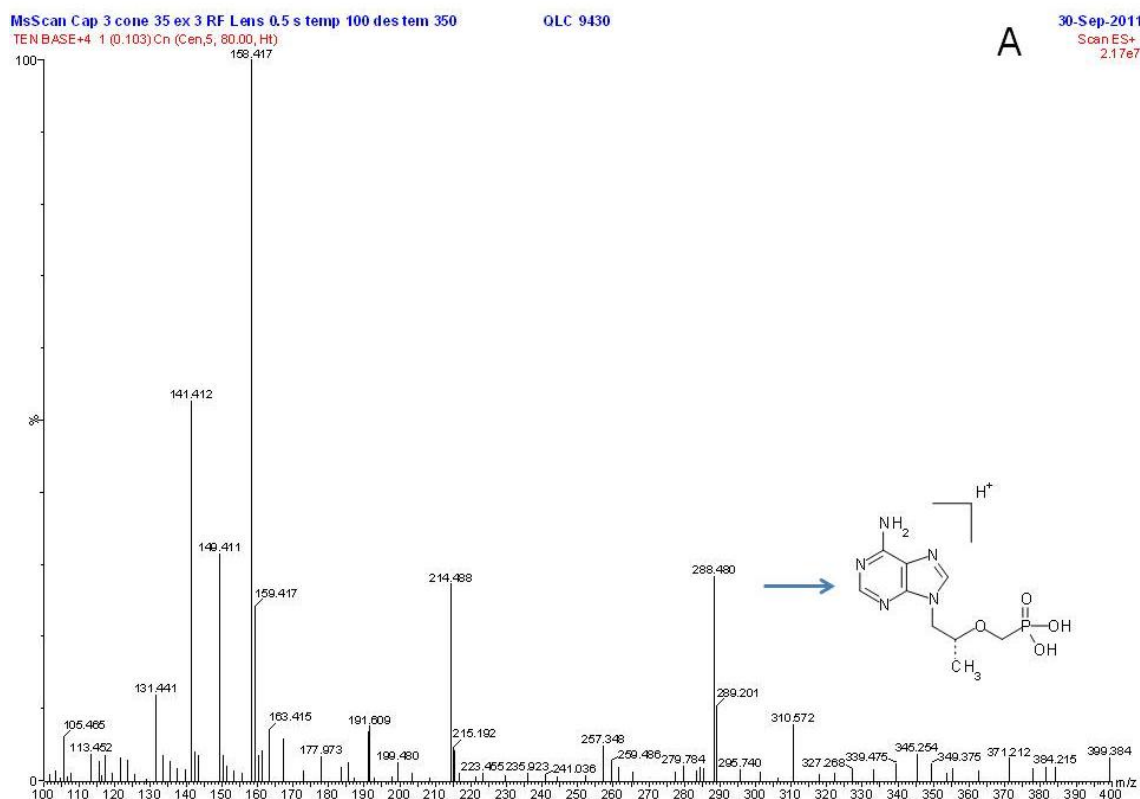


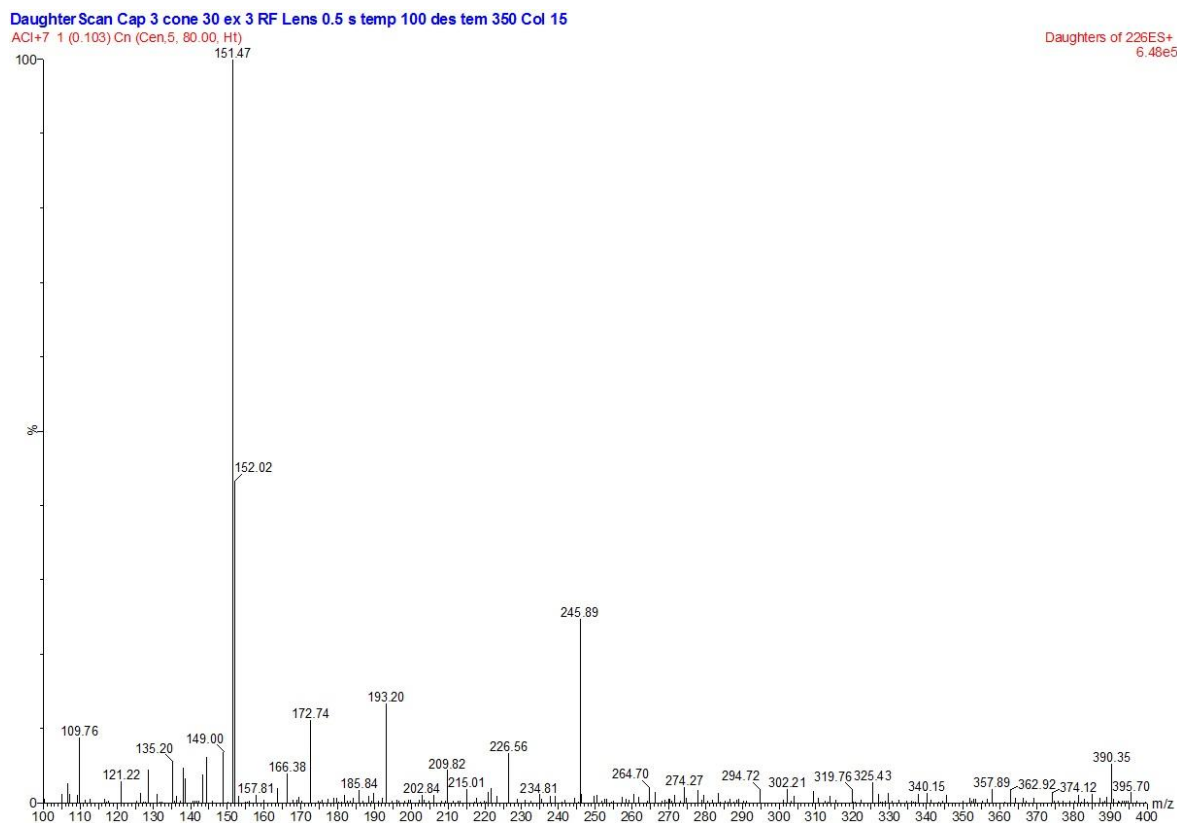
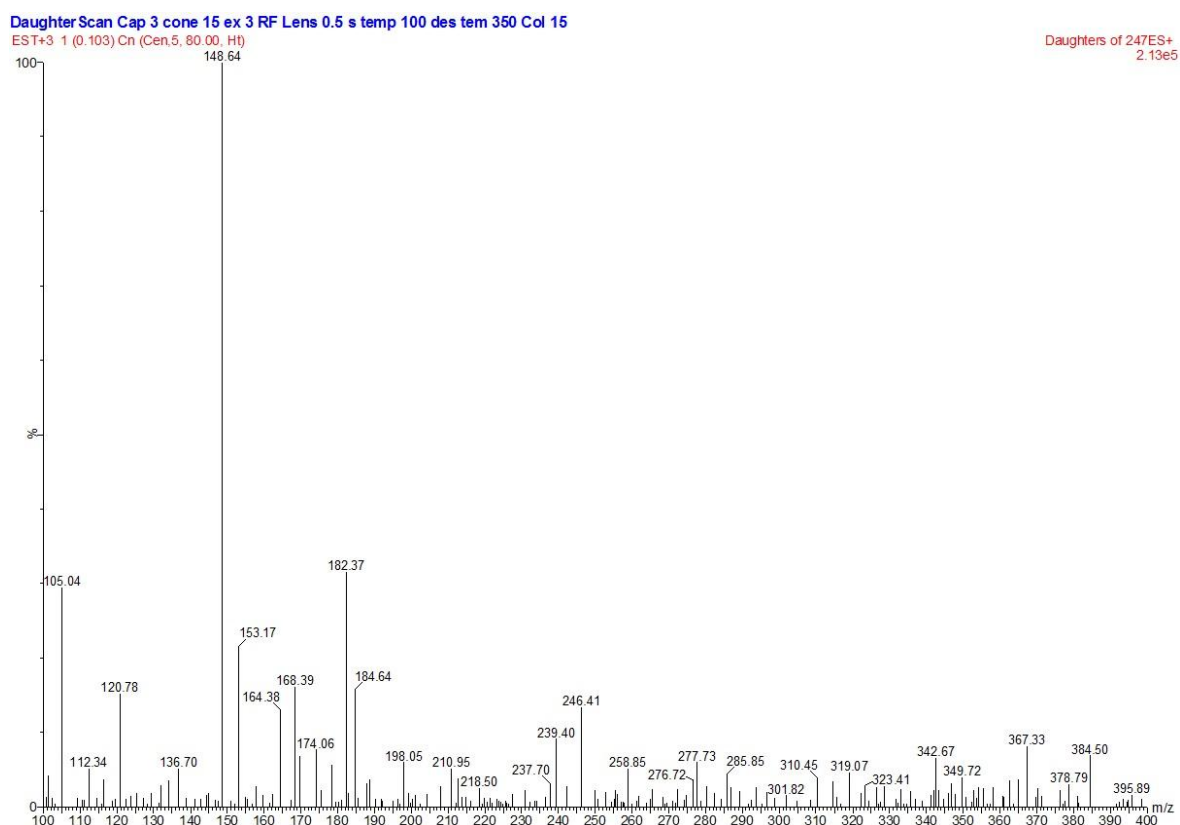
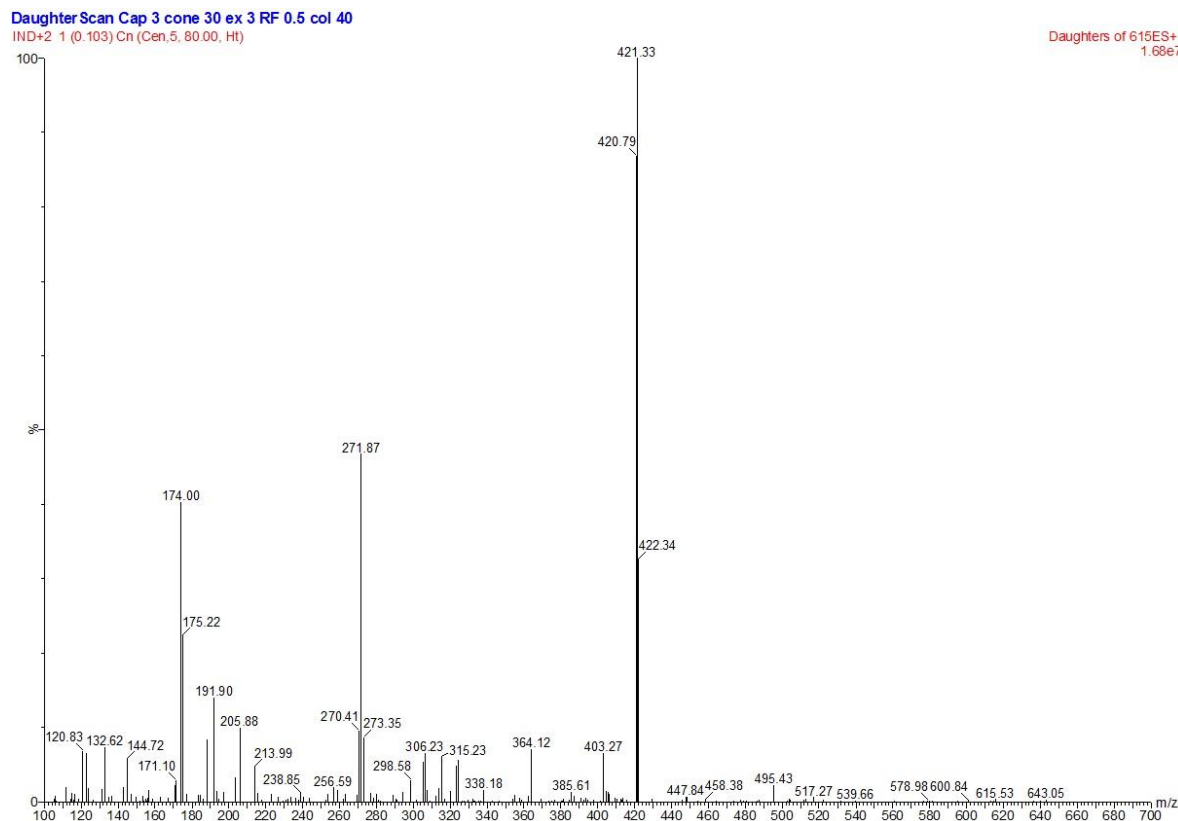
Figura 30 - Espectro ESI(+) de fragmentação de aciclovir. Fragmentação principal m/z 151,5.**Figura 31 - Espectro ESI(+) de fragmentação de estavudina. Fragmentação principal m/z** **148,6.**

Figura 32 - Espectro ESI(+) de fragmentação de sulfato de indinavir. Fragmentação principal m/z 421,3.



4.1.2 Purificação dos insumos farmacêuticos ativos e análise cromatográfica

As condições cromatográficas iniciais foram testadas em coluna cromatográfica ACE C₁₈ (100 mm x 4,6 mm; 5 μ m), mantida a 40 °C, vazão da fase móvel 1 mL/min e volume de injeção 20 μ L. Preparou-se solução contendo EFV, 3TC e tenofovir na concentração de 100 ng/mL utilizando a mesma fase móvel do método por CLAE (Capítulo 3) para determinação analítica dos insumos farmacêuticos ativos no comprimido de DFC (tampão acetato de amônio e MeOH na proporção 1:1). Nessas condições, EFV ficou retido na coluna cromatográfica, enquanto os pico de tenofovir e 3TC apresentaram t_R iguais a 1,39 e 1,52 min, respectivamente.

Com intuito de permitir a eluição do EFV, utilizou-se a mistura de tampão e MeOH na proporção 1:9. O aumento da proporção do solvente orgânico garantiu a eluição de EFV em pico de baixa intensidade no $t_R = 1,74$. Em seguida, ajustou-se a proporção tampão e MeOH para 2:8 e obteve-se a separação completa dos insumos

farmacêuticos ativos (tenofovir $t_R = 1,34$, 3TC $t_R = 1,43$ e EFV $t_R 2,54$). Entretanto, a intensidade do pico de EFV continuou baixa.

Diante dos diferentes comportamentos dos insumos farmacêuticos ativos em relação à interação com a fase ligada da coluna cromatográfica, optou-se por um gradiente para aumentar o t_R dos picos de 3TC e tenofovir afim de evitar a ocorrência de interferentes da matriz biológica. O gradiente foi realizado utilizando fase móvel composta de tampão acetato de amônio 2 mmol/ácido fórmico 0,025% v/v e MeOH, nos tempos e proporções de solvente orgânico estabelecidos no método analítico do doseamento de EFV, 3TC e TDF em comprimido de DFC (Capítulo 3). Nessas condições, os t_R para os três insumos farmacêuticos ativos aumentaram, entretanto, as intensidades dos picos continuaram reduzidas. Testaram-se outros gradientes de fase móvel constituída de ácido fórmico e MeOH, com variações na concentração do ácido (0,05%, 0,1% e 0,2%). Mesmo assim, os resultados não foram satisfatórios, principalmente para EFV e tenofovir cujas intensidades dos picos foram baixas.

Alternativamente, utilizou-se a coluna fenila Zorbax SB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), mantida a 40 °C, modo isocrático, fase móvel composta de tampão acetato de amônio 2 mmol/ácido fórmico 0,025% v/v e MeOH na proporção 1:1. O pico de EFV não eluiu nessas condições. Novas tentativas foram realizadas no modo gradiente com ácido fórmico e MeOH, mas os picos resultantes apresentaram baixa intensidade, principalmente para EFV.

A coluna ciano Zorbax SB-CN (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m) também foi utilizada nos testes iniciais. Obteve-se uma condição favorável para a análise simultânea dos insumos farmacêuticos ativos quando feita em modo gradiente de fase móvel ácido fórmico 0,05% e MeOH.

As colunas ciano possuem pronunciada diferença na seletividade e na retenção dos analitos quando comparada com as colunas alquil-sílica (C8 e C18). Uma observação comum é a menor retenção dos analitos, por ser mais polar, em relação as colunas C8 e C18. Também, são colunas menos restritivas para a penetração de moléculas “volumosas” em sua fase estacionária e estabelece fraca ligação de hidrogênio (MARCHAND *et al.*, 2005).

A execução de gradiente da fase móvel foi necessária, uma vez que as condições isocráticas exigiram uma proporção maior de solvente orgânico para eluir o EFV. As corridas isocráticas prejudicariam a determinação de 3TC e tenofovir, pois os t_R ficariam muito próximos do tempo morto, sujeitos à interferentes que eluem mais rapidamente. As condições selecionadas para a quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir por espectrometria de massas estão descritas no **Quadro 15** e o gradiente otimizado está apresentado na **Tabela 42**.

Quadro 15 - Condições cromatográficas selecionadas para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano por LC-MS/MS.

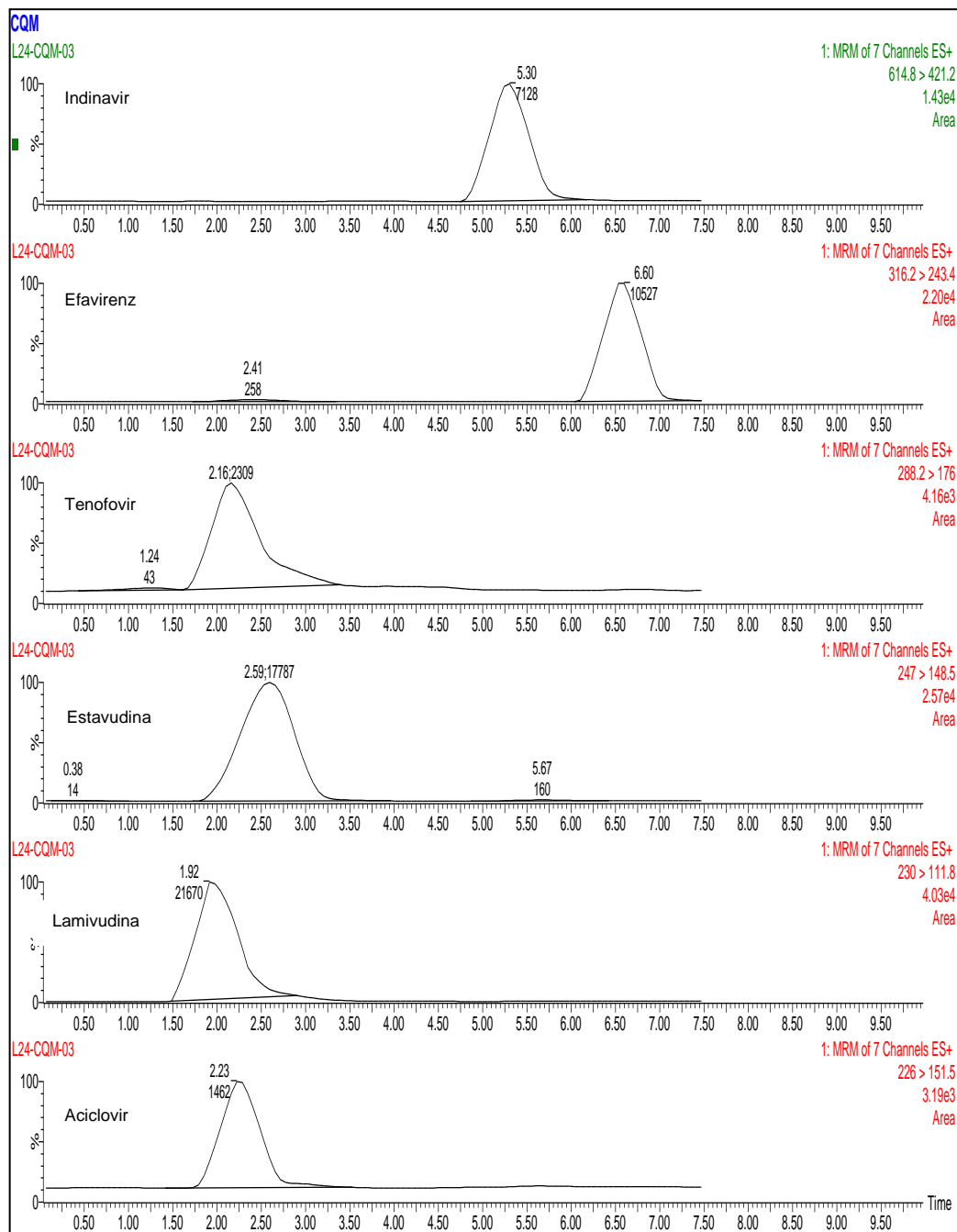
| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Coluna cromatográfica | Ciano (150 mm x 4,6 mm; 3,5 μ m) |
| Fase móvel | Ácido fórmico 0,05%:MeOH |
| Vazão | 1 mL/min |
| Volume de injeção | 20 μ L |
| Temperatura do forno da coluna | 40 °C |
| Temperatura do amostrador | 8 °C |

Tabela 42 - Condição de eluição em gradiente otimizada para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma por LC-MS/MS.

| Tempo (min) | Ácido fórmico 0,05% | MeOH | Eluição |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------|
| $T_0 - T_{3,0}$ | 70% | 30% | Isocrática |
| $T_{3,0} - T_{3,5}$ | 70% \rightarrow 10% | 30% \rightarrow 90% | Gradiente Linear |
| $T_{3,5} - T_{6,0}$ | 10% | 90% | Isocrática |
| $T_{6,0} - T_{6,5}$ | 10% \rightarrow 70% | 90% \rightarrow 30% | Gradiente Linear |
| $T_{6,5} - T_{7,5}$ | 70% | 30% | Isocrática |

Um cromatograma obtido para CQM extraído após a otimização das condições cromatográficas e de preparo da amostra está demonstrado na **Figura 33**.

Figura 33 - Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS, para quantificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano em modo gradiente, utilizando-se coluna ciano e fase móvel composta por metanol e ácido fórmico 0,05%. Concentrações das soluções CQM: efavirenz 4000 ng/mL, lamivudina 1600 ng/mL e tenofovir 450 ng/mL).



Legenda: CQM = controle de qualidade médio; EFV = efavirenz; 3TC = lamivudina.

Após a seleção das condições cromatográficas, foi definido o procedimento de purificação dos analitos do plasma humano. Para isso, testaram-se diferentes sistemas de solventes destinados à precipitação de proteínas. O método foi desenvolvido em plasma branco, sendo ACN escolhida como solvente precipitante. Prepararam-se soluções de contaminação baixa (SCB) e contaminação alta (SCA) em tubos Falcon.

Para o preparo da Solução SCB: transferiram-se 300 μL de solução estoque de EFV, 40 μL de solução estoque de 3TC e 200 μL de solução estoque de tenofovir para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com MeOH. Da solução obtida, 150 μL foram transferidos para tubo Falcon contendo 4,85 mL de plasma branco.

Para o preparo da Solução SCA: transferiram-se 2 mL de solução estoque de EFV, 2 mL de solução estoque de 3TC e 2,5 mL de solução estoque de tenofovir para balão volumétrico de 10 mL. Da solução obtida, 160 μL foram transferidos para tubo Falcon contendo 4,84 mL de plasma branco.

É recomendado que a quantidade de ACN como solvente de precipitação compreenda pelo menos duas vezes o volume de plasma utilizado para que a porcentagem de proteínas plasmáticas precipitadas seja maior que 99,7% (WELLS, 2003). Desse modo, utilizaram-se 300 μL de ACN para precipitar 125 μL de plasma.

A cada *ependorf* adicionaram-se separadamente 125 μL de plasma contaminado com SCB e SCA, 25 μL de solução padrão interno e 300 μL ACN. As misturas foram agitadas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas a 15000 rpm (21130 x g) por 5 minutos. Transferiram-se 300 μL do sobrenadante para *vial* contendo *insert*. O método de purificação, executado em triplicata, resultou na divisão do pico da estavudina, impossibilitando a integração.

Na segunda tentativa, 300 μL de ACN acidificada com ácido fórmico 0,5% na proporção de 1:1 foram utilizados como agente precipitante, nas mesmas condições anteriormente testadas. Mesmo assim, o pico da estavudina continuou dividido.

Em sequência, ACN e MeOH forem usados concomitantemente na avaliação do efeito matriz. O método de purificação não foi adequado, pois resultou em efeito matriz acentuado para 3TC e aciclovir.

A presença do efeito matriz é dependente do fluido analisado. Componentes da matriz, característicos de cada biofluido, interferem em diferentes graus e momentos ao longo da análise (DAMS *et al.*, 2003). O efeito matriz pode ser reduzido por uma simples injeção de pequeno volume ou diluição da amostra, que é útil para que a sensibilidade instrumental permaneça adequada (HELLER, 2007). Outra possibilidade para reduzir ou eliminar o efeito matriz é otimizar o preparo da amostra e/ou os parâmetros cromatográficos e, também, o uso de um padrão interno para compensar a alteração no sinal (EECKHAUT *et al.*, 2009).

A diluição da amostra purificada foi realizada com o objetivo de minimizar o efeito matriz. Entretanto, os resultados foram insatisfatórios, pois os interferentes da matriz mantiveram-se elevados para 3TC, tenofovir e aciclovir.

Outros agentes precipitantes foram avaliados: ACN com ácido fórmico 0,5% (1:1); ACN com 10% NH₄OH (v/v); ACN com 5% NH₄OH (v/v), ACN com 5% ácido fosfórico (v/v) e ZnSO₄ 10%. Na **Tabela 43** estão relacionadas as condições testadas e os resultados obtidos. A purificação com ACN basificada a 10% NH₄OH foi a melhor condição, mesmo apresentando efeito matriz residual na determinação de tenofovir.

Tabela 43 - Sistemas de solventes utilizados para o desenvolvimento do método de purificação de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano por precipitação de proteínas.

| Sistema solvente para purificação | Resultados |
|---|--|
| ACN com ácido fórmico 0,5% (1:1) | Efeito matriz acentuado para 3TC, tenofovir e aciclovir nas concentrações SCB e SCA. |
| ACN com 10% NH ₄ OH | Pouco efeito matriz para tenofovir na concentração SCA. |
| ACN com 5% NH ₄ OH | Efeito matriz para tenofovir na concentração SCA. |
| ACN com 5% H ₃ PO ₄ | Efeito matriz acentuado para EFV, 3TC e tenofovir na concentração SCA. |
| ZnSO ₄ 10% | Efeito matriz acentuado para 3TC e tenofovir na concentração SCA. |

Legenda: ACN = acetonitrila; NH₄OH = hidróxido de amônio; H₃PO₄ = ácido fosfórico; ZnSO₄ = sulfato de zinco; 3TC = lamivudina; EFV = efavirenz; SCB = solução de contaminação baixa; SCA = solução de contaminação alta.

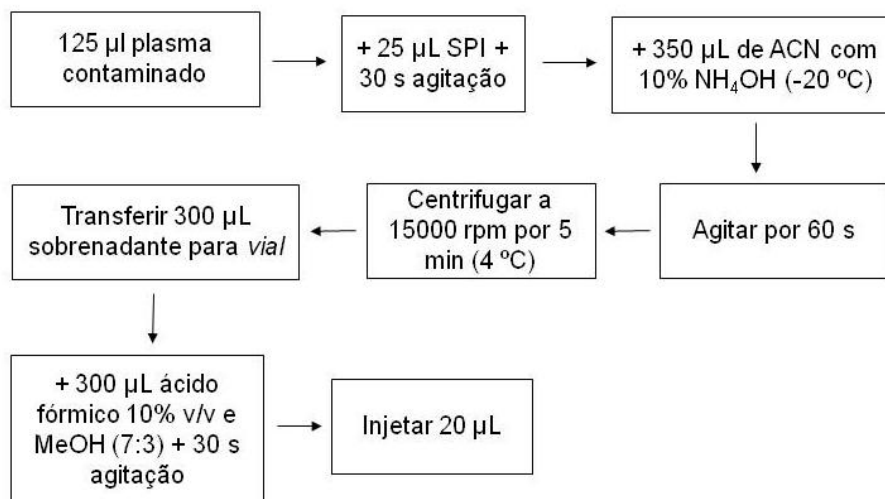
Os parâmetros do equipamento foram ajustados em *multiplier* igual a 800 e temperatura de dessolvatação de 400 °C. Na otimização do método de purificação, a quantidade de solvente precipitante (ACN com 10% NH₄OH) foi aumentada para 350 µL e mantida em refrigeração (-20 °C). Houve melhora expressiva do efeito matriz para tenofovir. Entretanto, verificou-se que o desvio do efeito matriz da resposta de EFV foi negativo, o que evidencia a degradação do insumo farmacêutico ativo. Uma nova curva analítica foi feita, diminuindo o tempo de contato do plasma contaminado com a solução precipitante. Nessa condição, todas as soluções controle (CQB, CQM e CQA) apresentaram resultados satisfatórios em relação ao efeito matriz.

O método de precipitação de proteínas foi adequado para a purificação dos analitos e padrões internos. O procedimento de purificação otimizado está descrito a seguir.

Purificação da amostra (Figura 34): foi adicionado 125 µL de plasma contaminado para tubo *ependorf* de 2 mL. No tubo, foram introduzidos 25 µL de *Solução padrão interno*, agitou-se por 30 segundos, e 350 µL da mistura de ACN com 10% NH₄OH refrigerada a -20 °C. Agitou-se por 1 min em agitador do tipo vórtex e centrifugou-se a 15000 rpm (21130 x g) por 5 min a 4 °C. Do sobrenadante obtido, foi transferido 300 µL para um *vial* contendo 300 µL da mistura de ácido fórmico 10% v/v e MeOH (7:3) e agitou-se em vórtex por 30 segundos.

A *Solução padrão interno* foi preparada em MeOH contendo sulfato de indinavir 100 µg/mL, estavudina 500 µg/mL e aciclovir 100 µg/mL.

Figura 34 - Esquema ilustrativo da purificação dos insumos farmacêuticos ativos efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano



Legenda: SPI = solução padrão interno; ACN = acetonitrila; MeOH = metanol.

4.2 Validação do método bioanalítico

4.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada na faixa de 200 a 10000 ng/mL para EFV, 50 a 4000 ng/mL para 3TC e 100 a 1000 ng/mL para tenofovir, por meio da construção de curvas analíticas com seis pontos de diferentes concentrações em três dias de análise. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação estão representados na **Tabela 44**.

Tabela 44 - Equações das retas e coeficientes de correlação correspondentes obtidos por regressão para efavirenz, lamivudina e tenofovir.

| | Dia | Equação da reta | Coefficiente de correlação (r) |
|------------|-----|-----------------------------------|--------------------------------|
| Efavirenz | 1 | $Y = 0,000651982 X + 0,00808416$ | 0,996 |
| | 2 | $Y = 0,000473055 X + 0,0189646$ | 0,999 |
| | 3 | $Y = 0,000408161 X + 0,0122799$ | 0,998 |
| Lamivudina | 1 | $Y = 0,000485293 X + 0,000422928$ | 0,998 |
| | 2 | $Y = 0,000457957 X + 0,00291724$ | 0,998 |
| | 3 | $Y = 0,000582508 X + 0,00591206$ | 0,999 |
| Tenofovir | 1 | $Y = 0,00350209 X + 0,283757$ | 0,998 |
| | 2 | $Y = 0,00348826 X + 0,13635$ | 0,995 |
| | 3 | $Y = 0,00295803 X + 0,173735$ | 0,996 |

Os dados obtidos para as três curvas analíticas para EFV, 3TC e tenofovir estão demonstrados, separadamente, nas **Tabelas 45 a 47**.

Tabela 45 - Dados obtidos para a construção das três curvas analíticas de efavirenz pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir.

| Conc. nominal (ng/mL) | Níveis | Curva analítica 1 | | Curva analítica 2 | | Curva analítica 3 | |
|-----------------------|--------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) |
| 200 | 1.1 | 190,96 | -4,5 | 432,05 | 116,0* | 196,71 | -1,6 |
| | 1.2 | 195,22 | -2,4 | 187,01 | -6,5 | 224,40 | 12,2 |
| 1000 | 2.1 | 1017,97 | 1,8 | 1072,49 | 7,2 | 1003,73 | 0,4 |
| | 2.2 | 1013,26 | 1,3 | 990,45 | -1,0 | 1019,04 | 1,9 |
| 2000 | 3.1 | 2124,00 | 6,2 | 2019,51 | 1,0 | 1814,14 | -9,3 |
| | 3.2 | 1825,81 | -8,7 | 2021,67 | 1,1 | 1971,96 | -1,4 |
| 5000 | 4.1 | 4870,00 | -2,6 | 4961,07 | -0,8 | 4458,41 | -10,8 |
| | 4.2 | 5261,64 | 5,2 | 4992,18 | -0,2 | 4948,90 | -1,0 |
| 7000 | 5.1 | 7035,43 | 0,5 | 6826,81 | -2,5 | 7176,01 | 2,5 |
| | 5.2 | 8050,27 | 15,0 | 7061,89 | 0,9 | 7311,37 | 4,4 |
| 10000 | 6.1 | 9490,64 | -5,1 | 9709,34 | -2,9 | 9777,34 | -2,2 |
| | 6.2 | 9324,82 | -6,8 | 10357,60 | 3,6 | 10497,99 | 5,0 |

*Valor excluído da curva analítica.

Tabela 46 - Dados obtidos para a construção das três curvas analíticas de lamivudina pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir.

| Conc. nominal (ng/mL) | Níveis | Curva analítica 1 | | Curva analítica 2 | | Curva analítica 3 | |
|-----------------------|--------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) |
| 50 | 1.1 | 45,85 | -8,3 | 47,35 | -5,3 | 45,88 | -8,2 |
| | 1.2 | 53,63 | 7,3 | 48,34 | -3,3 | 40,88 | -18,2 |
| 250 | 2.1 | 268,99 | 7,6 | 276,09 | 10,4 | 273,43 | 9,4 |
| | 2.2 | 219,62 | -12,2 | 255,38 | 2,2 | 276,19 | 10,5 |
| 1000 | 3.1 | 1063,63 | 6,4 | 1000,26 | 0,0 | 1118,24 | 11,8 |
| | 3.2 | 990,45 | -1,0 | 886,26 | -11,4 | 1355,40 | 35,5* |
| 2000 | 4.1 | 2028,11 | 1,4 | 2083,14 | 4,2 | 2370,19 | 18,5* |
| | 4.2 | 2104,34 | 5,2 | 2177,51 | 8,9 | 1964,42 | -1,8 |
| 3000 | 5.1 | 3565,59 | 18,9* | 2797,28 | -6,8 | 2964,17 | -1,2 |
| | 5.2 | 2751,97 | -8,3 | 3046,90 | 1,6 | 2984,38 | -0,5 |
| 4000 | 6.1 | 4262,32 | 6,6 | 3934,37 | -1,6 | 4131,49 | 3,3 |
| | 6.2 | 3811,09 | -4,7 | 4047,13 | 1,2 | 3800,93 | -5,0 |

*Valores excluídos da curva analítica.

Tabela 47 - Dados obtidos para a construção das três curvas analíticas de tenofovir pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir.

| Conc. nominal (ng/mL) | Níveis | Curva analítica 1 | | Curva analítica 2 | | Curva analítica 3 | |
|-----------------------|--------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) | Conc. obtida (ng/mL) | Desvio (%) |
| 100 | 1.1 | 107,38 | 7,4 | 150,12 | 50,1* | 112,05 | 12,1 |
| | 1.2 | 93,07 | -6,9 | 103,75 | 3,7 | 96,86 | -3,1 |
| 200 | 2.1 | 152,22 | -23,9* | 196,06 | -2,0 | 204,65 | 2,3 |
| | 2.2 | 198,22 | -0,9 | 216,19 | 8,1 | 198,74 | -0,6 |
| 400 | 3.1 | 425,14 | 6,3 | 376,84 | -5,8 | 348,02 | -13 |
| | 3.2 | 386,71 | -3,3 | 483,04 | 20,8* | 393,04 | -1,7 |
| 600 | 4.1 | 578,59 | -3,6 | 557,24 | -7,1 | 553,21 | -7,8 |
| | 4.2 | 599,22 | -0,1 | 567,49 | -5,4 | 634,91 | 5,8 |
| 900 | 5.1 | 929,26 | 3,3 | 1166,17 | 29,6* | 918,88 | 2,1 |
| | 5.2 | 872,12 | -3,1 | 919,83 | 2,2 | 904,18 | 0,5 |
| 1000 | 6.1 | 1053,77 | 5,4 | 1037,61 | 3,8 | 1074,52 | 7,5 |
| | 6.2 | 956,53 | -4,3 | 1025,01 | 2,5 | 960,94 | -3,9 |

*Valores excluídos da curva analítica.

A razão da área obtida entre o analito e o padrão interno foi usada para construção da curva de calibração e análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados, fator de peso $1/x$. Os padrões de calibração devem apresentar desvios $\leq 15\%$ em relação às concentrações nominais e para o LIQ desvios $\leq 20\%$ em relação às concentrações nominais. A curva de calibração é aceita se 75% dos padrões de calibração forem aprovados, e se, no mínimo, seis padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo LIQ e limite superior de quantificação (LSQ) forem aprovados, conforme critérios acima descritos (BRASIL, 2012; EUROPEAN..., 2011).

As curvas analíticas dos insumos farmacêuticos ativos atenderam aos critérios de aceitação preconizados, confirmando a linearidade do método para EFV, 3TC e tenofovir. Os pontos da curva analítica que não cumpriram com os critérios de aprovação foram excluídos, identificados com asterisco, e a regressão foi recalculada desconsiderando esses valores, sendo permitida a exclusão de, no máximo, três pontos (BRASIL, 2012). Os desvios foram $\leq 20\%$ em relação à concentração nominal do LIQ e $\leq 15\%$ em relação à concentração nominal para as demais determinações.

Nas **Figuras 35 a 37** estão representadas as curvas analíticas do primeiro dia de análise e os gráficos de distribuição dos resíduos para cada analito em estudo. Os pontos circundados correspondem àqueles excluídos do cálculo de regressão linear. Observa-se que os resíduos apresentaram distribuição aleatória, o que permite concluir que eles possuem variância constante e sem tendência nos intervalos de concentrações estudados.

Figura 35 - Gráfico de resíduos e curva analítica de efavirenz obtida por regressão no primeiro dia de análise, na faixa de 200 a 10000 ng/mL.

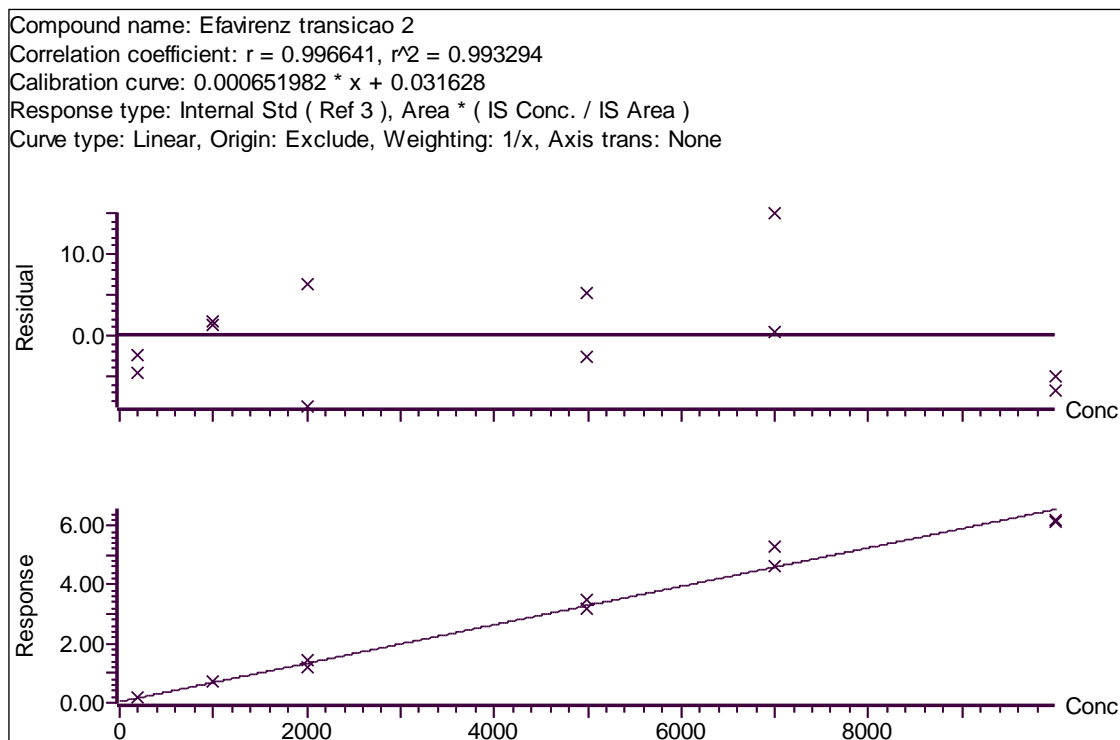


Figura 36 - Gráfico de resíduos e curva analítica de lamivudina obtida por regressão no primeiro dia de análise, na faixa de 50 a 4000 ng/mL.

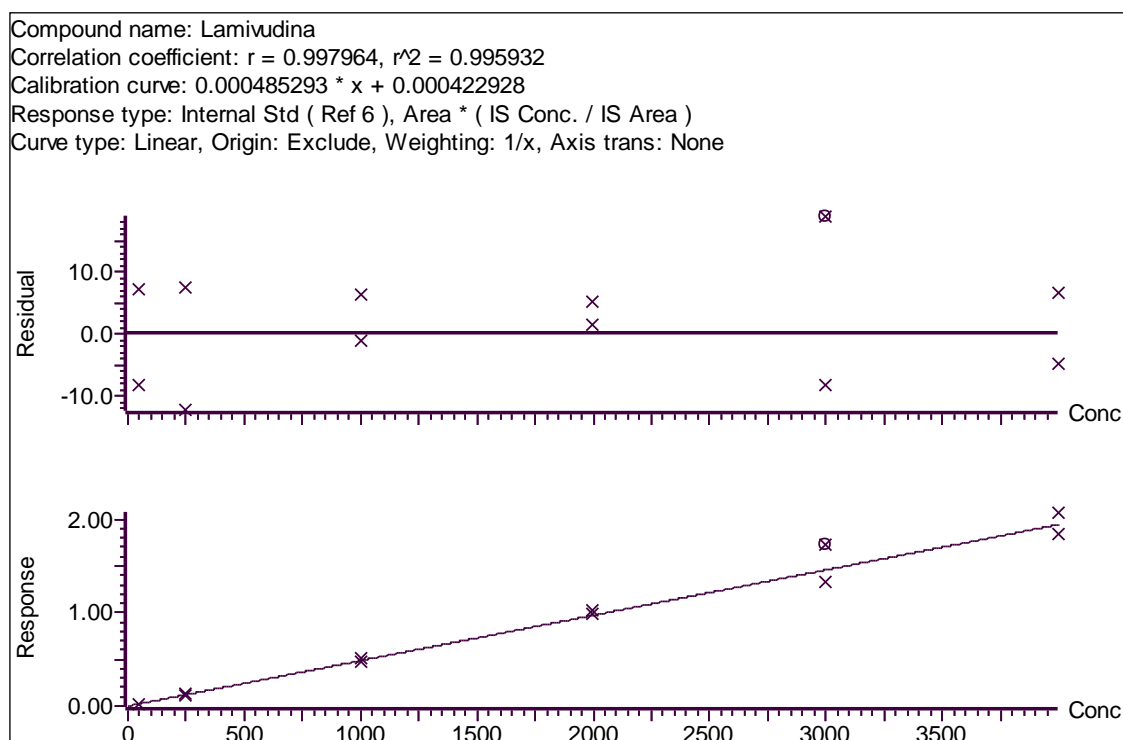
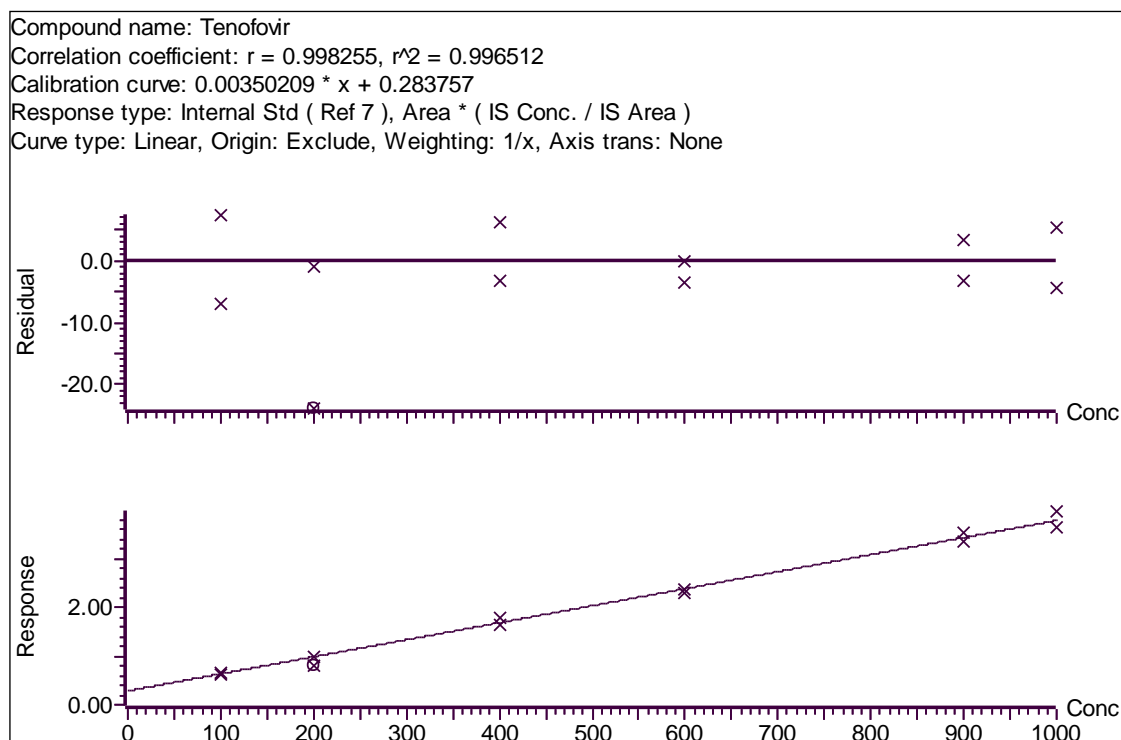


Figura 37 - Gráfico de resíduos e curva analítica de tenofovir obtida por regressão no primeiro dia de análise, na faixa de 100 a 1000 ng/mL.



4.2.2 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão, intracorrída e intercorrídas foram avaliadas em cinco concentrações diferentes (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), em quintuplicata, em três dias consecutivos. Os resultados de cada analito por concentração estão demonstrados nas **Tabelas 48 a 52**.

Tabela 48 - Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o LIQ de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico.

| Replicatas | Efavirenz (200 ng/mL) | | | Lamivudina (50 ng/mL) | | | Tenofovir (100 ng/mL) | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------------------------|-------|-------|--------------------------|--------|--------|
| | 1 | 163,30 | 195,17 | 187,83 | 53,86 | 42,10 | 48,02 | 95,59 | 113,63 |
| 2 | 157,25 | 230,13 | 198,37 | 50,88 | 47,00 | 56,64 | 82,65 | 103,35 | 111,66 |
| 3 | 182,40 | 200,54 | 181,59 | 54,64 | 40,65 | 42,55 | 75,45 | 124,48 | 106,29 |
| 4 | 151,22 | 237,90 | 223,78 | 52,85 | 47,64 | 55,31 | 82,29 | 114,05 | 97,92 |
| 5 | 167,66 | 248,94 | 193,03 | 48,79 | 59,50 | 40,43 | 73,58 | 106,45 | 96,51 |
| Média intracorrida | 164,37 | 222,53 | 196,92 | 52,20 | 47,38 | 48,59 | 81,91 | 112,39 | 112,20 |
| DPR (%) intracorrida | 7,20 | 10,59 | 8,25 | 4,55 | 15,66 | 15,03 | 10,56 | 7,27 | 18,97 |
| EPR (%) intracorrida | -17,82 | 11,27 | -1,54 | -4,41 | -5,25 | -2,82 | -18,09 | 12,39 | 12,20 |
| Média intercorrida | | 194,61 | | | 49,39 | | | 102,17 | |
| DPR (%) intercorrida | | 15,26 | | | 12,33 | | | 19,32 | |
| EPR (%) intercorrida | | -2,70 | | | -1,22 | | | 2,17 | |

Legenda: LIQ = limite inferior de quantificação; DPR = desvio padrão relativo; EPR = erro padrão relativo.

Tabela 49 - Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQB de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico.

| Replicatas | Efavirenz (600 ng/mL) | | | Lamivudina (150 ng/mL) | | | Tenofovir (300 ng/mL) | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|---------------------------|--------|--------|--------------------------|--------|--------|
| | 1 | 588,03 | 620,59 | 539,12 | 130,48 | 173,19 | 170,12 | 325,74 | 323,26 |
| 2 | 547,76 | 641,24 | 559,07 | 128,88 | 149,21 | 170,29 | 329,72 | 312,45 | 290,42 |
| 3 | 452,60 | 587,30 | 590,55 | 153,44 | 165,69 | 162,35 | 253,32 | 314,84 | 300,56 |
| 4 | 532,08 | 584,23 | 542,12 | 156,62 | 170,18 | 158,79 | 263,33 | 312,62 | 286,55 |
| 5 | 465,60 | 539,18 | 519,87 | 155,68 | 172,40 | 161,81 | 261,69 | 314,91 | 289,40 |
| Média intracorrida | 517,21 | 594,51 | 550,15 | 145,02 | 166,13 | 164,67 | 286,76 | 315,62 | 289,99 |
| DPR (%) intracorrida | 11,03 | 6,56 | 4,82 | 9,70 | 5,96 | 3,18 | 13,12 | 1,40 | 2,27 |
| EPR (%) intracorrida | -13,80 | -0,92 | -8,31 | 3,32 | 10,76 | 9,78 | -4,41 | 5,21 | -3,34 |
| Média intercorrida | | 553,96 | | | 158,61 | | | 297,45 | |
| DPR (%) intercorrida | | 9,27 | | | 8,73 | | | 8,24 | |
| EPR (%) intercorrida | | -7,67 | | | 5,74 | | | -0,85 | |

Legenda: CQB = controle de qualidade baixo; DPR = desvio padrão relativo; EPR = erro padrão relativo.

Tabela 50 - Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQM de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico.

| Replicatas | Efavirenz (4000 ng/mL) | | | Lamivudina (1600 ng/mL) | | | Tenofovir (450 ng/mL) | | |
|----------------------|---------------------------|---------|---------|----------------------------|---------|---------|--------------------------|--------|--------|
| | 1 | 3681,55 | 3686,64 | 3571,71 | 1846,22 | 1878,89 | 1835,19 | 456,98 | 459,50 |
| 2 | 3987,73 | 3670,46 | 3643,85 | 1845,81 | 1755,35 | 1755,01 | 465,19 | 415,70 | 420,89 |
| 3 | 3557,12 | 3919,03 | 3628,24 | 1656,63 | 1796,28 | 1807,64 | 449,67 | 473,50 | 439,08 |
| 4 | 3569,34 | 3758,71 | 3497,79 | 1513,75 | 1724,02 | 1832,11 | 434,89 | 452,70 | 451,01 |
| 5 | 3839,41 | 3597,40 | 3637,18 | 1475,21 | 1889,99 | 1825,09 | 395,87 | 453,90 | 423,15 |
| Média intracorrída | 3727,03 | 3726,45 | 3595,75 | 1667,52 | 1808,91 | 1811,01 | 440,52 | 451,06 | 442,35 |
| DPR (%) intracorrída | 4,95 | 3,27 | 1,72 | 10,58 | 4,07 | 1,83 | 6,21 | 4,75 | 5,25 |
| EPR (%) intracorrída | -6,82 | -6,84 | -10,11 | -4,22 | 13,06 | 13,19 | -2,11 | 0,24 | -1,70 |
| Média intercorrída | 3683,08 | | | 1762,48 | | | 444,64 | | |
| DPR (%) intercorrída | 3,76 | | | 7,08 | | | 5,14 | | |
| EPR (%) intercorrída | -7,92 | | | 10,15 | | | -1,19 | | |

Legenda: CQM = controle de qualidade médio; DPR = desvio padrão relativo; EPR = erro padrão relativo.

Tabela 51 - Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQA de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico.

| Replicatas | Efavirenz (8000 ng/mL) | | | Lamivudina (3200 ng/mL) | | | Tenofovir (800 ng/mL) | | |
|----------------------|---------------------------|---------|---------|----------------------------|---------|---------|--------------------------|--------|--------|
| | 1 | 6807,61 | 7488,04 | 6799,61 | 2937,25 | 3269,70 | 3163,13 | 768,30 | 779,98 |
| 2 | 7382,71 | 7640,98 | 7445,45 | 3307,82 | 3386,62 | 3214,55 | 845,58 | 821,65 | 785,88 |
| 3 | 6635,64 | 7732,40 | 6915,71 | 2842,95 | 3079,33 | 3426,53 | 809,69 | 921,94 | 880,46 |
| 4 | 7507,70 | 7092,00 | 7068,64 | 3300,77 | 3175,43 | 2994,37 | 767,14 | 908,15 | 868,25 |
| 5 | 7525,67 | 7667,93 | 6798,23 | 3255,02 | 3042,06 | 3417,80 | 734,26 | 829,05 | 747,92 |
| Média intracorrída | 7171,87 | 7524,27 | 7005,53 | 3128,76 | 3190,63 | 3243,27 | 784,99 | 852,16 | 818,32 |
| DPR (%) intracorrída | 5,84 | 3,43 | 3,85 | 7,07 | 4,41 | 1,83 | 5,50 | 7,11 | 6,82 |
| EPR (%) intracorrída | -10,35 | -5,95 | -12,43 | 2,23 | -0,29 | 1,35 | -1,88 | 6,52 | 2,29 |
| Média intercorrída | 7233,89 | | | 3187,55 | | | 818,49 | | |
| DPR (%) intercorrída | 5,17 | | | 5,57 | | | 6,99 | | |
| EPR (%) intercorrída | -9,58 | | | -0,39 | | | 2,31 | | |

Legenda: CQA = controle de qualidade alto; DPR = desvio padrão relativo; EPR = erro padrão relativo.

Tabela 52 - Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQD de efavirenz, lamivudina e tenofovir pelo método bioanalítico.

| Replicatas | Efavirenz (16000 ng/mL) | | | Lamivudina (6400 ng/mL) | | | Tenofovir (1600 ng/mL) | | |
|----------------------|----------------------------|---------|---------|----------------------------|---------|---------|---------------------------|---------|--------|
| 1 | 6017,86 | 7403,55 | 7187,95 | 2708,47 | 3652,08 | 3277,26 | 757,97 | 807,13 | 839,44 |
| 2 | 6904,26 | 7293,87 | 6938,65 | 3020,60 | 3316,34 | 3262,52 | 733,97 | 750,09 | 870,11 |
| 3 | 7856,85 | 7787,00 | 6934,62 | 3359,35 | 3163,67 | 3322,39 | 719,45 | 939,60 | 874,69 |
| 4 | 6736,92 | 6982,98 | 7054,97 | 2851,11 | 3182,60 | 3482,54 | 800,88 | 957,19 | 832,03 |
| 5 | 6562,71 | 7151,54 | 7112,88 | 2675,42 | 3268,34 | 3475,44 | 867,83 | 1026,01 | 828,21 |
| Média intracorrida | 6815,72 | 7323,79 | 7045,81 | 2922,99 | 3316,61 | 3364,03 | 776,02 | 896,01 | 848,90 |
| DPR (%) intracorrida | 9,84 | 4,14 | 1,56 | 9,56 | 5,96 | 3,19 | 7,72 | 12,69 | 2,58 |
| EPR (%) intracorrida | -14,80 | -8,45 | -11,93 | 8,66 | 3,64 | 5,13 | -3,00 | 12,00 | 6,11 |
| Média intercorrida | 7061,77 | | | 3201,21 | | | 840,31 | | |
| DPR (%) intercorrida | 6,40 | | | 8,76 | | | 10,28 | | |
| EPR (%) intercorrida | -11,73 | | | 0,04 | | | 5,04 | | |

Legenda: CQD = controle de qualidade de diluição; DPR = desvio padrão relativo; EPR = erro padrão relativo.

O método demonstrou ser preciso e exato para quantificação simultânea de EFV, 3TC e tenofovir. A precisão intercorrida foi confirmada pelos valores de DPR, $\leq 20\%$ para LIQ e $\leq 15\%$ para as demais concentrações. A exatidão intracorrida foi evidenciada pelos valores de EPR, $\leq \pm 20\%$ para LIQ e $\leq \pm 15\%$ para as demais concentrações.

4.2.3 Efeito residual

O efeito residual também é conhecido como *carryover* e pode ser definido como “efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente” (BRASIL, 2012).

Consideram-se como critérios de aceitação que as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. Também, deve-se considerar que as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5% da resposta do padrão interno (BRASIL, 2012).

Para os analitos em estudo, EFV, 3TC e tenofovir e os padrões internos estavudina e aciclovir, não foram observados efeitos residuais na amostra de plasma branco extraída e injetada imediatamente após a amostra extraída do LSQ. Para o padrão interno sulfato de indinavir na amostra branco injetada após o LSQ apareceu resposta de interferente no tempo de retenção do padrão interno igual a 0,27% da resposta do padrão interno. Conforme os requisitos da legislação, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5% da resposta do padrão interno (BRASIL, 2012). Desse modo, pode-se considerar que não houve efeito residual.

4.2.4 Efeito matriz

O efeito matriz é determinado na comparação da resposta de um analito analisado na matriz biológica e na solução padrão. A diferença pode ser descrita como supressão ou indução iônica, se a resposta do analito é diminuída ou aumentada (KING, R. *et al.*, 2000; DAMS *et al.*, 2003; HELLER, 2007). Nos casos em que os compostos endógenos ainda estão presentes após o preparo da amostra, a quantificação pode ser seriamente prejudicada pelo efeito matriz, especialmente se os analitos são eluídos mais cedo (tempo de retenção menor) (EECKHAUT *et al.*, 2009). Por isso, é considerado um parâmetro importante para ser avaliado durante o desenvolvimento e a validação de um método bioanalítico.

O efeito matriz foi avaliado por meio do FMN para o CQA. Não houve efeito matriz expressivo para os insumos farmacêuticos ativos em estudo, pois os DPR calculados foram inferiores a 15% (**Tabela 53**).

Tabela 53 - Resultados do efeito matriz para efavirenz, lamivudina e tenofovir para o método bioanalítico por meio do cálculo do FMN.

| Amostra | Fator de Matriz Normalizado (FMN) | | |
|----------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|
| | Efavirenz | Lamivudina | Tenofovir |
| | CQA (8000 ng/mL) | CQA (3200 ng/mL) | CQA (800 ng/mL) |
| Pool normal 1 | 0,88 | 0,64 | 0,98 |
| Pool normal 2 | 0,96 | 0,68 | 1,05 |
| Média | 0,92 | 0,66 | 1,01 |
| DPR (%) | 6,05 | 3,56 | 4,96 |

Legenda: FMN = fator de matriz normalizado; CQA = controle de qualidade alto; DPR = desvio padrão relativo.

CONCLUSÕES

- O desenvolvimento farmacotécnico dos comprimidos foi realizado com sucesso levando em consideração a dose humana dos antirretrovirais convertida para coelhos, de forma a viabilizar estudos de biodisponibilidade nesses animais. Os comprimidos preparados contém 66 mg de efavirenz, 33 mg de lamivudina e 33 mg de fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada.
- A granulação por via úmida foi o processo escolhido na produção dos comprimidos, devido a baixa densidade e fluidez do efavirenz na forma micronizada. O uso de tensoativo demonstrou-se necessário para melhorar a molhabilidade do insumo farmacêutico ativo e tornar possível a etapa de granulação da mistura.
- A mistura final de pós do terceiro lote piloto da Formulação 2 contendo efavirenz (66 mg), lamivudina (33 mg) e fumarato de tenofovir desoproxila (33 mg) apresentou propriedades de densidade e fluidez adequadas ao preenchimento da matriz de compressão. Os comprimidos cumpriram com os requisitos dos testes de determinação de peso, friabilidade, teor, uniformidade de conteúdo e desintegração, conforme especificações descritas nos Métodos Gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).
- Os perfis de dissolução em diferentes meios contribuíram para o estudo inicial da liberação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila dos comprimidos preparados. O meio de dissolução contendo concentrações inferiores a 1% p/v de lauril sulfato de sódio deve ser avaliado para ajuste das condições experimentais.
- O método analítico desenvolvido e validado por cromatografia a líquido de alta eficiência foi adequado para a quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada. O método demonstrou-se seletivo em relação aos excipientes da

formulação, linear nas faixas de concentração estudadas (66,0 a 198,0 µg/mL de efavirenz e 33,0 a 99,0 µg/mL de lamivudina e fumarato de tenofovir), preciso (DPR < 2,0%), exato e robusto.

- O teste de Youden se mostrou uma ferramenta adequada para avaliar a robustez do método cromatográfico para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada, permitindo ordenar e avaliar a influência de cada uma das variáveis para os parâmetros cromatográficos do método analítico.
- A otimização do gradiente da fase móvel possibilitou a análise em curto tempo de corrida cromatográfica (15 min). As condições são adequadas para análises de rotina de controle de qualidade de comprimidos contendo a associação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila, independente das doses dos insumos farmacêuticos ativos na forma farmacêutica, desde que os ajustes proporcionais no preparo das amostras sejam feitos de forma a obter as concentrações finais nas faixas lineares estabelecidas.
- Método bioanalítico por espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray* no modo positivo desenvolvido para a quantificação simultânea de efavirenz, lamivudina e tenofovir em plasma humano foi preciso, exato e não apresentou efeitos residuais e matriciais na quantificação dos antirretrovirais. A faixa de concentração estudada foi linear, abrangendo os intervalos de 200 a 10000 ng/mL para efavirenz, de 50 a 4000 ng/mL para lamivudina e de 100 a 1000 ng/mL para tenofovir. Sulfato de indinavir, estavudina e aciclovir foram selecionados como padrões internos de efavirenz, lamivudina e tenofovir, respectivamente.
- O método bioanalítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, bem como no monitoramento terapêutico de pacientes em tratamento com a associação de efavirenz, lamivudina e tenofovir.

- Faz-se necessário a transferência do método bioanalítico desenvolvido em plasma humano para plasma de coelho, com objetivo de aplicar o método bioanalítico e avaliar *in vivo* o desempenho da formulação contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em dose fixa combinada. O protocolo experimental submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz foi aprovado sob o nº 71/13-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, B. L.; BERNA, M. J.; MURPHY, A. T. Recent advances in use of LC/MS/MS for quantitative high-throughput bioanalytical support of drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 53-66, 2002.

AIROLDI, M.; ZACCARELLI, M.; BISI, T.; BINI, T.; ANTINORI, A.; MUSSINI, C.; BAI, F.; OROFINO, G.; SIGHINOLFI, L.; GORI, A.; SUTER, F.; MAGGIOLO, F. One-pill once-a-day HAART: a simplification strategy that improves adherence and quality of life of HIV-infected subjects. *Patient Preference and Adherence*, n. 4, p. 115-125, 2010.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de s. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 775 p.

ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; FONTES, D. A. F.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-VIS. **Quím. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

AMBERBIER, A.; WOLDEMICHAEL, K.; GETACHEW, S.; GIRMA, B.; DERIBE, K. Predictors of adherence to antiretroviral therapy among HIV-infected persons: a prospective study in Southwest Ethiopia. **BMC Public Health**, v. 8, n. 265, p. 1-9, 2008.

ANANDAKUMAR, K.; ABIRAMI, G.; MURUGAN, S.; ASHOK, B. RP-HPLC method for simultaneous estimation of lamivudine, tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz in tablet formulation. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 815-821, 2013.

ANNESLEY, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1041-1044, 2003.

ANTUNES, M. V.; POETA, J.; RIBEIRO, J. P.; SPRINZ, E.; LINDEN, R. Ultra-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors in human plasma. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 1, p. 134-141, 2011.

APPARAO, P.; JYOTHI, PRABHAKARREDDY, V.; RAJU, J.; SHASHIDHER, B. Formulation and evaluation of gum based matrix tablets of lamivudine. **Der Pharmacia Sinica**, v. 2, v. 3, p. 176-192, 2011.

AVERY, L. B.; PARSONS, T. L.; MEYERS, D. J.; HUBBARD, W. C. A highly sensitive ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS) technique for quantification of protein free and bound efavirenz (EFV) in human seminal and blood plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 3217-3224, 2010.

ARNAU, J. M.; LAPORTE, J. R. Uso racional dos medicamentos e guias farmacológicos. In: LAPORTE, J. R.; TOGNONI, G.; ROZENFELD, S. (ED.). **Epidemiologia do medicamento: princípios gerais**, São Paulo: Hucitec, 1989, p. 66-67.

ARRIZABALAGA, J.; ARAZO, P.; AGUIRREBENGOA, K.; GARCÍA-PALOMO, D.; CHOCARRO, A.; LABARGA, P.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, M. J.; ECHEVARRÍA, S.; OTEO, J. A.; URIZ, J.; LETONA, S.; FARIÑAS, C.; PERALTA, G.; PINILLA, J.; FERRER, P.; ÁLVAREZ, M. L.; IRIBARREN, J. A. Effectiveness and safety of simplification therapy with once-daily tenofovir, lamivudine, and efavirenz in HIV-1-infected patients with undetectable plasma viral load on HAART. **HIV Clin. Trials**, v. 8, n. 5, p. 328-336, 2007.

ASANTE-APPIAH, E.; SKALKA, A. M. HIV-1 integrase: structural organization, conformacional changes, and catalysis. **Ad. Virus Res.**, v. 52, p. 351-369, 1999.

ASHENAFI, D.; CHINTAM, V.; VEGHEL, D. V.; DRAGOVIC, S.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Development of a validated liquid chromatographic method for the determination of related substances and assay of tenofovir disoproxil fumarate. **J. Sep. Sci.**, v. 33, p. 1708-1716, 2010.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (AEFI). Validación de métodos analíticos. Barcelona, 2001.

AUNGST, B. J.; NGUYEN, N. H.; TAYLOR, N. J.; BINDRA, D. S. Formulation and food effects on the oral absorption of a poorly water soluble, highly permeable antiretroviral agent. **Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 6, p. 1390 – 1395, 2002.

AZEVEDO, R. C. P.; RIBEIRO, G. P.; ARAÚJO, M. B. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.

BAHETI, G.; KISER, J. J.; HAVENS, P. L.; FLETCHER, C. V. Plasma and intracellular population pharmacokinetic analysis of tenofovir in HIV-1-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5294-5299, 2011.

BALASUBRAMANIAM, J. BEE, T. Influence of superdisintegrants on the rate of drug dissolution from oral solid dosage forms. **Pharmaceutical Technology**, april 2009.

BANGSBERG, D. R.; RAGLAND, K.; MONK, A.; DEEKS, S. G. A single tablet regimen is associated with higher adherence and viral suppression than multiple tablet regimens in HIV + homeless and marginally housed people. **AIDS**, v. 24, p. 2835-2840, 2010.

BARDITCH-CORVO, P.; DEEKS, S. G.; COLLIER, A.; SAFRIN, S.; COAKLEY, D. F.; MILLER, M.; KEARNEY, B. P.; COLEMAN, R. L.; LAMY, P. D.; KAHN, J. O.; MCGOWAN, I.; LIETMAN, P. S. Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 2733-2739, 2001.

BARKIL, M. E.; GAGNIEU, M. C.; GUITTON, J. Relevance of a combined UV and single mass spectrometry detection for the determination of tenofovir in human

plasma by HPLC in therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 854, p. 192-197, 2007.

BARTLETT, J. A. Addressing the challenges of adherence. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 29, suppl. 1, p. S2-S10, 2002.

BELOHLAV, Z.; BRENKÓVA, L.; HANIKA, J.; DURDIL, P.; RAPEK, P.; TOMASEK, V. Effect of drug active substance particles on wet granulation process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. A7, p. 974-980, 2007.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F. Oprea TI BDDCS applied to over 900 drugs. **AAPS J.**, v. 13, n. 4, p. 519-547, 2011.

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**, v. 21, p. 2087-2094, 2007.

BENNETTO-HOOD, C.; JOHNSON, V. A.; KING, J. R.; HOESLEY, C. J.; ACOSTA, E. P. Novel methodology for antiretroviral quantification in the female genital tract. **HIV Clin. Trials**, v. 10, n. 3, p. 193-199, 2009.

BEST, B. M.; GOICOECHEA, M. Efavirenz – still first-line king? **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 4, n. 7, p. 965-972, 2008.

BLADES, A. T.; IKONOMOU, M. G.; KEBARLE, P. Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 2019, 1991.

BOFFITO, M.; ACOSTA, E.; BURGER, D.; FLETCHER, C. V.; FLEXNER, C.; GARAFFO, R.; GATTI, G.; KUROWSKI, M.; PERNO, C. F.; PEYTAVIN, G.; REGAZZI, M.; BACK, D. Current status and future prospects of therapeutic drug monitoring and applied clinical pharmacology in antiretroviral therapy. **Antiviral Therapy**, v. 10, p. 375-392, 2005.

BONATE, P. L.; REITH, K.; WEIR, S. Drug interactions at the renal level. Implications for drug development. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 34, p. 375-404, 1998.

BOZOVIC, A.; KULASINGAM, V. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: from small molecules to proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 444-455, 2013.

BRANDÃO, F. C.; TAGIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; BERTI, L. F.; STULZER, H. K. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 6, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 542, de 22 de dezembro de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, de 24 de dezembro de 1986.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 9.313, de 13 de novembro de 1996. **Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e**

doentes de Aids. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 14 de novembro de 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Poder Executivo, de 2 junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Guia para a realização de estudos de estabilidade.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Poder Executivo, de 1 de agosto de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. Lista 2 – Análise para estabelecimento de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Brasília, DF, Poder Executivo, de 24 de abril de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 24 de abril de 2007. **Declara de interesse público os direitos de patente sobre o efavirenz.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 25 de abril de 2007a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 16, de 02 de março de 2007. **Aprova regulamento técnico para medicamentos genéricos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 02 de março de 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Auditoria. Departamento Nacional de Auditoria do SUS. **Efavirenz será produzido no Brasil.** Brasília, DF, 2008a. Disponível em: <http://sna.saude.gov.br/noticias.cfm?id=4360>. Acesso em: 20/02/2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST/AIDS. Critérios para indicação de raltegravir 400 mg (RAL).** Nota Técnica nº 307, Brasília – DF, 2008b. Disponível em: http://www.sbinfecto.org.br/anexos/01_12_Nota_Tecnica_3007_08.pdf. Acesso em: 10 de junho de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV: 2008.** 7ª Ed. Brasília, DF, 2008c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Vice-Presidência de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação – CEUA. **Manual de utilização de animais/Fiocruz.** 1. ed. Rio de Janeiro, 2008d. Disponível: http://www.bioterio.net/Files/Manual%20de%20utilizacao%20de%20animais_FIOCRUZ.pdf. Acesso em: 17 de novembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Contratos para compra de antirretrovirais ficam R\$ 118 milhões mais baratos.** Notícias e mídias, Notícias do departamento, 25 de

jan. 2010. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/noticia/contratos-para-compra-de-antirretrovirais-ficam-r-118-milhoes-mais-baratos>. Acesso em: 17 de dezembro de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, DF, Poder Executivo, de 22 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional Aids e DST. **Boletim Epidemiológico Aids/DST 2013**, ano II, n. 01. Brasília, DF, 2013a. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2013>. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, DF, 2013b. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_hiv_web_pdf_41452.pdf. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Aids. **Medicamentos**, 2014. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

BRITISH Pharmacopoeia 2011. London: The Stationary Office, 2011. v. 5, General notices, Appendix XVII, N. Power Flow, p. A464- A467.

BUCHALLA, C. M.; CAVALHEIRO, T. R. A classificação internacional de funcionalidade, incapacidade a saúde e a Aids: uma proposta de core-set. **ACTA fisiátrica**, v. 15, n. 1, p. 42-48, 2008.

BURGESS, D. J.; DUFFY, E.; ETZLER, F.; HICKEY, A. J. Particle size analysis: AAPS Workshop report, cosponsored by Food and Drug Administration and the United States Pharmacopeia. **The AAPS Journal**, v. 6, n. 3, p. 1-12, 2004.

CAMMACK, N.; ROUSE, P.; MARR, C. L.; REID, P. J.; BOEHME, R. E.; COATES, J. A.; PENN, C. R.; CAMERON, J. M. Cellular metabolism of (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, n. 10, p. 2059-2064, 1992.

CASSETTI, J.; MADRUGA, J. V. R.; SULEIMAN, J. M. A. H.; ETZEL, A.; ZHONG, L.; CHENG, A. K.; ENEJOSA, J. The safety and efficacy of tenofovir DF in combination with lamivudine and efavirenz through 6 years in entiretroviral-naive HIV-1-infected patients. **HIV Clin. Trials**, v.8, n. 3, p. 164-172, 2007.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, p. 362-387, 2001.

CHECA, A.; OLIVER, R.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Reversed-phase liquid chromatographic method with spectrophotometric detection for the determination of antiretroviral drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 85-94, 2008.

CHESNEY, M. Adherences to HAART regimens. **Aids Patient Care and STDs**, v. 17, n. 4, p. 169-177, 2003.

CHOI, S. O.; REZK, N. L.; KASHUBA, A. D. M. High-performance liquid chromatography assay for the determination of the HIV-protease inhibitor tipranavir in human plasma in combination with nine other antiretroviral medications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1562-1567, 2007.

CHOI, S. O.; REZK, N.; KIM, J. S.; KASHUBA, A. D. M. Development of an LC-MS method for measuring TNF in human vaginal tissue. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 48, n. 3, p. 219-223, 2010.

CHOWDARY, K. P. R.; ANNAMMA, D. G. S. Preclinical pharmacokinetic evaluation of efavirenz - cyclodextrin – PVP inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, n. 5, p. 23-26, 2012.

CIHLAR, T.; BIRKUS, G.; GREENWALT, D. E.; HITCHCOCK, M. J. M. Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. **Antiviral Research**, v. 54, p. 37-45, 2002.

CLERCQ, E. D. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 1, p. 13-25, 2002.

CLERCQ, E. D. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115-133, 2004a.

CLERCQ, E. D. Antivirals and antiviral strategies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 704-720, 2004b.

CLERCQ, E. D. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, p. 287-299, 2009.

CONNOR, R. *et al.* Human immunodeficiency virus. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (ED.) **Clinical of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 63, p. 189-196, 1997.

COSTA, M. A.; SEICEIRA, R. C.; RODRIGUES, C. R.; HOFFMEISTER, C. R. D.; CABRAL, L. M.; ROCHA, H. V. A. Efavirenz dissolution enhancement I: co-micronization. **Pharmaceutics**, v. 5, p. 1-22, 2013.

COUTO, A. G.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Granulação. **Caderno de Farmácia**, v. 16, n. 1, p. 13-20, 2000.

CRISTOFOLETTI, R.; NAIR, A.; ABRAHAMSSON, B.; GROOT, D. W.; KOPP, S.; LANGGUTH, P.; POLLI, J. E.; SHAH, V. P.; DRESSMAN, J. B. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: efavirenz. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 2, p. 318-329, 2013.

CROTTI, A. E. M. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CROTTI, S.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. Some thoughts on electrospray ionization mechanisms. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, p. 85-100, 2011.

CUSINI, A.; VERNAZZA, P. L.; YERLY, S.; DECOSTERD, L. A.; LEDERGERBER, B.; FUX, C. A.; ROHRBACH, J.; WIDMER, N.; HIRSCHL, B.; GAUDENZ, R.; CAVASSINI, M.; KLIMKAIT, T.; ZENGER, F.; GUTMANN, C.; OPRAVIL, M.; GÜNTARD, H. F. Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 62, n. 1, p. 28-35, 2013.

DAMS, R.; HUESTIS, M. A.; LAMBERT, W. E.; MURPHY, C. M. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 14, p. 1290, 2003.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

D'AVOLIO, A.; SIMIELE, M.; SICCARDI, M.; BAIETTO, L.; SCIANDRA, M.; BONORA, S.; PERRI, G. D. HPLC-MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 774-780, 2010.

DECHRISTOFORO, R.; PENZAK, S. R. Tenofovir: a nucleotide analogue reverse-transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v. 61, n. 1, p. 86-98, 2004.

DEJESUS, E.; MCCARTY, D.; FARTHING, C. F.; SHORTINO, D. D.; GRINSZTEJN, B.; THOMAS, D. A.; SCHRADER, S. R.; CASTILLO, S. A.; SENSION, M. C.; GOUGH, K.; MADISON, S. J. Once-daily versus twice-daily lamivudine, in combination with zidovudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naïve adults with HIV infection: a randomized equivalence trial. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 411-418, 2004.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 6-12, 2006.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; ROBBINS, B.; FLETCHER, C. V. The simultaneous assay of tenofovir and emtricitabine in plasma using LC/MS/MS and isotopically

labeled internal standards. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 1907-1914, 2009.

DESAI, M.; IYER, G.; DIKSHIT, R. K. Antiretroviral drugs: critical issues and recent advances. **Indian J. Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 288-298, 2012.

DIOP, S. A.; FORTES-DÉGUÉNONVO, L.; SEYDI, M.; DIENG, A. B.; BASSE, C. D.; MANGA, N. M.; DIA, N. M.; NDAW, G.; NDOUR, C. T.; SOUMARÉ, M.; DIOP, B. M.; SOW, P. S. Efficacité et tolérance de l'association ténofovir-lamivudine-éfavirenz chez les patients VIH-1 à la Clinique des maladies infectieuses du CHNU de Fann à Dakar. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, december, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13149-012-0272-7#>. Acesso em: 16 de janeiro de 2013.

DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A.; USLU, B. Simultaneous determination of abacavir, efavirenz and valganciclovir in human serum samples by isocratic HPLC-DAD detection. **Chromatographia**, v. 66, p. S25-S30, 2007.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; JUPILLE, T. H.; WILSON, N. S. Variability of column selectivity for reversed-phase high-performance liquid chromatography. Compensation by adjustment of separation conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 960, p. 51-67, 2002.

DORR, P.; WESTBY, M.; DOBBS, S.; GRIFFIN, P.; IRVINE, B.; MACARTNEY, M.; MORI, J.; RICKETT, G.; SMITH-BURCHNELL, C.; NAPIER, C.; WEBSTER, R.; ARMOUR, D.; PRICE, D.; STAMMEN, B.; WOOD, A.; PERROS, M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4721-4732, 2005.

DOURADO, I.; VERAS, M. A. S.; BARREIRA, D.; BRITO, A. M. Tendências da epidemia de Aids no Brasil após a terapia antirretroviral. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 9-17, 2006.

DROSTE, J. A. H.; WISSEN, C. P. W. G. M. V.; KEARNEY, B. P.; BUFFELS, R.; VANHORSSSEN, P. J.; HEKSTER, Y. A.; BURGER, D. M. Pharmacokinetic study of tenofovir disoproxil fumarato combined with rifampin in healthy volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, 2005.

DUARTE, P. S.; RAMOS, D. G.; PEREIRA, J. C. Padrão de incorporação de s antiretrovirais pelo Sistema Público de Saúde no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 14, n. 4, p. 541-547, 2011.

EDGE, S.; STEELE, D. F.; CHEN, A.; TOBYN, M. J.; STANIFORTH, J. N. The mechanical properties of compacts of microcrystalline cellulose and silicified microcrystalline cellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, p. 67-72, 2000.

EECKHAUT, A. V.; LACKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2198-2207, 2009.

ELENS, L.; VERITER, S.; DI FAZIO, V.; VANBINST, R.; BOESMANS, D.; WALLEMACQ, P.; HAUFROLD, V. Quantification of 8 HIV-protease inhibitors and 2 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors by ultra-performance liquid chromatography with diode array detection. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 170-174, 2009.

EL-SAYED, A. A. Y.; EL-SALEM, N. A. Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications. **Anal. Sci.**, v. 21, n. 6, p. 595-607, 2005.

ENÉAS, P. C. R. **Oxcarbazepina**: desenvolvimento e validação de métodos analíticos de controle de qualidade. Aplicação em formulações magistrais. 2008. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ETTE, E. I.; GARG, V.; JAYARAJ, A. Drug development: a rational approach. In: BONATE, P. L.; HOWARD, D. R. (Ed.) **Pharmacokinetics in Drug Development: Regulatory and Development Paradigms**. v. 2. AAPS Press: Arlington, 2004. cap. 1, p.3-36.

EUROPEAN Medicines Agency, Science Medicines Health. Guideline on bioanalytical method validation, 2011. Acesso em: Disponível: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

FABBIANI, M.; ZACCARELLI, M.; GRIMA, P.; PROSPERI, M.; FANTI, I.; COLAFIGLI, M.; D'AVINO, A.; MONDI, A.; BORGHETTI, A.; FANTONI, M.; CAUDA, R.; GIAMBENEDETTO, S. Single tablet regimens are associated with reduced efavirenz withdrawal in antiretroviral therapy naive or switching for simplification HIV-infected patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 26, p. 2-7, 2014.

FAN, B.; BARTLETT, M. G.; STEWART, J. T. Determination of lamivudine/stavudine/efavirenz in human serum using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry with ionization polarity switch. **Biomedical Chromatography**, v. 16, p. 383-389, 2002.

FARDIS, M.; OLIYAI, R. Case study: tenofovir disoproxil fumarate: an oral prodrug of tenofovir. In: Borchardt RT and Middaugh CR, ed. **Prodrugs: Challenges and Rewards**. New York, USA: Springer, 2008; 1347–57.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª edição. Brasília: Anvisa, 2010.

FAURE, A.; YORK, P.; ROWE, R. C. Process control and scale-up of pharmaceutical wet granulation processes: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 269-277, 2001.

FERNANDES, C.; JUNQUEIRA, R. G.; CAMPOS, L. M. M.; PIANETTI, G. A. Dissolution test for lamivudine tablets: optimization and statistical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 601-606, 2006.

FLEXNER, C. Agentes antirretrovirais e tratamento da infecção pelo HIV. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 1623-1663.

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**, v. 24, n. 10, 2002.

GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E. Controle terapêutico de s e ajuste de dose. In: STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap 15, p. 113-118.

GALLANT, J. E.; DERESINSKI, S. Tenofovir disoproxil fumarate. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 944-950, 2003.

GALLANT, J. E.; STASZEWSKI, S.; POZNIAK, A. L.; DEJESUS, E. ; SULEIMAN, J. M. A. H. ; MILLER, M. D. ; COAKLEY, D. F. ; LU, B. ; TOOLE, J. J. ; CHENG, A. K. Efficacy and safety of tenofovir DF vs. stavudine in combination therapy in antiretroviral naïve patients: a 3 year randomized trial. **JAMA**, v. 292, p. 191—201, 2004.

GALLANT, J. E.; PARISH, M. A.; KERULY, J. C.; MOORE, R. D. Changes in renal function associated with tenofovir disoproxil fumarate treatment, compared with nucleoside reverse-transcriptase inhibitor treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1194-1198, 2005.

GALLICANO, K. Antiretroviral-drug concentrations in sêmen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, 2000.

GALLO, R. C.; MONTAGNIER, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, n. 24, p. 2283 – 2285, 2003.

GALLO, R.; MONTAGNIER, L. HIV's Leading men. **IAVI Report staff**, n. 15, v. 3, p. 13-14, 2011.

GANDER, B.; VENTOURAS, K.; GURNY, R.; DOELKER, E. In vitro dissolution medium with supramicellar surfactant concentration and its relevance for in vivo absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 117-124, 1985.

GEHRIG, A. K.; MIKUS, G.; HAEFELI, W. E.; BURHENNE, J. Electrospray tandem mass spectroscopic characterisation of 18 antiretroviral drugs and simultaneous quantification of 12 antiretrovirals in plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n. 21, p. 2704-2716, 2007.

GIR, E.; VAICHULONIS, C. G.; OLIVEIRA, M. D. Adesão à terapêutica anti-retroviral por indivíduos com HIV/AIDS assistidos em uma instituição do interior Paulista. **Rev. Latino-am Enfermagem**, v. 13, n. 5, p. 634-641, 2005.

GOHEL, M. C.; JOGANI, P. D. A review of co-processed directly compressible excipients. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 76-93, 2005.

GOMES, N. A.; VAIDYA, V. V.; PUDAGE, 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**, v. 48, p. 918-926, 2008.

GOMES, R. R. F. M.; MACHADO, C. J.; ACURCIO, F. A.; GUIMARÃES, M. D. C. Utilização dos registros de dispensação da farmácia como indicador da não-adesão à terapia antirretroviral em indivíduos infectados pelo HIV. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, p. 495-506, 2009.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GOUNDEN, V.; SNYMAN, T.; PAIKER, J.; GEORGE, J. A. Correlation of plasma efavirenz levels with central nervous system side effects in south African HIV-infected individuals. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 46, 2008.

GOUNDEN, V.; NIEKERK, C. V.; SNYMAN, T.; GEORGE, J. A. Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients. **AIDA Research and Therapy**, v. 7, n. 32, 2010.

HAEFELFINGER, P. Limits of the internal standard technique in chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 2108, p. 73-81, 1981.

HAMMER, S. M.; INOUE, R. T. Antiviral agents. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (ED.) **Clinical Virology**. New York: Churchill Livingstone, 1997, p. 207-213.

HANCOCK, B. C.; COLVIN, J. T.; MULLARNEY, M. P.; ZINCHUK, A. V. The relative densities of pharmaceutical powders, blends, dry granulations, and immediate-release tablets. **Pharmaceutical Technology**, abril, p. 64-80, 2013.

HARDY, W. D.; GULICK, R.; MAYER, H. B.; FATKENHEUER, G.; NELSON, M.; HEERA, J.; RAJICIC, N.; GOODRICH, J. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 55, n. 5, p. 558-564, 2010.

HARRIGAN, P. R.; HOGG, R. S.; DONG, W. W.; YIP, B.; WYNHOVEN, B.; WOODWARD, J.; BRUMME, C. J.; BRUMME, Z. L.; MO, T.; ALEXANDER, C. S.; MONTANER, J. S. Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large

antiretroviral-naïve cohort initiating triple antiretroviral therapy. **Journal of Infections Diseases**, v. 191, n. 3, p. 339-347, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 2005.

HELLER, D. Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effects of co-injected matrix on matrix effects. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, p. 644, 2007.

HEINE, R.; ALDERDEN-LOS, C. G.; ROSING, H.; HILLEBRAND, M. J. X.; GORP, E. C. M.; HUITEMA, A. D. R.; BEIJNEN, J. H. Fast and simultaneous determination of darunavir and eleven other antiretroviral drugs for therapeutic drug monitoring: method development and validation for the determination of all currently approved HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, p. 2505-2514, 2007.

HEINIG, K.; WIRZ, T. Determination of taspoglutide in human and animal plasma using liquid chromatography – tandem mass spectrometry with orthogonal column-switching. **Anal. Chem.**, n. 81, p. 3705-3713, 2009.

HENRIKSEN, T.; JUHLER, R. K. The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 16, p. 446-455, 2005.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 934-946, 2005.

HILTON, G. R.; BENESCH, J. L. P. Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. **J. R. Soc. Interface**, v. 9, p. 801-816, 2012.

HODDER, S. L.; MOUNZER, K.; DEJESUS, E.; EBRAHIMI, R.; GRIMM, K.; ESKER, S.; ECKER, J.; FARAJALLAH, A.; FLAHERTY, J. F. Patient-reported outcomes in virologically suppressed, HIV-1-infected subjects after switching to a simplified, single-tablet regimen of efavirenz, emtricitabine, and tenofovir DF. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 24, n. 2, p. 87-96, 2010.

HOETELMANS, R. M. W.; PROFIJT, M.; MEENHORST, P. L.; MULDER, J. W.; BEIJNEN, J. H. Quantitative determination of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (lamivudine) in human plasma, saliva and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p. 387-394, 1998.

HOLODNIY, M. Editorial response: what is antiretroviral failure? [Editorial response]. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 82-84, 1999.

HUANG, W.; WANG, H.; DONG, A.; JIN, Y.; LI, J. Determination of the contents of zidovudine and lamivudine in compound zidovudine tablets by HPLC. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, v. 28, n. 1, p. 37-39, 2011.

IKEGAWA, S.; YANAGIHARA, T.; MURAO, N.; WATANABE, H.; GOTO, J.; NIWA, T. Separation determination of bile acid 3-sulfates by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **J. Mass Spectrom**, v. 32, p. 401-407, 1997.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos** – DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, fevereiro de 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em: 15 de março de 2013.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation – ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2 R1)**. London, 2005.

ISOSCIENCES na MPD Chemicals Company. USA. Disponível em: <http://isosciences.com/catalog/366-efavirenz-13c6.html>. Acesso em: 12 de maio de 2014.

JASKOLSKI, M.; ALEXANDRATOS, J. N.; BUJACZ, G.; WLODAWER, A. Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. **NIH Public Access**, v. 276, n. 11, p. 2926-2946, 2009.

JEMAL, M.; XIA, Y. Q. LC-MS development strategies for quantification bioanalysis. **Current Drug Metabolism**, v. 7, p. 491-502, 2006.

JOHNSON, M. A.; MOORE, K. H. P.; YUEN, G. J.; BYE, A.; PAKES, G. E. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n.1, p. 41-66, 1999.

JOHNSTON, M. I.; HOTH, D. F. Presents status and future prospects for HIV therapies. **Sciences**, v. 260, p. 1286-1293, 1993.

JOSHI, A.; ESSEKU, F.; SILVA, L.; IGWILO, C.; OQUA, D.; KUNLE, B.; OBODOZIE, O.; INYANG, U.; ADEYEYE, M. C. Postmarketing in vitro/in vivo assessment of fixed dose combination products of first line antiretrovirals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 6, 2010.

JOZWIAKOWSKI, M. J.; NGUYEN, N. A.; SISCO, J. M.; SPANCAKE, C. W. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 2, p. 193-199, 1996.

KAPLAN, S. A. Biopharmaceutical considerations in drug formulation design and evaluation. **Drug Metabolism Reviews**, v. 1, n. 1, p. 15-33, 1972.

KAPPELHOFF, B. S., ROSING, H.; HUITEMA, A. D. R.; BEIJNEN, J. H. Simple and rapid method for the simultaneous determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors efavirenz and nevirapine in human plasma using liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 792, p. 353-362, 2003.

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 761-765, 2006.

KAUL, N.; AGRAWAL, H.; PARADKAR, A. R.; MAHADIK, K. R. The international conference on harmonization guidance in practice: stress degradation studies on lamivudine and development of a validated specific stability-indicating HPTLC assay method. **Chromatographia**, v. 60, p. 213-221, 2004.

KANO, E. K.; SERRA, C. H. R.; KOONO, E. E. M.; ANDRADE, S. S.; PORTA, V. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, p. 73-79, 2005.

KARNER, S.; URBANETZ, N. A. The impact of electrostatic charge in pharmaceutical powders with specific focus on inhalation-powders. **Journal of Aerosol Science**, v. 42, p. 428-445, 2011.

KEBARLE, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 804-817, 2000.

KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 898-917, 2009.

KENNEY, K.; WRING, S. A.; CARR, R. M.; WELLS, G. N.; DUNN, J. A. Simultaneous determination of zidovudine and lamivudine in human serum using HPLC with tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 967-983, 2000.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 11, p. 942, 2000.

KIPPAX, P. Particle size analysis. **Pharmaceutical Technology Europe**, v. 21, n. 4, 2009. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/Analytical/Particle-size-analysis/ArticleStandard/Article/detail/588633>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2014.

KOZIOLEK, M.; GARBACZ, G.; NEUMANN, M.; WEITSCHIES, W. Simulating the postprandial stomach: biorelevant test methods for the estimation of intragastric drug dissolution. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 2211-2221, 2013.

KUMAR, A. K. H., SUDHA, V.; SWAMINATHAN, S.; RAMACHANDRAN, G. Comparison of HPLC & spectrophotometric methods for estimation of antiretroviral drug content in pharmaceutical products. **Indian J. Med. Res.**, v. 132, p. 390-394, 2010.

KUMAR, R.; SHARMA, M.; VERMA, G.R. Stability indicating analytical method development and validation of efavirenz quantification by high performance liquid chromatographic technique. **E-Journal of Chemistry**, n. 8, v. 4, p. 1498-1503, 2011.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 1. 499 p.

LAHDENPAA, E.; ANTIKEINEN, O.; YLIRUUSI, J. Compression with silicified and non-silicified microcrystalline cellulose: study of some properties of powers and tablets. **S. T. P. Pharm. Sci.**, v. 11, p. 129-135, 2001.

LALEZARI, J. P.; STAGG, R. J.; KUPPERMANN, B. D.; HOLLAND, G. N.; KRAMER, F.; IVES, D. V.; YOULE, M.; ROBINSON, M. R.; DREW, W. L.; JAFFE, H. S. Intravenous didanosine for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. A randomized, controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 126, p. 257-263, 1997.

LANGEBEEK, N.; SPRENGER, H. G.; GISOLF, E. H.; REISS, P.; SPRANGERS, M. A. G.; LEGRAND, J. C.; RICHTER, C.; NIEUWKERK, P. T. A simplified combination antiretroviral therapy regimen enhances adherence, treatment satisfaction and quality of life: results of a randomized clinical trial. **HIV Medicine**, p. 1-5, 2013.

LANGFORD, T. D.; LETENDRE, S. L.; LARREA, G. J.; MASLIAH, E. Changing patterns in the neuropathogenesis of HIV during the HAART era. **Brian Pathol.**, v. 13, n. 2, p. 195-210, 2003.

LANIÈCE, I.; CISS, M.; DESCLAUX, A.; DIOP, K.; MBODJ, F.; NDIAYE, B.; SYLLA, O.; DELAPORTE, E.; NDOYE, I. Adherence to HAART and its principal determinants in a cohort of Senegalese adults. **AIDS**, v. 17, suppl. 3, p. S103-108, 2003.

LEUENBERGER, H. New trends in the production of pharmaceutical granules: the classical batch concept and the problem of scale-up. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 279-288, 2001.

LI, Z.; DING, C.; GE, Q.; ZHOU, Z.; ZHI, X.; LIU, X. Simultaneous determination of lamivudine, stavudine and nevirapine in human plasma by LC/MS/MS and its application to pharmacokinetic study in clinic. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 926-934, 2010.

LIN, Z. J.; LI, W.; WENG, N. Capsule review on bioanalytical method transfer: opportunities and challenges for chromatographic methods. **Bioanalysis**, v. 3, n. 1, 2011.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

LIU, X.; MA, Q.; ZHANG, F. Therapeutic drug monitoring in highly active antiretroviral therapy. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 9, n. 5, p. 743-758, 2010.

MAEK-A-NAHTAWAT, W.; AVIHINGSANON, A.; THAINSANGUANKUL, W.; WONGSABUT, J.; GOROWARA, M.; RAMAUTARSING, R.; CLARKE, A.; HSU, D.; RUXRUNGTHAM, K. Safety and efficacy of once-daily single generic fixed-drug

combination tablet of tenofovir, lamivudine and efavirenz among HIV-infected Thais. **Journal of the International AIDS Society**, v. 15, n. 4, p. 18285. Poster abstract P312, 2012. Disponível em: <http://www.jiasociety.org/index.php/jias/rt/printerFriendly/18285/2700>. Acesso em: 28 de novembro de 2012.

MAGGIOLO, F.; SUTER, F. Terapia once-a-day. **Read Files – Resistenza e Adesione alle terapie nella cura dell’AIDS**, v. 3, n. 5, p. 2, 2003.

MALESULK, M. D.; CARDOSO, S. G.; LANZANOVA, F.A.; BAJERSKI, L.; DORIGONI, E. Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsulas magistrais contendo anlodipino. **Rev. Ciênc. Farm. Básica e Apl.**, v. 27, n. 1, p. 37-49, 2006.

MANO, N.; GOTO, J. Biomedical and biological mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 3-14, 2003.

MARCHAND, D. H.; CROES, K.; DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. VII Cyanopropyl columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, p. 57-64, 2005.

MARVAL, E.; GARCÍA, L.; CANDELA, D. E.; AROCHA-PIÑANGO, C. L. Normal values of hemoglobin, hematocrit, blood coagulation factors, and fibrinolysis in New Zealand White rabbits. **Sangre (Barc.)**, v. 37, n. 5, p. 355-361, 1992.

MASUR, H. Tratamento da infecção pelo HIV e da Aids. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (ED.) **Cecil tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 2551-2561.

MATHIAS, A. A.; HINKLE, J.; MENNING, M.; HUI, J.; KAUL, S.; KEARNEY, B. P. bioequivalence of efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate single-tablet regimen. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 46, n. 2, p. 167 – 173, 2007.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 3019-3030, 2003.

MAURIN, M. B.; ROWE, S. M.; BLOM, K.; PIERCE, M. E. Kinetics and mechanism of hydrolysis of efavirenz. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 19, n. 4, p. 517-521, 2002.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; PUDAGE, A.; GOMES, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. High throughput LC-MS/MS method for simultaneous quantification of lamivudine, stavudine and nevirapine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 853, p. 320-332, 2007.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons**: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3. ed. London: Pharmaceutical Press (PhP), 2004. v. 2, 1935 p.

MOLINA, J. M. Efficacy and safety of once-daily regimens in the treatment of HIV infection. **Drugs**, v. 68, n. 5, p. 567-578, 2008.

MONTGOMERY, E. R.; EDMANSONA, A. L.; COOKB, S. C.; HOYSEPIANA, P. K. Development and validation of a reverse-phase HPLC method for analysis of efavirenz and its related substances in the drug substance and in a capsule formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 267-284, 2001.

MOORE, K. H.; BARRET, J. E.; SHAW, S.; PAKES, G. E.; CHURCHUS, R.; KAPOOR, A.; LLOYD, J.; BARRY, M. G.; BACK, D. The pharmacokinetics of lamivudine phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with HIV-1. **AIDS**, v. 13, n. 16, p. 2239-2250, 1999.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MORRIS, T.; DAVIES, B. Physiological parameters in laboratory animals and humans. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, 1993.

NEGREDO, E.; BONJOCH, A.; CLOTET, B. Benefits and concerns of simplification strategies in HIV-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 235-242, 2006.

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**, v. 23, p. 371-381, 2009.

NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L.; SHAH, V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. **Dissolution Technologies**, Hockessin, v. 7, n. 1, p. 16-18, 2000.

ONAH, J. O.; AJIMA, U. Spectrophotometric determination of tenofovir disoproxil fumarate after complexation with ammonium molybdate and picric acid. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, n. 1, p. 199-204, 2011.

OS-CAL® 500: carbonato de cálcio de conchas de ostras. São Paulo: Sanofi-Aventis farmacêutica Ltda, 2011. Bula de medicamento. Disponível em: http://produtos.sanofi.com.br/os-cal_500.pdf. Acesso em: 17 de março de 2014.

PAULA, N. C.; CIRILO, H. N. C.; SILVA, V. R.; KLUTHCOUSKI, P. S.; OLIVEIRA, V. Determinação de lamivudina em matéria prima e solução oral por espectrometria UV com formação do complexo azul de timol e cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 75-82, 2006.

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

PATEL, J. R.; BARVE, K. H. Intestinal permeability of lamivudine using single pass intestinal perfusion. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 5, p. 478-481, 2012.

PATEL, S.; KAUSHAL, A. M.; BANSAL, A. K. Compression physics in the formulation development of tablets. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 23, n. 1, p. 1-65, 2006.

PENDELA, M.; GYSEGHEM, E. V.; MOOTER, G. V. D.; BAERT, L.; ROSIER, J.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Development of a liquid chromatographic assay for an anti-HIV tablet containing lamivudine, zidovudine and TMC278.HCl. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 508-512, 2009.

PERRY, C. M.; FAULDS, D. Lamivudina. A Review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. **Drugs**, v. 53, n. 4, p. 657-680, 1997.

PINTO, Eduardo Costa. **Estudo de dissolução intrínseca de efavirenz como ferramenta para antecipação de sua biodisponibilidade**. Orientadora: Valéria Pereira de Sousa. 2012. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 263-275, 2003.

POWERS, A. C.; D'ALESSIO, D. Pâncreas endócrino e farmacoterapia do diabetes melito e da hipoglicemia. In: In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 1237-1273.

PRUVOST, A.; THÉODORO, F.; AGROFOGLIO, L.; NEGREDO, E.; BÉNECH, H. Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbosvir triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, p. 224-233, 2008.

PRUVOST, A.; NEGREDO, E.; THÉODORO, F.; PUIG, J.; LEVI, M.; AYEN, R.; GRASSI, J.; CLOTET, B. Pilot pharmacokinetic study of human immunodeficiency virus-infected patients receiving tenofovir disoproxil fumarate (TDF): investigation of systemic and intracellular interactions between TDF and abacavir, lamivudine, or lopinavir-ritonavir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1937-1943, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAHMAN, B. M.; WAHED, M. I. I.; KHONDKAR, P.; AHMED, M.; ISLAM, R.; BARMAN, R. K.; ISLAM, M. A. U. Effect of starch 1500 as a binder and disintegrant in lamivudine tablets prepared by high shear wet granulation. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 21, n. 4, p. 455-459, 2008.

RAMACHANDRAN, G.; KUMAR, A. K. H.; SWAMINATHAN, S.; VENKATESAN, P.; KUMARASWAMI, V.; GREENBLATT, D. J. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 835, p. 131-135, 2006.

RAMÍREZ, C. C. D.; ROBLES, L. V. Functionality of innovative and generic cellulose in metronidazole formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 47, n. 1, 2011.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.

REBIERE, H.; MAZEL, B.; CIVADE, C.; BONNET, P. A. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 376-383, 2007.

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

REMGINGTON, J. P.; BERINGER, P. Remington: the science and practice of pharmacy. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 2393 p.

RENTSCH, K. M. Sensitive and specific determination of eight antiretroviral agents in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 788, p. 399-350, 2003.

REZK, N. L.; TIDWELL, R. R.; KASHUBA, A. D. M. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 137-147, 2003.

REZK, N. L.; CRUTCHLEY, R. D.; KASHUBA, A. D. M. Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir in human plasma using high-performance liquid chromatography after solid phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 822, p. 201-208, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validações em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

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

ROSÉS, M.; SUBIRATS, X.; BOSCH, E. Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography. Effect of variation of mobile phase composition and temperature. **Journal of Chromatography A**, n. 1216, p. 1756-1775, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SAILAJA, A. L.; KUMAR, K. K.; KUMAR, D. V. R. R.; KUMAR, C. M.; YUGANDHAR, N. M.; SRINUBABU, G. Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of efavirenz in human plasma. **Chromatographia**, v. 65, n. 5/6, p. 359-361, 2007

SÁNCHEZ-CONDE, M.; PALACIOS, R.; SANZ, J.; RODRÍGUES-NOVOA, S.; RIVAS, P.; SANTOS, J.; SOLA, J.; ASENSI, V.; MENDOZA, C.; ESTRADA, V.; BARREIRO, P.; GONZÁLEZ-LAHOZ, J.; JIMÉNEZ-NACCHER, I.; SORIANO, V. Efficacy and safety of a once daily regimen with efavirenz, lamivudine, and didanosine, with and without food, as initial therapy for HIV infection: the ELADI study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, n. 10, p. 1237-1241, 2007.

SARKAR, M.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 349-354, 2006.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y-H. P.; WRIGHT, N.; PERSONS, D. L.; RANGARI, V. K.; FASINA, O.; BABU, R. J. Physicochemical characterization of efavirenz-cyclodextrin inclusion complexes. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 10, n. 1, p. 81-87, 2009.

SAUX, T. L.; CHHUN, S.; REY, E.; LAUNAY, O.; WEISS, L.; VIARD, J.; PONS, G.; JULIEN, V. Quantification of seven nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 865, p. 81-90, 2008.

SAX, P. E.; WALKER, B. D. Imunologia relacionada à Aids. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (ED.) **Cecil tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 2497-2500.

SCHELD, W. M. Introdução ao HIV e desordens associadas. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (ED.) **Cecil tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 2496-2497.

SERRAO, E.; ODDE, S.; RAMKUMAR, K.; NEAMATI, N. Raltegravir, elvitegravir, and metoogravir: the BIRD of “me-too” HIV-1 integrase inhibitors. **Retrovirology**, v. 6, n. 25, p. 1-14, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography method for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, n. 987, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P.; KONECNY, J. J.; EVERETT, R. L.; MCCULLOUGH, B.; NOORIZADEH, A. C.; SKELLY, J. P. In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 6, n. 7, p. 612-618, 1989.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL, M. L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; YACOBI, A. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, 2000.

SHARMA, T.; MISHRA, N.; MOITRA, S.; SI, S. C. SANKAR, D. G. A validated RP-HPLC method for estimation of tenofovir disoproxil fumarate in bulk and pharmaceutical formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 108-110, 2012.

SHARMA, R.; MEHTA, K. Simultaneous spectrophotometric estimation of tenofovir disoproxil fumarate and lamivudine in three component tablet formulation containing efavirenz. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 4, p. 527-530, 2010.

SHARMA, M. P.; NEERAJ; JAIN, S. Dissolution specification, dissolution profiling and dissolution profiles comparison methods. **Int. J. Drug Res. Tech.**, v. 12, n. 4S, p. 297-305, 2012.

SHAW, G. M. Biologia do vírus da imunodeficiência humana. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (ED.) **Cecil tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 2500-2505.

SHERMAN, M. Personal view: the management of chronic hepatitis B infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 23, p. 857-869, 2006.

SHIVHARE, U. D.; TAPAS, S. S.; MATHUR, V. B. Design and evaluation of sustained release matrix tablets of lamivudine. **International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 1-13, 2012.

SKEIE, L.; MAELAND, A. Can efavirenz be taken in the morning? **Scan. J. Infect. Dis.**, v. 38, n. 11-12, p. 1089-1091, 2006.

SLAWSON, M. H.; CHEN, M.; MOODY, D. E.; COMER, S. D.; NUWAYSER, E. S.; FANG, W. B.; FOLTZ, R. L. Quantitative analysis of naltrexone and 6 β -naltrexol in

human, rat, and rabbit plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with application to the pharmacokinetics of Depotrex[®] in rabbits. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 453-461, 2007.

SMITH, P. F.; DICENZO, R.; MORSE, G. D. Clinical pharmacokinetics of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 12, p. 893-905, 2001.

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

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: prioritizing experimental conditions. **Journal of Chromatography A**, n. 1302, p. 45-54, 2013.

SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Atividade antirretroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 9-19, 2004.

STANIFORTH, J. N. Fluxo de pós. In: AULTON, M. E., (Ed.). **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 208-221.

STONE, V. E.; JORDAN, J.; TOLSON, J.; MILLER, R.; PILON, T. Perspectives on adherence and simplicity for HIV-infected patients on antiretroviral therapy. **Journal Acquir Immune Defic Syndr**, v. 36, n. 3, p. 808-816, 2004.

STRAUCH, S.; JANTRATID, E.; DRESSMAN, J. B.; JUNGINGER, H. E.; KOPP, S.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; STAVCHANSKY, S.; BARENDIS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: lamivudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2054 – 2063, 2011.

STRIBILD[®]: elvitegravir, cobicistat, emtricitabina, fumarato de tenofovir desoproxila. California: Gilead Sciences, Inc., 2013. Bula de medicamento. Disponível em: http://www.gilead.com/~media/Files/pdfs/medicines/hiv/stribild/stribild_pi.pdf. Acesso em: 20 de abril de 2014.

STRYER, L. Antibodies and T-cell receptors. In: _____. **Biochemistry**. 4th. ed. New York: W. H. Freeman, 1995, p.384-386.

SUMMA, V.; PETROCCHI, A.; BONELLI, F.; CRESCENZI, B.; DONGHI, M.; FERRARA, M.; FIORE, F.; GARDELLI, C.; PAZ, O. G.; HAZUDA, D. J.; JONES, P.; KINZEL, O.; LAUFER, R.; MONTEAGUDO, E.; MURAGLIA, E.; NIZI, E.; ORVIETO, F.; PACE, P.; PESCATORE, G.; SCARPELLI, R.; STILLMOCK, K.; WITMER, M. V.; ROWLEY, M. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 5843-5855, 2008.

SUNFIRE Columns. Waters, Massachusetts, EUA, 2008. Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000875en.pdf>. Acesso em: 10 de maio 2014.

SUZUKI, K.; KATAYAMA, M.; TAKAMATSU, K.; KANEKO, S.; MIYAJI, K.; ISHIKAWA, H.; MATSUDA, Y. Improvement of sensitivity and selectivity of high-performance liquid chromatography for anti-retroviral drugs (non-reverse transcriptase inhibitors) by diamond-electrode electrochemical and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A.**, v. 1216, p. 3117-3121, 2009.

TAKAHASHI, M.; KUDAKA, Y.; OKUMURA, N.; HIRANO, A.; BANNO, K.; KANEDA, T. Determination of plasma tenofovir concentrations using a conventional LC-MS method. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 30, n. 9, p. 1784-1786, 2007.

TANUWIJAYA, J.; KARSONO. The effects of crospovidone and croscarmellose sodium as superdisintegrants on the characteristics of piroxicam nanoparticles ODT (Orally Disintegrating Tablet). **International Journal of Pharm. Tech. Research**, v. 5, n. 4, p. 1590-1597, 2013.

TASHIMA, K. T.; CALIENDO, A. M.; AHMAD, M. GORMLEY, J. M.; FISKE, W. D.; BRENNAN, J. M.; FLANIGAN, T. P. Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) suppression and efavirenz drug concentrations inn HIV-1-infected patients receiving combination therapy. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 862-864, 1999.

TASHIMA, K. T.; MITTY, J. A. Once-daily therapies for the treatment of HIV infection. **Current HIV/AIDS Report**, v. 3, p. 86-92, 2006.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: the achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clin. Biochem.**, v. 38, p. 328-334, 2005.

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia, 4. Ed. Geneva: World Health Organization, 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em: 20 de junho de 2013.

THE UNITED States Pharmacopeia: USP35-NF30. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2012.

TURNER, M. L.; REED-WALKER, K.; KING, J. R.; ACOSTA, E. P. Simultaneous determination of nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 784, p. 331-341, 2003.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/Aids. **2008 Report on the global AIDS epidemic**. [on line]. Geneva, 2008. Disponível em: http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1510_2008GlobalReport_en.zip. Acesso em: 01/03/2010.

UNAIDS -- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. **Progress Report Summary 2011: Global HIV/AIDS Response. Epidemic update and health sector progress towards universal acess**. 2011. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/resources/publications/2011/name,64437,en.asp>. Acesso em: 18 de novembro de 2012.

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/Aids. **2012 Report on the global Aids epidemic**. [on line]. Geneva, 2012. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/resources/publications/2012/name,76121,en.asp>. Acesso em: 05/12/2012.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry, dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**. Rockville, 1997.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry. Fixed dose combinations, co-packaged drug products and single-entity versions of previously approved antiretrovirals for the treatment of HIV** [on line]. Rockville, 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm124426.htm>. Acesso em: 25/01/2013.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. **Dissolution methods**. Rockville, 2007. Acesso em: 20 de jan. 2012. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm

U. S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Antiretroviral drugs used in the treatment HIV infection**. Última atualização: 20/08/2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>. Acesso em: 22 de janeiro de 2013.

VERVOORT, S. C. J. M.; BORLEFFS, J. C. C.; HOEPELMAN, A. I. M.; GRYPDONCK, M. H. F. Adherence in antiretroviral therapy: a review of qualitative studies. **AIDS**, London, v. 21, p. 271-281, 2007.

VIANA, O. S.; JÚNIOR, J. B.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; JÚNIOR, S. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 505-511, 2006.

VIANA, O. S.; JÚNIOR, J. B.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; JÚNIOR, S. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; NETO, P. J. R. Development and validation of a HPLC analytical assay method for efavirenz tablets: a medicine for HIV infections. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 97-102, 2011.

VICIANA, P.; RUBIO, R.; RIBERA, E.; KNOBEL, H.; IRIBARREN, J. A.; ARRIBAS, J. R.; PÉREZ-MOLINA, J. A. Estudio longitudinal de adherencia, satisfacción y efectividad Del tratamiento antirretroviral administrado uma vez al dia, frente a dos veces al dia, em uma cohorte espanhola de infectados por el VIH (estúdio CUVA: cualquiera uma vez al dia). **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 26, n. 3, p. 127-134, 2008.

VILLANI, P.; FEROGGIO, M.; GIANELLI, L.; BARTOLI, A.; MONTAGNA, M.; MASERATI, R.; REGAZZI, M. B. Antiretrovirals: simultaneous determination of five

protease inhibitors and three nonnucleoside transcriptase inhibitors in human plasma by a rapid high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 23, n. 4, p. 380-388, 2001.

VIREAD[®]: fumarato de tenofovir desoproxila. California: Gilead Sciences, Inc., 2006. Bula de medicamento. Disponível em: http://www.gilead.com/pdf/viread_pi.pdf. Acesso em: 17 de dezembro de 2012.

VOGESER, M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry-application in the clinical laboratory. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 41, p. 117-126, 2003.

VOLOSOV, A.; ALEXANDER, C.; TING, L.; SOLDIN, S. J. Simple rapid method for quantification of antiretrovirals by liquid chromatography – tandem mass-spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 99-103, 2002.

WANG, W.; RUSSEL, P. J.; CLARK, G. T.; LEWIS, D.; CHENG, K. N. A validated bioanalytical method in mouse, rat, rabbit and human plasma for the quantification of one of the steroid glycosides found in *Hoodia gordonii* extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 514-519, 2012.

WARD, B. A.; GORSKI, J. C.; JONES, D. R.; HALL, S. D.; FLOCKHART, D. A.; DESTA, Z. The cytochrome P450 2b6 (CYP2BA) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/Aids therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 287-300, 2003.

WATTANANAT, T.; PRASANCHAIMONTRI, I.; AKARAWUT, W. Simultaneous determination of stavudine and lamivudine in human plasma by high performance liquid chromatography and its application to a bioavailability study. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 41, p. 369-377, 2010.

WELLS, D. A. **High throughput bioanalytical sample preparation methods and automation strategies**. USA: Elsevier, 2003, v. 5, p. 1-610.

WHO – World Health Organization. **Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach**. 2010 revision. [on line]. Geneva, 2010. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599764_eng.pdf. Acesso em: 22 de janeiro de 2013.

WILLIAM, A.; PETRI, Jr. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 1477-1503.

WILSON, L. D. Handbook of Analytical Separations. In: LAW, B. **HPLC-MS(MS) for bioanalysis in drug discovery and development**. V. 4, 2003, p. 291-292.

WISSEN, C. P. W. G. M. V.; AARNOUTSE, R. E.; BURGER, D. M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors

lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 121-129, 2005.

WU, C.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of bcs: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.

XU, R. N.; FAN, L.; RIESER, M. J.; EL-SHOUBAGY, T. A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, p. 342-355, 2007.

YADAV, M.; MISHRA, T.; SINGHAL, P.; GOSWAMI, S.; SHRIVASTAV, P. S. Rapid and specific liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of tenofovir in human plasma and its fragmentation study. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 47, n. 2, p. 140-148, 2009.

YADAV, M.; SINGHAL, P.; GOSWAMI, S.; PANDE, U. C.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. Selective determination of antiretroviral agents tenofovir, emtricitabine, and lamivudine in human plasma by a LC-MS-MS method for a bioequivalence study in healthy Indian subjects. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, 2010.

YARCHOAN, R.; PLUDA, J. M.; PERNO, C. F.; MITSUYA, H.; BRODER, S. Antiretroviral therapy of human immunodeficiency virus infection: current strategies and challenges for the future. **Blood**, v. 78, p. 859-884, 1991.

YOGANANDA, R.; CHOWDARY, K. P. R. Enhancement of solubility, dissolution rate and bioavailability of efavirenz by cyclodextrins and solutol HS15- a factorial study. **Int. J. Drug Dev. & Res.**, v. 5, n. 1, p. 135-142, 2013.

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

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIN, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 221-227, 2004.

YUEN, G. J.; LOU, Y.; THOMPSON, F.; OTTO, V. R.; ALLSUP, T. L.; MAHONY, W. B.; HUTMAN, W. Abacavir/lamivudine/zidovudine as a combined formulation tablet: bioequivalence compared with each component administered concurrently and the effect of food on absorption. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 41, p. 277-288, 2001.

YUEN, G. J.; LOU, Y.; BUMGARNER, N. F.; BISHOP, J. P.; SMITH, G. A.; OTTO, V. R.; HOELSCHER, D. D. Equivalent steady-state pharmacokinetics of lamivudine in plasma and lamivudine triphosphate within cells following administration of lamivudine at 300 milligrams once daily and 150 milligrams twice daily. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 176-182, 2004.

ZORBAX Eclipse XDB HPLC Columns. Agilent Technologies, Massachusetts, EUA, 2002. Disponível em:
http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5988-8367EN_031498.pdf. Acesso em: 10 de maio 2014.

ANEXO A

Manuscrito submetido para publicação

**QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE EFAVIRENZ, LAMIVUDINA E FUMARATO
DE TENOFOVIR DESOPROXILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA
COMBINADA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

Paula Cristina Rezende Enéas^{*a}, André Lima de Oliveira Costa^a, Danielle Evangelista Rabelo de Souza^a, Jessica de Castro Alves^a, Milena Cristina R. S. Magalhães^b, Sílvia Ligório Fialho^b e Gerson Antônio Pianetti^a

^aDepartamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

^bDivisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, 30510-010 Belo Horizonte – MG, Brasil

*e-mail: paulafarma2004@yahoo.com.br

SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF EFAVIRENZ, LAMIVUDINE AND TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATE IN FIXED DOSE COMBINATION TABLET BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

The therapeutic regimen for the treatment of Aids using efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate has demonstrated efficacy and safety. In this work, an analytical method was developed and validated for simultaneous quantification of efavirenz, lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate in a fixed-dose combination tablet. Analysis by reverse phase HPLC with a gradient mobile phase (buffer pH 5.4 and methanol) and detection at λ 260 nm was efficient in the separation and quantification of this antiretrovirals. The developed method showed to be selective, linear, precise, accurate and robust and can be successfully used in for routine quality control analyses.

Keywords: antiretroviral; validation; HPLC.

INTRODUÇÃO

Diversas combinações e esquemas terapêuticos de antirretrovirais (ARV) são utilizados no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) com o objetivo de alcançar o máximo benefício e diminuir o risco do desenvolvimento de resistência viral. A otimização da terapia consiste em estabelecer doses ideais dos insumos farmacêuticos ativos, reduzir o número de unidades posológicas e elaborar formulações adequadas. Constantemente, busca-se desenvolver novos insumos farmacêuticos ativos e novas combinações medicamentosas, de modo a diminuir a durabilidade e o custo do tratamento bem como aumentar a eficácia, a conveniência e a tolerabilidade dos pacientes aos esquemas terapêuticos.¹⁻³

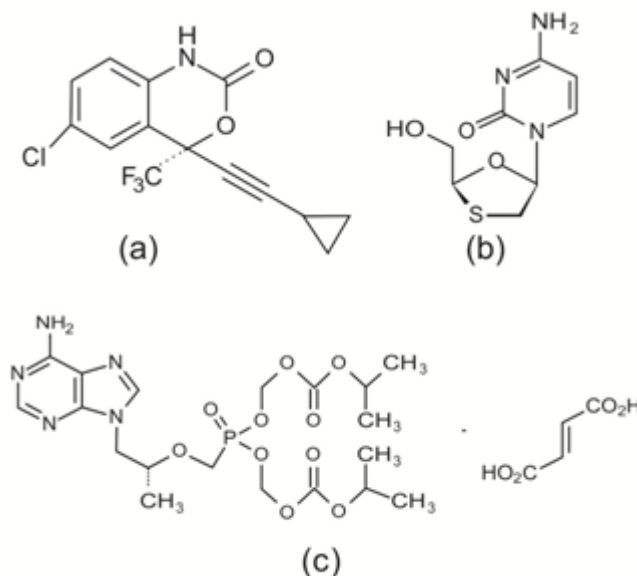
Em um estudo observacional, Maggiolo e Suter⁴ concluíram que a terapia ARV ideal deve ser constituída em não mais que duas formas farmacêuticas por dia, de pequenas dimensões, em administração diária única e sem interferência com a alimentação. Outros trabalhos demonstram que quanto mais simples o esquema terapêutico, maior é a probabilidade de adesão do paciente ao tratamento.⁵⁻¹⁷ A associação de insumos farmacêuticos ativos em dose fixa combinada tem grande aplicação e aceitação nesse sentido, uma vez que proporciona menor administração diária de formas farmacêuticas, além de oferecer comodidade e maior adesão do paciente.

O esquema terapêutico com efavirenz (EFV), lamivudina (3TC) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) tem demonstrado eficácia e segurança no tratamento da Aids.¹⁸⁻²¹ Os três insumos farmacêuticos ativos atuam, respectivamente, como inibidor não nucleosídeo, nucleosídeo e nucleotídeo da transcriptase reversa e são recomendados em terapias iniciais ARV, conforme diretrizes da OMS, do FDA e do Ministério da Saúde.²²⁻²⁴

As moléculas de EFV, 3TC e TDF (Figura 1) são estruturalmente distintas e apresentam propriedades físico-químicas diferenciadas. O EFV é hidrofóbico com pKa 10,2.^{25,26} A 3TC é um análogo da desoxicidina, possui pKa 4,3 e permanece primariamente na forma não-ionizada em soluções aquosas.²⁶⁻²⁷ O TDF, análogo da

adenina 5' monofosfato, é um pró- lipofílico, pka 3,75, biodisponível na forma de tenofovir.²⁸⁻³⁰

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



Sharma e Mehta³¹ descreveram método de quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF por espectrofotometria derivada pela técnica do ponto de anulação em λ 291,4 nm, 305,6 nm e 271,4 nm para cada insumo farmacêutico ativo, respectivamente. Um método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) em fase reversa com detecção a 265 nm foi descrito por Reddiah *et al.*³², em modo gradiente e com pH da fase móvel em 3,8. A quantificação dos ARV por espectrofotometria derivada apresenta como desvantagens o fato de não possuir alto nível de especificidade e sensibilidade como o obtido por CLAE, uma vez que não separa os componentes da amostra para posterior quantificação. Já o método de Reddiah *et al.*³² possui como desvantagens o tempo de corrida longo (120 min), o inviabiliza as análises de rotina de controle de qualidade, quando grandes quantidades de amostras são preparadas, e aumenta a probabilidade de degradação dos analitos durante o tempo de espera para a injeção das amostras. Somado a isso, o método proposto proporciona um gasto excessivo de solvente orgânico, o que impacta negativamente no custo das análises e constitui uma prática não ecologicamente consciente.

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de um método analítico simples, rápido e eficiente, aplicável ao controle de qualidade de comprimidos com associação dos ARV. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação simultânea de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Comprimidos e excipientes

Comprimidos revestidos de dose fixa combinada contendo 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF foram desenvolvidos na Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico da Fundação Ezequiel Dias (Funed, MG, Brasil). Os comprimidos foram elaborados com doses estimadas para coelhos com base no cálculo alométrico, visando, posteriormente, avaliar o perfil farmacocinético nesses animais.³¹ Para o preparo dos comprimidos, inicialmente EFV foi granulado com excipientes por via úmida e, em seguida, 3TC e TDF foram adicionados ao granulado normalizado juntamente com o restante dos excipientes e a mistura dos pós foi comprimida. As matérias-primas utilizadas foram EFV (Nortec Química S.A., Brasil), TDF (Cristália, Brasil) e 3TC (Coben Pharmaceutical Co., China). Os excipientes utilizados para a granulação do EFV foram laurilsulfato de sódio (Cognis Brasil Ltda, Brasil), amido parcialmente pré-gelatinizado (Colorcon do Brasil Ltda, Brasil) e croscarmelose sódica (Colorcon do Brasil Ltda, Brasil). Para a mistura final de pós foram utilizados celulose microcristalina 102 (Blanver Farmoquímica Ltda, Brasil), croscarmelose sódica e estearato de magnésio (Magnesia, Alemanha). Após a etapa de compressão, os comprimidos foram revestidos com suspensão de revestimento contendo dióxido de titânio (Kronos International, INC., Alemanha), Opadry[®] 7006 (hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol 400, polietilenoglicol 8000; Colorcon, Brasil) e álcool etílico grau farmacêutico (Vetec Química Fina Ltda., Brasil). Os equipamentos de produção utilizados foram: agitador Heidolph modelo RZR2021 (Alemanha), agitador Ultra Turrax[®] modelo T50 (Alemanha), balança semi-analítica Gehaka[®] (Brasil), compressora Riva[®] modelo Piccola[®] FR-U1205-0

(Argentina), drageadora Erweka[®] modelo AR402 (Alemanha), granulador (High Shear Niro Fielder) Aeromatic Fielder[™] modelo PMA-18578 (Suíça), normalizador Granulador Oscilante Erweka[®] modelo FGS (Alemanha) e tamis malha 20 Bronzinox (Brasil).

Reagentes e substâncias químicas de referência

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

Condições cromatográficas

Utilizou-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett Packard (HP 1100, EUA), equipado com bomba quaternária, forno de coluna, injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD). Os dados cromatográficos foram obtidos e processados no *software* HP ChemStation[®]. As análises quantitativas foram realizadas em coluna cromatográfica de fase reversa Sun Fire[®] C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) da Waters (EUA) mantida a 30 °C, detecção a λ 260 nm e com 20 µL de volume de injeção.

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol e tampão acetato pH 5,4. O tampão acetato foi preparado dissolvendo-se 7,7 g de acetato de amônio em 1 L de ácido acético diluído 0,1% (v/v). O pH da solução foi ajustado para 5,4 com ácido acético concentrado, com auxílio de pHmetro. As análises foram realizadas utilizando vazão de fase móvel de 1,0 mL/min e com eluição em gradiente conforme Tabela 1.

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

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

Preparação das soluções

Soluções padrão estoque

Aproximadamente 66 mg de EFV, 33 mg de 3TC e 33 mg de TDF foram transferidos separadamente para balões volumétricos de 50 mL. Adicionaram-se 40 mL de metanol em cada balão, submeteu-se ao ultrassom por 20 minutos e os volumes foram completados com o mesmo solvente.

Solução padrão diluída

Transferiram-se 5 mL de cada solução *Solução padrão estoque* para um único balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com a fase móvel inicial (mistura de metanol e tampão acetato 30:70, v/v). As concentrações finais foram 132 µg/mL para EFV e 66 µg/mL para 3TC e TDF, correspondendo a 100% da concentração de trabalho.

Solução amostra

Vinte comprimidos revestidos foram pesados e triturados a pó fino e uma quantidade de pó equivalente a um peso médio foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 40 mL de metanol e, após agitação em ultrassom por 20 minutos, o volume foi completado com o mesmo solvente e filtrado em papel de filtro quantitativo. A solução obtida foi diluída com fase móvel inicial até a concentração de 132 µg/mL

para EFV e 66 µg/mL para 3TC e TDF. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm.

Solução placebo

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

Validação do método analítico

O método analítico foi validado segundo a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Guia ICH Q2 (R1) (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*).^{33,34} Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

Seletividade

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

Linearidade

As curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF foram estabelecidas a partir de três soluções padrão de EFV 660 µg/mL, 3TC 330 µg/mL e TDF 330 µg/mL preparadas

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

Precisão

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

Exatidão.

Quantidades conhecidas de cada ARV foram adicionadas a misturas dos excipientes da formulação (placebo) com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação. O experimento foi executado em triplicata em três níveis, correspondentes a 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho. A recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a respectiva concentração teórica de acordo com a Equação 1. O critério de aceitação para a recuperação deve estar entre 98% a 102% do valor esperado.³⁵

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

Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde a menor quantidade do analito que se pode detectar nas condições experimentais do método. E o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito que se pode quantificar com adequada precisão e exatidão. Esses parâmetros foram estimados pelo desvio padrão do intercepto (δ) e inclinação da curva analítica (S) dos insumos farmacêuticos ativos (Equações 2 e 3). Em seguida, *Soluções padrão* de cada ARV foram preparadas nas concentrações de LQ e de LD estimadas e diluições sucessivas foram realizadas até a obtenção de uma relação entre sinal e ruído próxima de 3 para o LD e próxima de 10 para o LQ.³⁴ Ao encontrar a relação sinal/ruído esperada para o LQ e LD, a solução foi injetada cinco vezes no cromatógrafo e determinado o DPR das áreas obtidas.

$$LD = 3,3 \frac{\delta}{S} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \frac{\delta}{S} \quad (3)$$

Robustez

Os efeitos de sete variáveis (temperatura do forno da coluna, pH do tampão acetato, vazão da fase móvel, comprimento de onda, marca da coluna, modelo do cromatógrafo e tempo de agitação no ultrassom) foram estudados por análise multivariada e a influência de cada uma delas foi identificada e ordenada.^{36,37} O delineamento experimental incluiu oito análises, conforme demonstrado na matriz dos fatores (Tabela 2), sendo os parâmetros nominais identificados pelas letras maiúsculas e os parâmetros variados pelas letras minúsculas.

Tabela 2. Matriz de fatores do estudo de robustez

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

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

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

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

As diferenças mais relevantes indicaram que os fatores correspondentes têm maior influência que os outros sobre a precisão do método. Essas influências são consideradas relevantes se o valor absoluto do efeito é superior a expressão $s\sqrt{2}$, em que s é o desvio padrão obtido das oito determinações.³⁸

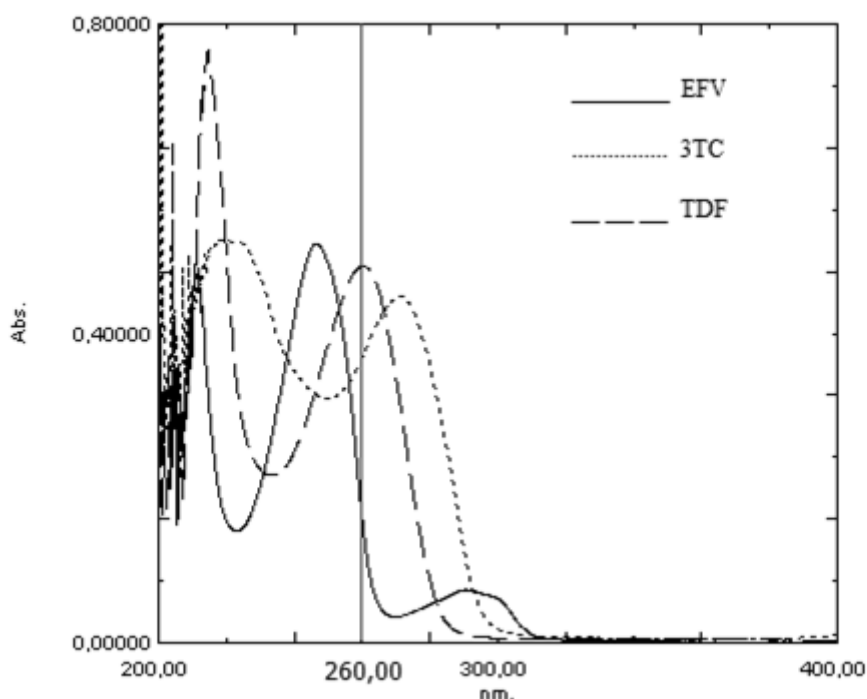
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de absorção no ultravioleta de soluções metanólicas dos ARV (EFV 10 µg/mL, 3TC 10 µg/mL e TDF 20 µg/mL) apresentaram máximos de absorção em 247 nm EFV, 271nm 3TC e 260 nm TDF (Figura 2). Optou-se pela detecção em λ 260 nm, uma vez que os ARV em estudo absorvem consideravelmente os raios ultravioleta nesse comprimento de onda. Apesar de não ser o λ máximo de EFV e 3TC, foi possível a quantificação com sensibilidade e seletividade adequadas no comprimento de onda selecionado.

Na análise cromatográfica dos ARV, 3TC foi o primeiro a ser eluído, seguido de TDF e EFV (Figura 3). A menor afinidade de 3TC pela fase estacionária resultou em menor fator de retenção ($k= 0,09$) quando comparada aos insumos farmacêuticos ativos mais hidrofóbicos TDF ($k = 2,59$) e EFV ($k = 3,29$). Todos os picos apresentaram resolução e simetria adequados para análise cromatográfica.

Mesmo com as características físico-químicas distintas dos insumos farmacêuticos ativos, a seleção do pH da fase móvel e o esquema de gradiente proposto neste estudo permitiram que a análise simultânea de EVF, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada fosse desenvolvida em condições satisfatórias e em curto tempo de corrida cromatográfica (15 min). Destaca-se, então, que o tempo de corrida total do método para a quantificação dos ARV proposto nesse trabalho é oito vezes menor que o publicado na literatura especializada.³²

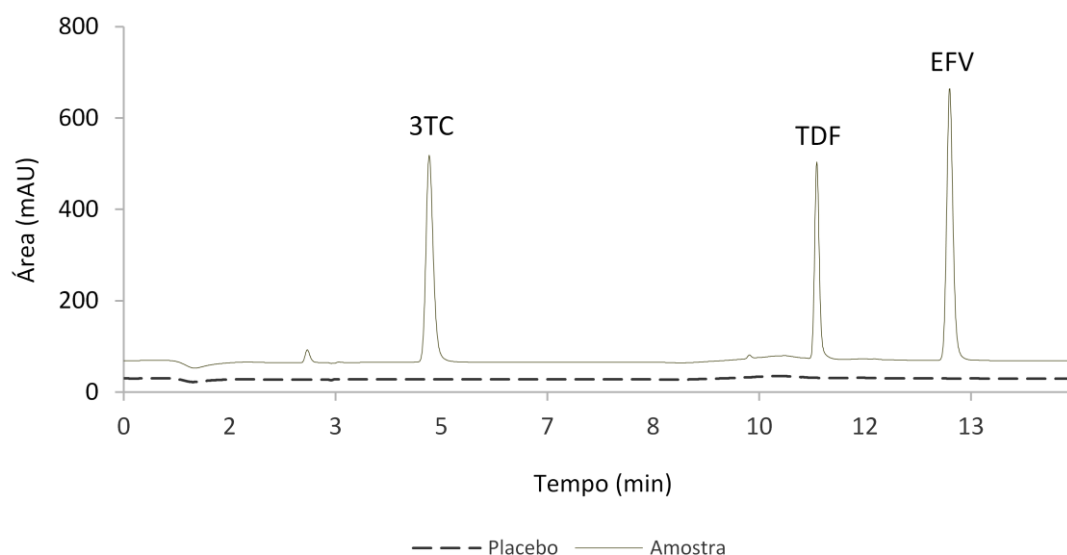
Figura 2. Espectros no ultravioleta de EFV 10 µg/mL, 3TC 10 µg/mL e TDF 20 µg/mL em metanol



Seletividade

O estudo da seletividade do método proposto foi realizado por verificação da resposta da matriz (placebo) na detecção dos insumos farmacêuticos ativos. O cromatograma da *Solução placebo* não apresentou interferências nos picos dos ARV (Figura 3), o que demonstra a seletividade do método em relação aos componentes presentes na formulação estudada. Adicionalmente, as purezas espectrais dos picos da *Solução amostra* foram avaliadas com o detector DAD (3TC = 99,95%, TDF = 99,86% e EVF = 99,27%). Os valores de pureza obtidos, próximos a 100%, evidenciam ausência de coeluição de substâncias junto aos insumos farmacêuticos ativos.

Figura 3. Sobreposição dos cromatogramas das Soluções amostra e placebo obtidos conforme as condições cromatográficas descritas na parte experimental deste estudo



Linearidade

As curvas analíticas de EFV, 3TC e TDF indicaram correlação linear adequada entre as concentrações e as áreas dos picos no intervalo de 50% a 150% da concentração de trabalho (Tabela 3). As regressões lineares foram significativas ($p < 0,05$) e os coeficiente de correlação (EFV = 0,9971; 3TC = 0,9983; TDF = 0,9962) foram superiores ao valor recomendado de 0,99.³² O intercepto não foi diferente de zero ($p > 0,05$) e os resíduos apresentaram distribuição aleatória e sem tendências na regressão de todos os insumos farmacêuticos ativos.

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

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

Precisão

A precisão da determinação de EFV, 3TC e TDF em comprimidos de dose fixa combinada foi estabelecida em três dias consecutivos de análises e expressa em valores de DPR. Na análise de EFV, 3TC e TDF nos comprimidos de dose fixa combinada, os valores de DPR para a precisão intra-dia ($n=6$) foram 1,16%, 1,12% e 1,32%, respectivamente. Para a precisão inter-dias, os valores de DPR ($n=18$) para EFV, 3TC e TDF foram 1,40%, 1,36% e 1,98%, respectivamente. Em todos os casos, os desvios foram menores que 2,0%, o que garante precisão satisfatória do método para doseamento dos ARV.³⁸

Exatidão

O método de adição de padrão ao placebo, em três diferentes concentrações, foi utilizado no experimento de exatidão (Tabela 4). As recuperações médias ($n=9$) obtidas para os ARV (EFV = 99,77%, 3TC = 100,09% e TDF = 100,24%) estão compreendidas no intervalo recomendado de 98% a 102% e os valores de DPR foram inferiores a 2,0%.³⁸ Alternativamente, esses resultados foram comparados ao valor teórico de 100% utilizando o teste *t* de Student ($\alpha = 0,05$; G.L. = 8). Os valores de *t* obtidos (EFV = 0,66; 3TC = 0,68 e TDF = 0,89) foram inferiores ao valor crítico $t_{0,05,8} = 2,31$, o que evidencia não existir diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as quantidades de insumos farmacêuticos ativos que foram recuperadas daquelas utilizadas nas contaminações dos placebos.

Tabela 4. Resultados da exatidão de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada

| Insumos farmacêuticos ativos | Efavirenz | | Lamivudina | | Fumarato de tenofovir desoproxila | |
|------------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|
| | Padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação \pm DPR (%) $n=3$ | Padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação \pm DPR (%) $n=3$ | Padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação \pm DPR (%) $n=3$ |
| Exatidão | 105,6 | 99,70 \pm 0,41 | 52,8 | 100,13 \pm 0,56 | 52,8 | 100,00 \pm 0,30 |
| | 132,0 | 100,07 \pm 0,92 | 66,0 | 100,26 \pm 0,01 | 66,0 | 99,87 \pm 1,28 |
| | 158,4 | 99,53 \pm 1,81 | 79,2 | 99,88 \pm 0,49 | 79,2 | 100,83 \pm 0,08 |

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

Os valores dos LD e de LQ foram estimados a partir das curvas analíticas e determinados experimentalmente por diluições sucessivas (Tabela 5). As concentrações obtidas pela relação entre o sinal e o ruído da linha de base foram inferiores às concentrações estimadas por regressão. Consideram-se válidos os resultados experimentais de LD e LQ, uma vez que os valores de DPR de cinco injeções consecutivas foram inferiores a 2,0% para os ARV, o que demonstra a reprodutibilidade das respostas nas concentrações experimentais de detecção e quantificação dos insumos farmacêuticos ativos.

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

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

Robustez

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

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

| Variável | EFV | | | | 3TC | | | | TDF | | | |
|---|-------|----------------|------------|-----------|-------|----------------|----------|-----------|-----------|----------------|----------------|-----------|
| | Teor | t _R | N | Fc | Teor | t _R | N | Fc | Teor | t _R | N | Fc |
| Forno da coluna (°C) A: 30; a: 25 | -0,54 | -0,15 | 8579 | 0,01 | -0,31 | - 0,09 | 150 | 0,00 | 0,30 | -0,05 | 150 20 | - 0,03 |
| pH do tampão B: 5,4 ; b: 5,7 | -0,50 | 0,03 | 1641 | - 0,01 | 0,77 | 0,00 | 120 | - 0,02 | 1,10 | 0,02 | -70 | - 0,02 |
| Vazão (mL) C: 1,0; c: 1,2 | 0,46 | 0,94 | -2728 | 0,01 | -0,49 | 0,56 | 770 | 0,02 | - 0,62 | 0,67 | - 739 8 | 0,03 |
| λ detecção (nm) D: 260; d: 262 | 0,30 | 0,03 | -1003 | - 0,01 | 0,09 | 0,02 | -104 | 0,01 | 0,14 | 0,01 | - 142 2 | - 0,01 |
| Tempo ultrassom (min) E: 20 min; e: 15 min | 1,50 | 0,03 | - 11274 | - 0,01 | 1,55 | 0,01 | -72 | 0,00 | 2,14 | 0,01 | 611 | 0,01 |
| Coluna F: SunFire; f: Eclipse | 1,36 | 0,98 | - 13287 | - 0,04 | 0,37 | 0,50 | 102 8 | - 0,08 | 1,02 | 0,34 | - 101 89 | - 0,09 |
| Modelo equipamento G: HP110; g: HP1200 | 0,56 | - 0,03 | - 11430 | 0,04 | 0,53 | 0,10 | -460 | 0,02 | 0,39 | 0,03 | - 237 31 | 0,01 |
| Valor crítico (sv ²) | 1,24 | 0,73 | 12372 | 0,04 | 1,06 | 0,39 | 777 | 0,05 | 1,31 | 0,40 | 182 99 | 0,06 |

O parâmetro que mais influenciou a determinação do teor dos ARV foi o tempo de agitação da amostra no ultrassom. A solubilização do insumo farmacêutico ativo é condição essencial para a análise cromatográfica e constitui-se em um parâmetro crítico na determinação do teor. A redução do tempo de agitação para 15 min prejudicou a extração dos insumos farmacêuticos ativos no solvente orgânico e, por conseguinte, os teores foram significativamente inferiores quando comparados aos resultados do procedimento normal de agitação em 20 min. Assim, recomenda-se que a pulverização dos comprimidos seja feita cuidadosamente até a obtenção de partículas finas e homogêneas e o tempo de extração em metanol seja padronizado e seguido conforme o procedimento descrito no preparo das amostras.

Apesar de possuir a mesma fase estacionária, diâmetro interno e tamanho de partículas, a mudança do fabricante da coluna provocou alterações no tempo de retenção, no número de pratos teóricos e no fator de cauda dos picos. Essas alterações são esperadas devido à diferença no processo de fabricação de cada coluna, da sílica utilizada como suporte e da manutenção e condições de uso, o que pode promover alterações abruptas da seletividade da fase estacionária em relação ao analito.^{39,40}

A mudança na vazão da fase móvel interferiu diretamente no t_R dos ARV. O aumento da vazão da fase móvel promove redução do tempo de retenção e, conseqüentemente, redução do tempo de corrida.³⁹

A temperatura do forno da coluna, o λ de leitura e o pH do tampão não apresentaram influência significativa nos parâmetros avaliados. A mudança do equipamento também não foi considerada uma variável crítica, exceto pela alteração da eficiência na determinação do teor de TDF.

CONCLUSÃO

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

O método desenvolvido foi seletivo em relação aos demais componentes da formulação e apresentou precisão e exatidão satisfatórias. O tempo de extração dos insumos farmacêuticos ativos é uma variável crítica do procedimento de preparo das amostras, sendo recomendável a pulverização cuidadosa até a obtenção de grânulos finos e homogêneos, de forma a permitir a total solubilização dos analitos. As faixas lineares obtidas e os limites de detecção e de quantificação dos insumos farmacêuticos ativos também foram adequados para as análises simultâneas dos ARV.

Considerando a demanda na produção industrial de comprimidos em dose fixa combinada contendo efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila para a simplificação terapêutica para o tratamento da Aids, a disponibilidade de um método analítico rápido, simples e capaz de garantir resultados confiáveis é essencial para viabilizar as análises de rotina de controle de qualidade exigidas pelos compêndios oficiais e regulamentações sanitárias vigentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapemig e a Farmacopeia Brasileira pelo suporte financeiro e a Fundação Ezequiel Dias pela parceria no desenvolvimento dos comprimidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clercq, E. D.; *Rev. Med. Virol.* **2009**, 19, 287.
2. Gomes, R. R.; Machado, C. J.; Acurcio, F. A.; Guimarães, M. D.; *Cad. de Saúde Pública* **2009**, 25, 495.
3. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS – UNAIDS; *Progress Report Summary 2011: Global HIV/AIDS Response. Epidemic update and health sector progress towards universal access I*, 2011.
4. Maggiolo, F.; Suter, F.; *Read Files – Resistenza e Adesione alle terapie nella cura dell'AIDS* **2003**, 3, 2.
5. Amberbier, A.; Woldemichael, K.; Getachew, S.; Girma, B.; Deribe, K. *BMC Public Health.* **2008**, 265, 1.
6. Bartlett, J. A.; *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2002**, 29, S2.
7. Chesney, M.; *AIDS Patient Care and STDs* **2003**, 17, 169.
8. Lanièce, I.; Ciss, M.; Desclaux, A.; Diop, K.; Mbodj, F.; Ndiaye, B.; Sylla, O.; Delaporte, E.; Ndoye, I.; *AIDS* **2003**, 17, S103.
9. Molina, J. M.; *Drugs* **2008**, 68, 567.
10. Parienti, J. J.; Bangsberg, D. R.; Verdon, R.; Gardner, E. M.; *Clin. Infect. Dis.* **2009**, 48, 484.
11. Rosenbach, K. A.; Allison, R.; Nadler, J. P.; *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 34, 686.

12. Stone, V. E.; Jordan, J.; Tolson, J.; Miller, R.; Pilon, T.; *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2004**, 36, 808.
13. Tashima, K. T.; Mitty, J. A.; *Curr. HIV/AIDS Rep* **2006**, 3, 86.
14. Vervoort, S. C.; Borleffs, J. C.; Hoepelman, A. I.; Grypdonck, M. H.; *AIDS* **2007**, 21, 271.
15. Viciano, P.; Rubio, R.; Ribera, E.; Knobel, H.; Iribarren, J. A.; Arribas, J. R.; Pérez-Molina, J. A.; *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2008**, 26, 127.
16. Harrigan, P. R.; Hogg, R. S.; Dong, W. W.; Yip, B.; Wynhoven, B.; Woodward, J.; Brumme, C. J.; Brumme, Z. L.; Mo, T.; Alexander, C. S.; Montaner, J. S.; *J. Infect. Dis.* **2005**, 191, 339.
17. Rosenbach, K. A.; Allison, R.; Nadler, J. P.; *Clin. Infec. Dis.* **2002**, 34, 686.
18. Gallant, J. E.; Staszewski, S.; Pozniak, A. L.; Dejesus, E.; Suleiman, J. M.; Miller, M. D.; Coakley, D. F.; Lu, B.; Toole, J. J.; Cheng, A. K.; *JAMA* **2004**, 292, 191.
19. Arrizabalaga, J.; Arazo, P.; Aguirrebengoa, K.; García-Palomo, D.; Chocarro, A.; Labarga, P.; Muñoz-Sánchez, M. J.; Echevarría, S.; Oteo, J. A.; Uriz, J.; Letona, S.; Fariñas, C.; Peralta, G.; Pinilla, J.; Ferrer, P.; Álvarez, M. L.; Iribarren, J. A.; *HIV Clin. Trials* **2007**, 8, 328.
20. Cassetti, J.; Madruga, J. V.; Suleiman, J. M.; Etzel, A.; Zhong, L.; Cheng, A. K.; Enejosa, J.; *HIV Clin. Trials* **2007**, 8, 164.
21. Diop, S. A.; Fortes-Déguénonvo, L.; Seydi, M.; Dieng, A. B.; Basse, C. D.; Manga, N. M.; Dia, N. M.; Ndaw, G.; Ndour, C. T.; Soumaré, M.; Diop, B. M.; Sow, P. S.; *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2012**.
22. World Health Organization – WHO; *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach*, Geneva, 2010.
23. U.S. Food and Drug Administration – FDA; *Guidance for industry. Fixed dose combinations, co-packaged drug products and single-entity versions of previously approved antiretrovirals for the treatment of HIV*, Rockville, 2006.
24. Brasil, Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids; *Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos*. Brasília, 2013.
25. Maurin, M. B.; Rowe, S. M.; Blom, K.; Pierce, M. E.; *Pharmaceut. Res.* **2002**, 19, 517.
26. Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B.; *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*, 3th ed., London: Pharmaceutical Press (PhP), 2004, v. 2, 1935 p.

27. Souza, J.; Storpirtis, S.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2004**, 40, 9.
28. Cihlar, T.; Birkus, G.; Greenwalt, D. E.; Hitchcock, M. J.; *Antiviral Res.* **2002**, 54, 37.
29. Gallant, J. E.; Deresinski, S.; *Clin. Infec. Dis.* **2003**, 37, 944-950.
30. http://www.gilead.com/pdf/viread_pi.pdf, acessada em Janeiro 2013.
31. Sharma, R.; Mehta, K.; *Indian J. Pharm. Sci.* **2010**, 72, 527.
32. Reddiah, C. H.; Devi, P. R.; Mukkanti, K.; Srinivasu, P.; *eIJPPR* **2012**, 2, 40.
33. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, 29/5/2003; Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 2003.
34. International Conference on Harmonisation – ICH; *Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2 R1)*, London, 2005.
35. Green, J. M.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 305A.
36. Youden, W. J.; Steiner, E. H.; *Statistical manual of the AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*, AOAC:Washington, 1975.
37. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO; *Orientação sobre validação de métodos analíticos – DOQ-CGCRE-008*, Rio de Janeiro, 2010.
38. Asociación Española de Farmacéuticos de La Industria –Aefi; *Validación de métodos analíticos*, Barcelona, 2001.
39. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC method development*, 2nd ed., Wiley Interscience: New York, 1997.
40. Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Jupille, T. H.; Wilson, N. S.; *J. Chromatogr. A.* **2002**, 960, 51-67.

ANEXO B

Certificado de apresentação de pôster no 23 th International Symposium on
Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA) – João Pessoa – PB, 9-12 de
outubro de 2011



*23rd International Symposium on
Pharmaceutical & Biomedical Analysis*

Certificate

*We hereby confirm that the poster entitled
Simultaneous quantification of efavirenz, lamivudine
and tenofovir disoproxil fumarate using
reversed phase chromatography with UV detection
authored by*

*Paula Cristina Rezende Enéas, André Lima de
Oliveira Costa, Danielle Evangelista Rabelo de Souza,
Sílvia Ligório Fialho, Gerson Antônio Pianetti*

*was presented at the 23rd International Symposium
on Pharmaceutical & Biomedical Analysis.*

João Pessoa, 12 October 2011.

Quezia B. Cass

PBA 2011 Organizing Committee