



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE ANTIRETROVIRAL DOSE-FIXA  
COMBINADA À BASE DE ZIDOVUDINA, LAMIVUDINA E NEVIRAPINA**

**ZÊNIA MARIA MACIEL LAVRA**

**RECIFE – 2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE ANTIRETROVIRAL DOSE-FIXA  
COMBINADA À BASE DE ZIDOVUDINA, LAMIVUDINA E NEVIRAPINA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

**ZÊNIA MARIA MACIEL LAVRA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto**

**RECIFE - 2006**

Lavra, Zênia Maria Maciel

Obtenção tecnológica de antiretroviral dose-fixa combinada à base de zidovudina, lamivudina e nevirapina / Zênia Maria Maciel Lavra. – Recife: O Autor, 2006.

63 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2006.

Inclui bibliografia, anexo.

1. Ciências farmacêuticas – Tecnologia de medicamentos . 2. Medicamentos antiretrovirais – Dose-fixa combinada. I. Título.

615.07  
615.1

CDU (2.ed.)  
CDD (20.ed.)

UFPE  
CCS2006-027



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Reitor**

Profº. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

**Vice-Reitor**

Profº. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação**

Profº. Dr. Celso Pinto de Melo

**Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Profº. Dr. José Tadeu Pinheiro

**Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Profº. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

**Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Profª. Drª Jane Sheila Higino

**Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Profº Dr. Samuel Daniel de Souza Filho

**Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Profª Drª Miracy Muniz de Albuquerque

**Vice-Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Profº Dr. Pedro José Rolim Neto



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Recife, 31 de Agosto de 2006.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 31 de Agosto de 2006 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO:** Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADOR INTERNO:** Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADOR EXTERNO:** Prof. Dr. Eduardo José Alécio de Oliveira (**Centro Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco - CEFET**)

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a meus pais,  
Marcilo e Zelma, pelo incentivo, carinho,  
compreensão e contribuição nos momentos mais difíceis.  
E a todos que de uma forma ou outra contribuíram  
para realização de meus ideais.*

**“O mérito do homem não reside no conhecimento que tem,  
mas no esforço que despendeu para alcançá-lo.”**

*(Gotthold Ephraim Lessing)*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e coragem de sempre seguir adiante e nunca desistir dos meus objetivos.

Ao orientador e amigo, Professor Dr. Pedro Rolim Neto pela confiança, compreensão e sabedoria na orientação desta dissertação, despertando em mim o dom pela ciência.

À minha família, em especial meus pais, meu irmão e minha tia Nelma pelo carinho, apoio, incentivo e crença no meu sucesso.

À Flávia e Rosali pela amizade, sinceridade e competência profissional; a Jaffe pela colaboração prestada a esse trabalho e a todos os que fazem o LAFEPE pela acolhida e oportunidade de crescimento profissional.

À Fabiane Sônego e Suênia Lacerda pela dedicação e auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus colegas de turma pela troca de conhecimento, experiências e pela amizade. Em especial a Roseane, Sílvia e Youssef que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos pela colaboração.

A todos os professores do Curso de Mestrado, pela competência, pelo nível de qualidade do curso e por todo conhecimento propiciado.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, onde aprendi a essência e satisfação de ser farmacêutica.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO I</b> – Uma nova proposta terapêutica para tratamento da AIDS: da monoterapia a dose-fixa combinada.	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO II</b> – Caracterização dos princípios ativos zidovudina, lamivudina e nevirapina.	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO III</b> – Desenvolvimento farmacotécnico industrial do comprimido revestido dose-fixa-coimbinada de zidovudina 300 mg + lamivudina 150 mg + nevirapina 200 mg.	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> - Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência.	<b>45</b>
<b>CONCLUSÕES FINAIS</b>	<b>58</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I: Uma Nova proposta terapêutica para tratamento da Aids: da monoterapia à dose-fixa combinada.**

**Figura 1:** Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). 9

**Figura 2:** Esquema do ciclo de replicação viral do HIV. 10

### **CAPÍTULO II: Caracterização dos princípios ativos antiretrovirais zidovudina, lamivudina e nevirapina.**

**Figura 3:** Estrutura molecular da zidovudina (AZT). 27

**Figura 4:** Estrutura molecular da lamivudina (3TC). 28

**Figura 5:** Estrutura molecular na nevirapina (NVP). 28

### **CAPÍTULO IV: Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência.**

**Figura 6:** Varredura espectrofotométrica do padrão misto contendo 3TC, AZT e NVP.

Anexo I

**Figura 7:** Cromatograma referente ao método analítico para quantificação de lamivudina (45 µg/mL), zidovudina (90 µg/mL) e nevirapina (60 µg/mL) em comprimido revestido dose-fixa combinada. 51

**Figura 8:** Curva de linearidade referente ao fármaco lamivudina. Anexo II

**Figura 9:** Curva de linearidade referente ao fármaco zidovudina. Anexo II

**Figura 10:** Curva de linearidade referente ao fármaco nevirapina. Anexo II

**Figura 11:** Especificidade do método realizada com comprimido revestido placebo. 53

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO II: Caracterização das matérias-primas antiretrovirais zidovudina, lamivudina e nevirapina.**

**Tabela 1:** Resultados das análises de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima zidovudina – lote: 15180 29

**Tabela 2:** Resultados das análises de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima lamivudina – lote: CLMC055034 29

**Tabela 3:** Resultados das análises de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima nevirapina – lote:NV00100106 30

### **CAPÍTULO III: Desenvolvimento farmacotécnico industrial do comprimido revestido dose-fixa combinada de zidovudina 300 mg + lamivudina 150 mg + nevirapina 200 mg.**

**Tabela 4:** Resultados analíticos dos lotes de bancada LB I, LB II, LB III, LB IV, LB V e LB VI. Anexo I

**Tabela 5:** Resultados analíticos dos lotes piloto LP I, LP II e LP III. Anexo I

### **CAPÍTULO IV: Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência.**

**Tabela 6:** Resultado dos testes para o desenvolvimento do método analítico para quantificação de 3TC, AZT e NVP. Anexo III

**Tabela 7:** Parâmetros cromatográficos para verificação da performance do sistema. Anexo III

**Tabela 8:** Resultados da análise de robustez com relação à variação da proporção da fase móvel. Anexo III

**Tabela 9:** Resultados da análise de robustez com relação à variação do fluxo Anexo III

**Tabela 10:** Resultados da análise de robustez com relação à variação do tempo de sonicação da amostra. Anexo III

**Tabela 11:** Resultados da análise de robustez com relação à variação da temperatura. Anexo III

**Tabela 12:** Resultados da análise de robustez com relação aos diferentes lotes da coluna Phenomenex®. Anexo III

**Tabela 13:** Resultados da ANOVA para verificação da robustez do método. Anexo III

**Tabela 14:** Resultados analíticos da repetitividade do método. Anexo III

**Tabela 15:** Resultados analíticos da precisão intermediária – 1º Dia. Anexo III

**Tabela 16:** Resultados analíticos da precisão intermediária – 2º Dia. Anexo III

**Tabela 17:** Resultados do teste *t de Student* para verificação da precisão intermediária do método. Anexo III

**Tabela 18:** Resultados do teste *t de Student* para verificação da exatidão do método. Anexo III

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
FDA – Food and Drug Administration  
TR – Transcriptase Reversa  
LTM – Laboratório de Tecnologia de Medicamentos  
LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco  
MS – Ministério da Saúde  
ITRN – Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo  
ITRNN – Inibidores da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo  
IP – Inibidores de protease  
IF - Inibidores de fusão  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
LQ – Limite de quantificação  
LD – Limite de detecção  
DFC – Dose-fixa combinada  
min – minuto  
rpm – Rotação por minuto  
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco  
UV – Ultravioleta  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
LB – Lote de bancada  
LP – Lote piloto  
USP – United States Pharmacopeia  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
TARV – Terapia antiretroviral  
AZT – Zidovudina  
3TC – Lamivudina  
NVP – Nevirapina  
HAART – Terapia Antiretroviral de Alta Eficiência

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

g – Grama

Kg - Kilograma

L – Litro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm<sup>3</sup> – Milímetro cúbico

nm – Nanômetro

$\lambda$  – Comprimento de onda

$\mu$ L – Microlitro

RSD – Desvio padrão relativo

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

$\mu$ g – Microgramas

M – Concentração molar

## RESUMO

### **OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE ANTIRETROVIRAL DOSE-FIXA COMBINADA À BASE DE ZIDOVUDINA, LAMIVUDINA E NEVIRAPINA**

O acesso ao tratamento antiretroviral aos pacientes infectados nos países em desenvolvimento é uma prioridade da saúde pública mundial. Novos fármacos e associações terapêuticas têm proporcionado uma maior adesão ao tratamento, diminuindo a mortalidade pelo vírus HIV e melhorando a qualidade de vida dos pacientes infectados. Tendo em vista, a necessidade de viabilizar alternativas que aumentem essa adesão e conseqüentemente a eficácia terapêutica, tem se desenvolvido antiretrovirais em dose-fixa combinada, que são produtos que combinam dois ou mais fármacos em uma única cápsula ou comprimido. Entre as vantagens desta associação, a mais evidente é a maior adesão ao tratamento em relação ao que já é administrado individualmente na terapia aos pacientes. Este estudo foi realizado em parceria com o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e teve como objetivo principal o desenvolvimento farmacotécnico industrial da associação de zidovudina, lamivudina e nevirapina, contemplando, desde o estudo de pré-formulação quali-quantitativo de excipientes até a transposição para escala industrial, buscando desenvolver uma formulação e forma farmacêutica estável, que atenda as Boas Práticas de Fabricação e Controle e que proporcione sua produção a baixo custo. Foi realizado o desenvolvimento e validação de um método analítico específico para quantificação dos fármacos nos comprimidos revestidos obtidos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, garantindo a qualidade do produto a ser disponibilizado para o Programa Nacional DST/AIDS do Ministério da Saúde Brasileiro (PNDST/AIDS).

**Palavras-Chave:** zidovudina, nevirapina, lamivudina, validação, estabilidade.

## ABSTRACT

### TECHNOLOGICAL OBTENTION FIXED DOSE COMBINATION ANTIRETROVIRAL BASED ON ZIDOVUDINE, LAMIVUDINE AND NEVIRAPINE

The access to anti-retroviral treatment by infected patients in development countries is a worldwide public priority. New drugs and therapeutical associations have been providing a greater adhesion to treatment, diminishing mortality caused by HIV and improving the life quality of the infected patients. Objecting the necessity to create alternatives that improve this adhesion, and consequently, the therapeutical efficacy, dose fixed combination anti-retrovirals have been developed, combining two or more drugs in a single capsule or tablet. Amongst the advantages of this association, the more evident is the greater adhesion to treatment compared to those already administered individually in patient therapy. This study was accomplished in a partnership between the Drug Technology Laboratory of the Pharmaceutical Sciences Department of the UFPE and the Phamaceutical Laboratory of Pernambuco State (LAFEPE), and had as the main objective the industrial pharmacotechnical development of the zidovudine, lamivudine and nevirapine association, contemplating since the quali-quantitative pre-formulation excipients study to the industrial scale transposition searching to develop a steady formulation and pharmaceutical form fulfilling the Good Manufacture and Control Practice, that provide its production at a low cost. It was carried through the development and validation of an analytical method, specific for quantification of the drugs contained in the coated tablets obtained by high performance liquid chromatography, guaranteeing the quality of the product, to be integrated to the National Program of AIDS of the Brazilian Health Ministry (PNDST/AIDS).

**Key-words:** zidovudine, nevirapine, lamivudine, validation, stability.

# **INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## **INTRODUÇÃO**

O vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). As consequências clínicas da infecção causada pelo HIV devem-se a sua capacidade de desarmar o sistema imunológico do hospedeiro, devido a redução progressiva dos linfócitos CD4+ e a alterações qualitativas e quantitativas no sistema imune, levando a susceptibilidade do organismo humano às infecções oportunistas (CAMPOS *et al*, 2006).

A abordagem para o tratamento de pacientes infectados com HIV tem mudado significativamente nos últimos anos, resultado de avanços no entendimento da patogênese do HIV, na disponibilidade de novos agentes antiretrovirais e no uso de terapias combinadas que demonstraram ser mais efetivas que a monoterapia.

A Organização Mundial de Saúde, através de Terapia Antiretroviral de Alta Eficiência (HAART), recomenda como tratamento de primeira linha a associação de dois inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTIs), como a zidovudina e lamivudina, e um inibidor não-análogo, como a nevirapina, constituindo uma combinação com boa adesão, eficácia e tolerabilidade.

Tendo em vista a grande quantidade de fármacos utilizados na terapia combinada e a falta de adesão ao tratamento decorrente da administração dos mesmos, fez-se necessário o desenvolvimento farmacotécnico-industrial de comprimidos dose-fixa combinada, na tentativa de se obter uma forma farmacêutica sólida estável constituída pela associação dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina e nevirapina, permitindo uma produção com baixo custo e boa qualidade.

A escolha do desenvolvimento do comprimido revestido levou em consideração as vantagens desta forma farmacêutica, tais como: maior precisão da dose e menor

variabilidade do conteúdo; menor custo em relação a outras formas farmacêuticas orais; forma compacta que favorece a embalagem e o transporte; boa estabilidade física, química, mecânica e microbiológica e comodidade na administração.

Este estudo foi possível devido à parceria firmada entre o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Sendo objetivo do estudo não só o desenvolvimento de uma forma farmacêutica segura e eficaz como nova proposta terapêutica, como também o desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o estudo de estabilidade do comprimido obtido.

## **JUSTIFICATIVA**

O desenvolvimento tecnológico de uma forma farmacêutica sólida contendo associações de três fármacos antiretrovirais na forma de dose-fixa combinada é de grande importância no cenário farmacêutico para o tratamento da AIDS, pois coloca a disposição da população uma alternativa terapêutica mais econômica e segura, trazendo inúmeras vantagens relacionadas diretamente ao tratamento (custo e redução de dosagens) e ao paciente (redução de reações adversas, maior adesão ao tratamento e comodidade).

A realização deste projeto além do sentido científico tem um cunho social, possibilitando a aquisição de medicamentos de qualidade e de baixo custo pela sociedade, pois o referido medicamento será produzido no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), contando com o apoio do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

## **OBJETIVOS**

### *Objetivo Geral*

- Desenvolver uma tecnologia para obtenção de uma associação dos antiretrovirais zidovudina 300mg, lamivudina 150mg e nevirapina 200mg na forma farmacêutica comprimidos revestidos dose-fixa combinada.

### *Objetivos Específicos*

- Estudo de pré-formulação (caracterização do princípio ativo e desenvolvimento farmacotécnico).
- Desenvolvimento e validação de método analítico para produto acabado, segundo a Resolução – RE nº. 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA).
- Elaboração da forma farmacêutica sólida comprimido revestido.
- Transposição de escala de produção.
- Avaliação da estabilidade da forma farmacêutica desenvolvida de acordo com o preconizado pela Resolução RE nº 1, de julho de 2005 (ANVISA).

## **CAPÍTULO I**

### **Revisão da Literatura**

**UMA NOVA PROPOSTA TERAPÊUTICA PARA TRATAMENTO DA AIDS:**

**DA MONOTERAPIA À DOSE-FIXA COMBINADA**

*(Artigo publicado pela Revista Brasileira de Farmácia)*

**UMA NOVA PROPOSTA TERAPÊUTICA PARA TRATAMENTO DA AIDS:  
DA MONOTERAPIA À DOSE-FIXA COMBINADA**

A NEW THERAPEUTICAL PROPOSAL FOR AIDS TREATMENT: FROM  
MONOTHERAPY TO FIXED-DOSE COMBINATION

Zênia Maria Maciel LAVRA<sup>1,4</sup>, Sílvia Renata Queiroz de FARIAS<sup>1,4</sup>, Flávia Patrícia  
Morais de MEDEIROS<sup>2,4</sup>, Pedro José ROLIM NETO<sup>3</sup>

**RESUMO**

É prioridade de saúde pública mundial a introdução de novos agentes antiretrovirais no mercado. Atualmente, são utilizadas quatro classes terapêuticas para esta terapia: inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo, inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo, inibidores de protease e inibidores de fusão. Por se tratar de uma doença com alto nível de replicação, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) contribui para a ocorrência de mutações e, conseqüentemente, resistência aos medicamentos existentes. O tratamento antiretroviral padrão sempre deve incluir três fármacos, podendo ser utilizados separadamente ou na forma de dose-fixa combinada, sendo esta última, a melhor opção, uma vez que este tipo de esquema resulta em melhor adesão e conseqüentemente, diminuição do índice de falhas na terapia. O desenvolvimento da associação de antiretrovirais, utilizados individualmente na prática médica, viabilizou três fármacos em uma mesma forma farmacêutica (comprimidos revestidos), como nova proposta terapêutica, oferecendo oportunidades de melhora da potência, durabilidade e conveniência da terapia anti-HIV. Neste contexto, o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco em parceria com o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, está desenvolvendo medicamentos em forma de dose-fixa combinada (DFC) a base de zidovudina, lamivudina, nevirapina e estavudina, podendo ser de grande valia principalmente para países em desenvolvimento na América, Ásia e África.

**Palavras-Chave:** Dose-fixa combinada (DFC), antiretrovirais, vírus da imunodeficiência humana (HIV).

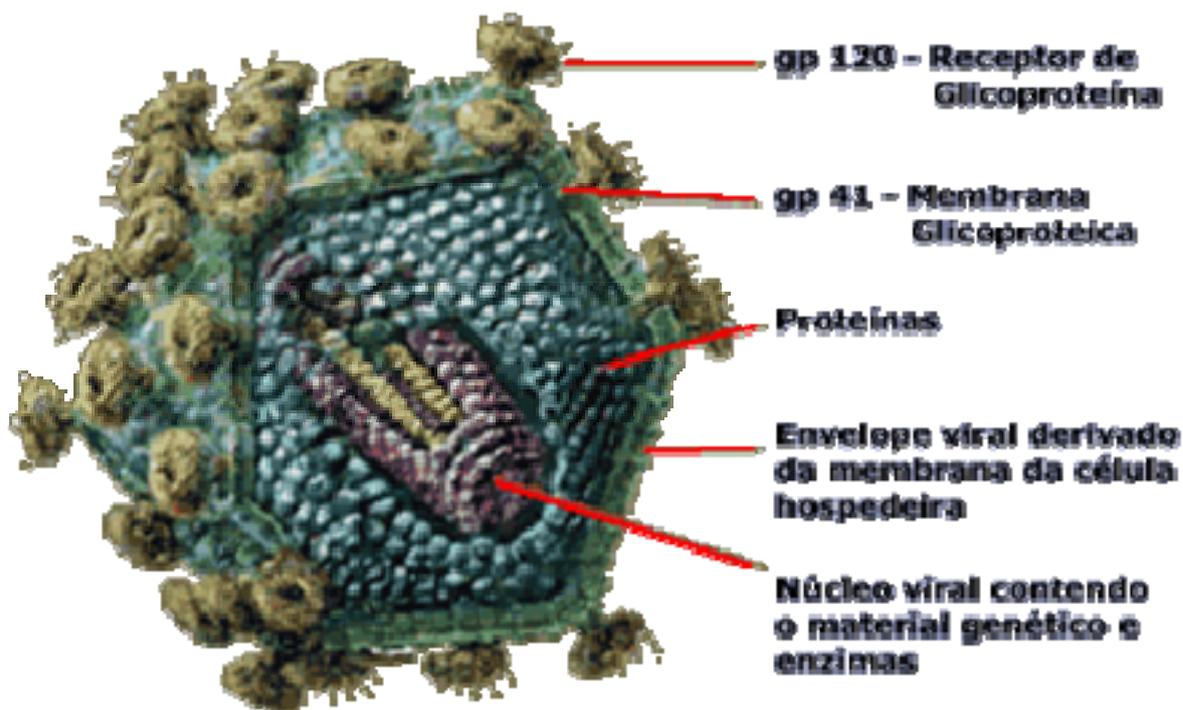
## ABSTRACT

The introduction of new antiretroviral agents in the market is a public health priority worldwide. Nowadays four therapeutical classes are used for the antiretroviral therapy: reverse transcriptase inhibitors nucleosidic analogues, reverse transcriptase inhibitors non-nucleosidic analogues, protease inhibitors and fusion inhibitors. Since we are dealing with a disease with a high replication level, the HIV contributes to the occurrence of mutations and, consequently, to the appearance of resistance to currently marketed drugs. The standard antiretroviral therapy must always include three drugs, that may be used separately or in the fixed-dose combination, the last one being the best option, since this kind of treatment results in a best adhesion and consequently in a reduction in the therapy flaws rate. The development of the antiretrovirals association, used individually in the medical practice, made possible three drugs in a single pharmaceutical form (coated tablets), as a new therapeutic proposal, offering opportunities for increasing strength, durability and convenience of the anti-HIV therapy. In this context, the Pharmaceutical Laboratory from Pernambuco State in partnership with the Medicine's Technology Laboratory, is developing medicines in fixed-dose combination form, containing zidovudine, lamivudine, nevirapine and stavudine, that may be of great value, mostly in developing countries, in America, Asia and Africa.

**Key words:** fixed-dose combination (FDC), antiretrovirals, Human Immunodeficiency Virus (HIV)

## Introdução

Os vírus causam algumas das maiores destruições que afligem a humanidade. Dentre eles destaca-se o vírus da Imunodeficiência Humana que afeta cerca de 40 milhões de pessoas no mundo (JEROME, 2005), e tem matado mais de 25 milhões de pessoas desde que foi reconhecido em 1981, fazendo desta uma das mais destrutivas epidemias relatadas na história (UNAIDS, 2005).



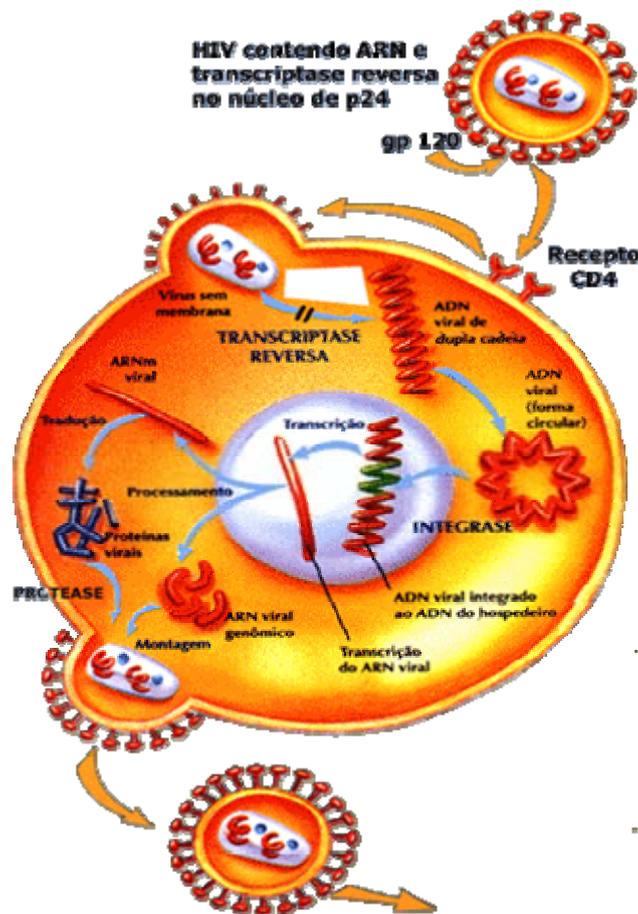
**Figura 1.1** – Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

(Disponível em [http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia\\_id=90&materiaver=1](http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia_id=90&materiaver=1). Acesso em 5 ago. 2006.)

A síndrome clínica da AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*, ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) foi primeiramente descoberta nos anos 80, mais precisamente em 1981, e o vírus HIV-1 foi identificado um pouco depois dessa época, pelos pesquisadores Luc Montaigner, na França, e Robert Gallo, nos EUA, recebendo os nomes de LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus* ou Vírus Associado à Linfadenopatia) e HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus* ou Vírus T-Linfotrópico Humano tipo III), respectivamente. Em 1986, um comitê internacional recomendou o termo HIV (*Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana) para denominá-lo, reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos. Nesse

mesmo ano, foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes, denominado HIV-2 (ALVES, 2004; VASCO, 2004).

O HIV, um retrovírus da subfamília *Lentiviridae*, apresenta um ciclo de replicação (figura 1.2) que requer a transcrição do seu código genético RNA de filamento único em DNA pela ação de uma enzima conhecida como transcriptase reversa (TR), fazendo com que o material genético transcrito integre-se ao genoma do hospedeiro (JEROME, 2005). Após a transcrição reversa, o DNA de filamento duplo circula e penetra no núcleo. A integração do DNA pró-viral no cromossomo do hospedeiro é mediada por uma segunda enzima viral essencial, a integrase. Uma vez incorporado ao cromossomo do hospedeiro, o DNA pró-viral pode ser transcrito em RNA do HIV pela maquinaria de transcrição celular. Os vírus maduros sofrem um processo de maturação mediada pela enzima protease, terceira enzima essencial ao HIV.



**Figura 1.2** - Ciclo de replicação do HIV.

(Disponível em [http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia\\_id=90&materiaver=1](http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia_id=90&materiaver=1))

A evolução natural da infecção se caracteriza por intensa e contínua replicação viral em diversos compartimentos celulares e anatômicos, que resulta principalmente na destruição e disfunção de linfócitos T que expressam o antígeno de membrana CD4 (linfócitos T-CD4<sup>+</sup>) e de outras células do sistema imune (BARRY, 1998). A característica fundamental da doença é a deteriorização gradual dos linfócitos T-CD4<sup>+</sup>. Essas células, eliminadas durante a evolução da doença, são essenciais para a resposta imunológica, atuando como sinalizadoras de outras células do sistema imune para o desempenho de suas funções (MONTEIRO, 2005).

A penetração do vírus no organismo ocorre através das células de Langerhans presentes nas mucosas, que os apresentam aos linfócitos da sua superfície, ocorrendo então a fusão e infecção destes linfócitos. Em poucos dias, o vírus já atinge os linfonodos regionais e entra na circulação sangüínea, caracterizando intensa viremia (índices elevados de RNA-HIV). Ao atingir a circulação sistêmica, ele também atinge os tecidos linfóides e o sistema nervoso central. O tempo entre a infecção e o início da viremia varia de 4 a 11 dias. Após este período, o organismo reage à infecção com intensa resposta imune, inicialmente através dos linfócitos T citotóxicos (CD8) e em seguida com os linfócitos B, reduzindo a carga viral, mas sem eliminar o vírus (FIGUEIRA *et al.*, 2004).

Por esta razão, o quadro clínico da AIDS é caracterizado em função da contagem sangüínea de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> no indivíduo infectado (PEÇANHA, 2002). A depleção progressiva dos linfócitos T-CD4<sup>+</sup> em conjunto com todas estas alterações quantitativas e qualitativas do sistema imune, levam à imunodeficiência, que em sua forma mais grave manifesta-se pelo surgimento de infecções oportunistas e neoplasias que caracterizam a AIDS. Assim, a supressão máxima e contínua da replicação viral é desejável para reduzir ou reverter o dano imunológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A infecção pelo HIV pode ser dividida em três fases: aguda, assintomática e sintomática. A síndrome aguda acomete 50 a 70% dos indivíduos contaminados que podem apresentar os sintomas 2 a 4 semanas após a exposição ao vírus, apresentando febre alta, faringite, *rash* cutâneo, mialgia, astenia, diarréia, vômitos, cefaléias, dentre outras, que duram um período de 10 a 15 dias. Em seguida o paciente entra na fase assintomática por tempo variável onde o vírus se mantém num estado replicativo de

pequena intensidade. A fase sintomática é caracterizada pelo surgimento de sinais e sintomas inespecíficos, de intensidade variável, além da instalação das doenças oportunistas que se desenvolvem em decorrência da alteração imunitária do hospedeiro. Estas doenças são geralmente de origem infecciosa ou neoplasias (FIGUEIRA *et al.*, 2004).

Diversas etapas do ciclo replicativo do HIV foram identificadas como alvos para intervenção farmacológica. Assim, vários compostos são candidatos a fármacos terapêuticamente úteis, uma vez que inibem as etapas do ciclo de replicação viral (JEROME, 2005). Atualmente, estão disponíveis comercialmente fármacos que interferem em três fases do ciclo: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e não análogos (ITRNN), inibidores da protease (IP) e inibidores de fusão (IF).

A terapia combinada, o notório coquetel anti-AIDS, permite manter níveis extremamente baixos ou mesmo indetectáveis de partículas virais circulantes.

Infelizmente, apesar desses inúmeros avanços e prolongamento da expectativa de vida, a cura da AIDS ainda não foi alcançada, uma vez que, vírus residentes em linfócitos T "de memória" não são erradicados através da terapia disponível. Estes vírus latentes se replicam continuamente, quando na descontinuidade da terapia ou no surgimento de mutações que confirmam a estes, resistência aos fármacos utilizados (PEÇANHA, 2002).

## **Desenvolvimento**

### *Incidência no Mundo*

Dados epidemiológicos da AIDS mostram que em 2005 o número de pessoas vivendo com HIV chegou a 43 milhões, destes, 38 milhões eram adultos, sendo 17,5 milhões de mulheres, e 2,3 milhões de crianças abaixo de 15 anos (UNAIDS, 2005).

O HIV/AIDS é a quarta maior causa de morte no mundo. Há uma estimativa que 14 pessoas/dia (5 milhões de pessoas/ano, incluindo 600.000 crianças com menos de 15 anos de idade) estejam sendo infectadas com o HIV, com mais de 95% delas vivendo em regiões subdesenvolvidas do mundo (GIRARD *et al.*, 2006).

O número de infecções do HIV é igualmente distribuído entre homens e mulheres, mas a proporção da infecção em mulheres jovens é quase três vezes maior quando comparada com homens na mesma faixa etária, o que pode ser entendido também como a falta de educação e informação em saúde, própria da realidade dessas mulheres (GIRARD, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 15% das pessoas em países em desenvolvimento (cerca de 1 bilhão de pacientes) que precisam de terapia anti-retroviral (TARV) podem ter acesso a estes medicamentos, mas pelo menos 3 milhões poderão ser capazes de adquiri-los em 2006, e um novo objetivo para alcançar um acesso universal em 2010 foi estabelecido (OMS, 2005).

#### *A doença na América Latina*

O número de pessoas com AIDS na América Latina é de aproximadamente 1,8 milhões. Em 2005, cerca de 66.000 pessoas morreram de AIDS e 200.000 foram infectadas (UNAIDS, 2005).

Devido as suas grandes populações, países como Argentina, Brasil e Colômbia são os que apresentam maior número de portadores do HIV. O Brasil sozinho é responsável por mais de um terço das 1,8 milhões de pessoas que vivem com HIV na América Latina. A maior prevalência do HIV, no entanto, é encontrada em pequenos países, como Belize, Guatemala e Honduras, onde aproximadamente 1% ou mais dos adultos foram infectados pelo HIV até o fim de 2003. No Chile e no Uruguai, a maioria das infecções por HIV está concentrada em áreas urbanas. Já no Paraguai o HIV tem aparecido nas áreas rurais, especialmente nas que fazem fronteira com Brasil e Argentina (UNAIDS, 2005).

O acesso a TARV tem se expandido consideravelmente, e o feito do Brasil nesta área permanece inigualável. De acordo com as diretrizes do país, pacientes portadores de HIV são detectados pelo sistema nacional de saúde e tratados com a terapia adequada. O índice de adesão entre os pacientes em tratamento tem sido estimado em 75%. A cobertura do tratamento também é alta na Argentina, Chile, Cuba, México, Uruguai e Venezuela. Na Costa Rica e no Panamá o acesso ao tratamento tem melhorado consideravelmente reduzindo a mortalidade pela AIDS. Por outro lado, em países pobres da América Central e da América do Sul, o avanço tem sido bastante

lento. Em 2004 menos de 1.000 pacientes equatorianos tinham acesso ao tratamento (UNAIDS, 2005).

### *Política Nacional de Medicamentos para AIDS*

No Brasil, o primeiro caso de AIDS foi identificado em 1980 e até junho de 2005 já foram notificados cerca de 371 mil casos. Do total de casos, mais de 80% concentram-se nas regiões Sudeste e Sul. Em 2004, uma pesquisa de abrangência nacional estimou que no Brasil cerca de 593 mil pessoas entre 15 a 49 anos de idade vivem com HIV e AIDS. Deste número, cerca de 204 mil são mulheres e 389 mil são homens (BRASIL, 2006a).

É prioridade de saúde pública no mundo, a introdução de novos agentes anti-retrovirais no mercado; e no Brasil, o Ministério da Saúde (MS), através da Política de Medicamentos de AIDS, tem garantido acesso universal e gratuito ao TARV, de acordo com a Lei nº 9.313/96, disponibilizando tratamento mais adequado aos pacientes infectados pelo HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em 1986, foi criado pelo governo brasileiro o Programa Nacional DST/AIDS e em 1991, iniciou-se o processo para a aquisição e distribuição gratuita de medicamentos anti-retrovirais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dois anos após (1993) a ZIDOVUDINA, primeiro medicamento utilizado no combate ao vírus da AIDS, passou a ser produzido pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), sendo este o primeiro laboratório oficial do país a produzi-lo. Em 1999, com o aumento de medicamentos disponibilizados pelo Ministério da Saúde, teve-se como consequência a queda de 50% na mortalidade e a melhora da qualidade de vida dos portadores do HIV (BRASIL, 2006b).

Em 2001, o Brasil ameaçou quebrar patentes e conseguiu negociar com a indústria farmacêutica internacional a redução no preço dos medicamentos utilizados na terapia. Dezesesseis anos após a criação (2002), o Programa Nacional de DST/AIDS é considerado por diversas agências de cooperação internacional como referência mundial (BRASIL, 2006b). O número de brasileiros em TARV tem continuado a aumentar e alcançou aproximadamente 170.000 pacientes em setembro de 2005 (OMS, 2005).

A produção nacional de medicamentos anti-retrovirais é fator essencial para a viabilidade da distribuição universal e gratuita dessas drogas para as pessoas que vivem com AIDS. Hoje, o Brasil produz oito anti-retrovirais, dentre eles: didanosina (ddI), lamivudina (3TC), zidovudina (AZT), estavudina (d4T), indinavir (IND), ritonavir (RTV), nevirapina (NVP) e a associação AZT + 3TC num mesmo comprimido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

#### *A Terapia Antiretroviral (TARV)*

O advento da TARV, em 1996, conduziu a uma revolução no cuidado de pacientes com HIV/AIDS no mundo. Embora os tratamentos não sejam a cura e apresentem novos desafios com relação aos efeitos adversos e resistência às drogas, eles têm radicalmente reduzido a razão de mortalidade e morbidade, tem aumentado a qualidade de vida das pessoas que vivem com AIDS, e tem transformado comunidades. Além disso, HIV/AIDS é agora percebido mais como doença crônica do que propriamente como praga, como até pouco tempo este termo poderia ser utilizado (OMS, 2005).

Em 1987, surgiu a primeira droga que conseguiu com sucesso agir em nível de TR do HIV, o AZT, droga pertencente à classe de ITRN, demonstrando grande eficácia em pacientes em estágios avançados de AIDS. Desde a aprovação do AZT, o número de fármacos disponíveis para o tratamento do HIV tem aumentado consideravelmente, e novos mecanismos de ação anti-retroviral tem sido descobertos (TURNER, 2003). A partir do ano de 1987 até meados de 1990, o mundo científico viveu de grandes esperanças e muito poucos resultados com a administração de tratamentos à base de apenas um tipo de fármaco (monoterapia). A partir do ano de 1995, um grupo de pesquisadores atraiu a atenção da comunidade científica, a respeito de um novo esquema terapêutico, que foi a combinação de dois análogos de nucleosídeos. Estes estudos demonstraram maior eficácia quando comparados a esquemas monoterápicos; estava aí determinado um novo padrão de tratamento para portadores do HIV (HOFMAN, 2003).

O crescimento das possibilidades de combinações oferece oportunidades de melhora da potência, durabilidade e conveniência da TARV, mas também pode ocasionar complicações de tolerância, interações entre fármacos e resistência à terapia. Espera-se que os novos regimes sejam seguros e toleráveis, tenham uma baixa carga de

comprimidos/cápsulas e horários de dosagens simplificados, possam ser administrados com outros fármacos, e tenham baixos efeitos colaterais (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Os inibidores da transcriptase reversa foram a primeira classe de drogas, introduzidos como agente anti-retroviral para o tratamento do HIV e têm sido a base da terapia anti-HIV (GOODMAN & GILMAN, 2003). Para inibir a replicação viral, quatro classes terapêuticas têm sido desenvolvidas (LEGRAND, 2000): ITRNs, ITRNNs, IP e IF. Nos Estados Unidos, há atualmente sete inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa, três inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa, sete inibidores da protease, e um inibidor de fusão, aprovados pelo “*Food and Drugs Administration*” (FDA), sendo utilizados em combinações de três ou mais fármacos (NACHEGA et al, 2005). Ao compor o esquema terapêutico estes devem ser iniciados ao mesmo tempo e em doses completas, evitando assim o risco de desenvolvimento de resistência viral e ineficiência da terapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dentre as classes terapêuticas utilizadas temos:

- *Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa*

São pró-drogas análogas de dideoxynucleosídeos, que requerem fosforilação intracelular em seu correspondente derivado trifosfatado. O metabólito trifosfato então, compete com a transcriptase reversa por agir como um substrato alternativo para a enzima, e uma vez que o metabólito é incorporado à cadeia terminal do DNA em desenvolvimento, interrompe o alongamento desta (DE CLERCQ, 2004). Os ITRNs previnem a continuidade da síntese de DNA viral sendo incorporadas na cadeia nucleosídica de DNA que está sendo produzida pela TR, interrompendo futuras ligações nucleosídicas (TURNER *et al.*, 2003). Os fármacos desta classe impedem a infecção aguda das células suscetíveis, mas exercem pouco efeito sobre as células já infectadas pelo HIV (GOODMAN & GILMAN, 2003). Dentre os inibidores de nucleosídeos destacam-se: zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina, estavudina (d4T), lamivudina (3TC), abacavir (ABC), tenofovir (TDF), entricitabina e andoxovir.

- *Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa*

São compostos sintéticos quimicamente distintos, inibidores alostéricos não competitivos que diminuem a razão da incorporação do nucleosídeo e bloqueiam a

transcriptase reversa por meio de sua ligação adjacente ao sítio ativo da enzima, induzindo a alterações na configuração deste local (GOODMAN & GILMAN, 2003). Esta classe de drogas possui maior eficácia contra o HIV-1 do que contra o HIV-2 (DE CLERQ, 1998). É ativo no seu estado nativo e não requer fosforilação. A forma ideal de utilização destes fármacos é na terapia combinada com análogos de nucleosídeos e inibidores de protease, onde a atividade sinérgica deles é mais potente ( DE CLERCK, 2004). Dentre os inibidores não nucleosídicos destacam-se: efavirenz (EFZ) e nevirapina (NVP).

- *Inibidores de protease*

A exposição das células infectadas a inibidores de protease do HIV resulta na produção de vírus imaturos que carecem de nucleocapsídeo típico e que, portanto, não são infecciosos. Isto ocorre devido ao impedimento da clivagem de poliproteínas no estágio final do processamento da proteína viral, impedindo a montagem e resultando numa partícula viral defeituosa e não infecciosa (DE CLERCK, 2004). Dentre estes destacam-se: saquinavir (SQV), indinavir (IDV), ritonavir (r), nelfinavir (NFV), lopinavir (LPV) e atazanavir (ATV).

- *Inibidores de Fusão*

Uma nova classe de antiretrovirais, os inibidores de fusão, até o momento representada por um único medicamento disponível na prática clínica, a enfuvirtida (ENF), passou a ser disponibilizada para terapia de resgate (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006). Inibem a etapa inicial do ciclo de vida do HIV (fixação do vírus) e, conseqüentemente, a entrada viral na célula. Testes clínicos têm mostrado que inibidores de fusão reduzem a carga viral mais rápido que a terapia convencional (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Pesquisas atuais concentram esforços em busca de novos compostos antiretrovirais pertencentes às classes já utilizadas e também na busca de fármacos que atuem em outras fases do ciclo (DE CLERCK, 2002), como por exemplo: inibidores de adsorção e antagonistas de co-receptores virais, inibidores de integrase.

Devido a uma rápida seleção de vírus resistentes às drogas presentes no mercado, e graças ao aumento do número de drogas anti-HIV aprovadas pelo FDA, as multiterapias

têm exercido papel importante na eficácia dos tratamentos atuais. O padrão atual de tratamento do HIV refere-se à terapia antiretroviral de alta atividade (HAART), a qual combina pelo menos três drogas antiretrovirais. Neste tipo de terapia tem-se a associação de dois ITRNs associados a um ou dois IPs ou um ITRNNs. Devido à terapia de fármacos atual não ser curativa, o tratamento da infecção por HIV requer um regime com efeito, no tempo de vida, cujo objetivo é maximizar a expectativa e qualidade de vida do paciente (OMS, 2005).

A TR do HIV é extremamente propensa a erros, cerca de uma mutação a cada genoma transcrito. O resultado desta transcrição errônea é a geração de múltiplas variantes do HIV, que diferem por uma ou mais mutações que estão simultaneamente presentes dentro de um indivíduo infectado com o HIV. Estas mutações podem conferir resistência às terapias convencionais, ou até mesmo a classes inteiras de drogas. O aparecimento de resistência às drogas é associado com uma resposta diminuída à terapia e falha virológica (MUGAVERO, 2004).

A fim de melhorar a conveniência do tratamento, formulações multidrogas na forma de dose-fixa estão sendo amplamente promovidas como regime de 1ª linha em programas de acesso ao tratamento antiretroviral (KAPOOR et. al, 2006a).

O termo dose-fixa-combinada (DFC) refere-se a associações de classes variadas de drogas em diversas combinações, sendo que os regimes terapêuticos mais potentes são aqueles que combinam dois ITRNs e um ITRNN associados numa única forma farmacêutica. Dentre as vantagens desta associação: baixo custo; eficácia e tolerabilidade semelhantes a outros esquemas terapêuticos; melhor adesão ao tratamento; menor número de comprimidos/cápsulas ingeridos. Sendo esta última, uma das mais importantes características, visto ser um dos pré-requisitos da ineficácia de grande parte dos tratamentos (LAURENT, 2004); melhoramento de propriedades farmacocinéticas e biofarmacêuticas (solubilidade e permeabilidade) dos fármacos envolvidos, resultando em formulações mais estáveis também foi observado (KAPOOR et al., 2006b).

Nos sistemas terapêuticos utilizados atualmente, o regime inicial varia de 2 a 16 cápsulas ou comprimidos por dia (HOFFMAN, 2003). Através do esquema de dose-fixa-combinada, é requerida uma menor quantidade de formas farmacêuticas ingerida

pelo paciente (BRASIL, 2006a), que é uma consideração importante na escolha do tratamento.

### *Início do Tratamento*

O principal objetivo da TARV é retardar a progressão da imunodeficiência e restaurar a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida da pessoa infectada. O tratamento é recomendado para todos os pacientes infectados pelo HIV que sejam sintomáticos, independente da contagem de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e para os assintomáticos com contagem de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> abaixo de 200/mm<sup>3</sup> (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006).

Em casos onde não exista possibilidade de se realizar a contagem de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> deve-se introduzir a TARV mesmo que o paciente não apresente qualquer sinal de infecção (assintomáticos). A realização de exames simples como o hemograma pode dar um estimativa da infecção, como por exemplo: uma quantidade de linfócitos em torno de 1000/mm<sup>3</sup> e hemoglobina abaixo de 13 g/dL, indicam provavelmente uma baixa carga de linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, e possivelmente a presença do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Segundo WOOD *et al.* (2005), a fase apropriada para se começar a terapia anti-retroviral de alta atividade seria em pacientes com uma contagem de células T-CD4<sup>+</sup> entre 200 e 350 cel/μL e em pacientes que apresentem grandes quantidades de HIV no plasma.

As características individuais do paciente, incluindo co-infecção, adesão dentre outros parâmetros, são importantes na hora da escolha da terapia, a fim de que seja definido o melhor esquema terapêutico para cada pessoa, assegurando assim melhores resultados. As terapias anti-retrovirais têm demonstrado uma redução drástica na quantidade de níveis circulantes de HIV no plasma, com isso um aumento na quantidade de células T-CD4<sup>+</sup> e conseqüentemente, redução na morbidade e mortalidade para pacientes que as recebem (WOOD *et al.*, 2005).

### *O que motiva a pesquisa na área*

A adesão do paciente a TARV é reconhecida como a chave principal da eficácia da terapia, isto geralmente está associada com o desenvolvimento de mutações virais e

de resistência aos fármacos, progressão da doença e morte. Evidências recentes indicam que a relação entre adesão e resistência é postulada por uma curva dose-resposta, tal que o risco à resistência aumenta com moderados níveis e diminui com a completa adesão. Observações recentes indicam que a diminuição da resposta está associada com o desenvolvimento de variados tipos de resistências para diferentes classes de anti-retrovirais (MUGAVERO, 2004).

A falha de resposta ao esquema terapêutico é multifuncional, incluindo estágio muito avançado da doença, presença de co-morbidades, resistência viral prévia a um ou mais fármacos, absorção gastrointestinal alterada, interações medicamentosas, baixa potência do esquema terapêutico, falta de informação, efeitos colaterais, uso de medicamentos em sub-doses ou de forma irregular (aceleração do processo de seleção de cepas virais resistentes) e número elevado de comprimidos/cápsulas por dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

## **Conclusão**

Depois de anos de árdua e frustrante luta contra o HIV, atualmente têm ocorrido inúmeros avanços em termos de descobertas da biologia do vírus, assim como, novidades em termos de regimes terapêuticos e descobrimento de novos fármacos. Tudo isso tem mudado a condição da AIDS como doença inevitavelmente fatal, para ser definida como um processo crônico e controlável.

O desenvolvimento contínuo de fármacos ativos contra cepas de HIV resistentes é necessário, uma vez que seu alto nível de replicação contribui para a ocorrência de mutações e conseqüentemente de resistência aos medicamentos existentes no mercado. Baseado nisto, faz-se necessário e urgente o desenvolvimento de novos medicamentos, assim como novos regimes terapêuticos a fim de que garantam uma melhor qualidade e expectativa de vida aos pacientes.

Atualmente, o tratamento antiretroviral padrão sempre deve incluir três fármacos, podendo ser utilizados separadamente ou na forma de dose-fixa combinada, sendo esta última a melhor opção, uma vez que este tipo de esquema resulta em melhor adesão e, conseqüentemente, diminuição do índice de falhas na terapia.

O LAFEPE, juntamente com o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM), vem contribuindo na pesquisa e desenvolvimento destes medicamentos. Atualmente, encontra-se em fase de obtenção tecnológica a forma farmacêutica comprimido revestido, associando três dos principais medicamentos anti-retrovirais utilizados no país na forma de dose fixa combinada num único comprimido, com as seguintes associações: estavudina 40 mg + lamivudina 150 mg + nevirapina 200mg e zidovudina 300 mg + lamivudina 150 mg + nevirapina 200 mg. Desta forma, este é um grande passo para o tratamento da AIDS, visto que estas associações são inéditas no país e garantirão uma maior eficácia aos tratamentos já utilizados, além de contribuir com a política nacional de AIDS do Ministério da Saúde, que garante tratamento adequado, universal e gratuito.

### **Referências Bibliográficas**

ALVES, S. P. *AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento*. Disponível em: <http://www.salves.com.br/virtua/aidsaids.htm>. Acesso em: 12 mai. 2004.

BARRY M., *et al.* Antiretroviral therapy for patients with HIV disease. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45: 221-228p.;

BRASIL. Ministério da Saúde. *Aids no Brasil*. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS13F4BF21PTBRIE.htm> Acesso em: 19/03/2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Historia da AIDS*. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS13F4BF21PTBRIE.htm> Acesso em: 19/03/2006b.

CARRASCO, D.A.; STRATEN M.V. & TYRING S.K. A Review of antiretroviral drugs. *Dermatology Therapy*, 2000; 13: 305-317p.;

DE CLERCQ, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002; 1587: 258-275p.;

DE CLERCQ, E. Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *IL Farmaco*, 1998; 54: 26-45p.;

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of clinical virology*, 2004; 30: 115-133p.;

FIGUEIRA, N. A.; COSTA JUNIOR, J. I.; LEITÃO, C. C. S.; LUCENA, V. G.; MELO, H. R. L.; BRITO, C. A. A. *Conduas em clínica médica*. 3ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2004. 759-772p.;

GIRARD, P. M.; OSMANOV, K. S.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: The human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine*, 2006; 24: 4061-4081p.;

GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1011 - 1033 p.;

HOFFMAN C.; ROCKCKSTROH, J.; Kamps, B. S.. HIV Therapy. *HIV Medicine*, 2003. 163-193p.;

JEROME, K. R. The road to new antiviral therapies. *Clinical and applied Immunology Reviews*, 2005. 5: 65-76p.;

KAPOOR, N.; KHANDEVALLI S.; PANCHAGNULA R.. Simultaneous determination of lamivudine, stavudine and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2006a; 570: 41-45p.;

KAPOOR, N.; KHANDEVALLI 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*, 2006b; 41: 761-765p.;

LAURENT C. et al. Effectiveness and Safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *The Lancet*. France, 2004; 364: 29-34p.;

LEGRAND, G.A.M; DIQUET, N.T.B. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. France, 2000; 744: 227-240p.;

MAAT, M. M. R. et al.; Evaluation of clinical pharmacist interventions on drug interactions in outpatient pharmaceutical HIV-care. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.*, 2004; 29: 121-130p.;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para a terapia Anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília(DF); 2006.

MONTEIRO, V. C. S. *Tecnologia de Obtenção de Anti-Retroviral à Base de Mesilato de Nelfinavir*. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife. 2005.

MUGAVERO, M.J.; HICKS C.B. HIV resistance and the effectiveness of combination antiretroviral treatment. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2004;I 4: 529-535p.;

NACHEGA, J. B. et al.; HIV/AIDS and Antiretroviral Treatment Knowledge, Attitudes, Beliefs, and Practices in HIV-Infected Adults in Soweto, South Africa; *J. Acquir Immune Defic Syndr*. 2005, 38: 196-201p.;

OMS. 2005 Revision of WHO ARV Treatment Guideline of adults and adolescents in Resource-limited Settings.; Suíça; Junho/2005

PEÇANHA, E.P.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, 2002; 25: 1108-1116p.;

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*, 2003 784: 331-341p.;

UNAIDS. 2. Joint united nations programme on aids (uniaids) /world health organization (OMS) Aids. Epidemic update - special report on hiv prevention, Dezembro, 2005

WOOD E.; HOOG, R. S.; HARRINGAN, P. R.; MONTANER, J.S.G.. When to initiate antiretroviral therapy in HIV-1-infected adults: a review for clinicians and patients. *Lancet inf. Dis*, 2005; 5: 407-414p.

## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS ANTIRETROVIRAIS ZIDOVUDINA, LAMIVUDINA E NEVIRAPINA**

## **CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS ANTIRETROVIRAIS ZIDOVUDINA, LAMIVUDINA E NEVIRAPINA**

### **Introdução**

A aquisição de matérias-primas é um fator decisivo nas indústrias farmacêuticas para manutenção da garantia da qualidade dos produtos em processo e acabado, garantindo a produção de medicamentos confiáveis e com a qualidade requerida (SANTIN, 2004). Sendo assim, avaliar a qualidade da matéria-prima empregada num processo industrial tecnológico é muito importante para padronizar as condições de fabricação e assegurar a qualidade do medicamento produzido (GRANGEIRO, 2002).

Antes do desenvolvimento de qualquer forma farmacêutica, é essencial que as propriedades físicas e químicas da molécula do fármaco e outras propriedades do fármaco em pó sejam determinadas. As informações obtidas nesta etapa, conhecida como pré-formulação, são imprescindíveis no desenvolvimento da nova formulação (AULTON, 2005).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os antiretrovirais zidovudina, lamivudina e nevirapina, realizando as análises de controle de qualidade físico-químicos de acordo com os métodos descritos na Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

### **Materiais e Métodos**

#### *Matérias-primas*

As matérias – primas utilizadas neste estudo foram: zidovudina, (Northeast<sup>®</sup> lote: 15180); lamivudina (Aurobindo<sup>®</sup> lote: CLMC055034) e nevirapina (Aurobindo<sup>®</sup>, lote: NV 00100106). A caracterização baseou-se nos métodos analíticos descritos na Farmacopéia Brasileira, 4ª edição, 1988, 2001 e 2002.

#### *Padrões de trabalho*

Zidovudina (Ítaca<sup>®</sup> lote HVZ0210304 – teor 100,0%), lamivudina (Northeast<sup>®</sup> lote 00019 – teor 100,47%) e nevirapina (Xiamem Mchem<sup>®</sup> lote 050501 – teor 98,32%).

## Controle de qualidade físico-químico

### Zidovudina

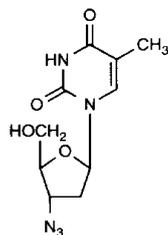


Figura 3: Estrutura molecular da zidovudina (AZT)

A zidovudina possui massa e fórmula molecular equivalente a 267,2 g/mol e C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, respectivamente, apresentando-se na forma de pó branco ou acastanhado. Funde-se a aproximadamente 124 °C, sendo levemente solúvel em água e solúvel em etanol.

Na verificação da descrição, foi realizada sua análise macroscópica e avaliada a solubilidade. Foram avaliadas também as constantes físico-químicas referentes ao ponto de fusão e poder rotatório. O ponto de fusão foi determinado por método capilar no fusiômetro, já para o poder rotatório utilizou-se o polarímetro com uma solução a 1 % (m/v) em etanol. O conteúdo de água foi determinado em 1 g da amostra utilizando um analisador de umidade de alta precisão com fonte de radiação halógena, a uma temperatura entre 100 °C - 105 °C.

Todos os ensaios foram realizados com auxílio da balança analítica e de vidrarias graduadas e/ou volumétricas.

O doseamento foi realizado por dois métodos: espectrofotométrico, desenvolvido e validado pelo LAFEPE (RV 024, LAFEPE, 2003), e por cromatografia líquida de alta eficiência. Na quantificação pelo método espectrofotométrico foi analisada uma solução aquosa a 0,01 mg/mL num comprimento de onda de 268 nm. Pelo método cromatográfico uma solução a 0,2 mg/mL em fase móvel foi analisada nas seguintes condições cromatográficas: coluna C18 (LiChrospher<sup>®</sup>), 250 x 4,6 mm, partícula 5 µm; detector UV (λ = 265 nm); fase móvel metanol grau HPLC e água ultrapurificada numa proporção de 20:80; fluxo de 1,2 mL/min e volume de injeção de 10 µL. Para os dois métodos foram preparadas e analisadas soluções padrões nas mesmas condições.

### Lamivudina

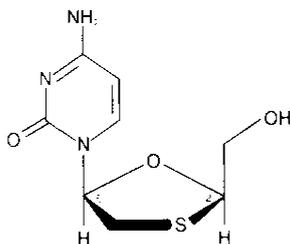


Figura 4: Estrutura molecular da lamivudina (3TC)

A lamivudina apresenta-se na forma de pó cristalino branco a branco-amarelado, com massa e fórmula molecular equivalente a 229,26 g/mol e C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S, respectivamente. Funde-se num intervalo entre 176 °C – 178 °C.

A verificação da sua solubilidade foi realizada em água purificada, metanol, etanol, acetona, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M. O poder rotatório específico foi determinado em polarímetro, com uma solução metanólica a 0,8 % (m/v) e o ponto de fusão pelo método capilar em fusiômetro. O teor de água foi verificado pelo método Karl-Fischer. O resíduo por incineração foi determinado em condições semelhantes à zidovudina.

O doseamento da amostra foi realizado pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico. Por espectrofotometria uma solução aquosa de lamivudina a 0,0015 % (p/v) foi preparada e lida em detector UV ( $\lambda = 270$  nm). Para análise por cromatografia, as condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: coluna C 8 (Microbondapack<sup>®</sup>), 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; detector UV ( $\lambda = 277$  nm); fase móvel com tampão acetato pH 3,8 e metanol (95:5); fluxo 1 mL/min e volume de injeção de 10  $\mu$ L.

### Nevirapina

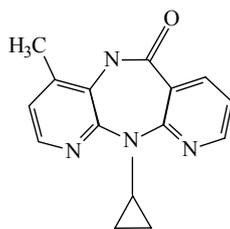


Figura 5: Estrutura molecular na nevirapina (NVP)

A nevirapina é representada pela fórmula molecular  $C_{15}H_{14}N_4O$  e possui massa molecular 266,30 g/mol. Caracteriza-se como pó cristalino branco a branco-amarelado. Apresenta-se solúvel em clorofórmio, água, dimetilformamida, ácido acético glacial, pouco solúvel em metanol. A faixa de fusão entre 247°C - 249°C foi verificada pelo método capilar em fusiômetro.

O teste de perda por dessecação foi determinado em 1 g da amostra, utilizando analisador de umidade de alta precisão com fonte de radiação halógena a 105 °C. O doseamento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, tendo como fase estacionária a coluna cromatográfica C 8 (Waters<sup>®</sup>), 250 x 4,6 mm, 10 µm; detector UV ( $\lambda = 237$  nm); fase móvel com tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila (60:40); fluxo 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A solução amostra e padrão foram preparados a uma concentração de 0,3 mg/mL em fase móvel.

## Resultados e Discussão

### *Controle de qualidade físico-químico*

Os resultados das matérias-primas dos fornecedores testados estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Resultados das análises de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima zidovudina – lote: 15180

<b>Parâmetros</b>	<b>Especificações (Farmacopéia Brasileira)</b>	<b>Resultado</b>
Caracteres físicos	Pó branco ou acastanhado	De acordo
Solubilidade	Levemente solúvel em água	De acordo
	Solúvel em etanol	De acordo
Perda por dessecação	Máximo 1,0%	0,58%
Doseamento (espectrofotometria)	98,0 a 102,0%	100,79%
Doseamento (CLAE)	98,0 a 102,0%	101,01%
Ponto de fusão	Aproximadamente 124°C	122,9°C
Poder rotatório	+ 60,5° a + 63,0° a 25°C	+ 62,0°

Tabela 2: Resultados das análises de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima lamivudina – lote: CLMC055034

<b>Parâmetros</b>	<b>Especificações</b>	<b>Resultado</b>
Caracteres físicos	Pó cristalino branco a branco-amarelado	De acordo
	Facilmente solúvel em água	De acordo
Solubilidade	Ligeiramente solúvel em metanol e etanol	De acordo
	Insolúvel em acetona	De acordo
	Facilmente solúvel em HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M	De acordo
Perda por dessecação	Máximo 2,0 % (por Karl Fischer)	0,21%
Doseamento (espectrofotometria)	98,0 a 102,0%	99,89%
Doseamento (CLAE)	98,0 a 102,0%	101,08%
Faixa de fusão	176°C a 178°C	178 °C
Poder rotatório (25°C)	-135° a -146° a 25 °C	- 135, 0°

Tabela 3: Resultados das análises de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima nevirapina – lote:NV00100106

<b>Parâmetros</b>	<b>Especificações</b>	<b>Resultado</b>
Caracteres físicos	Pó cristalino branco a branco-amarelado	De acordo
	Solúvel em água	Não conforme
Solubilidade	Solúvel em clorofórmio	De acordo
	Levemente solúvel em dimetilformamida	De acordo
	Pouco solúvel em ácido acético e metanol	De acordo
Perda por dessecação	Máximo 2,0%	0,4%
Doseamento (CLAE)	98,0 a 102,0%	99,6%
Faixa de fusão	247°C a 249°C	248°C

A primeira etapa na análise da qualidade das matérias-primas é a verificação de suas características físicas tais como aparência, odor, pH da solução saturada e ponto de fusão (AULTON, 2005). De acordo com as especificações para os três fármacos em estudos, descritos nas tabelas acima, todos estavam em conformidade com os aspectos físicos específicos para cada ativo. No entanto, sabe-se que a determinação do aspecto macroscópico sozinho não é capaz de garantir a qualidade de qualquer substância farmacêutica, sendo necessário a realização de testes analíticos adicionais que confirmem suas características.

No parâmetro solubilidade, apenas a nevirapina se apresentou em desacordo à especificação descrita na Farmacopéia Brasileira, com relação ao solvente água. Tendo em vista estudos anteriores com este princípio ativo (GRANGEIRO, 2002) e

informações do laudo analítico do fornecedor, o qual especifica a mesma como praticamente insolúvel em água, este resultado, portanto, não foi considerado decisivo para reprovação do princípio ativo. Testes posteriores realizados no desenvolvimento do método de dissolução do núcleo e comprimido revestido comprovaram que este resultado não interferiu na dissolução do produto final.

A análise do teor de água, para zidovudina e nevirapina, seguiram o princípio termogravimétrico no qual após o aquecimento, ocorre uma redução no peso inicial da substância em análise, devido à volatilização da água (GENNARO, 2004). O equipamento utilizado foi o analisador de umidade de alta precisão com fonte de radiação halógena, sendo esta responsável pelo aquecimento. Já para a lamivudina utilizou-se o método titulométrico de Karl Fischer. Os três princípios ativos apresentaram teor de água dentro do especificado.

A determinação do ponto de fusão corresponde a temperatura na qual a substância em análise encontra-se totalmente fundida (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) e muitas vezes uma redução nesta constante pode caracterizar alteração na pureza ou polimorfismo. Os três ativos apresentaram resultados em conformidade com as especificações.

A determinação do poder rotatório é utilizada para estabelecer a identidade e a pureza da substância, representando a sua capacidade de desviar o plano de luz polarizada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). De acordo com o resultado obtido, AZT apresenta-se como uma substância dextrógira e 3TC levógira, estando em conformidade com as respectivas especificações.

Para quantificação do AZT e 3TC, foram utilizados dois métodos. O cromatográfico, que por ser mais seletivo e específico detectaria a presença de possíveis impurezas e substâncias de degradação. No entanto este tipo de análise requer maior tempo e custo mais elevado, desde a preparação das amostras até a obtenção dos resultados. Como alternativa, para redução do custo e tempo de análise, utilizou-se método espectrofotométrico, que para 3TC já é farmacopêico e para AZT foi desenvolvido e validado pelo LAFEPE<sup>®</sup>, agilizando o processo analítico de rotina. O teor dos fármacos, por ambos os métodos, apresentavam-se dentro do limite especificado. O teor da nevirapina determinado por CLAE também se apresentou dentro do limite especificado.

## **Conclusão**

Através das análises físico-químicas realizadas foi possível verificar e garantir que a matéria-prima utilizada no processo de desenvolvimento farmacotécnico industrial dos comprimidos revestidos dose-fixa-combinada de zidovudina, lamivudina e nevirapina apresentavam a qualidade requerida para produtos farmacêuticos. Além disso, a caracterização dos ativos foi o passo inicial para o processo de qualificação de fornecedores exigidos pela RDC nº 210, de 04 de Agosto de 2003 (ANVISA).

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO**  
**COMPRIMIDO REVESTIDO DOSE-FIXA COMBINADA DE**  
**ZIDOVUDINA 300 mg + LAMIVUDINA 150 mg + NEVIRAPINA 200 mg**

*(Artigo submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada /  
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences )*

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO INDUSTRIAL DO  
COMPRIMIDO REVESTIDO DOSE-FIXA COMBINADA DE  
ZIDOVUDINA 300 mg + LAMIVUDINA 150mg + NEVIRAPINA 200 mg**

Zênia M<sup>a</sup> Maciel Lavra<sup>1, 2</sup>; Sílvia R. Queiroz de Farias<sup>1, 2</sup>; Flávia P. Morais de  
Medeiros<sup>1,2</sup>; Rosali M<sup>a</sup> F. da Silva<sup>1,2</sup>; Leduar G. de Lima<sup>1,2</sup>; Pedro J. Rolim Neto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM). Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Recife, PE, Brasil.

**Autor correspondente:** Zênia M. M. Lavra. LTM. Departamento de Ciências Farmacêuticas. UFPE. Av. Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária. CEP 50740-521. Recife/PE. Fone/Fax: 55 81 3272-1383. **E-mail:** zeniamaciel@hotmail.com

**RESUMO**

O desenvolvimento da associação de antiretrovirais, utilizados individualmente na prática clínica, em uma única forma farmacêutica como nova proposta terapêutica visa garantir boa eficácia, baixo custo e melhor adesão ao tratamento. Este trabalho teve como objetivo apresentar o desenvolvimento farmacotécnico industrial de comprimidos revestidos dose-fixa combinada de zidovudina 300 mg, nevirapina 200 mg e lamivudina 150 mg. Para o desenvolvimento da forma farmacêutica foi utilizada a técnica de granulação por via úmida, juntamente com uma planificação quali-quantitativa de excipientes, obtendo-se comprimidos com qualidade de acordo com as especificações de compêndios oficiais. O processo de transposição de escala e o estudo de estabilidade encontram-se em andamento para disponibilização do medicamento, resultando em mais uma alternativa terapêutica anti-HIV a ser utilizada no Programa Nacional de combate a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

**Palavras-chaves:** dose-fixa combinada, zidovudina, lamivudina, nevirapina.

**INDUSTRIAL PHARMACOTECHNICAL DEVELOPMENT OF  
COMBINED FIXED-DOSE ZIDOVUDINE 300 mg + LAMIVUDINE 150 mg  
+ NEVIRAPINE 200 mg FILM-COATED TABLET**

**ABSTRACT**

The development of antiretroviral combinations used individually in clinical practice as a single dosage form, in the role of a new therapeutic proposal aims to ensure good efficacy, low cost and better adherence to treatment. The purpose of this work was to present the industrial pharmacotechnical development of combined fixed-dose zidovudine 300 mg plus Lamivudine 150 mg plus nevirapine 200 mg film-coated tablets. For the development of the pharmaceutical dosage form, the wet granulation technique was used, along with a qualitative and quantitative description of excipients, in order to obtain tablets with a quality that meets the specifications established in official compendia. The scaling-up process and stability study are ongoing in order to make the drug available, resulting in yet another choice of anti-HIV therapy to be used in the Brazilian Programme in the fight against Acquired Immune Deficiency Syndrome (SIDA).

**Keywords:** combined fixed-dose; zidovudine; nevirapine; lamivudine.

## 1. Introdução

A associação de dois fármacos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e um inibidor não-análogo é considerada tratamento de primeira linha da Terapia de Alta Eficiência (HAART) recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Essa combinação apresenta-se com boa eficácia, tolerabilidade, baixo custo e boa adesão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs) foram a primeira classe de fármacos antiretrovirais a serem utilizados como tratamento anti-HIV, com a introdução da zidovudina (AZT) em 1987 que é um análogo sintético da timidina ativo contra HIV-1 e HIV-2. Esta foi aprovada pela *Food and Drugs Administration* (FDA) para o tratamento de adultos e crianças e sua associação a outros inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa proporciona maior benefício clínico do que a monoterapia. A posologia recomendada geralmente é de 300 mg duas vezes ao dia (CARRASCO, 2000).

A lamivudina (3TC) é um outro inibidor da transcriptase reversa, análogo da pirimidina sendo o único fármaco aprovado pelo FDA que tem atividade contra HIV-1, HIV-2 e hepatite B. Sua dose usual é 150 mg duas vezes ao dia. Estudos mostram que a associação de lamivudina com zidovudina reduz o avanço da doença nas doses de 150 mg + 300 mg duas vezes ao dia (CARRASCO, 2000).

Já a nevirapina (NVP) foi o primeiro inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeos (ITRNN), introduzido em 1996. Este fármaco é indicado em pacientes que tem demonstrado falência imunológica e virológica, e deve ser usado em combinação com análogos de nucleosídeos. A dose inicial deve ser de 200 mg ao dia por 14 dias e em seguida 200 mg duas vezes ao dia (CARRASCO, 2000).

Com o propósito de melhorar a conveniência do tratamento, formulações de antiretrovirais dose-fixa combinada estão amplamente sendo promovidas como regime de 1ª linha em programas de acesso ao tratamento da AIDS, proporcionando em muitos países disponibilidade de uma forma mais simples e de baixo custo resultando num tratamento mais eficaz. O sucesso desta terapia se dá principalmente em virtude do menor número de comprimidos/cápsulas administradas e conseqüentemente da maior adesão ao tratamento (HOFFMAN, 2003). Com esta proposta da dose-fixa combinada, a quantidade de comprimidos é reduzida para apenas um comprimido duas vezes ao dia. Recentemente o FDA aprovou o primeiro comprimido anti-retroviral 3 em 1, produzido

por uma empresa farmacêutica Indiana (FDA, 2006) contendo os fármacos utilizados neste desenvolvimento.

O desenvolvimento na área de ativos farmacêuticos, excipientes e equipamentos de compressão, com o passar das décadas, tem tornado a produção de comprimidos uma ciência, considerando estes a forma de dosagem mais comumente utilizada (SAM & FOKKENS, 1997; RASENACK & MULLER, 2002). A facilidade na produção, conveniência na administração, precisão na dosagem, estabilidade comparada aos líquidos orais e a segurança comparada às formas parenterais, têm feito dos comprimidos uma forma farmacêutica popular e versátil (GOHEL & JOGANI, 2005).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação estável de comprimidos revestidos dose-fixa combinada de zidovudina, nevirapina e lamivudina, cuja associação até o presente momento não é produzida nacionalmente. Selecionar o tipo de revestimento adequado para os comprimidos desenvolvidos, desenvolver o método para dissolução para controlar *in vitro* a disponibilidade dos ativos dissolvidos, em seguida transpor a escala. Identificar a embalagem primária e iniciar o estudo de estabilidade seguindo os parâmetros da RE nº 1/ 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

## **2. Materiais e Métodos**

O processo de desenvolvimento farmacotécnico foi realizado utilizando os princípios ativos zidovudina, lamivudina e nevirapina. Foram testados dois processos de fabricação: compressão direta e granulação por via úmida (ANSEL, 2000). Em ambos foram feitos estudos de planificação quali-quantitativa de diluentes utilizando-se: celulose microcristalina 250; lactose monohidratada spray-dried; amido de milho e celulose microcristalina 101. Nas formulações destinadas a compressão direta foram utilizados glicolato de amido sódico como desintegrante, dióxido de silício coloidal como deslizante e estearato de magnésio como lubrificante. À formulação para obtenção dos núcleos por via úmida, foi adicionado polivinilpirrolidona como agente agregante. Para o revestimento, foram testados os polímeros Opadry white II HP<sup>®</sup> e Instacoat Aqua Moistshield II<sup>®</sup>. Os equipamentos de produção utilizados foram: balança semi-analítica, misturador em “V”, granulador, estufa, compressora rotativa e sistema de revestimento.

Foram manipulados seis Lotes de Bancada (LB) de 250,0g, com núcleos de peso médio 800mg, sendo três por compressão direta (LB I, LB II e LB III) e três por

granulação por via úmida (LB IV, LB V e LB VI). Em seguida foram manipulados três lotes piloto de 1,2 kg com as formulações obtidas por via úmida (LP I, LP II e LP III).

O processo de manipulação da formulação para compressão direta foi realizado com a homogeneização dos ativos, o diluente e 50% do desintegrante em um misturador em “V”, durante quinze minutos. Em seguida, foram adicionados e homogeneizados por 10 minutos o estearato de magnésio e o dióxido de silício coloidal, previamente tamisado em malha 1,5 mm. Para granulação por via úmida, o processo de mistura dos ativos, diluente e agregante foi idêntico ao da compressão direta, porém a mistura obtida foi umedecida com uma dispersão hidroalcoólica de polivinilpirrolidona. A massa úmida foi granulada em malha 3 mm, e o granulado foi transferido para estufa. A secagem foi realizada a 55°C por 55 minutos. A calibração do granulado foi realizada em malha 2 mm. Ao granulado adicionou-se o estearato de magnésio, o dióxido de silício coloidal e os 50% restante do glicolato de amido. Tanto a mistura de pós quanto o granulado obtido foram comprimidos em compressora rotativa, com punção circular côncavo, 13 mm. Todo o processo de fabricação e compressão foi realizado com temperatura ambiente e umidade controladas.

Para escolha do revestimento adequado aos comprimidos produzidos, foi utilizado um placebo da formulação, no qual foram testados dois tipos de polímeros dispersos em sistemas aquosos, com ganho de peso de 4% e dispersão a 20%. Os parâmetros definidos para o processo foram: temperatura de secagem ( $38 \pm 2^\circ\text{C}$ ), rotação da drageadeira (19 rpm), distância da pistola de aspersão ao leito dos comprimidos (20 cm) e pressão de atomização (3 Bar). A eficiência do revestimento foi avaliada pelas características macroscópicas do filme polimérico e pela relação percentual entre o ganho de peso teórico e prático.

Os métodos utilizados para verificação dos testes de controle de qualidade físico-químico dos Lotes de Bancada e Piloto, seguiram os parâmetros e especificações descritas na Farmacopéia Brasileira IV, para a análise do peso médio, dureza, friabilidade e desintegração. O método utilizado para determinação do teor foi por cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvido e validado de acordo com o preconizado pela RE nº 899/2003 (ANVISA), sendo utilizado as seguintes condições cromatográficas: coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), fase móvel: tampão fosfato de potássio pH 3,0 : acetonitrila (60:40), fluxo de 1,0 mL/min, detector UV com comprimento de onda 270 nm, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura do forno 30°C e concentração média de 45, 60 e 90  $\mu\text{g/mL}$  para lamivudina, nevirapina e

zidovudina, respectivamente. Os equipamentos utilizados no controle de qualidade dos comprimidos foram: durômetro, friabilômetro, balança analítica, desintegrador, dissolutor e cromatógrafo líquido.

Para o desenvolvimento do método de dissolução foram testados como meio: água purificada, ácido clorídrico 0,1N e tampão citrato pH 5,8, com os parâmetros pá, rotação 50 rpm, volume do meio de dissolução de 900 mL, tempo 30 minutos e temperatura dos meios de 37,5°C. As concentrações analíticas utilizadas foram 33,33; 44,44 e 66,67 µg/mL para lamivudina, nevirapina e zidovudina, respectivamente. As amostras foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em condições cromatográficas semelhantes a do doseamento.

### **3. Resultados**

O desenvolvimento farmacotécnico se definiu ao longo do estudo de planificação de excipientes utilizando o processo de obtenção dos núcleos por granulação úmida. Os lotes de bancada testados (LB III, LB IV e LB V) estavam de acordo com as especificações previamente determinadas para o atendimento da etapa seguinte do processo de produção, que foi o revestimento dos núcleos. Estes lotes foram reproduzidos, aumentando-se a massa para 1,2 kg, correspondendo aos lotes piloto LP I, LP II e LP III.

Nas tabelas 4 e 5 (ANEXO I) estão descritos os resultados analíticos referentes aos lotes de bancada e lotes piloto, respectivamente.

Para o desenvolvimento da suspensão aquosa de revestimento, os resultados dentro dos parâmetros definidos (concentração da dispersão aquosa, distância da pistola, temperatura, ângulo de atomização, rotação) demonstraram que a dispersão contendo Opadry White II HP obteve a melhor performance produzindo comprimidos com superfície lisa e contínua, e ganho de peso aceitável, considerando o sistema de revestimento aberto utilizado.

Os testes para desenvolvimento do método para dissolução, realizado nos três diferentes meios (água, tampão pH 5,8 e HCl 0,1N), evidenciaram uma maior média de teor dissolvido dos fármacos utilizando como meio HCl 0,1N.

### **4. Discussão**

No método por compressão direta os comprimidos são obtidos pela compressão direta da mistura de pós dos princípios ativos e excipientes adequados. A simplicidade

do processo é evidente em comparação com as etapas que envolvem a produção de comprimidos pela granulação por via úmida, sendo, portanto o método de primeira escolha no processo de desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos (GOHEL & JOGANI, 2005).

Os adjuvantes utilizados no processo por compressão direta devem apresentar entre suas características boa fluidez, compressibilidade, coesão e tamanho de partícula equivalente às dos ativos presentes na formulação (GOHEL & JOGANI, 2005).

Na planificação quali-quantitativa das formulações aqui desenvolvidas foram testados os diluentes lactose spray-dried e celulose microcristalina 250 em diferentes proporções. Esses excipientes foram introduzidos a partir da década de 60, mudando o processo de produção de comprimidos e abrindo portas para o processo de compressão direta (GOHEL & JOGANI, 2005). A lactose spray-dried, utilizada no LB I, apresenta partículas com formato cristalino que contribuem para fluidez, coesão, compressibilidade do produto, e a parte amorfa é responsável pela melhor agregação e deformação plástica, produzindo comprimidos com dureza satisfatória e menos friáveis, características relevantes para um núcleo que será revestido. A celulose microcristalina 250 utilizada no LB II, por sua vez, confere a mistura dos pós um maior grau de fluidez, excelente compressibilidade e dureza, e elevado grau de aglutinação seca. No LB III, a associação dos dois diluentes teve como objetivo combinar e assim incrementar suas propriedades na tentativa de melhorar a performance na compressão.

Os resultados dos controles físico-químicos dos lotes de bancada produzidos por compressão direta (LB I, LB II e LB III), evidenciaram que apesar das características ideais dos excipientes utilizados, o aporte de princípios ativos na formulação de 75% em relação ao peso médio do comprimido limitou a ação destes excipientes, apresentando friabilidade excessiva, dureza inferior ao especificado (LB I, LB II e LB III) e aderência aos punções durante o processo de compressão, ocasionando uma alta variabilidade no peso dos comprimidos.

Já o método de granulação por via úmida é bastante utilizado e difundido na preparação de comprimidos principalmente pela maior probabilidade de que a granulação satisfaça todos os requisitos para a compressão de comprimidos aceitáveis (GENNARO, 2004) ou neste caso específico, núcleos para o processo de revestimento.

Na planificação quali-quantitativa dos lotes de bancada preparados por este método (LB IV, LB V e LB VI) os diluentes de escolha foram, amido e celulose microcristalina 101, excipientes bastante utilizados no processo de granulação por via

úmida (LACHMAN, 2001) e consagrados na indústria farmacêutica. Os lotes de bancada produzidos apresentaram comportamento semelhante no processo de obtenção do granulado e os núcleos atenderam as especificações definidas previamente. No processo de transposição de escala para produção de lotes piloto foi garantida a reprodutibilidade das características dos núcleos obtidas previamente com os lotes de bancada.

O sistema de revestimento baseado em solvente aquoso está sendo bastante utilizado atualmente, principalmente por apresentar significativa redução nos custos quando comparados aos solventes orgânicos. Entre as vantagens, temos a não toxicidade garantindo a segurança durante o processo para o operador e ao meio ambiente. O Opadry white II HP<sup>®</sup> e o Instacoat Aqua Moistshield II<sup>®</sup> são revestimentos gastrossolúveis utilizados em ativos higroscópicos, a base de hidroxipropilmetilcelulose, polímero solúvel em meio aquoso, que forma filme de elevada resistência e de fácil aplicação (AULTON, 2005). Por apresentar um revestimento contínuo do filme polimérico, sem a presença de rugosidades e atendendo as exigências relativas a comprimidos revestidos, o Opadry white II HP<sup>®</sup> foi o escolhido para revestir os lotes piloto.

Dando continuidade ao processo analítico dos comprimidos revestidos, foi avaliada a dissolução dos fármacos visto que é um parâmetro chave na qualidade das formas farmacêuticas sólidas (MONTEIRO, 2005). O método desenvolvido foi baseado na variação do meio de dissolução (água purificada, HCl 0,1 N e tampão pH 5,8) fixando os parâmetros de aparato (pá) e rotação (50 rpm) utilizados, encontrando-se em fase de otimização para posterior validação.

Os três lotes piloto produzidos foram acondicionados em frascos de polietileno opaco com tampa contendo sílica sendo submetidos ao estudo de estabilidade acelerada e de longa duração, seguindo os parâmetros da RE n° 1/2005 (ANVISA).

## **5. Agradecimentos**

Agradecemos ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE pelo suporte técnico e financeiro.

## 6. Referências Bibliográficas

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALLEN, Jr. L.V. *Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6ª ed. São Paulo: Editorial PREMIER, 2000. p. 215-227.

AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 444-448.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RE nº 29 de Julho de 2005 – Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. *Diário Oficial da União*, 01 de agosto de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - *Diário Oficial da União*, 02 de Junho de 2003.

CARRASCO, D. A.; STRATEN M. V. & TYRING S. K. A review of antiretroviral drugs. *Dermatologic Therapy*, 2000; 13:305-317.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ªed. São Paulo: Atheneu editora, 1988, parte I.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. U. S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <http://www.fda.gov/oia/pepfar.htm>. Acesso em: 21 de Julho, 2006.

GENNARO, A. R. *Remington – A Ciência e a Prática da Farmácia*. 20ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.887-914, 923-932.

GOHEL, M. C.; JOGANI, P. D. A review of co-processed directly compressible excipients. *J Pharm Pharmaceut Sci* [periódico on-line] 2005; 8(1): 76-93. Disponível em: <http://www.cspscanada.org>. Acesso em: 01/06/2006.

HOFFMAN C; ROCKSTROH, J.; KAMPS, B. S. HIV Therapy. *HIV Medicine*, 2003. p.163-193;

KIBBE, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3<sup>a</sup> ed. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. United States of America: 2000.

LACHMAN, L; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbekian, v2. 2001. p. 563-576.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Recomendações para Terapia Anitretroviral em Adultos e Adolescentes infectados pelo HIV*. Brasília (DF); 2006.

MONTEIRO, V. C. S. *Tecnologia de obtenção de anti-retroviral à base Mesilato de Nelfinavir*. [Dissertação] Recife: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UFPE; 2005.

RASENACK, N.; MULLER, B. W.; *Crystal Habit and Tableting Behaviour*. *Int J Pharm*. 2002; 244: 45-57.

SAM, A. P.; FOKKENS, J. G.; *Drug Delivery System: Adding Therapeutic and Economic Value to Pharmacotherapy. Part 2*. *Pharm Tech Eur*. 9: 58-56, 1997.

## **Capítulo IV**

# **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LAMIVUDINA, ZIDOVUDINA E NEVIRAPINA EM COMPRIMIDOS DOSE-FIXA COMBINADA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

*(Artigo submetido à Revista Química Nova)*

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LAMIVUDINA, ZIDOVUDINA E  
NEVIRAPINA EM COMPRIMIDOS DOSE-FIXA COMBINADA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Zênia Maria Maciel Lavra\* ; Pedro José Rolim Neto.

*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Av. Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade  
Universitária, CEP: 50740 – 521, Recife – PE, Brasil*

Rosali Maria Ferreira da Silva; Flávia Patrícia Morais de Medeiros; Leduar Guedes de Lima.

*Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE - Largo de Dois  
Irmãos, 1117, Dois Irmãos - CEP 52171 - 010 - Recife – PE*

\* pedro.rolim@pesquisador.cnpq.br

**RESUMO**

Um método analítico para quantificação de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimido revestido dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado de acordo com a Resolução RE nº 899/2003, ANVISA. Baseou-se num sistema de eluição isocrático, com fase móvel tampão fosfato de potássio pH 3,0 : acetonitrila (60:40 v/v), coluna C18, 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm, λ 270 nm. Os resultados obtidos, tratados estatisticamente, provaram que o método é seletivo, específico, preciso, exato e robusto, garantindo a segurança analítica do doseamento de 3TC, AZT e NVP, que surge como nova alternativa terapêutica para o tratamento antiretroviral.

**Palavras-chave:** Dose-fixa combinada; validação; CLAE

## **INTRODUÇÃO**

A introdução da terapia combinada tem reduzido a morbidade e mortalidade de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Fármacos de várias classes têm sido associados na forma de dose-fixa combinada (DFC). Um dos mais potentes regimes terapêuticos inclui dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), como a zidovudina (AZT) e a lamivudina (3TC), e um não análogo (ITRNN), a nevirapina (NVP)<sup>1</sup>.

A produção de comprimidos DFC como nova alternativa terapêutica, exige o desenvolvimento e validação de um método analítico que atenda as especificações dos órgãos reguladores, haja vista a ausência de métodos publicados em compêndios oficiais para quantificação destes fármacos associados.

A validação de um método assegura a especificidade, linearidade, exatidão, sensibilidade e precisão de um ensaio analítico e estima a estabilidade do analito durante a estocagem e manipulação<sup>2</sup>, tendo como objetivo garantir que o procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado<sup>3</sup>.

Técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destacam na química analítica pela capacidade de realizar análises quali-quantitativas em amostras farmacêuticas<sup>4</sup>, sendo frequentemente utilizada para determinação de fármacos em formulações farmacêuticas, especialmente nas que contêm mais de um constituinte ativo<sup>1</sup>.

Este estudo descreve o desenvolvimento e validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para detecção e quantificação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos revestidos DFC, atendendo as exigências do guia para validação de métodos analíticos publicado na Resolução RE nº 899/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>5</sup>.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Materiais**

#### *Medicamento*

Comprimidos revestidos desenvolvidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE, contendo 300 mg de zidovudina, 150 de lamivudina e 200 mg de nevirapina.

#### *Padrões de trabalho*

Para o desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento do comprimido revestido foram utilizados padrões de trabalho de zidovudina (Ítaca® lote HVZ0210304 – teor 100,0%), lamivudina (Northeast® lote 00019 – teor 100,47%) e nevirapina (Xiamem Mchem® lote 050501 – teor 98,32%).

#### *Excipientes*

Celulose microcristalina 101 (Valdequímica®), amido de milho (Cargill®), glicolato de amido sódico (Blanver®), dióxido de silício coloidal (Degussa®) polivinilpirrolidona (Forlab®), estearato de magnésio (Labsynth®) e constituintes do revestimento: hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico, talco e dióxido de titânio (Colorcon®).

#### *Reagentes*

Acetonitrila grau CLAE(J. T. Baker®); fosfato de potássio monobásico P. A. (Nuclear®); ácido fosfórico 85% (Merck®) e água ultra-pura obtida por sistema Milli-q-Plus (Millipore Corporation®).

### **Equipamentos e condições cromatográficas**

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu® equipado com bomba binária LC – 10ADVP, auto-injetor SIL – 10ADVP, detector UV SPD – 10 AVP, controlador de sistema SCL – 10 AVP e forno para coluna CTO – 10ASVP. As colunas utilizadas neste estudo foram: coluna C 8 (Waters®), 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm e C-18 (Phenomenex®), 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm, mantida a 30°C. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila em diferentes proporções.

Foram utilizadas vidrarias (Pyrex®) certificadas por lote e equipamentos previamente qualificados e certificados: sistema de purificação de água Milli-Q-Plus (Millipore Corporation®); aparelho de Ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique®); balança

analítica (Mettler®); unidades filtrantes de 0,45 µm (Millex Millipore®) e espectrofotômetro UV (Cary 50 Varian®).

## **Método**

### ***Desenvolvimento do método analítico***

O desenvolvimento do método teve início com a realização de uma varredura espectrofotométrica na região do UV visível, numa faixa de 200 a 800 nm, do padrão misto contendo os três fármacos em estudo, objetivando-se identificar em qual comprimento de onda os três fármacos associados apresentavam valores de absorvâncias máximos.

Após realização de pesquisas referente a métodos de análises para quantificação de antiretrovirais, já descritos em farmacopéias<sup>5,6</sup> e em artigos científicos<sup>2,7,8</sup>, foram testadas variações, avaliando-se os seguintes parâmetros: fase estacionária (C8 e C 18); fase móvel, modificando-se as proporções do tampão fosfato de potássio monobásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e acetonitrila (ACN); fluxo (1,0 e 1,5 mL/min) e volume de injeção (10,0 e 20,0 µL).

A partir dos cromatogramas obtidos, avaliou-se a adequação do sistema cromatográfico, através dos parâmetros: fator de capacidade, número de pratos teóricos, fator de cauda e resolução entre os picos.

### ***Preparação da solução tampão fosfato pH 3,0***

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se 7,09 g de fosfato de potássio monobásico em água ultra-pura para cada 1000 mL. O ajuste do pH foi realizado com ácido fosfórico 85%.

### ***Preparação das amostras***

Os comprimidos revestidos DFC foram pesados, triturados e pulverizados. O equivalente a 37,5 mg de 3TC, 75 mg de AZT e 50 mg de NVP foi pesado analiticamente, transferido para balão volumétrico de 100 mL, diluído em fase móvel e sonificado por 20 minutos. As amostras foram filtradas em papel de filtro faixa-preta (Schleicher & Scheuell®). Do filtrado retirou-se alíquota volumétrica e se diluiu com fase móvel até obtenção da concentração final de 45, 90 e 60 µg/mL de 3TC, AZT e

NVP, respectivamente. As soluções obtidas foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45 µm (Millex Millipore®) e analisadas por CLAE. Foram preparadas amostras em quintuplicatas.

#### *Preparação da curva controle*

As curvas controle foram preparadas diariamente a partir de diluições de uma solução estoque do padrão misto em fase móvel (375 µg/mL de 3TC, 750 µg/mL de AZT e 500 µg/mL de NVP), obtendo-se concentrações de 30, 45 e 75 µg/mL para 3TC, 60, 90 e 150 µg/mL para AZT e 40, 60 e 100 µg/mL para NVP, referentes as concentrações mínima, média e máxima.

#### *Validação do método analítico*

##### *Condições cromatográficas*

O método de separação cromatográfica desenvolvido capaz de quantificar os comprimidos revestidos foi alcançado com sistema de eluição isocrático, em coluna de fase reversa C18, 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm, a uma temperatura de 30°C. A fase móvel foi constituída de 60% de tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,0 e 40% de acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O comprimento de onda selecionado foi 270 nm.

##### *Parâmetros avaliados*

O método proposto foi validado seguindo os parâmetros de linearidade, robustez, faixa de variação, precisão, exatidão, especificidade e limites de detecção e de quantificação de cada princípio ativo, especificados na Resolução RE nº 899/2003<sup>5</sup>.

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas do padrão misto nas concentrações de 30; 37,5; 45; 60 e 75 µg/mL para 3TC; 60; 75; 90; 120 e 150 µg/mL para AZT e 40; 50; 60; 80 e 100 µg/mL para NVP. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente sendo avaliados por intermédio do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O intervalo de variação testado foi entre 66 e 166% da concentração média dos três fármacos.

No parâmetro robustez foi analisada a possível influência de pequenas variações ocasionadas pela alteração na proporção da composição da fase móvel, no fluxo, na temperatura do forno, no tempo de sonicação para preparação das amostras e em três

diferentes lotes da coluna utilizada como fase estacionária. Na variação da proporção da fase móvel, foram realizadas análises com tampão fosfato de potássio monobásico : acetonitrila nas proporções de 62 : 38 (v/v); 60 : 40 (v/v); e 58 : 42 (v/v). Em relação ao fluxo, a variação analisada foi de 0,99; 1,00 e 1,01 mL/min. A variação do tempo de sonicação testado para preparação das amostras foi de 15, 20 e 25 minutos. Para a temperatura do forno, foram avaliadas as variações de 28, 30 e 32°C.

A especificidade e seletividade do método foi determinada pela análise do placebo dos comprimidos revestidos contendo amido, celulose microcristalina 101, polivinilpirrolidona, glicolato de amido sódico, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio componentes do núcleo, e HPMC, PEG, álcool polivinílico, talco e dióxido de titânio componentes do revestimento.

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas). Para a repetitividade, replicatas de 6 determinações a 100% da concentração teste dos fármacos associados foram analisadas. Já para precisão intermediária, 5 replicatas foram analisadas em dias diferentes e por analistas diferentes.

Para avaliar a exatidão do método amostras em concentrações conhecidas equivalentes a 66, 100 e 166 % da concentração teórica analisada para cada fármaco, foram testadas, as quais correspondem a concentração mínima, média e máxima, respectivamente.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações  $LD = DP \times 3 / IC$  e  $LQ = DP \times 10 / IC$ , onde: DP é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtido com as três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas.

## **Resultados e Discussão**

### *Desenvolvimento do Método Analítico*

As condições para o método cromatográfico foram primeiramente estabelecidas com o padrão misto de 3TC, AZT e NVP e após otimização dos parâmetros foram aplicadas para o doseamento do comprimido revestido DFC.

A varredura espectrofotométrica realizada para verificação do comprimento de onda adequado (figura 6 – ANEXO II) demonstrou que a associação de fármacos

apresentava absorvância significativa em 270 nm, sendo confirmado por análise cromatográfica em detector de arraste de fotodiodo.

Por apresentar os três picos simétricos, com boa resolução entre eles e áreas bem definidas, a fase estacionária escolhida para o doseamento foi a coluna C18 (Phenomenex®).

Sob as condições experimentais verificadas, descritas na tabela 6 (ANEXO III), o método 2 foi o escolhido por apresentar melhor resolução entre os picos, condições ideais para conservação da coluna e tempos de retenção de 2,4 minutos para lamivudina; 3,4 minutos para zidovudina e 4,6 minutos para nevirapina (figura 7), adequadas para rotina de análise na indústria farmacêutica. A temperatura selecionada foi de 30°C por ser percebido em rotina de análise, a maior facilidade de estabilização para o equipamento. O volume de injeção e o fluxo selecionados foram 20 µL e 1,0 mL/min., respectivamente.

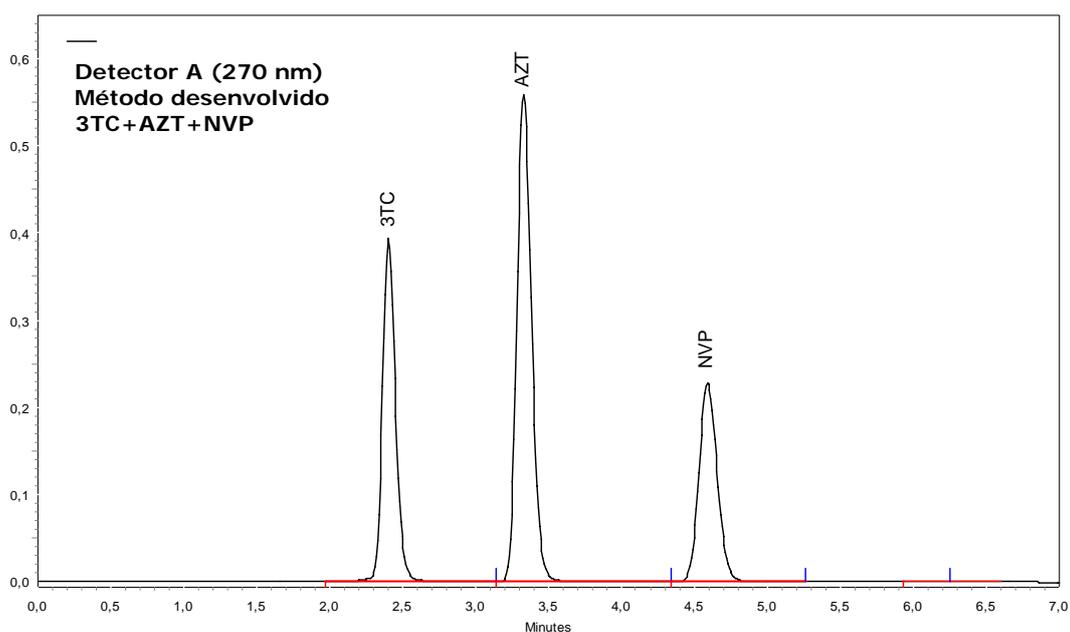


Figura 7: Cromatograma referente ao método analítico (método 2) para quantificação de lamivudina (45 µg/mL), zidovudina (90 µg/mL) e nevirapina (60 µg/mL) em comprimido revestido dose-fixa-combinada.

A performance do sistema cromatográfico escolhido foi avaliada de acordo com os parâmetros: fator de capacidade, resolução entre os picos, fator de cauda e número de pratos teóricos. A resolução entre os picos mede a qualidade da separação entre eles, quanto mais distantes, melhor a separação e mais segura é a quantificação. Os valores da resolução entre os picos dos fármacos foram superiores a 2,0, indicando separação

eficaz entre os mesmos. O fator de cauda por se apresentar próximo da unidade, indica simetria dos picos. O número de pratos teóricos diz respeito a eficiência da coluna, devendo ser superior a 2000<sup>4</sup>. Os valores obtidos para os parâmetros de performance do sistema cromatográfico estão descritos na tabela 7 (ANEXO III).

### **Validação do método analítico**

Os resultados obtidos da avaliação dos parâmetros foram tratados estatisticamente por Análise de Variância *one-way* (ANOVA) e teste *t de Student*<sup>11</sup>, com nível de significância de 95%.

#### *Robustez*

Um método robusto tem a habilidade de fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças<sup>10</sup>. Para todas as modificações analisadas na robustez, os resultados obtidos dispostos nas tabelas 8, 9, 10, 11 e 12 (ANEXO III), foram tratados estatisticamente por ANOVA *one-way* e os valores do F calculado para todas as variações foram inferiores ao do F tabelado, não sendo evidenciadas diferenças estatisticamente significativa, com 95% de confiança, indicando que o método é robusto, conforme tabela 13 (ANEXO III).

#### *Lineridade e Intervalo de Variação*

A linearidade de um método demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo especificado<sup>5</sup>. As áreas obtidas no intervalo de concentração analisado demonstraram que o resultado é linear, apresentando as seguintes equações da reta:  $y = 52812,31 (\pm 2205,359)x + 119560 (\pm 114832,3)$  para 3TC;  $y = 42449,57 (\pm 1470,171)x + 164932,9 (\pm 153102,6)$  para AZT e  $y = 32655,38 (\pm 1117,988)x + 47994,81 (\pm 77617,68)$  para NVP, correlacionando as concentrações de cada fármaco (x) e as áreas dos picos (y) obtidas nos cromatogramas. Os coeficientes de correlação obtidos para 3TC, AZT e NVP foram:  $r^2 = 0,9968$ ;  $r^2 = 0,9978$  e  $r^2 = 0,9978$ , respectivamente, indicam uma correlação linear entre as variáveis aleatórias x e y. Portanto, o método é linear em concentrações compreendidas entre 30 e 75 µg/mL para 3TC, 60 e 150 µg/mL para AZT e 40 e 100 µg/mL para NVP (figuras 8, 9 e 10 – ANEXO II). Finalizando a avaliação da linearidade do método, foi calculado o LD e LQ referente a cada fármaco,

obtendo-se os valores LD = 1,1153 µg/mL e LQ = 1,6898 µg/mL para 3TC; LD = 1,5376 e LQ = 2,3298 para AZT e LD = 2,0025 e LQ = 3,0341 para NVP.

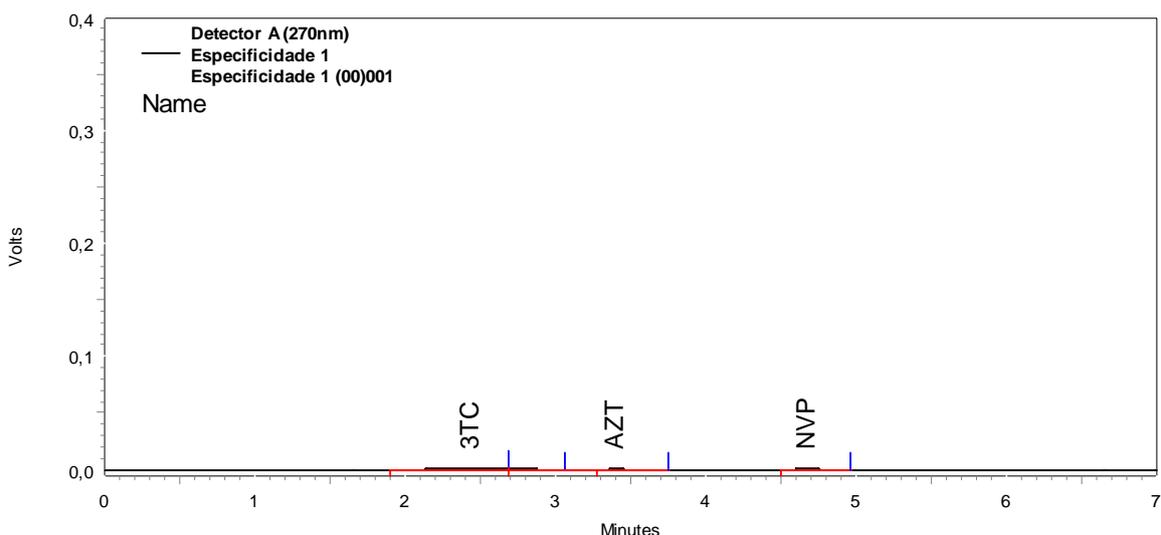
#### *Precisão e Exatidão*

O método apresentou-se preciso nos dois níveis analisados. Na repetitividade, as seis amostras autênticas com concentração de 100%, apresentaram desvio padrão relativo (RSD) inferior a 2% para os três fármacos, descritos na tabela 14 (ANEXO III). Para a precisão intermediária, testada entre dias e analistas diferentes (tabelas 15 e 16 – ANEXO III), não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre analistas e dias, empregando-se o teste *t de Student*, visto que o *t* calculado foi inferior ao tabelado, com 95% de confiança (tabela 17 – ANEXO III).

Na exatidão, empregando-se o teste *t de Student* (tabela 18 – ANEXO III), também foi confirmado que com 95% de confiança, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos e os esperados.

#### *Especificidade*

O método proposto demonstrou ser seletivo e específico, não sendo afetado pelos excipientes utilizados no processo de fabricação do comprimido revestido, o que pôde ser confirmado pela ausência de absorvâncias nos tempos de retenção dos picos referentes aos três fármacos, visualizado na figura 11.



**Figura 11:** Especificidade do método com comprimido revestido placebo.

## **Conclusão**

O método descrito neste trabalho foi desenvolvido a fim de se disponibilizar um procedimento analítico para quantificação desta associação de fármacos antiretrovirais em comprimidos revestidos dose-fixa-combinada, haja vista a inexistência de métodos oficiais destinados a este doseamento. É um método simples, apresentando a confiabilidade e segurança necessária em procedimentos analíticos. Os parâmetros verificados garantiram que ele é robusto, exato, preciso e específico para a quantificação da forma farmacêutica contendo a associação de lamivudina, zidovudina e nevirapina, apresentando-se, portanto validado conforme a RE 899/2003, ANVISA e sendo recomendado para a rotina de análises de controle de qualidade na indústria farmacêutica, atendendo as Boas Práticas de Laboratório.

### **Referências Bibliográficas**

1. PANCHAGNULA, R.; KHANDAVILLI, S.; KAPOOR, N. **Simultaneous determination of lamivudine, stavidine and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography.** *Analytica Chimica Acta* 570 (2006). p. 41-45.
2. TIDWELL, R. R.; PEREIRA, A. S.; **Separation methods for nucleoside analogues used for treatment of HIV-1 infection.** *Journal of Chromatography B.* 764 (2001) p. 327-347.
3. MATIOLI, G.; SOMMER, W. A.; VALENTINI, S. R.; **Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril – comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade.** *Acta Scientiarum. Health Sciences.* v. 16. n° 2. Maringá, 2004. p. 357 – 364.
4. JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G.; RIBANI, M.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química Nova*, v. 27, n° 5, p. 771-78. 2004.
5. ANVISA, Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003 (DOU 02/06/03) – **Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos** - Ministério da Saúde.
6. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ªed. São Paulo: Atheneu editora, 1988.
7. UNITED STATES PHARMACOPEIA, 28 ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2005.
8. DOERGE, D. R.; BELAND, F. A.; VON TUNGELN, L. S.; WILLIAMS, L. D.; **Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of the metabolism and disposition of the anti-retroviral nucleoside analogs zidovudine and lamivudine in C57BL/6N and B6C3F1 mice.** *Journal of Chromatography B.* 798 (2003) p. 55-62.

9. MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R.; AGRAWAL, H. KAUL, M.; **HTPLC method for determination of nevirapine in pharmaceutical dosage form.** *Talanta* 62. (2004). p. 843-852.

10. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L.; *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.* São Carlos: Ed. UFSCAR, 2001.

11. KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; PRADO, M. S. A.; STEPPE, M.; SANTORO, M. I. R. M. **Métodos estatísticos empregados para comparação de métodos analíticos.** *Revista Brasileira de Farmácia* 83 (1/4): p. 69-79. 2002.

## **CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÕES FINAIS**

O processo de obtenção tecnológica engloba desde a caracterização dos princípios ativos, desenvolvimento farmacotécnico, verificação da qualidade do produto obtido e realização do estudo de estabilidade, etapas seguidas na realização deste estudo.

Formulações dose-fixa combinada surgem como uma alternativa terapêutica eficaz, reduzindo o número de comprimidos administrados e aumentando a adesão ao tratamento.

A caracterização dos princípios ativos utilizados no desenvolvimento além de garantir a qualidade dos mesmos foi parte integrante do processo de certificação destes e qualificação dos fornecedores.

Os comprimidos revestidos dose-fixa-combinada de zidovudina, lamivudina e nevirapina foram obtidos com sucesso, viabilizando a produção desta associação ainda inédita no Brasil.

O processo de validação do método analítico destinado à quantificação dos fármacos nesta associação tríplice garantiu que o mesmo é robusto, preciso e exato, dentro do intervalo de variação no qual os comprimidos foram analisados.

## **PERSPECTIVAS**

## **PERSPECTIVAS**

- ☆ Realização de estudos termo-analíticos e outros ensaios de caracterização das matérias-primas, visando a certificação das mesmas e qualificação dos fornecedores dos antiretrovirais.
  
- ☆ Otimização e validação do método desenvolvido para **teste de dissolução** do comprimido revestido dose-fixa combinada.
  
- ☆ Acompanhamento do estudo de estabilidade acelerada e de longa duração para conclusão do processo de obtenção do novo produto farmacêutico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H.C. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª ed. Baltimore: Editorial PREMIER, 2000.

AULTON, M. E, *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 444-448.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RE n° 29 de Julho de 2005 – Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. *Diário Oficial da União*, 01 de agosto de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RE n° 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - *Diário Oficial da União*, 02 de Junho de 2003.

BRASIL, Resolução RDC n° 210, de 04 de Agosto de 2003 (DOU 14/08/03) - *Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos* - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA .

CAMPOS, L. M. M.; SOARES, C. D. V.; NUNAN, E. A.; PIANETTI, G. A.; LAGES, G. P.; SILVA, G. S. **Determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos, por cromatografia líquida de alta eficiência**. *Química Nova*. Vol. 29, n° 6, 2006.

CARRASCO, D. A.; STRATEN, M. V. & TYRING S. K. **A review of antiretroviral drugs**. *Dermatologic Therapy*, Vol. 13, 305-317p; U.S.A.; 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ªed. São Paulo: Atheneu editora, 1988, parte I.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ªed. São Paulo: Atheneu editora, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ªed. São Paulo: Atheneu editora, 2002.

GENNARO, A. R. Remington – A Ciência e a Prática da Farmácia. 20<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.502 -503.

GRANGEIRO JR, S. *Desenvolvimento Farmacotécnico, Validação da Metodologia Analítica, Estudo de Estabilidade e Equivalência Farmacêutica da Nevirapina* Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife. 2002.

RV 024 LAFEPE; Relatório de Validação para Metodologia Analítica de zidovudina matéria-prima. Revisão A. 2003.

SANTIN, M. R. *Introdução a Qualificação de Fornecedores. Perspectivas de Aplicação à Indústria de Medicamentos*. Infarma, v. 16, nº 11-12, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS) UNAIDS. Joint united nations programme on aids (uniaids) / (OMS) Aids. Epidemic update - special report on hiv prevention, Dezembro, 2005.

# **ANEXOS**

**ANEXO I. Capítulo III** – Desenvolvimento farmacotécnico industrial do comprimido revestido dose-fixa combinada de zidovudina 300 mg + lamivudina 150 mg + nevirapina 200 mg

**Tabela 4:** Resultados analíticos dos lotes de bancada LB I, LB II, LB III (Compressão direta), LB IV, LB V e LB VI (Granulação por via úmida).

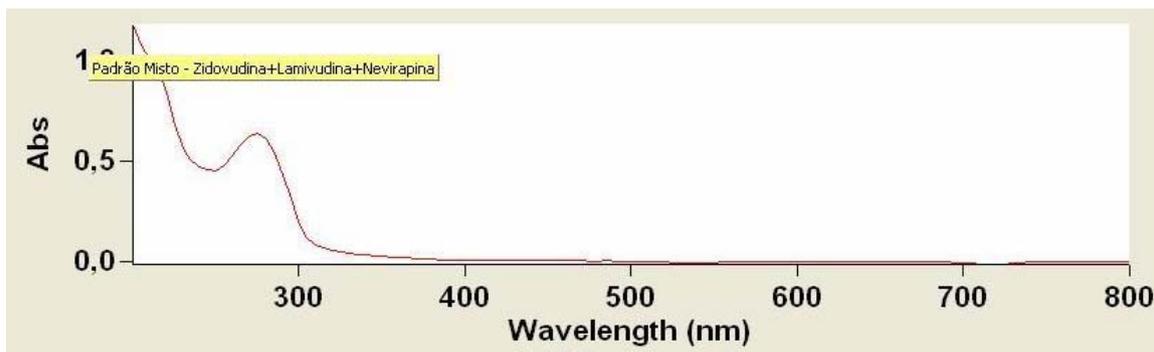
Testes	Especificação	LB I	LBII	LB III	LB IV	LB V	LB VI
		Compressão Direta			Granulação por Via Úmida		
<b>Descrição</b>	Comprimido circular, de cor branca	Não atende	Não atende	Não atende	De acordo	De acordo	De acordo
<b>Peso médio</b>	800 mg ± 5%	816,80	773,60	779,25	808,20	805,50	800,10
<b>Friabilidade</b>	Máximo de 2,0%	3,09	3,51	3,56	0,16	0,12	0,34
<b>Desintegração</b>	Máximo 30'	1'25"	1'33"	1'36"	1'13"	1'35"	1'29"
<b>Dureza</b>	> 8,0 kgf/cm <sup>2</sup>	6,0	3,3	4,82	12,54	14,04	13,96
		-	-	-	<b>3TC</b> -100,99%	<b>3TC</b> -99,21%	<b>3TC</b> -97,51%
<b>Teor</b>	90 a 110%				<b>AZT</b> -97,50%	<b>AZT</b> -98,51%	<b>AZT</b> -98,97%
					<b>NVP</b> -98,49%	<b>NVP</b> -97,87%	<b>NVP</b> -99,57%

**Tabela 5:** Resultados analíticos dos lotes piloto LP I, LP II e LP III (Granulação por via úmida).

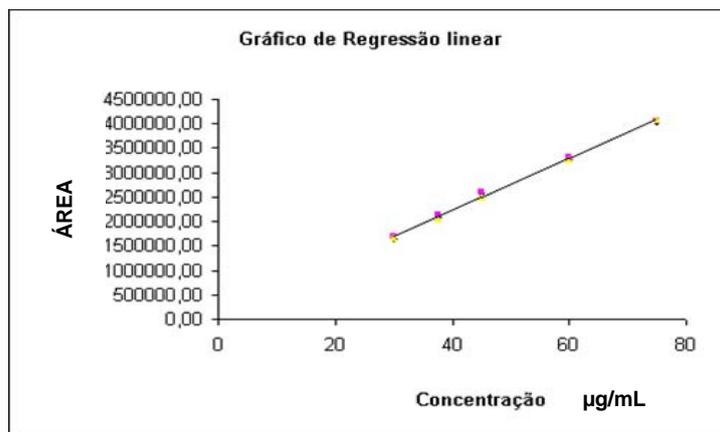
Testes	Especificação	LP I	LP II	LP III
<b>Descrição</b>	Comprimido circular, revestido, de cor branca	De acordo	De acordo	De acordo
<b>Peso médio</b>	832 mg ± 5%	805,18	834,04	829,36
<b>Desintegração</b>	Máximo 30'	2'47"	3'10"	3'00"
<b>Dureza</b>	> 8,0 kgf/cm <sup>2</sup>	20,41	20,38	21,80
		<b>3TC</b> - 97,73%	<b>3TC</b> - 99,32%	<b>3TC</b> - 97,20%
<b>Teor</b>	90 a 110%	<b>AZT</b> - 99,45%	<b>AZT</b> - 99,33%	<b>AZT</b> - 98,70%
		<b>NVP</b> - 98,25%	<b>NVP</b> - 100,93%	<b>NVP</b> - 97,63%
<b>Dissolução</b>	> 80% em 30 min.	<b>3TC</b> – 96,96%	<b>3TC</b> – 98,49%	<b>3TC</b> – 97,12%
	em HCl 0,1 N	<b>AZT</b> - 99,06%	<b>AZT</b> – 98,55%	<b>AZT</b> – 99,02 %
		<b>NVP</b> - 97,85%	<b>NVP</b> – 99,01%	<b>NVP</b> – 98,04%

**ANEXO II. Capítulo IV** – Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos revestidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência.

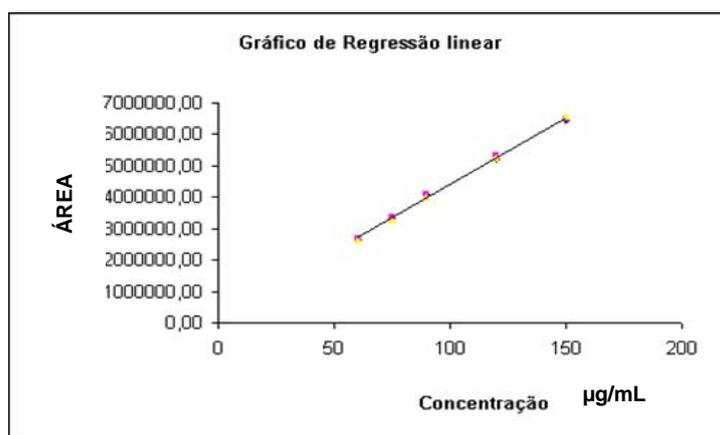
**FIGURAS**



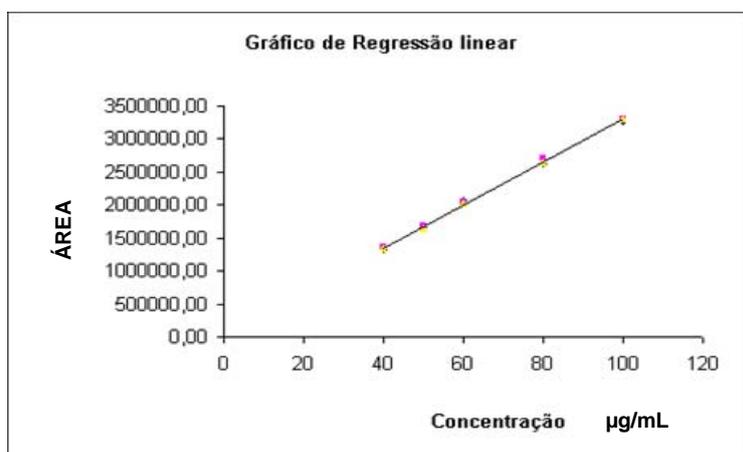
**Figura 6:** Varredura espectrofotométrica do padrão misto contendo 3TC, AZT e NVP.



**Figura 8:** Curva de linearidade referente ao fármaco lamivudina



**Figura 9:** Curva de linearidade referente ao fármaco zidovudina



**Figura 10:** Curva de linearidade referente ao fármaco nevirapina

**ANEXO III – Capítulo IV:** Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos revestidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência.

## TABELAS

**Tabela 6:** Resultados dos testes para o desenvolvimento do método analítico para quantificação de 3TC, AZT e NVP.

Parâmetros	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
<b>Fase móvel</b>	60 : 40	60 : 40	25 : 75	75 : 25	60 : 40	60 : 40
<b>Fase estacionária</b>	C8	C18	C18	C18	C18	C18
<b>Fluxo (mL/min.)</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5
<b>Tempo de retenção (min.)</b>						
<b>3TC</b>	2,4	2,4	2,4	2,8	2,3	1,6
<b>AZT</b>	3,4	3,4	2,7	5,0	2,9	1,9
<b>NVP</b>	4,6	4,8	3,1	10,1	3,4	2,3
<b>Volume de injeção(µL)</b>	20	20	20	20	10	20
<b>Resultado</b>	Picos com assimetria caudal	Boa resolução entre os pico e áreas reprodutíveis	Não houve separação dos picos	Tempo de retenção alto para rotina de análise	Áreas não reprodutíveis	Picos muito próximos

**Tabela 7:** Parâmetros cromatográficos para verificação da performance do sistema utilizando o método 2.

PARÂMETROS	3TC	AZT	NVP
<b>Número de pratos teóricos</b>	3330,56	4927,21	5828,60
<b>Fator de capacidade</b>	2,19	3,46	5,17
<b>Fator de cauda</b>	1,30	1,24	1,19
<b>Resolução</b>	-	5,46	6,70

**Tabela 8:** Resultados da análise de robustez com relação à variação da proporção da fase móvel com as concentrações de 45 µg/mL para 3TC, 90 µg/mL para AZT e 60 µg/mL para NVP.

Proporção de tampão fosfato pH 3,0 : Acetonitrila		Concentração (µg/mL)					Média	RSD%
		1	2	3	4	5		
58 : 42	3TC	47,42	46,06	46,00	47,24	47,32	46,83	1,56
	AZT	93,25	92,84	93,14	92,71	93,90	93,17	0,50
	NVP	62,29	62,71	64,47	63,33	64,59	63,48	1,62
60 : 40	3TC	46,48	46,51	46,88	45,71	47,35	46,59	1,29
	AZT	94,39	92,00	92,25	94,35	92,65	93,13	1,24
	NVP	63,21	62,06	62,74	63,25	62,06	62,66	0,94
62 : 38	3TC	46,95	45,81	47,09	47,67	46,18	46,74	1,59
	AZT	93,43	92,64	92,77	93,35	93,52	93,14	0,44
	NVP	63,85	62,40	63,39	63,91	62,90	63,29	1,01

**Tabela 9:** Resultados da análise de robustez com relação à variação do fluxo com as concentrações de 45 µg/mL para 3TC, 90 µg/mL para AZT e 60 µg/mL para NVP.

Fluxo (mL/min)		Concentração (µg/mL)					Média	RSD%
		1	2	3	4	5		
0,99	3TC	45,21	45,84	44,27	43,96	44,58	44,77	1,69
	AZT	89,31	91,25	89,08	88,79	89,06	89,50	1,11
	NVP	59,51	60,26	59,70	59,53	59,58	59,72	0,52
1,00	3TC	43,72	43,87	44,33	44,18	44,11	44,04	0,56
	AZT	89,72	89,06	89,77	89,17	88,77	89,30	0,49
	NVP	58,35	58,95	60,04	58,91	58,59	58,97	1,10
1,01	3TC	43,89	44,55	43,80	44,29	44,39	44,18	0,73
	AZT	87,20	89,01	87,74	89,16	88,93	88,41	1,00
	NVP	58,07	58,97	58,61	60,38	59,49	59,10	1,49

**Tabela 10:** Resultados da análise de robustez com relação à variação do tempo de sonicação da amostra com as concentrações de 45 µg/mL para 3TC, 90 µg/mL para AZT e 60 µg/mL para NVP.

Tempo de sonicação da amostra (min)		Concentração (µg/mL)					Média	RSD%
		1	2	3	4	5		
15	3TC	44,26	44,58	44,85	44,10	43,46	44,25	1,19
	AZT	90,81	88,77	88,37	89,70	88,59	89,24	1,13
	NVP	60,26	59,50	59,44	58,97	59,13	59,46	0,84
20	3TC	43,72	43,87	44,33	44,18	44,11	44,04	0,56
	AZT	87,29	87,06	87,88	87,17	89,77	87,83	1,28
	NVP	60,04	58,95	58,60	58,91	58,59	59,02	1,01
25	3TC	44,74	43,58	43,92	44,59	44,19	44,20	1,08
	AZT	86,67	87,63	89,11	88,98	88,59	88,20	1,17
	NVP	58,75	58,99	59,56	59,96	59,68	59,39	0,85

**Tabela 11:** Resultados da análise de robustez com relação à variação da temperatura com as concentrações de 45 µg/mL para 3TC, 90 µg/mL para AZT e 60 µg/mL para NVP.

Temperatura (°C)		Concentração (µg/mL)					Média	RSD%
		1	2	3	4	5		
28	3TC	45,19	44,99	44,38	44,88	45,74	45,04	1,10
	AZT	91,01	89,82	90,16	90,34	91,09	90,48	0,61
	NVP	61,41	60,40	61,70	60,33	61,63	61,09	1,10
30	3TC	44,79	44,81	43,99	44,28	44,79	44,53	0,85
	AZT	90,18	90,02	89,69	90,00	91,15	90,21	0,62
	NVP	60,48	60,30	60,73	60,75	61,04	60,66	0,47
32	3TC	45,73	45,59	44,25	44,19	45,07	44,97	1,61
	AZT	91,57	91,01	90,16	90,34	91,09	90,83	0,64
	NVP	61,58	60,50	61,75	60,70	61,36	61,18	0,90

**Tabela 12:** Resultados da análise de robustez com relação aos diferentes lotes da coluna Phenomenex® com as concentrações de 45 µg/mL para 3TC, 90 µg/mL para AZT e 60 µg/mL para NVP.

Número do lote		Concentração (µg/mL)					Média	RSD%
		1	2	3	4	5		
228954-7	3TC	43,74	43,82	43,55	43,84	45,17	44,02	1,48
	AZT	89,73	89,70	89,77	88,03	88,94	89,23	0,85
	NVP	60,88	60,88	60,21	59,93	59,33	60,25	1,10
160140	3TC	45,15	45,03	43,62	44,01	43,99	44,36	1,55
	AZT	89,48	88,33	89,56	90,05	90,19	89,52	0,82
	NVP	59,68	59,03	60,39	60,38	60,36	59,97	1,01
330738-3	3TC	43,96	44,21	44,81	44,36	44,09	44,29	0,74
	AZT	88,61	88,99	89,79	88,55	88,13	88,81	0,70
	NVP	59,80	59,82	60,87	59,61	60,22	60,06	0,84

**Tabela 13:** Resultados da ANOVA para verificação da robustez do método.

Parâmetros	Fármacos	F calculado	F tabelado
Proporção da fase móvel	3TC	0,137	3,885
	AZT	0,003	
	NVP	1,503	
Fluxo	3TC	3,041	
	AZT	3,347	
	NVP	1,837	
Tempo de sonicação	3TC	0,312	
	AZT	2,321	
	NVP	0,978	
Temperatura	3TC	1,229	
	AZT	1,554	
	NVP	1,388	
Lotes da coluna cromatográfica	3TC	0,461	
	AZT	2,818	
	NVP	0,284	

**Tabela 14:** Resultados analíticos da repetitividade do método

	Concentração						Média	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
<b>3TC</b>	44,79	44,81	43,95	43,36	44,28	44,79	44,33	1,33
<b>AZT</b>	90,18	90,02	89,68	89,07	90,00	91,15	90,02	0,76
<b>NVP</b>	61,44	60,48	60,30	60,73	60,75	61,04	60,79	0,67

**Tabela 15:** Resultados analíticos da precisão intermediária – 1º Dia

Analistas		Concentração (µg/mL)					Média	%RSD
		1	2	3	4	5		
<b>I</b>	<b>3TC</b>	44,79	43,95	43,36	43,99	44,28	44,07	1,18
	<b>AZT</b>	90,18	90,02	89,69	90,00	91,15	90,21	0,62
	<b>NVP</b>	61,44	60,48	60,30	60,73	59,93	60,58	0,93
<b>II</b>	<b>3TC</b>	44,39	44,00	44,53	44,43	44,16	44,30	0,49
	<b>AZT</b>	91,61	90,13	91,03	91,13	90,29	90,84	0,68
	<b>NVP</b>	61,43	61,25	60,81	61,90	60,07	61,09	1,13

**Tabela 16:** Resultados analíticos da precisão intermediária – 2º Dia

Analistas		Concentração					Média	%RSD
		1	2	3	4	5		
<b>I</b>	<b>3TC</b>	43,96	44,21	44,81	44,36	44,09	44,29	0,74
	<b>AZT</b>	90,61	90,99	89,79	90,56	88,72	90,13	1,00
	<b>NVP</b>	59,80	59,82	60,87	61,34	60,22	60,41	1,12
<b>II</b>	<b>3TC</b>	44,70	44,14	44,79	44,05	43,71	44,28	1,03
	<b>AZT</b>	90,51	89,29	90,22	90,65	91,10	90,35	0,75
	<b>NVP</b>	60,89	60,63	60,64	60,81	61,32	60,86	0,46

**Tabela 17:** Resultados do teste *t de Student* para verificação da precisão intermediária do método.

	<i>t</i> calculado	<i>t</i> tabelado
<b>1º dia – Analistas 1 e 2</b>	<b>3TC</b>	0,911
	<b>AZT</b>	1,697
	<b>NVP</b>	1,277
<b>2º dia - Analistas 1 e 2</b>	<b>3TC</b>	0,040
	<b>AZT</b>	0,437
	<b>NVP</b>	1,373
<b>Analista 1 – 1º e 2º dias</b>	<b>3TC</b>	0,799
	<b>AZT</b>	0,169
	<b>NVP</b>	0,431
<b>Analista 2 – 1º e 2º dias</b>	<b>3TC</b>	0,088
	<b>AZT</b>	1,199
	<b>NVP</b>	0,688

**Tabela 18:** Resultados do teste *t de Student* para verificação da exatidão do método.

<b>Concentração</b>		<b>t calculado</b>	<b>t tabelado</b>
<b>66%</b>	<b>3TC</b>	0,449	
	<b>AZT</b>	0,175	
	<b>NVP</b>	0,815	
<b>100%</b>	<b>3TC</b>	0,908	
	<b>AZT</b>	0,850	2,776
	<b>NVP</b>	1,771	
<b>166%</b>	<b>3TC</b>	1,353	
	<b>AZT</b>	1,554	
	<b>NVP</b>	2,115	