



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO MULTIDISCIPLINAR UFRJ-MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



**CARACTERÍSTICAS, PROPRIEDADES E MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ATAZANAVIR: UMA REVISÃO**

JULIA CAVALCANTE FARIA

Macaé-RJ
Dezembro de 2020

JULIA CAVALCANTE FARIA

**CARACTERÍSTICAS, PROPRIEDADES E MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ATAZANAVIR: UMA REVISÃO**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Maximiliano da Silva Sangoi

COORIENTADOR: Prof. Dr. Vítor Todeschini

Macaé-RJ

Novembro de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

F224

Faria, Júlia Cavalcante

Características, propriedades e métodos analíticos para determinação de atazanavir: uma revisão / Júlia Cavalcante Faria - Macaé, 2021.
40 f.

Orientador(a): Maximiliano da Silva Sangoi .

Coorientador(a): Vitor Todeschini.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloisio Teixeira, Bacharel em Farmácia, 2021.

1. Atazanavir. 2. Espectrometria de massa . 3. Cromatografia líquida.

I. Sangoi, Maximiliano da Silva, orient. II. Todeschini, Vitor, coorient.

III. Título.

CDD 547

Julia Cavalcante Faria

Características, propriedades e métodos analíticos para determinação de
atazanavir: uma revisão

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do
título de farmacêutico.

Macaé, 26/11/2021

Prof. Dr. Maximiliano da Silva Sangoi (Presidente da Banca)

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/9077694098407886>

Prof. Dr. Thiago Barth

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/2954810429809063>

Prof. Dr. Aridio Mattos Junior

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/8768895227036467>

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus que com seu imensurável amor, cuidado e misericórdia me proporcionou ingressar em um ensino superior de qualidade. Ele me conduziu, com força, persistência, sabedoria e permitiu viver um dia após o outro com a certeza de que o melhor estaria por vir. A Ele, com todo o meu coração.

Aos meus pais, Cassia e Eden, que fizeram esforços, trabalharam arduamente, incentivaram o meu crescimento acadêmico e me auxiliaram durante essa caminhada. Me deram suporte e incentivo para que eu buscasse, longe de casa, crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amados avós, Maria Therezinha e Pedro, que durante toda essa caminhada oraram por mim e nunca deixaram de estar presentes, mesmo que distante. Todo dia tinha uma chamada de vídeo para matar a saudade.

Ao meu amor, Bruno Soares, por toda paciência, por todo o incentivo, pelo companheirismo e amor.

Ao meu trio, que se tornou família. Mirella Botinhão e a Jaqueline Neris foram excepcionais. Dividimos os medos, as angustias e, principalmente, a felicidade. Caminhamos juntas durante esses cinco anos com muita dedicação, coragem e persistência.

A minha amiga Juliana Freitas, de colégio, do Rio, que também veio para Macaé e viveu toda essa experiência comigo, sempre me apoiando.

A minha amiga Larissa Duarte que sempre esteve presente, mesmo que há muitos km de distância. Sempre disposta a me ouvir e ter o dom de me acalmar.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que abriram o horizonte de um nível superior.

A agência de fomento CNPq pelo suporte financeiro.

Aos meus atenciosos orientadores Maximiliano Sangoi e Vitor Todeschini, pelos conselhos acadêmicos, inúmeros e-mails respondidos, apoio e dedicação.

Essa caminhada não valeria tão a pena sem amigos e professores excepcionais! Obrigada por todo conhecimento tanto acadêmico quanto pra vida, guardarei vocês no coração.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o meu crescimento, muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), doença adquirida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) provoca a queda do sistema imunológico colocando qualquer pessoa em risco. Atualmente 37,7 milhões de pessoas são portadoras de HIV no mundo. Existem medicamentos e apresentações farmacêuticas que combatem a infecção pelo HIV, dentre esses, o atazanavir, um antirretroviral (ARV) de segunda geração pertencente à classe dos inibidores de protease. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem a obrigatoriedade de se adequar às normas internacionais de qualidade para registro de medicamentos. Neste contexto, o controle de qualidade do produto acabado é de extrema importância, uma vez que é requerido o estabelecimento dos limites seguros para garantir a qualidade do medicamento. Assim, deve-se destacar que os métodos analíticos são uma das ferramentas de controle de qualidade utilizadas na indústria farmacêutica para verificar a adequação tanto dos produtos acabados quanto dos insumos farmacêuticos ativos (IFA). Como consequência, um tratamento seguro e mais eficaz estará disponível para os pacientes. Realizar levantamento bibliográfico da literatura no que tange o controle de qualidade do antirretroviral, através da contextualização de características, propriedades e métodos analíticos para determinação do atazanavir. Foi realizada uma revisão na literatura científica nas bases Ebsco Host, Scopus, Pubmed e Portal de Periódicos CAPES, utilizando como palavras-chave os termos: “atazanavir”, “pharmacology” e “analytical method”. Também foi realizada uma análise de monografias de matérias-primas e formulações farmacêuticas de atazanavir nas Farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia. Nos compêndios oficiais, cujo objetivo é auxiliar na promoção da saúde da população, por meio do estabelecimento de requisitos de qualidade e segurança para fármacos, o método para controle de qualidade do IFA e produto acabado do sulfato de atazanavir não foi encontrado na sexta edição da Farmacopeia Brasileira (2019). Recentemente, foi incluída monografia do insumo farmacêutico ativo na Farmacopeia Europeia décima edição (2019), apresentando método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação do IFA e impurezas conhecidas, bem como verificado na Farmacopeia Americana (2020). Além disso, nove artigos demonstram o desenvolvimento de métodos para quantificação do ativo e suas impurezas de degradação por técnicas cromatográficas e apesar das informações encontradas ainda serem escassas, pode ser observado que a determinação do fármaco é realizada por métodos cromatográficos, onde há prevalência para o método de CLAE com 75%. Sabendo que há importante utilização do atazanavir na clínica, destaca-se a partir de dados desta revisão um número limitado de estudos tratando de métodos analíticos para sua determinação, limitando, por sua vez, a disponibilidade de métodos de controle de qualidade. Ressalta-se que quanto maior o número de métodos disponíveis na literatura, maior é a intercambialidade entre metodologias simples e complexas, e conseqüentemente, um maior número de laboratórios é beneficiado, principalmente aqueles com menor infraestrutura, impactando diretamente na eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos mundialmente comercializados.

Palavras-chave**: sulfato de atazanavir, antirretrovirais, espectrometria de massas, cromatografia líquida.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 1.1 Estrutura química | 11 |
| 1.2 Maturação do HIV do organismo | 12 |
| 1.3 Eficácia e mecanismo de ação do atazanavir..... | 14 |
| 1.4 Propriedades farmacodinâmicas. | 16 |
| 1.5 Farmacocinética | 17 |
| 1.6 Toxicidade | 20 |
| 1.7 Métodos analíticos | 22 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 Objetivo geral | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 27 |
| 5 CONCLUSÃO | 35 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O vírus pode ser transmitido durante a relação sexual, compartilhando seringas, ou perinatalmente durante a gravidez, parto ou amamentação (BRASIL, 2019).

O HIV ataca o sistema imunológico do organismo humano, onde os linfócitos T CD4 +, um tipo de glóbulo branco vital para combater a infecção, são as células mais afetadas. O HIV é capaz de alterar o DNA dessa célula e fazer cópias de si mesmo. Depois de se multiplicar, ele quebra os linfócitos em busca de outros para dar continuidade à infecção (BRASIL, 2019). A queda do sistema imunológico coloca qualquer pessoa em risco de infecções graves e certos tipos de câncer. São as chamadas doenças oportunistas, que na maioria dos casos causam a morte (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019). Desde que os primeiros casos de AIDS foram relatados em 1981, o HIV / AIDS tem sido uma das epidemias mais mortais e persistentes da humanidade. Embora um progresso extraordinário tenha sido feito na luta contra novos casos de HIV e mortes por AIDS, a pandemia de HIV continua (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2020).

Em 2017, o HIV levou mais de 35 milhões de pessoas à morte. Além disso, vale ressaltar que 37,7 milhões de pessoas eram portadoras de HIV até o final de 2016, com 1,8 milhão de novos casos de infecção pelo vírus em todo o mundo. A região mais afetada do mundo é a África Subsaariana, com 25,6 (23,1-28,5) milhões de pessoas vivendo com HIV em 2015. A região também é responsável por dois terços do total global de novas infecções pelo vírus (OMS, 2016). Existem muitos medicamentos e apresentações farmacêuticas que combatem a infecção pelo HIV e reduzem o risco de infectar outras pessoas (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019). Os usuários desse tratamento são adultos, crianças, gestantes e bebês que vivem com HIV e recebem terapia antirretroviral ao longo da vida. Dentre estes, 54% dos adultos e 43% das crianças, bem como uma alta cobertura global de terapia antirretroviral de 76% para gestantes e bebês portadores do vírus (OMS, 2016).

Manter a terapia antirretroviral adequada, conforme prescrito, permite que as pessoas com HIV vivam normalmente e por mais tempo, além de suprimir a quantidade do vírus no sangue a um nível tão baixo que é indetectável pelos testes padrão. Pessoas com HIV que mantêm uma carga viral indetectável e duradoura por meio do uso diário de medicamento antiretroviral não podem transmitir o vírus sexualmente, um conceito conhecido como indetectável (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2020).

O HIV pode ser suprimido pela combinação da terapia antirretroviral com três ou mais medicamentos. A terapia não cura a infecção pelo HIV, mas controla a replicação viral dentro do corpo de uma pessoa e permite que o sistema imunológico do indivíduo seja fortalecido e seja capaz de combater infecções (OMS, 2016). Entre esses medicamentos usados na terapia do HIV está o atazanavir, que foi aprovado para uso nos Estados Unidos em 2003. Esse medicamento é um antirretroviral classificado como inibidor de protease, que atua inibindo a protease do vírus HIV (NCBI, 2020).

O sulfato de atazanavir, de nome comercial Reyataz, desenvolvido e comercializado pelo laboratório Bristol Myers Squibb, foi aprovado para uso nos Estados Unidos em 2003. Este medicamento está disponível em nas formas farmacêuticas de cápsula e pó para uso oral, contendo como substância ativa atazanavir sob a forma de sal sulfato. Na forma de cápsula dura, as formulações apresentam as concentrações de 100 mg, 150 mg e 200 mg de atazanavir expresso como base livre. As diferentes formulações podem ser distinguidas pelo tamanho, cor e impressão das cápsulas, além disso, há presença de excipientes que incluem lactose mono-hidratada, crospovidona, estearato de magnésio, tinta de impressão e cápsula de gelatina dura. Já em forma de pó oral, o Reyataz é formulado contendo 1,5 g de pó, equivalente a 50 mg de atazanavir expresso em base livre e excipientes que incluem aspartame, sacarose e aroma de laranja e baunilha (EP10, 2019).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, o atazanavir é comercializado como medicamento genérico com nome comercial Sulfato de Atazanavir produzido pela Fundação Oswaldo Cruz. O medicamento de referência é chamado Reyataz, produzido pelo laboratório Bristol-Myers Squibb. Sua apresentação é na forma farmacêutica de cápsula dura na concentração de ativo de

300 miligramas. A embalagem primária é frasco de plástico transparente, e a secundária, cartucho de cartolina. Sua classe terapêutica é antivirótico (inibe a replicação virótica) (BRASIL, 2020).

Levando em consideração o amplo uso de antiretrovirais na população mundial, principalmente o uso mais recente do atazanavir, é necessária uma produção industrial adequada, bem como um rígido controle de qualidade. Nesse sentido, deve-se destacar que os métodos analíticos são uma das ferramentas de controle de qualidade utilizadas na indústria farmacêutica para verificar a adequação tanto dos produtos acabados quanto dos insumos farmacêuticos. Exemplos de algumas análises importantes de fármaco incluem identificação, pureza e quantificação. Como consequência, um tratamento seguro e mais eficaz estará disponível para os pacientes (BRASIL, 2019).

A escolha de um método analítico adequado é muito importante no processo de controle de qualidade de medicamentos (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007). Os métodos são classificados em dois tipos principais: analíticos e bioanalíticos. A diferença fundamental é que nestes o método é realizado em matriz biológica, como plasma, urina e outros fluídos biológicos (LA ROCA *et al.*, 2007).

O método analítico é desenvolvido com finalidade de determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Dentre as técnicas analíticas empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos, o laboratório conta, como por exemplo, com a cromatografia líquida, cromatografia gasosa, espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido, espectroscopia de absorção atômica, espectrofotometria UV/visível e espectrometria de massas. Além dessas, outras técnicas podem auxiliar no desenvolvimento analítico, principalmente no estudo do analito em questão, entre elas, a calorimetria Exploratória Diferencial, termogravimetria, difração e fluorescência de raios X e ressonância magnética nuclear (BRASIL, 2003).

Tendo em vista a relevância dos dados expostos, o presente trabalho apresenta uma revisão da literatura sobre as características e propriedades do atazanavir, além de relatar os métodos analíticos utilizados para sua determinação em diferentes matrizes. Os métodos analíticos para avaliação do atazanavir foram

pesquisados na literatura por meio de artigos científicos e em compêndios oficiais. As bases de dados Science Direct, PubMed e Scopus foram utilizadas para a revisão. O principal descritor utilizado foi: “atazanavir”.

1.1 Estrutura Química

O atazanavir é quimicamente descrito como metil N-[(2S)-1-[2-[(2S, 3S)-2-hidroxi-3-[[[(2S)-2-(metoxicarbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil]amino]-4-fenilbutil]-2-[(4-piridin-2-ilfenil)metil]hidrazinil]-3,3-dimetil-1-oxobutan-2-il]carbamato (Figura 1). O medicamento é um pó branco e inodoro com peso molecular de 704,9 g/mol e fórmula molecular de $C_{38}H_{52}N_6O_7$. Além disso, é uma base livre que apresenta solubilidade em água (PUBCHEM, 2020; DRUGBANK, 2020).

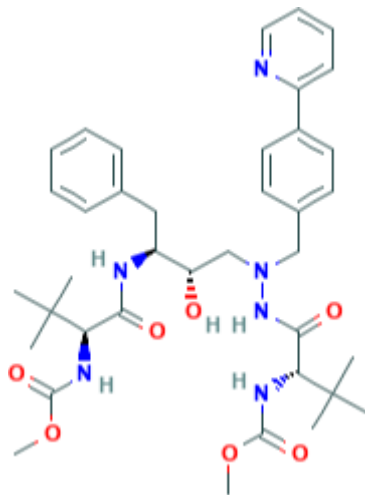


Figura 1 - Estrutura química do atazanavir.

Fonte: PubChem

O medicamento comercializado é conhecido como sulfato de atazanavir (Fig. 2) que é quimicamente descrito como metil N-[(2S)-1-[2-[(2S, 3S)-2-hidroxi-3-[[[(2S)-2-(metoxicarbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil] amino]-4-fenilbutil]-2-[(4-piridin-2-ilfenil) metil] hidrazinil]-3,3-dimetil-1-oxobutan-2-il] carbamato; ácido sulfúrico.

Apresenta fórmula empírica como $C_{38}H_{52}N_6O_7$. H_2SO_4 e peso molecular 802,93 g/mol (PUBCHEM,2020).

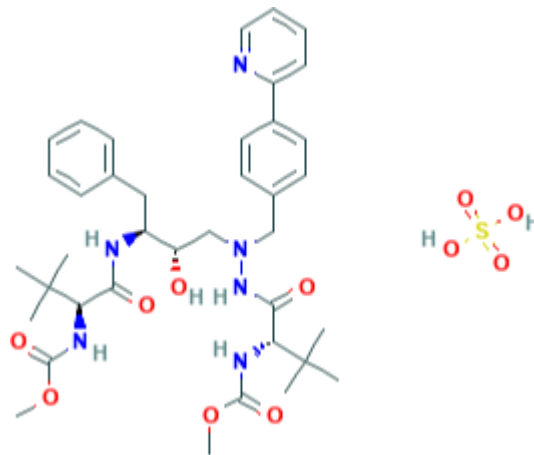


Figura 2 - Estrutura química do sulfato de atazanavir.

Fonte: PubChem

1.2 Ciclo de vida viral e maturação do HIV no Organismo

Para que a infecção do vírus ocorra dentro do organismo, o vírus imaturo (não infeccioso) é transformado em um vírus maduro (infeccioso), a partir do momento em que o HIV atravessa a membrana plasmática da célula hospedeira por meio de brotamento e liberação. Por conseguinte, ocorre, então, a formação do DNA a partir do RNA pela ação da enzima transcriptase reversa do HIV, que leva a formação de uma dupla hélice de DNA viral. O DNA é transportado para dentro do núcleo celular, onde sofre clivagens específicas e é integrado ao DNA da célula do hospedeiro pela ação da enzima integrase. A ativação da célula hospedeira resulta na transcrição do DNA em RNA mensageiro, que é traduzido em proteínas virais. A enzima protease do HIV é responsável por clivar a poliproteína viral precursora em proteínas individuais maduras. O RNA e as proteínas virais agrupam-se na superfície celular

como um novo vírion e são liberados para infectar outra célula. O ciclo de vida do vírus está ilustrado a seguir (CUNICO *et al*, 2008).

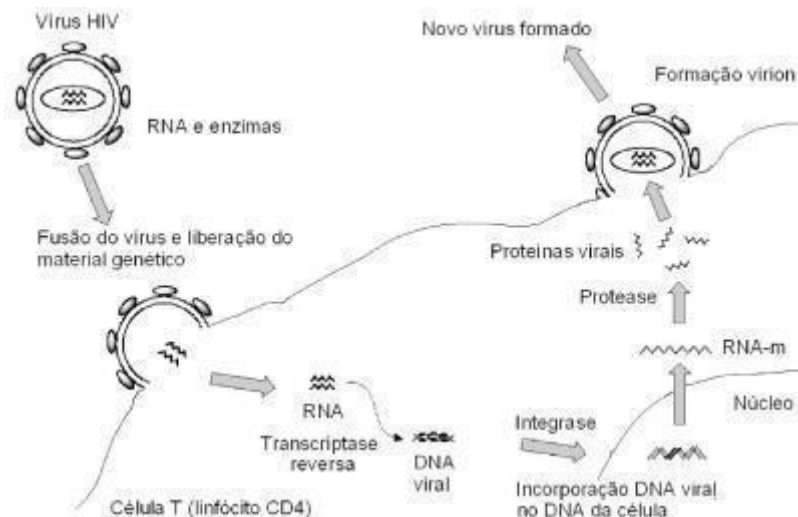


Figura 3 - Ciclo de vida do HIV no organismo humano.

Fonte: CUNICO *et al*, 2008.

A passagem do vírus imaturo para o maduro ocorre por meio de uma série de clivagens proteolíticas que são realizadas pela enzima protease viral - ela participa da família da protease aspártica, além de ser um homodímero simetricamente montado, composto por duas subunidades idênticas de 99 aminoácidos. As subunidades contribuem com resíduos catalíticos para o ativo local (um ácido aspártico no códon 25). A clivagem ocorre preferencialmente no lado N-terminal dos resíduos de prolina, particularmente entre fenilalanina e prolina (GOODMAN e GILMAN, 2010; FUN, WENSING, VERHEYEN *et al.*, 2012).

A clivagem ocorre no genoma do vírus HIV, o DNA genômico é composto por genes estruturais doados gag (grupo antigênico), env (envelope), pol (polimerase). O vírus HIV-1 realiza a biossíntese viral, onde ocorre o ciclo de replicação, que se divide nas seguintes etapas: adsorção e fusão, separação, transcrição reversa, integração, expressão gênica e maturação. Durante a expressão gênica, o provírus é transcrito em RNAs mensageiros virais, que vão para o citoplasma. Eles darão origem a proteínas não estruturais que serão responsáveis por regular a transcrição de outros RNAs mensageiros, pela síntese de proteínas estruturais de vírus. O

transcrito primário do HIV-1 é um RNA mensageiro idêntico ao RNA viral que é traduzido nas proteínas gag e gag-pol. As lipoproteínas chamadas gag e gag-pol, serão preferencialmente clivadas pela protease viral para a formação de HIV infeccioso / maduro no organismo hospedeiro (ROSEN, PAVLAKIS, 1990; FUN, WENSING, VERHEYEN *et al.*, 2012).

A clivagem ocorre nas poliproteínas gag-pol virais. Este processamento proteolítico ocorre em sequência, onde, primeiro, ocorre a clivagem, pela protease viral, do peptídeo espaçador com o nucleocapsídeo, a seguir ocorre a clivagem da matriz e do capsídeo, em seguida, ocorre a clivagem do peptídeo espaçador com o nucleocapsídeo, do nucleocapsídeo com outro peptídeo espaçador e, finalmente, a clivagem final do capsídeo e do peptídeo espaçador. Percebe-se, então, que a clivagem é regulada pelos referidos aminoácidos (FUN, WENSING, VERHEYEN *et al.*, 2012).

1.3 Eficácia e Mecanismo de Ação do Atazanavir

O atazanavir é um inibidor altamente seletivo e potente da enzima protease do HIV-1, conhecido como o primeiro inibidor da protease administrado uma vez ao dia. É um inibidor mimético de peptídeo competitivo, o qual imita o substrato natural da enzima protease viral, e é formado por um núcleo de hidroxietileno que atua proibindo a clivagem de poliproteínas pela enzima protease viral. Ou seja, quando não há clivagem, não há maturação do vírus e, conseqüentemente, também não ocorre transformação em vírus maduro / infeccioso, determinando o bloqueio do ciclo de vida viral. O atazanavir é um inibidor de protease de segunda geração, que apresenta melhor estabilidade em relação à eficácia do tratamento, pois possui uma barreira genética intrínseca que diminui significativamente a chance de resistência viral dada por mutações da protease viral (BUSTI, HALL, MARGOLIS, 2004; FUN, WENSING, VERHEYEN *et al.*, 2012). O mecanismo de ação descrito acima está ilustrado na Figura 4.

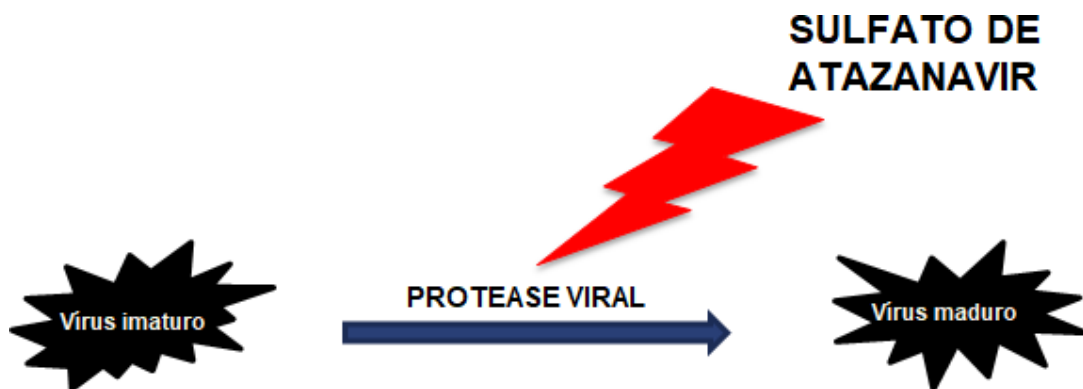


Figura 4 - Mecanismo de ação do atazanavir.

Fonte: Próprio autor

A concentração efetiva de 50% do atazanavir (EC50- inibe metade da replicação viral) é de 2,62-5,28 nmol/L, e tem uma constante de inibição (Ki) de 2,66 nmol/L. A partir do valor da EC50, sabe-se que o atazanavir tem uma maior potência do que alguns outros IPs, como indinavir, nelfinavir, saquinavir, amprenavir e ritonavir (SWAINSTON HARRISON, SCOTT, 2005).

Ainda sobre a eficácia do tratamento, vale ressaltar que a terapia medicamentosa para o HIV é feita com, no mínimo, três medicamentos – incluindo dois inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeos com pelo menos um inibidor da protease –, justamente para aumentar a eficácia terapêutica, uma vez que iniciar o tratamento com apenas um único antirretroviral resulta inevitavelmente no aparecimento de vírus resistentes aos medicamentos, em alguns casos, de algumas semanas apenas (GOODMAN e GILMAN, 2010). Sabe-se também que a administração concomitante de atazanavir com ritonavir, um inibidor da isoenzima p4503A4 do citocromo, que está envolvido no metabolismo dos inibidores da protease, melhorou a biodisponibilidade e meia-vida dos IPs (FUN, *et al.*, 2012).

Além disso, alguns estudos randomizados já foram realizados para avaliação da eficácia do tratamento com o medicamento. Molina e colaboradores realizaram um estudo randomizado em 96 semanas, comparando a terapia de Reyataz (300 mg 1x/dia) com ritonavir (100 mg 1x/dia) e lopinavir com ritonavir (400/100 mg 2x/dia), cada um em combinação com dose fixa de tenofovir mais entricitabina

(300/200 mg 1x/dia), em 878 pacientes virgens de tratamento antirretroviral, mostrou que houve 75% de resposta -pacientes obtiveram RNA HIV<50 cópias/mL- ao primeiro tratamento, em comparação a 68% de diminuição de carga viral no segundo tratamento descrito acima e o tratamento com reyataz apresentou 17% de falha virológica em comparação a 19% do tratamento com lopinavir. Dessa forma, o tratamento mostra-se eficaz (MOLINA *et al.*, 2008).

Acosta e colaboradores, por sua vez, realizaram estudo randomizado, duplo-cego e multicêntrico comparando Reyataz (400 mg uma vez ao dia) e efavirenz (600 mg uma vez ao dia), cada um em combinação com uma dose fixa de lamivudina (3TC) (150 mg) e zidovudina (ZDV) (300 mg) administradas duas vezes ao dia, em 810 pacientes sem tratamento prévio com antirretroviral. Neste caso, a quantidade alcançou 67% de indivíduos que obtiveram resposta - pacientes que atingiram e mantiveram confirmadas menos de 400 cópias/mL (< 50 cópias/mL) de RNA de HIV até a semana 48 - ao tratamento para o tratamento com reyataz e 62% ao tratamento com efavirenz (ACOSTA *et al.*,2007).

Algumas interações medicamentosas causam atenuação ou perda de eficácia do tratamento com atazanavir. O uso de agentes indutores da enzima CYP 3A4, como a rifampicina, é contra-indicado, pois o atazanavir também é metabolizado por essa enzima. A concentração plasmática do atazanavir reduz em 74% quando administrado em conjunto com o medicamento efavirenz, inibidores da transcriptase reversa, também utilizado para o tratamento do HIV (GOODMAN e GILMAN, 2010).

1.4 Propriedades Farmacodinâmicas

O Atazanavir inibe selectivamente o processamento específico do vírus de poliproteínas virais Gag e Gag-Pol de HIV-1 de células infectadas por ligação ao local activo da protease HIV-1, evitando assim a formação de viriões maduros. Em uma análise *in vitro*, que foi utilizado uma variedade de isolados laboratoriais e clínicos de HIV-1, o atazanavir foi capaz de exibir atividade anti-HIV-1, com uma

média de concentração inibitória de 50% (IC50) de 2 a 5 nM. Foram realizados, também, estudos de ação antiviral para combinação de dois medicamentos com atazanavir, onde não apresentaram antagonismo *in vitro* com outras classes de antirretrovirais como: inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (delavirdina, efavirenz e nevirapina), inibidores de protease (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir e saquinavir) e com inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (abacavir, didanosina, entricitabina, lamivudina, estavudina, tenofovir, zalcitabina e zidovudina) (BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2019).

1.5 Farmacocinética

O atazanavir é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e é capaz de atingir o pico de concentração plasmática 2 horas após a administração oral. Os picos de concentração plasmática de atazanavir no estado de equilíbrio se dá aproximadamente três horas após a administração de doses múltiplas de 400 mg de Reyataz, uma vez ao dia. O estado de equilíbrio para o atazanavir foi alcançado entre 4 e 8 dias (BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2019).

A administração de Reyataz concomitantemente com alimentação é capaz de aumentar a biodisponibilidade e reduzir a variabilidade farmacocinética, sendo assim um medicamento sensível a presença de alimentos. Ao comparar a administração de uma dose única de 400 mg de Reyataz com uma refeição leve e uma refeição rica em gordura resultou respectivamente em um aumento de 70% na área sob a curva (ASC) e aumento de 57% da concentração máxima (C_{max}) em relação ao estado de jejum, e no aumento médio de 35% na ASC e nenhuma alteração na C_{max} em relação a uma refeição rica em gordura. Portanto, a utilização da terapia de atazanavir tanto com uma refeição leve como com uma refeição rica em gordura, mostrou-se capaz de diminuir o coeficiente de variação da ASC, comparado ao estado de jejum (BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2019).

Le Tiec e colaboradores determinaram que a biodisponibilidade absoluta - medida de extensão que determina a quantidade de um fármaco terapeuticamente ativo que atinge a circulação sistêmica e está disponível no local de ação - ainda não foi definida. No entanto, as consequências farmacocinéticas da administração concomitante de ritonavir indicam que o efeito de primeira passagem pré-sistêmico é baixo. Portanto, sabe-se que a biodisponibilidade relativa das cápsulas de atazanavir é de aproximadamente 60% em comparação com a solução oral (LE TIEC *et al.*, 2005).

Segundo Croom e colaboradores, o fármaco possui farmacocinética não linear, o que afeta diretamente seu valor de meia-vida, na dose padrão de 400 mg uma vez ao dia é relativamente 7h, porém, a meia-vida aumenta para quase 10h com a dose de 600 mg. Também se distribui rapidamente por todo o corpo e tem alta ligação às proteínas plasmáticas (CROOM *et al.*, 2009). O atazanavir liga-se às proteínas séricas humanas (86%), sendo a ligação protéica independente da concentração. O atazanavir liga-se à alfa-1-glicoproteína ácida (AAG) e à albumina em uma extensão similar (89% e 86%, respectivamente).

O atazanavir sofre ampla metabolização em humanos. As principais vias de biotransformação consistem em monooxigenação e deoxigenação, e glicuronidação, N-dealquilação, hidrólise e oxigenação com dehidrogenação como biotransformações secundárias. O atazanavir é metabolizado principalmente pela isoenzima CYP3A4 a metabólitos oxigenados, sendo os metabólitos excretados na bile na forma de metabólito livre ou glicuronidados. Além disso, nenhum metabólito demonstrou atividade anti-viral *in vitro* (BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2019).

Randall e colaboradores realizaram um estudo de dose múltipla em pacientes infectados pelo HIV. Esses pacientes receberam atazanavir 400 mg uma vez ao dia com uma refeição leve durante 12 semanas. Após esse tempo, o atazanavir foi detectado no líquido cefalorraquidiano e no líquido seminal, com uma relação líquido cefalorraquidiano / plasma variando entre 0,0021 e 0,026 e uma relação líquido seminal / plasma variando entre 0,11 e 4,32 (RANDALL *et al.*, 2002). Os inibidores da protease do HIV-1 são substratos da glicoproteína P (gp-P), um transportador de efluxo que atuará determinando níveis adequados de IP nos tecidos corporais e que também explica os baixos níveis de fluidos corporais (LE TIEC *et al.*, 2005).

Estudo relacionado a eliminação do atazanavir detectou que após uma dose única de 400 mg, 79% e 13% da radioatividade total foram recuperados nas fezes e urina, respectivamente. O fármaco inalterado totalizou cerca de 20% e 7% da dose administrada nas fezes e urina, respectivamente. Os valores médios da meia-vida de eliminação terminal em voluntários saudáveis que receberam doses orais únicas de atazanavir 100, 300 ou 600 mg, respectivamente, foram 2,8 horas, 2,8 horas e 6,1 horas. Além disso, a meia-vida é de aproximadamente 7 horas no estado de equilíbrio após uma dose diária de 400 mg junto a refeição (GOLDSMITH, 2003).

Taburet e colaboradores também mostram a diferença na farmacocinética entre pessoas saudáveis e pessoas infectadas pelo HIV, na administração de doses múltiplas. As concentrações de atazanavir podem ser menores em pacientes infectados pelo HIV do que em voluntários saudáveis, a concentração plasmática média de atazanavir em 10 pacientes infectados pelo HIV que receberam 400 mg de atazanavir uma vez ao dia foi de 14.187 ng/mL, em comparação com 33.097 ng/mL em 36 voluntários saudáveis. O mesmo aspecto é verificado com a administração de atazanavir 300 mg uma vez ao dia, com dose baixa de ritonavir 100 mg. As meias-vidas de eliminação medidas ao longo de um intervalo de dosagem foram mais curtas em pacientes infectados do que em voluntários saudáveis e foram de 8,6 horas e 16 horas, respectivamente. Além disso, o fato de que as concentrações médias em pacientes infectados pelo HIV que receberam atazanavir 400 mg uma vez ao dia foi destacado foi de 273 ng/mL, que se acreditava ser várias vezes superior à concentração inibitória correta de 50% dos vírus. Naqueles que receberam atazanavir (300 mg) intensificado com ritonavir (100 mg), a concentração média mínima (\pm DP) foi de 862 (\pm 838) ng/mL (TABURET, 2004).

A farmacocinética do medicamento pode ser diferente em diferentes grupos populacionais. Os pacientes que apresentam disfunção hepática moderada, por exemplo, recomenda-se reduzir a dose de atazanavir para 300 mg uma vez ao dia. Já os pacientes que apresentam disfunção hepática grave, o atazanavir está contraindicado. Em mulheres grávidas, sugere-se uma diminuição da exposição plasmática durante a da 28^a até à 41^a semana. Além disso, não foram observadas diferenças farmacocinéticas clinicamente importantes relacionadas à idade e ao sexo e não há dados em crianças infectadas pelo HIV para determinar uma recomendação posológica específica para atazanavir em crianças. Em pacientes com disfunção

renal, a farmacocinética do atazanavir provavelmente não será afetada, uma vez que é eliminado e metabolizado principalmente pelo fígado. Portanto, já no caso de indivíduo com insuficiência hepática, a ASC média é de 42% maior em pacientes com insuficiência hepática em relação a voluntários que não apresentam AIDS. A meia-vida média do atazanavir em pacientes com insuficiência hepática é de aproximadamente 12 horas, comparada a 6 horas em voluntários saudáveis. Concentrações aumentadas de atazanavir são esperadas em pacientes com insuficiência hepática moderada ou grave (LE TIEC *et al.*, 2005; BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2019).

1.6 Toxicidade

O atazanavir pode causar alterações na função metabólica normal do indivíduo. O fármaco atua como um inibidor da difosfato de uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferase (UDP-glucuronosiltransferase, UGT), que é uma glicosiltransferase citosólica, responsável pela conjugação da bilirrubina. A principal enzima da subfamília UGT1A, UGT1A1 é expressa principalmente no fígado e no trato gastrointestinal e é eficiente na eliminação efetiva da bilirrubina. A inibição da enzima faz com que a bilirrubina não seja excretada normalmente, o que leva ao acúmulo sérico de bilirrubina não conjugada (indireta). A hiperbilirrubinemia é geralmente leve, os aumentos são em média 0,3-0,5 mg/dL, mas podem ser mais pronunciados em pacientes com síndrome de Gilbert com aumentos de 1,5 mg/dL ou mais e icterícia clínica (PANAGOPOULOS *et al.*, 2017).

A causa da hepatotoxicidade clínica do atazanavir é apenas parcialmente conhecida. No entanto, sabe-se que durante os processos farmacocinéticos, uma molécula do fármaco passa por várias membranas biológicas e que a extensão do movimento do fármaco através dessas membranas é geralmente afetada por transportadores de membrana, que podem facilitar ou impedir a movimentação dos fármacos. O atazanavir em combinação com ritonavir atua inibindo importantes

transportadores farmacocinéticos, que são: OATP1B1 e OATP1B3. Os referidos transportadores são expressos no hepatócito e atuam facilitando a captação hepática de fármacos. Essa inibição provoca uma diminuição na facilidade de captação pelo fígado e, conseqüentemente, na metabolização dos fármacos. A inibição do metabolismo do medicamento gera disfunção hepática, portanto, a terapia com atazanavir e ritonavir gera hepatotoxicidade (KALLIOKOSKI, NIEMI, 2009). Além disso, a *Food and Drugs Administration* mostrou que, pelo motivo acima mencionado, há um aumento na dobra da ASC, ou seja, a coadministração de atazanavir e ritonavir bloqueiam os transportadores e outras drogas permanecem no plasma por mais tempo, aumentando assim a ASC (FDA, 2020).

Os inibidores da protease têm sido associados a uma toxicidade fatal: a síndrome do intervalo de tempo que corresponde à sístole ventricular e que é variável consoante a frequência cardíaca (QT) prolongado. Este prolongamento foi descrito na terapia com atazanavir em combinação com lopinavir, nelfinavir, ritonavir e terapias com saquinavir. Tam Ly e Maria Elena Ruiz descreveram o primeiro caso relatado, em que o paciente tem insuficiência cardíaca congestiva, infecção por HIV e é tratado com lamivudina (50 mg uma vez ao dia), zidovudina (300 mg uma vez ao dia) e atazanavir (400 mg uma vez por dia) dia). O paciente, antes da terapia antirretroviral, apresentava intervalo QTc de 398 min. Desde o início do tratamento, um novo intervalo QTc prolongado de 619 foi revelado pelo eletrocardiograma. A terapia anti-retroviral foi interrompida e assim que os eletrocardiogramas de vigilância de 12 derivações foram reiniciados, o intervalo QTc aumentou para 571 min. Concluiu-se, portanto, que o culpado pelo prolongamento do intervalo QT foi a terapia com atazanavir (LY & RUIZ, 2007).

Em adição, estudos indicam que o atazanavir aumenta a duração do potencial de ação e inibe racamente as correntes de sódio e potássio e modeiramente as correntes de cálcio (EMEA, 2005).

1.7 Métodos Analíticos

O uso de métodos bioanalíticos, que são aqueles que utilizam materiais biológicos como, por exemplo, sangue e plasma e o uso dos métodos analíticos para avaliar a qualidade do produto é extremamente importante. (BRASIL, 2012) Na área farmacêutica, um método é selecionado para uma análise detalhada de cada componente da família farmacêutica, que determina propriedades que dão qualidade à matéria-prima e ao produto acabado. Além disso, são essenciais para a realização de estudos de estabilidade de formulações, identificação e quantificação de produtos de degradação e impurezas, padronização de procedimentos de produção e estudos farmacocinéticos e clínicos (ROZET, CECCATO, HUBERT, 2007).

Dentre os métodos analíticos conhecidos estão a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que fazem parte do grupo de classificação da cromatografia em coluna. Essas técnicas cromatográficas normalmente são empregadas em amostras de fármacos, alimentos, água, solo, sangue, urina, etc. A CLAE obteve um avanço significativo a partir dos anos 70, e desde então vem apresentando novas sofisticações tecnológicas, como por exemplo, o CLUE, que é uma técnica de cromatografia líquida mais sofisticada que permite a utilização de colunas preenchidas por partículas pequenas, obtendo maior resolução, melhor detectabilidade, menor tempo de análise. Além disso, esta técnica apresenta menor vazão e, por consequência, produz menos descarte de solventes (FREITAG, 2018) (MALDANER *et al*, 2009).

Os cromatógrafos líquidos utilizados na CLAE e na CLUE apresentam algumas diferenças, dentre elas destaca-se o tipo coluna que contém a fase estacionária. Ambos os aparelhos apresentam um sistema de reservatório de fase móvel, um sistema de bombeamento de fase móvel, um sistema de injeção, um sistema analítico que é constituído pela coluna cromatográfica, um sistema de detecção (existe detecção por UV, fluorescência, espectrofotometria de massas, etc.) e o sistema de aquisição e registro de dados (FREITAG, 2018) (MALDANER *et al*, 2009).

Na cromatografia líquida existe um sistema composto por duas fases, uma fase móvel e outra fase denominada de estacionária. Na fase estacionária podem ser utilizados compostos sólidos ou líquidos. Os sólidos normalmente são substâncias absorventes, tais como, sílica, carvão ativo, etc., que se encontram em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. Nesse caso a base para a separação de misturas é chamada de absorção. Já o composto líquido da fase estacionária é denominado de película delgada, sendo a base de separação de misturas denominada de partição. Na fase móvel emprega-se uma mistura de alguns solventes, por exemplo, metanol, acetonitrila e água, sendo essa mistura denominada de eluente. Normalmente para a fase móvel existem alguns critérios quanto aos solventes, tais como: grau de pureza dos solventes, baixa viscosidade, dissolução da amostra sem perda dos compostos e polaridade adequada para a realização da separação dos componentes da amostra. Além disso, para a eluição dos compostos é importante ressaltar que existem dois tipos de eluições, a isocrática na qual a composição da fase móvel se apresenta constante durante todo o processo de análise, e a gradiente, na qual a composição da fase móvel pode ser alternada durante a realização da análise (FREITAG, 2018).

Quando a fase móvel é constituída por substâncias polares (hidrofílicas) e a fase estacionária é composta por substâncias apolares, o método de análise é denominado como de fase reversa. Quando o inverso ocorre, o método de análise chama-se fase normal.

A maioria dos métodos analíticos aplicados para controle de qualidade de medicamentos são usados para avaliações de identidade e conteúdo, e são representados por espectrofotometria, titulação, eletroanalítica e cromatografia (SIDDIQUI, ALOTHMAN, RAHMAN, 2017). Porém, para empregar métodos analíticos de forma adequada, é necessário desenvolver metodologias específicas de acordo com a necessidade única de cada análise, otimizando todas as variáveis envolvidas. Além disso, para garantir que os métodos analíticos estejam de acordo com os requisitos de suas aplicações e para garantir a qualidade da indicação, através de sua comparabilidade, rastreabilidade, confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, ainda é necessário validá-los, desde que não errados dados analíticos podem levar a decisões desastrosas e perdas financeiras (ERMER, MILLER, 2005; BRASIL, 2017).

A RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, publicada no DOU nº 141, de 25 de julho de 2017, tem por objetivo prover a validação de métodos analíticos e dá outras providências. A seletividade é o primeiro parâmetro de validação analítica a ser descrito, que consiste na capacidade de um método em identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. A linearidade é outro parâmetro de validação que mostra que um método é capaz de apresentar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. A faixa de trabalho, que é determinada a partir dos estudos de linearidade e com os resultados de precisão e exatidão. A precisão que avalia se o método apresenta proximidade entre os resultados obtidos por meio de testes com amostras preparadas. A precisão do método analítico que é determinada pelo grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. O limite de detecção de um método que é determinado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não é necessariamente quantificado, nas condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação do método que se baseia na menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais estabelecidas. E, por fim, a robustez do método é um parâmetro que indica a capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas (BRASIL, 2017).

A falta de metodologia analítica descrita tanto na literatura quando na Farmacopeia Brasileira mostram a escassez de informação para a determinação do atazanavir. Com isso, a realização deste trabalho é importante para identificar e comparar os métodos disponíveis na literatura. Ressalta-se que quanto maior o número de métodos disponíveis na literatura, maior é a intercambialidade entre metodologias simples e complexas, e conseqüentemente, um maior número de laboratórios é beneficiado, principalmente aqueles com menor infraestrutura, impactando diretamente na eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos mundialmente comercializados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral o levantamento bibliográfico de métodos analíticos e bioanalíticos aplicados a determinação do antirretroviral atazanavir em estudos farmacocinéticos e controle de qualidade.

2.2 Objetivos específicos

O presente trabalho tem como objetivo específico a contextualização de características, propriedades e métodos analíticos e bioanalíticos para determinação do antirretroviral atazanavir.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As determinações qualitativas e quantitativas do atazanavir são de extrema importância tanto para o controle de qualidade do fármaco e dos produtos acabados, quanto para os estudos farmacocinéticos de biodisponibilidade e bioequivalência, que se enquadram nas aplicações da biofarmácia.

Em primeiro lugar, o presente estudo realizou uma análise em farmacopéias em busca de monografias de matérias-primas ou formulações referentes ao atazanavir. A análise em questão foi feita nas Farmacopeias Brasileira (FB6, 2019), Americana (USP43, 2020) e Europeia (EP10, 2019).

O levantamento bibliográfico e artigos foi realizado seguindo critérios de exclusão e de inclusão. Os trabalhos selecionados foram aqueles que objetivaram a determinação apenas do atazanavir. Foram excluídos aqueles que determinavam o atazanavir em simultaneidade com outros medicamentos. Foram excluídos também os artigos de revisão. Sabendo-se quais são os artigos relacionados ao critério de exclusão e inclusão, foram realizadas as etapas de seleção e classificação. A etapa de seleção foi dividida em duas: aquisição e extração. Na etapa de aquisição, foram conduzidas a busca dos artigos nas bases de dados: Ebsco Host, Scopus, Pubmed e Portal de Periódicos CAPES, utilizando como palavras-chave os termos: “atazanavir”, e “analytical method”. Todos os resumos publicados no período de janeiro de 2004 a novembro de 2021 foram lidos para avaliar se estão dentro dos critérios de inclusão. A partir disso, iniciou-se a etapa de extração, os artigos selecionados na etapa I, foram lidos na íntegra e a partir disso foram extraídos os dados de interesse.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os compêndios oficiais apresentam relevante importância no que tange assuntos relacionados a promoção da saúde da população, isso porque tem com objetivo estabelecer requisitos de qualidade e segurança para fármacos e medicamentos. A partir dessa premissa, ao realizar busca na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, o método para controle de qualidade do IFA e produto acabado do sulfato de atazanavir não foi encontrado (FB6, 2019). Porém, em contrapartida, recentemente foi incluída monografia do insumo farmacêutico ativo na Farmacopeia Europeia 10ª edição, apresentando método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação do IFA e impurezas conhecidas (EP10, 2019), bem como verificado na Farmacopeia Americana 43ª edição (USP43, 2020). A identificação da amostra descrita nas farmacopéias é determinada por uma amostra teste e duas amostras de referência, a qual são injetadas 10 µL no cromatógrafo. O processo separativo é realizado através de uma coluna com fase estacionária contendo sílica gel octadecilsilano a uma temperatura de 25°C. Além disso, a vazão da fase móvel é de 1,0 mL/min, composta por uma mistura de 25 volumes de acetonitrila e 75 volumes de uma solução recém-preparada de 2,73 g/L de di-hidrogenofosfato de potássio, previamente ajustada para pH 3,5 com ácido fosfórico diluído. A eluição é do tipo gradiente, sendo nos primeiros 5 minutos a porcentagem v/v da primeira fase móvel foi de 100% e da segunda de 0%, dos 5 aos 45 minutos a primeira fase móvel passou de 100% para 0% e a segunda de 0 para 100%. A detecção é realizada em espectrofotometria que compara quantitativamente a fração de luz que passa através de uma solução de referência e uma solução de teste, neste caso, a 215 nm. Em adição, seis impurezas conhecidas são detectadas pelo método, identificadas a partir da comparação dos tempos de retenção no cromatograma com solução de referência e cromatograma da solução teste. As impurezas conhecidas estão descritas na Figura 4.

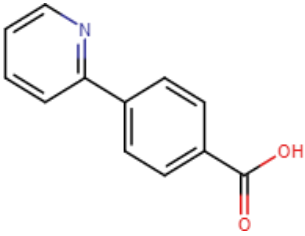
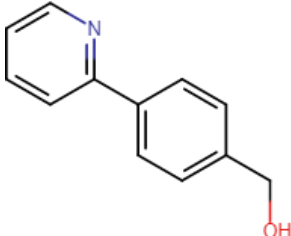
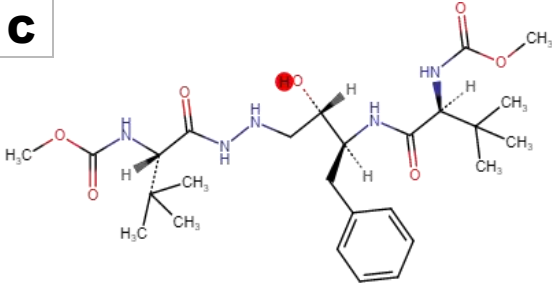
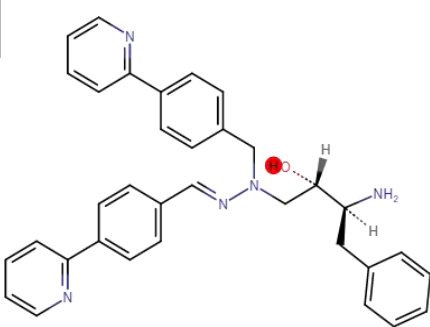
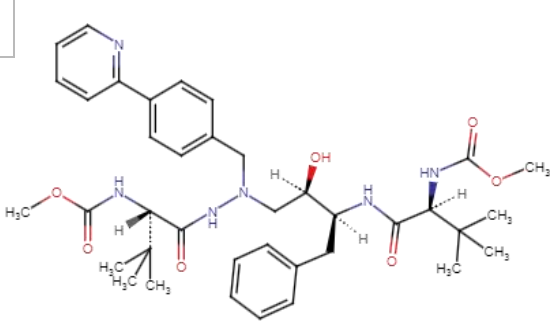
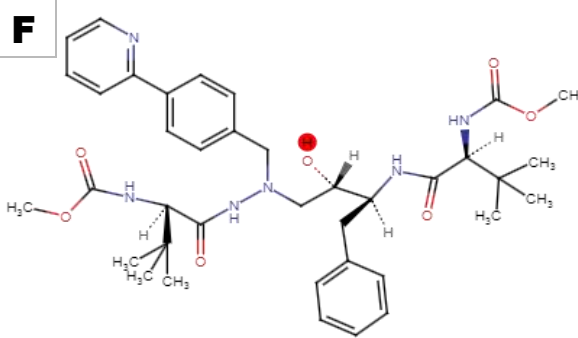
| | |
|--|--|
| <p>A</p>  | <p>B</p>  |
| <p>Ácido 4- (piridin-2-il) benzoico.</p> | <p>Aldeído (piridin-2-il) benzoico.</p> |
| <p>C</p>  | <p>D</p>  |
| <p>Metil [(5S, 10S,11S,14S) -11- benzil-5-tercbutil- 10- hidroxi 15, 15 – dimetil-3,6,13- triox-2- oxa-4,7,8,12- tetraazaexadecan-14-il] carbamato.</p> | <p>(2S,3S)-3- amino-4-fenil-1-[(E)-1-[[4-(piridina-2-il) fenil] metil]- 2-[[4-(piridina-2-il) fenil] metil] hidrazina-1-il] butano-2-ol.</p> |
| <p>E</p>  | <p>F</p>  |
| <p>Metil [(5S,10R,11S,14S) -11- benzil-5-tercbutil- 10- hidroxi 15, 15 – dimetil-3,6,13- triox-8- [[4-(piridina-2-il) fenil] metil]-2-oxa-4,7,8,12- tetraazaexadecan-14-il] carbamato.</p> | <p>Metil [(5R,10S,11S,14S) -11- benzil-5-tercbutil- 10- hidroxi 15, 15 – dimetil-3,6,13- triox-8- [[4-(piridina-2-il) fenil] metil]-2-oxa-4,7,8,12- tetraazaexadecan-14-il] carbamato.</p> |

Figura 4. Impurezas descritas nas farmacopéias europeia e americana: (A) – Impureza A; (B) – Impureza B; (C) – Impureza C; (D) – Impureza D; (E) – Impureza E; (F) – Impureza F.

Por outro lado, quando foi realizada uma busca na literatura científica, foram encontrados um total de dez artigos sobre métodos analíticos para a determinação do sulfato de atazanavir, nos quais todos utilizavam cromatografia líquida para determinação do sulfato de atazanavir. A Tabela 1 detalha as condições cromatográficas dos trabalhos encontrados na literatura sobre os métodos de quantificação do atazanavir. As técnicas se baseiam em cromatografia líquida, podendo se especificar em CLAE e CLUE, em diferentes matrizes.

Nesta pesquisa, que inclui métodos da literatura científica e métodos farmacopeicos, com 75%, o método de CLAE acoplada à espectrofotometria no ultravioleta (CLAE-UV) mostrou-se prevalente perante os outros métodos, como exposto na Figura 5. O método CLAE-UV apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas cromatográficas, como ser uma técnica de menor custo para aquisição e operação, e estar disponível na maioria dos laboratórios analíticos. Já o método de CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) necessita de instalações específicas e profissionais altamente capacitados, além do alto custo de aquisição, porém apresenta vantagens como rapidez de análise e alta seletividade. Além disso, um trabalho foi encontrado (8%) utilizando a técnica por CLUE acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM). Esta técnica que tem sido considerada o mais recente avanço em técnicas de separação e detecção, levando em consideração a complexidade dos materiais utilizados, parâmetros e condições de análise, aliando rapidez de análise, menor produção de resíduos e alta seletividade de resposta.

O detalhamento dos métodos analíticos está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos cromatográficos descritos na literatura para a determinação de atazanavir.

| Método | Condições analíticas | Deteção | Matriz | Ref. |
|---------|---|--|-----------------------|----------------------------------|
| CLAE-UV | Coluna: C18 (125 mm x 4 mm); Fase móvel: Metanol (A), solução ácido fosfórico 8,5% e 0,2 g/L de heptanosulfonato de sódio (pH 5,14) (B); Acetonitrila + 0,3% de ácido acético (C); Vazão: 1 mL/min; Volume de injeção: 40 µL. | 201 nm | Plasma humano | [COLOMBO <i>et al.</i> , 2004] |
| CLAE-UV | Coluna: ultrasfera octila (4,6 mm x 15 cm, 4 µm) a 30 °C; Fase móvel: 45% de água, 20% de metanol e 35% de acetonitrila; Vazão: 1 mL/min; Volume de injeção: 30 µL. | 260 nm | Plasma humano | [CATTANEO <i>et al.</i> , 2008] |
| CLAE-UV | Coluna: Symmetry C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm) a 40 °C; Fase móvel: acetonitrila e tampão contendo 25 mM de hidrogenofosfato dissódico (pH 6,8) e 0,1% (v/v) trietilamina (45:55, v/v); Vazão: 1,5 mL/min; Volume de injeção: 50 µL. | 280 nm | Plasma humano | [SPARIDANS <i>et al.</i> , 2005] |
| CLAE-UV | Coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µ) a 25°C; fase móvel de 0,02 M de tampão dihidrogenofosfato de amônio: acetonitrila: metanol (30:25:45, v/v) e pH ajustado para 2,5 com ácido orto- fosfórico. Vazão: 1 mL/min; Volume de injeção: 10 µL. | 288 nm | Cápsula/matéria-prima | [BHIRUD <i>et al.</i> , 2013] |
| CLAE-UV | Coluna: C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) a 25°C; Fase móvel: 900 mL de metanol e 100 mL de água e pH foi ajustado para 3,55 com ácido acético. Vazão: 0,5 ml/min. Volume de injeção: 20 µL. | 249 nm | Cápsula | [DEY <i>et al.</i> , 2017] |
| CLAE-UV | Coluna: C18(150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm) e C18 (20 mm x 3,9 mm, 5 µm) a 30 °C; Fase móvel: tampão de acetonitrila-fosfato (pH 6, 52,5 mM) (43:57, v/v); Vazão: 1,5 mL/min; Volume de injeção: 20 µL. | 203 nm | Plasma humano | [LOREGIAN <i>et al.</i> , 2006] |
| CLAE-UV | Coluna: C18 (150 mm x 2,0 mm, 5 µm) a 30 °C; Fase móvel: acetonitrila - tampão formato de amônio (pH 3; 10 mM) (45:55, v/v); Vazão: 0,3 mL/min; Volume de injeção: 20 µL. | 210 nm | Plasma humano | [MÜLLER <i>et al.</i> , 2010] |
| CLAE-EM | Coluna: C18 (4,6 x 100 mm, 5,0 µm) a 37 °C; Fase móvel: 55% ACN, 45% água, 0,15% de ácido acético e 4 mM de acetato de amônio; Vazão: 0,8 mL/min; Volume de injeção: 2 µL. | Ionização por eletrospray positiva; Modo de monitoramento múltiplo (m/z 705,3 → 168,0 e m/z 710,2 → 168,0) | Cabelo Humano | [PHUNG <i>et al.</i> , 2018] |
| CLAE-EM | Coluna: Uptisphere HDO C18 (33 mm X 4,6 mm, 3 µm) à temperatura ambiente; Fase móvel: ácido acético a 0,1% (A) e acetonitrila (B); Vazão: 0,8 mL/min; Volume de injeção: 15 µL. | Ionização por eletrospray positiva; Modo de monitoramento múltiplo (m/z 335 → 341) | Plasma humano | [SCHUSTER <i>et al.</i> , 2003] |
| CLUE-EM | Coluna: C18 (1,7 µm, coluna de 1 mm x 50 mm) a 45 °C; Fase móvel: acetato de amônio 10 mmol/L-acetonitrila; Vazão: 0,4 mL/min; Volume de injeção: 6 µL. | m/z 705 | Cápsula | [SAHA <i>et al.</i> , 2020] |

CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta;

CLAE-EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;

CLUE-EM: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas.

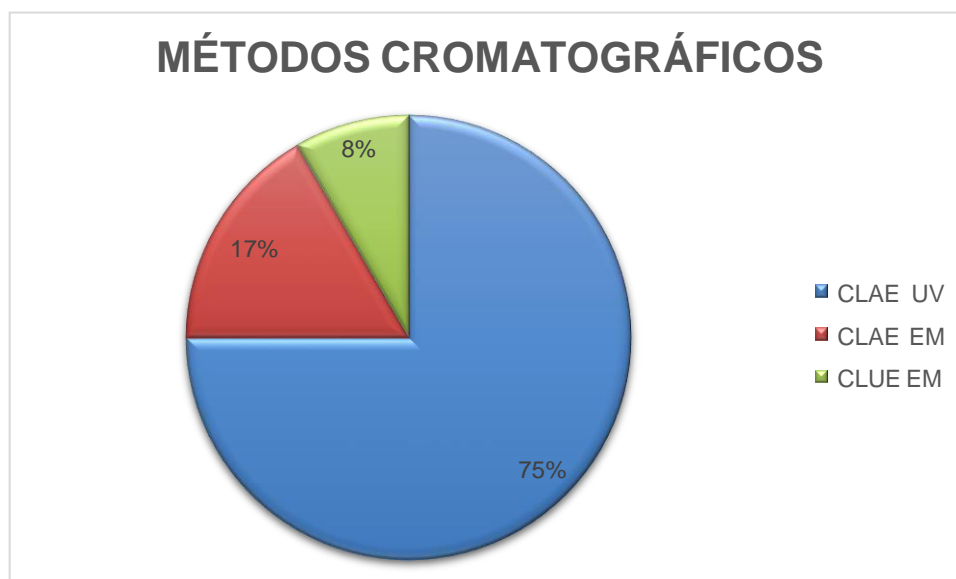


Figura 5. Proporção de métodos cromatográficos para determinação de atazanavir.

Nhi Phung e colaboradores desenvolveram e validaram um método por CLAE-EM sensível e específico para a análise de atazanavir em cabelo humano, seguindo as diretrizes de validação de método bioanalítico do FDA (PHUNG *et al.*, 2018). O método tem a capacidade de diferenciar analitos coeluentes, principalmente padrões internos deuterados, o que elimina a sobreposição de sinais de analito de pico e cálculo incorreto dos níveis de fármaco, além de permitir tempos de análise mais curtos, pois o fármaco pode ser eluído mais rápido sem interferência, com base no monitoramento de múltiplas reações específicas do analito. Por outro lado, uma das desvantagens da CLAE-EM é a potencial influência do efeito da matriz na sensibilidade de um analito por supressão ou intensificação da ionização, que pode ser eliminada por meio de etapas de limpeza e extração da amostra (PHUNG *et al.*, 2018).

Com uma abordagem diferente, Cattaneo e colaboradores estudaram o método por CLAE-UV para determinar a concentração de atazanavir em amostras de plasma humano, utilizando procedimento de extração simples. Além disso, neste estudo foi utilizado o uso de extração em fase sólida (EFS) em vez da extração líquido-líquido (ELL) mais convencional, o que pode resultar em uma etapa de preparação mais rápida com menos necessidade de solventes orgânicos tóxicos. A EFS também apresenta cromatogramas mais limpos em comparação com o ELL e

evita a degradação rápida da coluna analítica. Além disso, uma eluição isocrática em uma coluna de fase reversa e detecção no UV em 260 nm foram usadas (CATTANEO *et al.*, 2008).

Loregian e colaboradores determinaram em seu estudo que, como o atazanavir é um substrato e um inibidor das enzimas do citocromo P450 (CYP3A4), é provável que a terapia combinada seja confrontada com interações medicamentosas envolvendo indução ou inibição do metabolismo do CYP3A4 e, portanto, redução ou aumento do metabolismo exposição ao fármaco. A partir daí, tornou-se importante um método suficientemente sensível para medir os níveis plasmáticos de atazanavir em diferentes regimes terapêuticos. O método por CLAE-UV utiliza eluição isocrática, coluna de fase reversa e detecção de UV em 203 nm. Para extração das amostras emprega um procedimento simples e rápido de EFS. O método desenvolvido é sensível o suficiente para medir níveis mínimos terapeuticamente relevantes de atazanavir e é prontamente adaptável aos cromatógrafos padrão em laboratórios analíticos (LOREGIAN *et al.*, 2006).

Saha e colaboradores utilizaram método por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) para determinação do sulfato de atazanavir. O método não utiliza sistema tampão complexos, ou seja, utiliza uma fase móvel simples. A validação do método seguiu as normas internacionais. O método comprovou linearidade na faixa de 10-90 µg/mL. A recuperação ficou entre 100,2-101,0% e a precisão dentro dos limites aceitos (porcentagem de coeficiente de variação 0,2-0,7%). O limite de detecção e o limite de quantificação foram 2,68 e 8,14 µg/mL, respectivamente. Estudos de degradação mostraram que o sulfato de atazanavir se degradou em condições ácidas e básicas. A técnica sugerida é simples, rápida e sustentável, sendo, portanto, adequada para análises de rotina de sulfato de atazanavir (SAHA *et al.*, 2020).

Colombo e colaboradores estudaram a determinação de atazanavir em plasma humano. O método desenvolvido utiliza EFS offline como extração e CLAE-UV como ferramenta analítica. O autor utilizou, no estudo, o processamento de amostras previamente proposto para os cinco primeiros IPs comercializados e o efavirenz. Este método fornece excelente separação do atazanavir de outros IPs (amprenavir, indinavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nelfinavir) e NNRTIs (efavirenz

e nevirapina), permitindo a medição precisa do atazanavir em qualquer tratamento antirretroviral concomitante. O método CLAE para atazanavir possui o nível necessário de sensibilidade e reprodutibilidade. É importante ressaltar que o estudo determina a importância do monitoramento de medicamentos antirretrovirais para detectar interações que modifiquem sua disposição sistêmica. Como, por exemplo, quando a terapia combinada pode haver interações envolvendo indução e/ou inibição do CYP3A4. Esta interação fármaco / fármaco foi notavelmente documentada para o atazanavir cuja área sob a curva, C_{max} e concentração mínima são drasticamente reduzidos (em 74%, 59% e 93%, respectivamente) pela co-administração de efavirenz (um indutor potente do CYP3A4). Para superar a indução do CYP3A4 devido ao efavirenz, o atazanavir foi associado a 100 mg de ritonavir (potenciador farmacocinético) uma vez ao dia, com a possibilidade de o atazanavir e o efavirenz serem administrados em combinação (COLOMBO *et al.*, 2004).

Müller e Kanfer estudaram um método de CLAE eficiente para a determinação quantitativa de atazanavir em plasma humano adequado para estudos de bioequivalência e farmacocinética em indivíduos humanos saudáveis. Este trabalho apresenta a importância de avaliar as medidas de exposição sistêmica, como C_{max} e ASC, para entender melhor as interações que ocorrem com o atazanavir e o comprometimento da segurança e / ou eficácia do fármaco que eles podem causar. Os valores de C_{max} e ASC podem ser obtidos a partir de perfis de concentração-tempo de atazanavir no plasma em voluntários humanos saudáveis na ausência e na presença do fármaco potencialmente interagente (MÜLLER *et al.*, 2010).

Schuster e colaboradores estudaram a determinação quantitativa do atazanavir em plasma humano por CLAE-EM em espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) após EFS automatizada. O método é seletivo, preciso e reprodutível. O analito foi determinado por eletropulverização de íons positivos. O estudo testou a estabilidade do atazanavir no plasma humano em amostras de plasma coletadas. Finalmente, o atazanavir também demonstrou ser estável no plasma humano por pelo menos 109 h em temperatura ambiente. (SCHUSTER *et al.*, 2003).

Além disso, Sparidans e colaboradores também desenvolveram e validaram um método de CLAE em fase reversa com eluição isocrática, sensível e seletivo

para determinação de atazanavir em plasma humano com detecção UV, empregando a ELL. O método desenvolvido é útil quando não há disponibilidade da técnica de detecção por espectrometria de massas (SPARIDANS *et al.*, 2005).

Bhirud e Hiremath também desenvolverem um método simples, preciso, de CLAE-UV para determinação do sulfato de atazanavir que pode ser aplicado para controle de qualidade de rotina do sulfato de atazanavir em formas farmacêuticas em cápsulas, bem como em fármacos a granel. O estudo descreve que o tempo de retenção obtido para o sulfato de atazanavir foi de 3,0 min. Além disso, o resultado obtido com a resposta do detector foi considerado linear na faixa de concentração de 5–50 µg/mL. Este método foi validado e demonstrado ser específico, sensível, preciso, linear, exato, robusto, robusto e rápido. O sulfato de atazanavir foi submetido a diferentes condições de estresse acelerado. Os produtos de degradação, quando em qualquer lugar bem resolvidos a partir do fármaco puro, com valores de tempo de retenção significativamente diferentes (BHIRUD *et al.*, 2013).

Dey e colaboradores também desenvolveram método de CLAE-UV pra determinação de sulfato de atazanavir utilizando capsula e o produto a granel como forma farmacêutica. As cápsulas utilizadas nesse estudo foram adquiridas do laboratório Bristol Mayer Squibb. Nesse estudo verificou-se que a droga sulfato de atazanavir é mais degradada quando exposta à hidrólise básica. Os parâmetros de validação do método foram dentro dos limites, tornando-o valido, seguro e, conseqüentemente, reproduzível (DEY *et al.*, 2017).

Ademais, pode ser observado que os métodos cromatográficos encontrados para identificação do atazanavir são em sua maioria utilizando CLAE-UV, em intermédio CLAE-EM e com uma menor porcentagem o método CLUE-EM. Isso pode ser explicado também pelo fato do método por CLUE ser mais recente e ainda há poucos estudos com sua utilização, apesar de apresentar vantagens com relação a necessidade da realização de análises mais rápidas sem o comprometimento do desempenho cromatográfico.

Como pode ser observado nesta revisão, poucos estudos foram encontrados sobre a determinação do atazanavir em formas farmacêuticas. Esse fato pode ser

preocupante, visto que metodologias analíticas são importantes para avaliar a qualidade do medicamento, a fim de garantir sua eficácia e segurança, garantindo o sucesso do tratamento do paciente. Assim, é necessário tanto o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação do fármaco, quanto a otimização dos existentes com foco na melhor resposta analítica, menor consumo de solventes e menores tempos de análise.

Outra questão importante é a escolha do método analítico para a determinação do fármaco. Grandes indústrias farmacêuticas e químicas têm recursos para investir em tecnologia. Por outro lado, pequenas indústrias e laboratórios independentes costumam ter menos recursos financeiros e não contam com as tecnologias mais recentes. Desse modo, uma variedade de métodos se faz necessária para que a indústria ou os laboratórios escolham o mais adequado à sua realidade.

5. CONCLUSÃO

O atazanavir é um medicamento antirretroviral utilizado em pacientes com AIDS, causada pelo vírus HIV, com o objetivo de melhorar o tempo e a qualidade de vida do paciente soro positivo.

Dentre os estudos analisados nesta revisão, a maioria descreve o uso da técnica de CLAE-UV para determinação de fármacos. Porém, técnicas mais nobres como CLAE-EM e CLUE-EM também são usadas na determinação do atazanavir.

Apesar da ampla utilização do atazanavir na clínica, os dados desta revisão mostraram um número limitado de estudos tratando de métodos analíticos para sua determinação, limitando, por sua vez, a disponibilidade de métodos de controle de qualidade. Ressalta-se que quanto maior o número de métodos disponíveis na literatura, maior é a intercambialidade entre metodologias simples e complexas, e conseqüentemente, um maior número de laboratórios é beneficiado, principalmente aqueles com menor infraestrutura, impactando diretamente na eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos mundialmente comercializados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHIRUD, C. H.; HIREMATH, S. N. Stability indicating RP-HPLC method for the determination of Atazanavir sulphate in bulk and dosage form. **Drug Invention Today**, v.5, n.2, p.81–86, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre Boas Práticas na Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de agosto de 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de maio de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de Métodos Analíticos e outras Medidas. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de julho de 2017.

Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA. Reyataz sulfato de atazanavir. Disponível em: https://www.bms.com/assets/bms/brazil/documents/hcp/bulas-profissionais-otimizadas/REYATAZ_VPS_v01_25042018.pdf; Acesso em: 07 de agosto de 2020.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman**: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUSTI, A. J.; HALL, R.; MARGOLIS. Atazanavir for the treatment of human immunodeficiency virus infection. **Pharmacotherapy**. v. 12, p. 1732-1747, 2004.

COLOMBO, S.; GUIGNARD, N.; MARZOLINI, C.; *et al.* Determination of the new HIV-protease inhibitor atazanavir by liquid chromatography after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 810, n. 1, p. 25-34, 2004.

CUNICO, W., GOMES, C. R. B., & VELLASCO JUNIOR, W. T. HIV – recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, v.31, n.8, p.2111–2117, 2008

CROOM, K. F.; DHILLON, S.; KEAM SJ. Atazanavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. **Drugs**, v. 69 p. 1107-1140, 2009.

CATTANEO, D.; MAGGIOLO, F.; RIPAMONTI, D.; *et al.* Determination of atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with uv detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 6, p. 485-489, 2008.

DEY, S.; SUBHASIS PATRO, S.; SURESH BABU, N.; *et al.* Development and validation of a stability-indicating RP–HPLC method for estimation of atazanavir sulfate in bulk. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.7, n.2, p.134–140, 2017.

DRUGBANK. Database for Drug and Drug Target Info. Disponível em: <https://go.drugbank.com/>. Acesso em: 05 de junho de 2020.

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. Method validation in pharmaceutical analysis. **A Guide to Best Practice**, 2005.

European Medicines Agency. European Public Assessment Report (EPAR) for Reyataz. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/reyataz-epar-scientific-discussion_en.pdf. Acesso em: 12 de setembro de 2020.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (Ph. Eur.), 10^a edição 2019.

Farmacopeia Brasileira (FB6), volumes 1 e 2. 6^a Ed. Brasília. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FUN, A.; WENSING, A. M.; VERHEYEN, J.; *et al.* Human immunodeficiency virus gag and protease: partners in resistance. **Retrovirology**, v. 9, n. 1, p. 63, 2012.

GOLDSMITH, D. R.; PERRY, C. M. Atazanavir. **Drugs**, v. 63, n. 16, p.1679-93, 2003.

Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Digestivas e Renais. LIVERTOX: INFORMAÇÕES CLÍNICAS E DE PESQUISA SOBRE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR DROGAS. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>. Acesso em: 12 de maio de 2020.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 693-705, 2009.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHOJ. L. S.; NUNE, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de

medicamentos. **Revista Brasileira Farmacologia**, Recife, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LE TIEC, C.; BARRAIL, A.; GOJARD, C.; TABURET, A. Clinical pharmacokinetics and summary of efficacy and tolerability of atazanavir. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 10, p.1035-1040, 2005.

LOREGIAN, A.; PAGNI, S.; BALLARIN, E.; *et al.* Simple determination of the HIV protease inhibitor atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 4, p. 500–505, 2006.

LY, T.; RUIZ, M. E. Intervalo QT prolongado e torsades de pointes associados à terapia com atazanavir. **Doenças Infecciosas Clínicas**, v. 44, n. 6, p.67-68, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 214–222. 2009.

MALVEZZI, A.; OLIVEIRA, K. M.; SILVA, W. C. F. N. Obtenção de valores do coeficiente de partição e do pka de análogos estruturais à procainamida para estudos de qsar. **Sociedade Brasileira de Química**, 1999.

Ministério da Saúde. AIDS/ HIV: O QUE É, CAUSAS, SINTOMAS, DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO. Disponível em: < <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/aids-hiv>>. Acesso em: 09 de março de 2020.

MOLINA, J. M.; ANDRADE-VILLANUEVA, J.; ECHEVARRIA, J.; *et al.* Once-daily atazanavir/ritonavir versus twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naive HIV-1-infected patients: 48 week efficacy and safety results of the CASTLE study. **Lancet**, v. 372, n. 9639, p. 646-655, 2008.

MÜLLER, A. C.; KANFER, I. An efficient HPLC method for the quantitative determination of atazanavir in human plasma suitable for bioequivalence and pharmacokinetic studies in healthy human subjects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 1, p. 113–118, 2010.

National Center for Biotechnology Information. PUBCHEM. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 05 de junho de 2020.

National Institute Of Allergy And Infectious Diseases. HIV/AIDS. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hivaids>; Acesso em: 09 de maio de 2020.

Organização Mundial da Saúde. FOLHA INFORMATIVA - HIV/AIDS. Disponível em: https://www3.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5666:folha-informativa-hiv-aids&Itemid=812; Acesso em: 09 de maio de 2020.

PANAGOPOULOS, P.; MALTEZOS, E.; HATZAKIS, A.; *et al.* Hyperbilirubinemia in atazanavir treated HIV-infected patients: the impact of the UGT1A1*28 allele. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 10, p. 205–208, 2017.

PHUNG, N.; KUNCZE, K.; OKOCHI, H.; *et al.* Development and validation of an assay to analyze atazanavir in human hair via liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 5, p. 431–441, 2018.

RANDALL D.; AGARWALA S.; MUMMANEMI V.; *et al.* Concentrações de compartimento tecidual de atazanavir no líquido cefalorraquidiano, líquido seminal e plasma em indivíduos HIV + [resumo no. H-1711]. **42ª Conferência de Interciência sobre Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia**. p. 27-30, 2002.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SAHA, C.; GUPTA, N. V.; CHANDAN, R.S. Development and validation of a UPLC-MS method for determination of atazanavir sulfate using the "analytical quality by design" approach. **Acta Pharmaceutica**, v. 70, n. 1, p.17-33, 2020.

SCHUSTER, A.; BURZAWA, S.; JEMAL, M.; *et al.* Quantitative determination of the HIV protease inhibitor atazanavir (BMS-232632) in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry following automated solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 788, n. 2, p. 377-386, 2003.

SPARIDANS, R. W.; DOST, F.; CROMMENTUYN, K. M. L.; *et al.* Liquid chromatographic assay for the protease inhibitor atazanavir in plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 1, p. 72-76, 2005.

SILVEIRA, A. A.; Mapeamento Genético do HIV-1 e Análise de Resistências Associadas aos Antirretrovirais em Pacientes do Centro - Oeste Brasileiro. **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás**, 2011.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: a review. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 10, n. 1, p. 1409-1421, 2017.

SWAINSTON HARRISON, T.; SCOTT, L. J. Atazanavir: uma revisão de seu uso no tratamento da infecção por HIV. **Drugs**. v. 16, p. 2309-2336, 2005.

TABURET, A. M.; PIKETTY, C.; CHAZALLON C, *et al.* Interactions between atazanavirritonavir and tenofovir in heavily pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2091-2096, 2004.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. The National Formulary - USP 43; NF- 38, 2020

U.S. National Library of Medicine. MEDLINE PLUS: HIV/AIDS. Disponível em: <https://medlineplus.gov/hivaids.html>; Acesso em: 09 de março de 2020.

U.S. Food & Drug Administration. Drug development and drug interactions | table of substrates, inhibitors and inducers. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers#table2-2>. Acesso em: 09 de agosto de 2020.

VALENTINI, S.R.; SOMMER W.A.; MATIOLI G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v.11, n.2, p. 26-31, 2007.