



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
FACULDADE DE FARMÁCIA



DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE NEVIRAPINA, LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA
EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO CALIBRAÇÃO
MULTIDERIVADA

GUSTAVO MELO GONÇALVES

Macaé
2016

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE NEVIRAPINA, LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA
EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO CALIBRAÇÃO
MULTIDERIVADA.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro
como requisito para obtenção do título de
farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Maximiliano Silva
Sangoi

Macaé
2016

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades encontradas ao longo do caminho.

A UFRJ e ao seu corpo docente que proporcionaram a experiência de cursar o curso de farmácia, que muito contribuiu para a minha formação profissional.

Em especial aos meus avós que sempre tinham um gesto ou uma palavra de carinho em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e paciência nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Maximiliano Sangoi pela oportunidade, apoio e dedicação na elaboração deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da zidovudina	16
Figura 2 - Esquema de fosforilação da zidovudina.....	18
Figura 3 - Estrutura molecular da lamivudina	19
Figura 4 - Esquema de fosforilação da lamivudina (3TC).....	20
Figura 5 - Estrutura molecular da nevirapina.....	21
Figura 6 - Esquema das combinações das diferentes concentrações dos fármacos empregadas na otimização da metodologia espectrofotométrica utilizando método dos quadrados mínimos parciais (PLS).....	39
Figura 7 - Espectros das soluções contendo mistura de excipiente, fármacos individuais e em mistura.....	40
Figura 8 - Gráfico de linearidade da lamivudina	41
Figura 9 - Gráfico de linearidade da Nevirapina	41
Figura 10 - Gráfico de linearidade da zidovudina	41
Figura 11 - Gráfico referente ao teste de precisão da lamivudina, mostrando os resíduos em relação à concentração. A) Resíduo padronizado X Ordem de observação. B) Porcentagem X Resíduo padronizado.....	43
Figura 12 - Gráfico referente ao teste de precisão da zidovudina, mostrando os resíduos em relação a concentração. A) Resíduo padronizado X Ordem de observação. B) Porcentagem X Resíduo padronizado.....	44
Figura 13 - Gráfico referente ao teste de precisão da Nevirapina, mostrando os resíduos em relação a concentração. A) Resíduo padronizado X Ordem de observação. B) Porcentagem X Resíduo padronizado.....	45
Figura 14 - Gráfico referente ao teste de exatidão da zidovudina.	47
Figura 15 - Gráfico referente ao teste de exatidão da lamivudina.	47
Figura 16 - Gráfico referente ao teste de exatidão da nevirapina.....	47
Figura 17 - Gráfico de robustez, referente à lamivudina. A) Resíduo padronizado X Ordem Observada. B) Porcentagem X Resíduo padronizado. C) Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados).....	50
Figura 18 - Gráfico de robustez, referente à zidovudina. A) Resíduo padronizado X Ordem Observada. B) Porcentagem X Resíduo padronizado. C) Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados).....	51

Figura 19 - Gráfico de robustez, referente à Nevirapina. A) Resíduo padronizado X Ordem Observada. B) Porcentagem X Resíduo padronizado. C) Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados).....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparo das amostras para otimização do método espectrofotométrico. .34	
Tabela 2 - Valores encontrados no ensaio de precisão intermediária para os fármacos.....42	
Tabela 3. Valores encontrados no ensaio de precisão intradia para os fármacos....42	
Tabela 4. Valores encontrados no ensaio de exatidão para os fármacos.....46	
Tabela 5. Valores de teor encontrados no ensaio de robustez para os fármacos. ...49	

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC	lamivudina
3TC-2P	lamivudina bifosfato
3TC-3P	lamivudina trifosfato
3TC-P	lamivudina monofosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZT	zidovudina
BW	Burroughs Wellcome Co.
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
EC	Espectroscopia
FDA	Food and Drugs Administration
GRID	Deficiência Imunológica Relacionada aos Gays
HAART	Highly Active Antirretroviral Therapy
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
ISO	Organização Internacional para Padronização
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos
ITRNN	Inibidor da Transcriptase Reversa não Análogo de Nucleosídeos
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia
NCI	National Cancer Institute
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCP	<i>Pneumocystis carinii</i>
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SQR	Substância Química de Referência
TR	Transcriptase Reversa
ZDV	zidovudina

Resumo

Atualmente vem se fazendo necessário o desenvolvimento de novos fármacos e/ou associações entre eles, visando o aumento do conforto do paciente e o aumento da adesão do mesmo ao tratamento. No entanto, a segurança e a eficácia de tais medicamentos devem ser atestadas e asseguradas por meio de validações competentes e de acordo com as normas previamente estabelecidas pelos órgãos reguladores a fim de garantir a qualidade do mesmo. O método espectrofotométrico no UV foi escolhido por se apresentar como um método, rápido e preciso para análise simultânea de fármacos, especialmente quando auxiliado por ferramentas estatísticas e software. Sabe-se também que a falta de qualidade de um medicamento pode ocasionar sérios transtornos na saúde do paciente, tanto com um aumento da dose, quanto com a redução da mesma, visto isso, podemos notar a necessidade de ser realizado um controle de qualidade adequado. A falta de estudos para a determinação e validação da curva de absorção dessa associação de medicamentos faz-se necessário um estudo para tal desenvolvimento. O objetivo do trabalho foi determinar simultaneamente zidovudina, lamivudina e nevirapina em formas farmacêuticas a partir do desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico com determinação por análise multivariada. O método desenvolvido com solução diluente etanol/água (1:1) possibilitou a determinação de zidovudina, lamivudina e nevirapina nos comprimentos de onda de 267 nm, 235 nm e 295 nm, respectivamente. A validação foi realizada conforme guias do ICH e ANVISA, avaliando os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. O método foi considerado específico, sem interferência de excipientes das formulações; linear, com coeficientes de determinação superiores a 0,998; preciso e exato com desvio padrão relativo inferior a 1,96% e robusto nas condições avaliadas. O método espectrofotométrico validado permitiu o doseamento em formulações farmacêuticas contendo fármacos individuais ou em associações. Dessa forma, o método contribui para o desenvolvimento tecnológico das ciências farmacêuticas no Brasil no âmbito do controle de qualidade de medicamentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
Resumo	8
SUMÁRIO	9
1. Introdução	11
1.1. Histórico.....	11
1.2. Virologia.....	13
1.3. Fisiologia viral.....	14
1.4. Descrição dos medicamentos.....	16
1.4.1. Zidovudina.....	16
1.4.2. Lamivudina.....	18
1.4.3. Nevirapina.....	20
1.5. Espectrofotometria no UV/Vis.....	22
1.6. Análise Fatorial.....	23
1.7. Validação de métodos analíticos.....	25
1.8. Revisão de métodos analíticos.....	28
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. Materiais e métodos	31
3.1. Materiais.....	31
3.1.1. Produtos farmacêuticos.....	31
3.1.2. Substâncias químicas de referências (SQR).....	32
3.1.3. Solventes e reagentes.....	32
3.1.4. Equipamentos e reagentes	32
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Preparo das soluções padrões de estoque	32
3.2.2. Preparo das soluções padrão de trabalho.....	33
3.2.3. Preparo das amostras comerciais.....	33
3.2.4. Desenvolvimento e otimização do método estatístico.....	33
3.2.5. Validação da metodologia analítica.....	35

3.2.6. Especificidade	35
3.2.7. Linearidade	36
3.2.8. Precisão	36
3.2.9. Exatidão	37
3.2.10. Robustez	37
4. Resultados e Discussão	38
4.1 Desenvolvimento e otimização do método	38
4.2. Especificidade	39
4.3. Linearidade	40
4.4. Precisão	41
4.5. Exatidão	45
4.6. Robustez	48
5. Conclusão	53
Referências Bibliográficas	54

1. Introdução

1.1. Histórico

Atualmente, a *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) é considerada uma pandemia. Foi descoberta em 1981 e hoje é uma das grandes discussões existentes no mundo, pois envolve questões como direitos humanos, o uso racional de medicamentos e sua política, além da qualidade de vida dos portadores desta síndrome (BASAVAPATHRUNI & ANDERSON, 2007).

A AIDS causada pelo vírus HIV atinge atualmente milhões de pessoas ao redor do mundo. Estima-se que, no Brasil, 718 mil indivíduos vivam com o vírus HIV, dentre elas alguns já manifestam a AIDS, e, em média, são identificados cerca de 37 mil novos casos por ano. Nos últimos dez anos, houve aumento na taxa de detecção de AIDS em jovens em quase todas as regiões do Brasil, com destaque para as Regiões Norte e Nordeste, que tiveram, em 2012, um aumento de casos de 111,0% e 72,3%, respectivamente, em comparação com o ano de 2003 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A AIDS foi observada clinicamente pela primeira vez em 1981, nos Estados Unidos. Os casos iniciais foram primeiramente detectados em um grupo de usuários de drogas injetáveis e de homens homossexuais que estavam com a imunidade comprometida sem motivo aparente. Esses indivíduos apresentavam sintomas de pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis carinii* (PCP), uma infecção oportunista incomum até então, conhecida por ocorrer em pessoas com o sistema imunológico muito debilitado. Pouco tempo depois, um número inesperado de homens homossexuais desenvolveu um tipo de câncer de pele raro chamado Sarcoma de Kaposi. Muitos mais casos de PCP e de Sarcoma de Kaposi foram diagnosticados quando um alerta foi dado ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o qual enviou uma força-tarefa para acompanhar o surto (BASAVAPATHRUNI & ANDERSON, 2007).

Inicialmente, o CDC não se referia a doença por um nome específico, mas sim por nomenclaturas associadas às condições clínicas dos pacientes, como linfadenopatia generalizada persistente, Sarcoma de Kaposi e infecções oportunistas (BARRÉ-SINOUSSE, 1983). Em determinado momento, o CDC cunhou a frase "a doença dos quatro H's", uma vez que a síndrome parecia afetar haitianos, homossexuais, hemofílicos e usuários de heroína. Na imprensa

geral, o termo "GRID", deficiência imunológica relacionada aos gays - tradução livre, tinha sido inventado. No entanto, depois de determinar que não era uma doença restrita à comunidade homossexual, o termo GRID foi abolido dando lugar a sigla AIDS. Essa sigla foi introduzida em uma reunião em julho de 1982 em setembro daquele mesmo ano, o CDC começou a se referir à doença como AIDS (FONSECA, et al., 1999).

Em 1983, dois grupos de pesquisa encontraram dois vírus, HTLV-III e LAV (vírus associado à linfadenopatia), que apresentavam características semelhantes e que promoviam sintomas parecidos em pacientes. Posteriormente, em 1986 descobriram que os vírus, antes chamados por nomes distintos, se tratavam do mesmo vírus e passaram a ser chamados de HIV (GALLO, 1983).

Acredita-se que os vírus HIV-1 e HIV-2 tenham se originado em primatas no centro-oeste africano e foram transferidos para os seres humanos no início do século XX. O HIV-1 parece ter se originado no sul de Camarões através da evolução do vírus da imunodeficiência símia (SIV), que infecta os chimpanzés selvagens (o HIV-1 descende do SIV endêmico nas subespécies de chimpanzés *Pan troglodytes*). O mais próximo do HIV-2 é o SIV, um vírus proveniente de, um macaco do Velho Mundo que vive no litoral da África Ocidental (do sul do Senegal ao oeste da Costa do Marfim). Os macacos do Novo Mundo, como o macaco-da-noite, são resistentes à infecção pelo HIV-1, possivelmente devido a uma fusão genômica de dois genes com resistência viral. Acredita-se que o HIV-1 tenha ultrapassado a barreira das espécies pelo menos em três ocasiões diferentes, dando origem a três grupos de vírus (M, N e O) (CORBEIL et al., 2001).

Há evidências de que humanos que participavam de atividades com animais selvagens, como caçadores ou vendedores de animais silvestres, se infectaram com o SIV. No entanto, o SIV é um vírus de baixa virulência que, normalmente, é suprimido pelo sistema imunológico humano dentro de poucas semanas após a infecção. Acredita-se que várias transmissões (do tipo pessoa-pessoa), desse vírus em rápida sucessão são necessárias para dar-lhe tempo suficiente para se transformar no HIV. Além disso, devido a sua taxa de transmissão pessoa-a-pessoa relativamente baixa, o SIV só pode se espalhar por toda a população na presença de um ou mais canais de transmissão de alto risco, que eram ausentes na África antes do século XX (MARX; ALCABES; DRUCKER, 2001).

Os canais de transmissão de alto risco específicos, que permitiram que o vírus se adaptasse aos seres humanos e se espalhasse por toda a sociedade, dependiam do calendário proposto para a transmissão de animais para humanos. Estudos genéticos do vírus sugerem que o ancestral comum mais recente do grupo M do HIV-1 remonta ao ano de 1910. Os defensores desse dado ligam a epidemia do HIV ao surgimento do colonialismo e do crescimento das grandes cidades africanas coloniais, o que levou a diversas mudanças sociais, como um maior grau de promiscuidade sexual, disseminação da prostituição e alta frequência de casos de doenças genitais (como a sífilis) nas cidades coloniais nascentes. Embora as taxas de transmissão do HIV durante a relação sexual vaginal sejam baixas em circunstâncias normais, elas são muitas vezes aumentadas se um dos parceiros sofre de uma doença sexualmente transmissível que cause úlceras genitais. No início dos anos 1900, as cidades coloniais eram notáveis por sua alta prevalência de prostituição e de casos de úlceras genitais. Em 1928, por exemplo, acredita-se que em torno de 45% das mulheres residentes no leste de Kinshasa, no Congo, eram prostitutas, e, em 1933, cerca de 15% de todos os moradores da mesma cidade tinham sífilis (SOUSA; MÜLLER; LEMEY, 2010).

O caso mais antigo e bem documentado de HIV em humanos remonta a 1959, na República Democrática do Congo. O vírus pode ter estado presente nos Estados Unidos desde 1966, mas a grande maioria das infecções que ocorrem fora da África subsaariana (incluindo nos Estados Unidos) podem ser rastreadas até um único indivíduo desconhecido que se infectou com o HIV no Haiti e, em seguida, trouxe a infecção para os Estados Unidos por volta de 1969. A epidemia se espalhou rapidamente entre os grupos de alto risco e em 1978, a prevalência de HIV-1 entre homossexuais masculinos residentes de Nova Iorque e São Francisco era estimada em 5%, sugerindo que vários milhares de pessoas no país estavam infectadas (CORBEIL et al., 2001).

1.2. Virologia

O HIV é a causa da doença conhecida como AIDS. O HIV é um retrovírus que infecta primariamente os componentes do sistema imunológico humano, tais como as células T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas. Ele direta e indiretamente destrói as células T CD4⁺ (ALIMONTI et al., 2003).

O HIV é um membro do gênero *Lentivirus*, parte da família *Retroviridae*. Os lentivírus compartilham muitas características morfológicas. Muitas espécies de mamíferos são infectadas pelos *Lentivirus*, que são tipicamente responsáveis por doenças de longa duração, com um longo período de incubação. Após a entrada na célula-alvo, o genoma do vírus de RNA viral é convertido em DNA de cadeia dupla através de uma transcriptase reversa codificada pelo vírus, que é transportada juntamente com o genoma viral na partícula do vírus. O DNA viral resultante é depois importado para o núcleo da célula e integrado ao DNA celular por uma integrase codificada pelo vírus (SMITH et al., 2006). Uma vez integrado, o vírus pode tornar-se latente, permitindo que ele e sua célula hospedeira não sejam detectados pelo sistema imunológico (MARTÍNEZ et al., 2010). Alternativamente, o vírus pode ser transcrito, produzindo novos genomas de RNA e proteínas virais que são "empacotados" e liberados a partir da célula como novas partículas virais, que então recomeçam o ciclo de replicação (GERALD et al., 2004).

Dois tipos de HIV foram caracterizados: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o vírus que foi originalmente descoberto (e também inicialmente referido como LAV ou HTLV-III). É mais virulento, infeccioso, e é a causa da maior parte das infecções de HIV no mundo. O HIV-2 é menos infeccioso em comparação ao HIV-1, o que indica que menos pessoas serão infectadas por exposição ao HIV-2 (GILBERT et al., 2003).

1.3. Fisiologia viral

Depois que o vírus entra no organismo, há um período de rápida replicação viral, levando a uma grande quantidade de vírus no sangue periférico. Durante a infecção primária, o nível de HIV pode chegar a vários milhões de partículas de vírus por microlitro de sangue (PIATAK et al., 1993). Esta resposta é acompanhada por uma diminuição acentuada do número de células T CD4⁺ circulantes. A viremia aguda é quase invariavelmente associada com a ativação das células T CD8⁺, que matam células infectadas com HIV e, subsequentemente, com a produção de anticorpos. A resposta de células T CD8⁺ é considerada importante no controle dos níveis de vírus, que chega a um pico e depois entra em declínio, conforme as contagens de células T CD4⁺ se recuperarem. Uma boa resposta das células T CD8⁺ tem sido associada a uma progressão mais lenta da doença e a um prognóstico melhor, apesar de não eliminar o vírus (PANTALEO et al., 1997).

O vírus HIV infecta as células T CD4+ do sistema imune, que são linfócitos T que expressam moléculas CD4 em suas superfícies, o vírus consegue infectar as células ligando-se as moléculas de CD4 presentes nas superfícies desses linfócitos. Uma vez dentro da célula, o vírus se utilizará de toda a estrutura bioquímica da célula para a sua replicação (MACHADO, 2004).

Os primeiros sintomas da infecção inicial podem ser dor muscular, febre, infecções de garganta. Uma vez superada essa fase, ocorre à chamada infecção latente, que pode variar de 2 a 10 anos, em alguns casos até mais. Por final, o vírus HIV causa uma grande depressão do sistema imunológico, o que abre precedente para doenças conhecidas como doenças oportunistas, tal motivo se dá pelo fato de que as células T CD4+ do sistema imune, que possuem importante papel na resposta imunológica, sofrem uma grande diminuição (RACHID, 2005).

Além desses fatores complicadores, o vírus HIV apresenta resistência a alguns fármacos pelo acúmulo de mutações genéticas de resistência do HIV, o que pode ser um fator limitante para o sucesso da terapia. A presença de determinadas posições na cadeia de peptídeos que são alvos específicos para as mutações que resultam em trocas de aminoácidos. Este grande volume de mutações tanto na transcriptase reversa, quanto na protease viral, implica na resistência aos fármacos antirretrovirais. Além das mutações já comentadas, outro fator pode interferir na resistência a terapia medicamentosa, o polimorfismo genético, que são variações comuns e que se fazem presente mesmo como ausência de pressão exercida pelos fármacos antirretrovirais. Portanto, tem-se a necessidade do tratamento por múltiplos fármacos, o que diminui a possibilidade de resistência ao tratamento (SETHI, 2004).

A ZDV e a 3TC são medicamentos antirretrovirais da classe dos inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeos. São normalmente utilizados hoje em dia simultaneamente com o objetivo de potencializar a supressão viral, inibir a resistência aos fármacos e facilitar a posologia (SOUZA, 2004).

Sabe-se que se feito o tratamento concomitantemente com zidovudina (ZDV) e lamivudina (3TC), além de um inibidor da protease como por exemplo a nevirapina (NVP), o sucesso da terapia pode aumentar em até 3,5%, comparativamente ao uso dos mesmos medicamentos em comprimidos diferentes. O uso em associação desses fármacos pode refletir também na adesão do paciente ao tratamento, tendo em vista a complexidade da terapia nesses casos devido a grande variedade de doses, o que pode estar associado a erros, principalmente por intoxicação. O uso

de fármacos em associação na mesma formulação pode diminuir esses tipos de interferentes associados à toxicidade (SOUZA, 2004).

1.4. Descrição dos medicamentos

1.4.1. Zidovudina

A zidovudina (AZT), que tem sua estrutura molecular representada na Figura 1, foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da AIDS, pertencente ao grupo dos inibidores da transcriptase reversa. O AZT foi sintetizado em 1964 por J. Horwitz do *Barbara Ann Karmanos Cancer Institute e Wayne State University School of Medicine* sintetizou (HORWITZ et al. 1964).

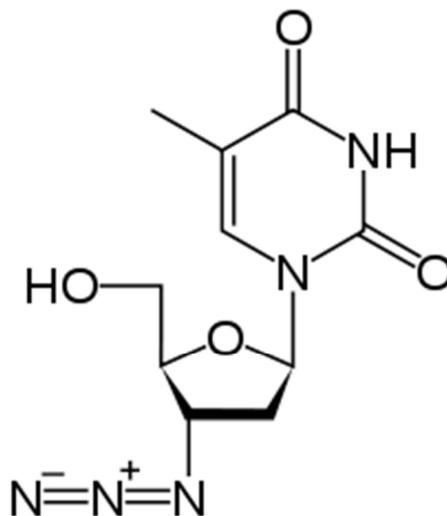


Figura 1 - Estrutura molecular da zidovudina

Em 1974, Ostertag e colaboradores, do Instituto Max Planck na Alemanha, obtiveram indícios que o AZT era ativo numa cultura de retrovírus de ratos. Em 1984, pouco após a confirmação de que o HIV era a causa da AIDS, os cientistas na *Burroughs Wellcome Co.* (BW) começaram a pesquisar novos compostos para tratar a doença. O esforço de seus investigadores focou-se na enzima viral transcriptase reversa. A transcriptase reversa é um tipo de enzima na qual os retrovírus, incluindo o HIV, utilizam em sua replicação (OSTERTAG et al., 1974).

A AZT é um medicamento da classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN). Um pró-fármaco, cuja forma ativa é a zidovudina trifosfato (AZT-3P). A zidovudina trifosfato é obtida por reações de fosforilação do

fármaco nos linfócitos, reações essas que estão ilustradas na Figura 2. Seu mecanismo de ação consiste em inibir competitivamente a incorporação, pela enzima transcriptase reversa, da timidina DNA viral (VEAL; BACK, 1995).

O AZT apresenta mecanismo de ação semelhante à lamivudina, também atuando na inibição da enzima transcriptase reversa viral, pois se ligam ao DNA pró-viral de linfócitos, ocasionando a terminação da cadeia de aminoácidos. Para se transformarem na forma ativa trifosfatada também fosforilada em reações intracelulares (AOKI, 1999).

Porém, a sua eficácia tem sido dificultada pela rápida aquisição de resistência viral. Atualmente a 3TC é indicada, para tratamento da infecção por HIV em combinação com pelo menos dois outros medicamentos antirretrovirais, e em monoterapia na prevenção da transmissão materno-fetal do HIV (ZAPOR et al., 2004).

A zidovudina requer a fosforilação intracelular por parte de um anabólico trifosfatado. O fármaco trifosfato interfere com a transcriptase reversa do HIV por competição com os nucleotídeos naturais para incorporação no crescimento da cadeia de DNA do HIV, interrompendo o alongamento da cadeia de DNA do HIV se retomada porque ao AZT falta o grupo 3' hidroxil no anel da desoxirribose necessário à ligação do açúcar-fosfato (ANDERSON et al., 2010).

Abaixo, as características físico-químicas da AZT:

Aspecto: pó cristalino branco.

Nome químico (IUPAC): 1-[(2R,4S,5S)- 4-azido-5-(hidroximetil) oxolan-2-il]- 5-metil-pirimidine-2,4-diona

Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}N_5O_4$.

Massa Molecular: 267,242.

Denominação Comum Internacional (DCI): Zidovudine.

Denominação Comum Brasileira (DCB): zidovudina.

Ponto de fusão: 177 °C.

Solubilidade: Solúvel em água, muito solúvel em etanol (FB5, 2010).

Via das fosforilações:

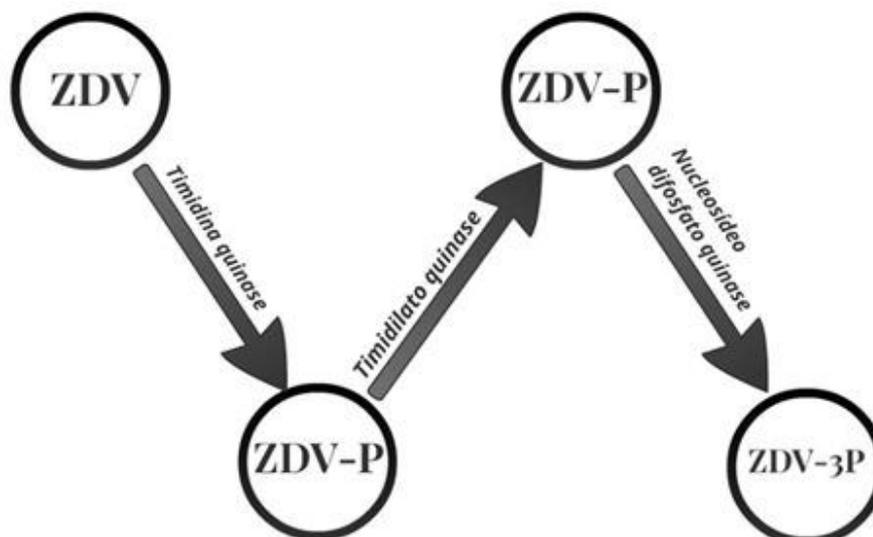


Figura 2 - Esquema de fosforilação da zidovudina

1.4.2. Lamivudina

A lamivudina (3TC) a qual sua estrutura molecular está representada na Figura 3, é um potente inibidor seletivo da replicação do HIV-1 e HIV-2 *in vitro*, da classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN). É também ativo contra isolados clínicos de HIV resistentes a AZT. A 3TC é um nucleosídeo análogo sintético desenvolvido em 1987 (SOUDEYNS, 1991; BENHAMOU, 1995; BLANEY, 1995). Uma análise da estereoquímica e de parâmetros eletrônicos levou a conclusão de que a atividade e a especificidade dos nucleosídeos análogos como inibidores da transcriptase reversa eram dependentes da forma do anel desoxiribose tanto quanto do ambiente eletrônico na região do carbono 3'. Por esta razão, os pesquisadores planejaram e sintetizaram nucleosídeos análogos com um anel pentose isostérico no qual o carbono 3' foi substituído por um heteroátomo. O resultado desta modificação foi que o par de elétrons disponível no heteroátomo participaria da formação ligações de hidrogênio entre átomos do centro catalítico da enzima, logo a ligação entre o nucleosídeo e a enzima seria mais forte. Este tipo de modificação simularia o efeito do grupo hidroxila presente no desoxinucleosídeo natural na formação da cadeia (DIONNE, 1999).

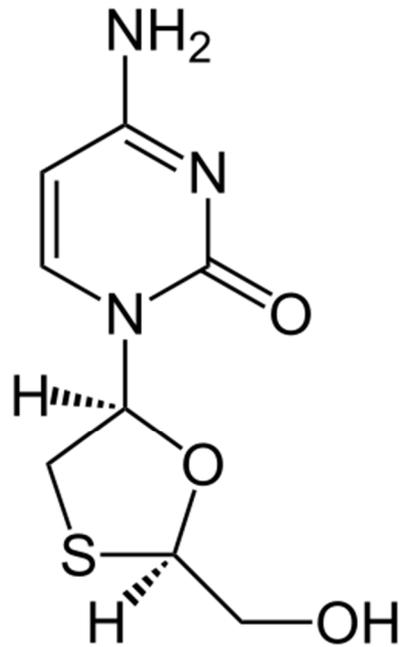


Figura 3 - Estrutura molecular da lamivudina

A 3TC atua inibindo a enzima transcriptase reversa viral, pois se liga ao DNA pró-viral de linfócitos, ocasionando a terminação da cadeia de aminoácidos. É um pró-fármaco, que passa por reações intracelulares de fosforilação, para atingir a sua conformação ativa. A desoxicitidina quinase é responsável pela formação da lamivudina monofosfato (3TC-P). A lamivudina difosfato (3TC-2P) é formada pela ação das enzimas citidina monofosfato quinase e finalmente, pela ação da difosfato quinase a 3TC, chega a sua última forma, (3TC-3P) (Moore et al., 1999). Tais reações estão esquematizadas na Figura 4 para melhor visualização. O metabólito ativo é o composto trifosforilado (3TC-3P), sendo que o difosfato é o anabólito predominante e limitante da formação da 3TC-3P (JOHNSON et al., 1999).

Kewn e colaboradores (1997) investigaram o anabolismo intracelular da 3TC para dar origem à forma trifosfatada. Eles avaliaram dois tipos de células sanguíneas: mononucleares periféricas e monocíticas. A 3TC-3P se liga ao DNA do HIV competindo com a 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato que atua inibindo a transcriptase reversa e termina a extensão da cadeia de DNA pró-viral (MOORE et al., 1999). Os metabólitos fosforilados não são usualmente detectados no sangue (MOYER et al., 1999). Devido à ausência do grupo hidroxila na posição 3' a cadeia de DNA não é alongada e não há replicação do HIV (PERRY; FAULDS, 1997).

Abaixo, as características físico-químicas da 3TC:

Aspecto: pó cristalino branco.

Nome químico (IUPAC): 4-amino-1-[(2R, 5S)-2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2-dihidropirimidin-2-ona;

Fórmula molecular: $C_8H_{11}N_3O_3S$.

Massa Molecular: 229,256.

Denominação Comum Internacional (DCI): Lamivudine.

Denominação Comum Brasileira (DCB): lamivudina.

Ponto de fusão: 160 °C.

Solubilidade: Solúvel em água, muito solúvel em etanol. (FB5, 2010).

Via das fosforilações:

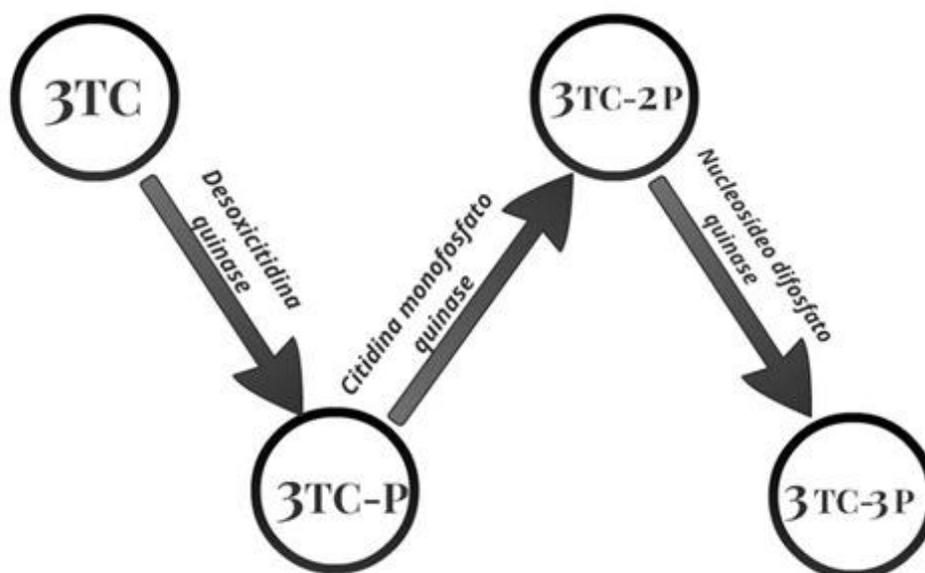


Figura 4 - Esquema de fosforilação da lamivudina (3TC).

1.4.3. Nevirapina

A nevirapina (NVP), com sua estrutura ilustrada na Figura 5, foi desenvolvida pela Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. Este fármaco foi o primeiro medicamento do grupo dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNN) aprovados pela Food and Drugs Administration (FDA), para o tratamento de adultos soropositivos ao HIV. Entretanto o mesmo não foi autorizado

no Canadá entre 1996 e 1998, devido a sua alta toxicidade e pouca evidência sobre sua efetividade antirretroviral, entretanto, posteriormente aceita pelo Canadá e pelo resto do mundo.

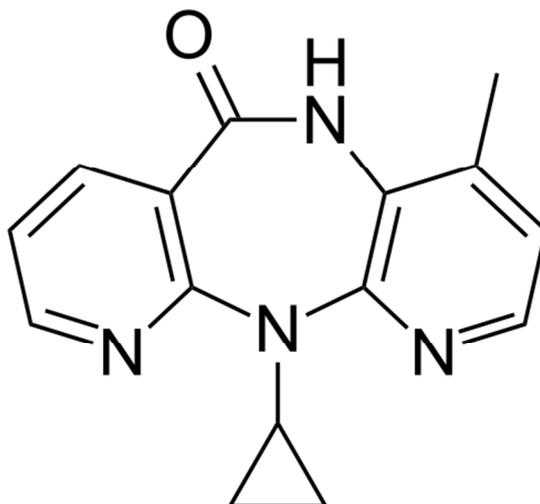


Figura 5 - Estrutura molecular da nevirapina

A NVP é um ITRNN do VIH-1. A NVP liga-se diretamente à transcriptase reversa e bloqueia as atividades RNA dependentes e DNA dependentes da DNA polimerase, provocando uma ruptura do local catalítico da enzima. A atividade da NVP não é competitiva relativamente aos trifosfatos padrão ou nucleosídicos.

Semelhante aos outros INNRTs liga-se à RT do HIV-1 e bloqueia a atividade do RNA polimerase dependente de DNA, provocando uma ruptura do local catalítico da enzima (Scott et al., 2000).

Desde 1996 tem sido usado no tratamento de adultos e crianças infectados pelo HIV-1, bem como na prevenção da transmissão vertical. É bem tolerado, o seu baixo custo, em comparação a outros fármacos, e a sua disponibilidade em co-formulações com os INRTs, o torna uma opção interessante para países com recursos limitados (RICHMAN et al., 1994; BOTTARO et al., 2010).

Os relatos mais comuns de efeitos adversos relacionados com a NVP são erupção cutânea e hepatotoxicidade e pode variar de leve a eventos com risco de vida até mesmo fatal (BOTTARO et al., 2010).

Abaixo, as características físico-químicas da NVP:

Aspecto: pó cristalino branco.

Nome químico (IUPAC): 11-ciclopropil-4-metil-5,11-dihidro-6H- dipirido [3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-ona

Fórmula molecular: $C_{15}H_{14}N_4O$;

Massa Molecular: 266,888;

Denominação Comum Internacional (DCI): Nevirapine

Denominação Comum Brasileira (DCB): Nevirapina

Ponto de fusão: 248 °C

Solubilidade: Solúvel em água, muito solúvel em etanol. (FB5, 2010)

1.5. Espectrofotometria no UV/Vis

A espectrofotometria UV-visível é uma técnica analítica que permite determinar a concentração de um composto em solução. Baseia-se na absorção de radiação eletromagnética pelas moléculas, por sua vez que a quantidade de luz absorvida depende da forma ideal da concentração. Para fazer este tipo de medida usa-se um espectrofotômetro, que selecionam o comprimento de onda e medem a quantidade de luz absorvida ou transmitida pela mesma (BORBA et al., 2013).

A determinação quantitativa é regida pela Lei de Lambert-Beer, na qual estabelece a relação entre a concentração e a quantidade de radiação absorvida por uma espécie química.

O espectro ultravioleta e visível nos fornece informações limitadas sobre as estruturas químicas de uma substância. Mas, por causa da sensibilidade destas técnicas e do alto grau de precisão e exatidão em suas medidas, elas são empregadas extensivamente em determinações quantitativas. As aplicações da espectrofotometria são para determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, resumindo:

- Análise comparativa de substâncias;
- Análise de compostos orgânicos e inorgânicos, cromóforos, complexos inorgânicos com metais de transição;
- Em compostos orgânicos que apresentam grupos carbonilas, dienos conjugados, aromático, etc.
- A espectrofotometria UV/VIS se aplica a moléculas orgânicas, íons inorgânicos ou complexos em dissolução e moléculas que apresentam conjugação. Esta técnica pode ser usada em determinações qualitativas e quantitativas.
- Laboratórios de controle de qualidade, pesquisa e desenvolvimento de análises clínicas e toxicológicas.

- Análises de águas: potável, caldeiras, resfriamento e na preparação de água desmineralizada, onde se determina principalmente ferro, sulfatos, fosfatos e outras.

1.6. Análise Fatorial

O desenvolvimento tecnológico oriundo das descobertas científicas tem alavancado o próprio desenvolvimento científico, ampliando em várias ordens de grandeza a capacidade de obter informações de acontecimentos e fenômenos que estão sendo analisados. Uma grande massa de informação deve ser processada antes de ser transformada em conhecimento. Portanto, cada vez mais se está necessitando de ferramentas estatísticas que apresentem uma visão mais global do fenômeno que aquela possível numa abordagem univariada. A denominação “análise multivariada” corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

Análise fatorial é um nome genérico dado a uma classe de métodos estatísticos multivariados cujo propósito principal é definir a estrutura subjacente em uma matriz de dados. Em termos gerais, a análise fatorial aborda o problema de analisar a estrutura das inter-relações (correlações) entre um grande número de variáveis (por exemplo, escores de testes, itens de testes, respostas de questionários), definindo um conjunto de dimensões latentes comuns, chamados fatores (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

Com a análise fatorial, o pesquisador pode primeiro identificar as dimensões separadas da estrutura e então determinar o grau em que cada variável é explicada por cada dimensão. Uma vez que essas dimensões e a explicação de cada variável estejam determinadas, os dois principais usos da análise fatorial resumo e redução de dados podem ser conseguidos. Ao resumir os dados, a análise fatorial obtém dimensões latentes que, quando interpretadas e compreendidas. Descrevem os dados em um número muito menor de conceitos do que as variáveis individuais originais. A redução de dados pode ser conseguida calculando escores para cada dimensão latente e substituindo as variáveis originais pelos mesmos (Tatham et al., 2005).

A análise fatorial desempenha um papel único na aplicação de outras técnicas multivariadas. A principal vantagem das técnicas multivariadas é sua habilidade em acomodar múltiplas variáveis em uma tentativa de compreender as relações complexas não possíveis com métodos univariados e bivariados (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

Aumentar o número de variáveis também aumenta a possibilidade de que nem todas as variáveis são não correlacionáveis e representativas de conceitos distintos. Em vez disso, grupos de variáveis podem ser inter-relacionados a ponto de todos serem representativos de um conceito mais geral. Isso pode ser por planejamento, como a tentativa de medir as muitas facetas da personalidade ou de uma imagem, ou pode surgir simplesmente da adição de novas variáveis (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

Em qualquer caso, o pesquisador deve saber como as variáveis estão inter-relacionadas para melhor interpretar os resultados. Finalmente, se o número de variáveis é muito grande ou se há uma necessidade de representar melhor um número menor de conceitos, em vez das muitas facetas, a análise fatorial pode auxiliar na seleção de um subconjunto representativo de variáveis ou mesmo na criação de novas variáveis como substitutas das variáveis originais, e ainda mantendo seu caráter original (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

A análise fatorial difere das técnicas de dependência, nas quais uma ou mais variáveis são explicitamente consideradas como as variáveis de critério ou dependentes e todas as outras são as variáveis preditoras ou independentes.

Na análise fatorial, as variáveis estatísticas (fatores) são formadas para maximizar seu poder de explicação do conjunto inteiro de variáveis, e não para prever uma variável dependente. Se tiver que esboçar uma analogia com as técnicas de dependência, seria no sentido de que cada variável observada (original) é uma variável dependente que é uma função de algum conjunto latente de fatores (dimensões) feitos eles próprios a partir de todas as outras variáveis (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

Técnicas analíticas fatoriais podem atingir seus objetivos ou de uma perspectiva exploratória ou de uma perspectiva confirmatória. Existe um debate contínuo sobre o papel apropriado da análise fatorial. Muitos pesquisadores consideram-na apenas exploratória, útil na busca da estrutura em um conjunto de variáveis ou como um método de redução de dados. Sob essa perspectiva, as

técnicas analíticas fatoriais “consideram o que os dados oferecem” e não estabelecem restrições *a priori* sobre o número de componentes a serem extraídos (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

Para muitas - talvez a maioria - das aplicações, esse uso da análise fatorial é adequado. No entanto, em outras situações, o pesquisador tem preconcebido ideias sobre a real estrutura dos dados, baseado em suporte teórico ou em pesquisas anteriores. Ele pode desejar testar hipóteses envolvendo questões sobre, por exemplo, quais variáveis deveriam ser agrupadas em fator ou número exato de fatores. Nesses casos, o pesquisador espera que a análise fatorial desempenhe um papel confirmatório, ou seja, avalie o grau em que os dados satisfazem a estrutura esperada (HAIR; BLACK; BABIN, 2009).

1.7. Validação de métodos analíticos

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

A validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade do fármaco em estudo, garante que os mesmos atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 34, 2011), demonstrando a importância do desenvolvimento deste trabalho.

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias,

qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal (RIBANI et al., 2004). Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003; ERMER; MILLER, 2005; ICH, 2005; ROZET et al., 2007). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação também é parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação (RAO; NAGARAJU, 2003; ICH, 2006a; ICH, 2006b). Um método deve ser validado ou revalidado sempre que seus parâmetros sofrerem alterações.

Quanto à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação, tanto o ICH (2005) como a Farmacopéia Americana (USP 34, 2011) reconhecem que não há necessidade de serem avaliados todos os parâmetros. O tipo de método e o seu propósito é que irão determinar o desenvolvimento do processo e os parâmetros a serem avaliados (SWARTZ; KRULL, 1998; ERMER, 2001; ERMER; MILLER, 2005).

Os métodos espectrofotométricos são as técnicas mais comumente utilizadas e continuam a desfrutar de grande popularidade. A disponibilidade de instrumentação, a simplicidade dos procedimentos, a velocidade, a precisão, e a exatidão da técnica ainda fazem dos métodos espectrofotométricos uma atraente opção. Além disso, estes métodos são mais econômicos e mais simples, em comparação aos métodos por CLAE e EC. A espectroscopia na região UV-vis é uma técnica útil na obtenção de informações qualitativas e quantitativas pela sobreposição das bandas dos analitos e interferências (PASCHOAL et al., 2003; ROJAS; OJEDA 2009).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos:

O primeiro, chamado de validação no laboratório (*"in house validation"*), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à validação completa (*"full validation"*) (RIBANI et al., 2004).

O segundo, chamado de validação completa envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação, por exemplo, monografias farmacopeicas (RIBANI et al., 2004).

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos de separação. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento, acreditação de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003). E o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/ 2003 (INMETRO, 2003).

Importante esclarecer que as resoluções são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidas e *guias* são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da *International Conference on Harmonization* (ICH), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos.

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que

tem sido utilizado pela ISO10. A norma internacional ISO/IEC 17025, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração. O *US-FDA* (“*United States Food and Drug Administration*”) também tem proposto guias sobre validação de métodos.

Assim, órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Como estes organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI et al., 2004).

1.8. Revisão de métodos analíticos

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação.

Como por exemplo, o artigo publicado pela Lavra et al. (2008) sobre desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos de dose fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência. O método de separação cromatográfica permite quantificar os três fármacos presentes nos comprimidos revestidos utilizando sistema de eluição isocrática, em coluna de fase reversa C₁₈, 250 x 4,6 µm, partícula 10 mm, a temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída de 60% de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 3,0 e 40% de acetonitrila, com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O comprimento de onda selecionado foi 270 nm (LAVRA et al., 2008). O método foi validado de acordo com guias internacionais, assegurando os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, além de robustez.

Aymard et al. (2000) desenvolveram e validaram uma técnica por HPLC com detecção no UV, usando extração sólido-líquido sem padrão interno adaptado aos antirretrovirais em estudo, incluindo zidovudina e efavirenz. Os autores avaliaram a

especificidade da técnica frente a 112 fármacos de diferentes classes usados amplamente por pacientes com infecção por HIV em tratamento com antirretrovirais. A técnica mostrou-se precisa, exata, específica e linear, com recuperação maior que 70%, com limite de quantificação de 5 ng/mL para zidovudina e 50 ng/mL para efavirenz.

Fan & Stewart (2002) determinaram zidovudina proveniente de plasma humano usando aprobarbital como padrão interno. A extração por fase sólida foi realizada utilizando metanol, água, tampão acetato de amônio 25 mM pH 7,0 e água-acetonitrila 70:30 v/v como eluente. A separação e quantificação foram realizadas por HPLC com pareamento iônico e detecção no UV a 265 nm com eluição isocrática. A fase móvel utilizada foi composta de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 3,2 – acetonitrila 86:14 v/v. O sistema cromatográfico consistiu de coluna e pré-coluna C8 150 x 3,9 mm com partículas de 5 µm. Esta técnica mostrou-se exata e precisa, com recuperação maior que 92% e linear no intervalo de 57,6 ng/mL a 2.880,0 ng/mL de zidovudina.

Rezk et al. (2003) validaram uma técnica cromatográfica para quantificar antirretrovirais, dentre eles zidovudina, utilizando extração por fase sólida dos fármacos com adição do padrão interno hexobarbital, tampão acetato de amônio 100 mM pH 7,0 e eluição com metanol. A análise cromatográfica consistiu de HPLC com detector UV, e coluna e pré-coluna: C18, com 150 x 3,9 mm e C18, 20 x 3,9 mm, com partículas de 5 µm, respectivamente. Foram utilizadas como fases móvel: tampão acetato de amônio 10 mM (pH 6,5 ajustado com ácido acético), acetonitrila e metanol. Este estudo foi avaliado no intervalo de 10 ng/mL a 10 000 ng/mL. A técnica mostrou-se exata e precisa, com recuperação maior que 90,0% para zidovudina.

Christian Fernandes et al. (2003) realizaram o doseamento da lamivudina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (DAD), coluna Merck C-8, 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm. A fase móvel constituída de (5:95) metanol: solução de acetato de amônio 0,025 M pH 3,8 ± 0,2, ajustado com ácido acético, de 1 mL/minuto, volume injetado de 10 µL, detecção no ultravioleta a 270 nm e temperatura de 30 °C. O padrão e amostras foram preparados na concentração de 0,4 mg/mL, utilizando fase móvel como solvente. A especificação de teor para comprimidos é de 90,0% a 110,0% da quantidade declarada.

Verweij-Van Wissen et al. (2005) validaram uma técnica de quantificação de ITRN, incluindo zidovudina no plasma, sem adição de padrão interno. A técnica extrativa escolhida foi extração por fase sólida utilizando metanol e água, seguido da separação e quantificação por HPLC a 260 nm. A coluna e pré-coluna utilizadas foram: C18, com 150 x 4,6 mm e C18, 20 x 3,9 mm, com partículas de 3,5 µm, respectivamente. Dois tipos de fases móvel foram utilizadas: tampão acetato (acetato de potássio 20 mM, pH 4,6 ajustado com ácido acético) – acetonitrila 95:5 e 76:24 v/v. Os resultados foram lineares no intervalo de 15 a 5000 ng/L.

Também baseado em extração sólido-líquido e HPLC-UV-Vis, (Notari et al. 2006) conseguiram separar e quantificar simultaneamente 16 fármacos antirretrovirais incluindo zidovudina e efavirenz. Os fármacos foram extraídos por processo de extração fase sólida com metanol, água e fosfato ácido de potássio 0,01 M. A coluna e pré-coluna utilizadas foram: C18 250 x 4,6 mm com partículas de 5 µm e 20 x 3,9 mm, respectivamente. A fase móvel foi composta de acetonitrila e fosfato ácido de potássio 0,01 M. A recuperação observada situou-se entre 88% e 120%. O limite de quantificação foi de 25 ng/mL para zidovudina e 100 ng/mL para efavirenz.

Beck et al. (2007) apresentam método validado por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. Para tal processo, foi empregado um sistema cromatográfico binário. Como fase estacionária foi empregada uma coluna Lichrospher 100 (RP-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) acoplada a uma pré-coluna RP-18. A fase móvel foi constituída pela mistura de metanol e tampão acetato de amônia 0,1M e ácido acético glacial a 1% (50:50 v/v) pH 6,5, com vazão de 1,0 mL/min. O sistema cromatográfico foi operado à temperatura ambiente, e a detecção foi realizada a 270 nm.

Camilo et al. (2008) realizaram a detecção de três medicamentos, estavudina, lamivudina e zidovudina, no ultravioleta fazendo as análises a 270 nm. Utilizou-se fase móvel gradiente constituída de tampão (acetato de potássio), 0,0663 molar, pH 6,0 e metanol, com vazão de 1,2 mL/min. A coluna foi mantida na temperatura de 45°C e o volume de injeção da amostra de 20 µL.

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação da 3TC, AZT e NVP utilizando a técnica de espectrofotometria por ultravioleta se faz de grande valia no meio acadêmico, por se tratar de uma técnica de baixo custo e de fácil execução. Destaca-se que a 3TC, AZT e NVP, não possuem monografia com similaridade no meio acadêmico, para determinações quantitativas em produto acabado,

apresentando grande progresso ao meio científico. Com base no exposto este estudo contribui para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade e garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos comercializados oferecendo credibilidade para os profissionais dedicados a eficiência do produto, contribuindo para o almejado efeito ao que o tratamento se propõe, melhorando a evolução de vida do paciente.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica para a determinação quantitativa e simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em produto acabado, tendo em vista que os fármacos podem ser encontrados para a comercialização em associação para o tratamento de pacientes portadores do vírus HIV.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico por UV para determinação simultânea dos fármacos;
- Otimização do método por análise multivariada;
- Identificação e doseamento das formulações por UV.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Produtos farmacêuticos

Foram utilizados comprimidos contendo 150 mg de lamivudina e 300 mg de zidovudina, em associação, fabricados pela Fundação para o Remédio Popular – FURP (Guarulhos-SP, Brasil), validade 12/2013, além de comprimidos Nevirax contendo 200 mg de nevirapina, fabricado pela Fundação Ezequiel Dias – FUNED (Belo Horizonte-MG, Brasil), validade 10/2014.

3.1.2. Substâncias químicas de referências (SQR)

As substâncias químicas de referência dos fármacos foram sintetizadas pelo Instituto Farmanguinhos (Rio de Janeiro-RJ, Brasil).

3.1.3. Solventes e reagentes

- Etanol P.A. (Vetec);
- Água destilada.

3.1.4. Equipamentos e reagentes

- Espectrofotômetro UV PerkinElmer Lambda 35;
- Espectrofotômetro UV Thermo Genesys 10;
- Balança analítica Sartorius MSU224S;
- Banho ultrassom 1600A.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das soluções padrões de estoque

Os padrões de nevirapina e zidovudina foram preparados individualmente a partir da pesagem de 10 mg de cada fármaco. Para a lamivudina, pesou-se 15 mg. A seguir foram transferidos individualmente para balões volumétricos de 10 mL, solubilizando e completando volume com a mistura de água destilada e etanol (1:1, v/v). As concentrações finais das soluções estoque I foram de 1,0 mg/mL para nevirapina e zidovudina e 1,5 mg/mL para lamivudina. Estas foram armazenadas sob refrigeração com temperatura entre 2-8 °C e protegidas da luz.

Destas, preparou-se diariamente as soluções estoque II. Assim, pipetaram-se, respectivamente, 200, 480 e 600 µL das soluções estoque I de lamivudina, nevirapina e zidovudina para tubos de ensaio individuais, completando o volume de 3,0 mL com água:etanol (1:1), obtendo as concentrações de 100, 160 e 200 µg/mL, de lamivudina, nevirapina e zidovudina, respectivamente.

3.2.2. Preparo das soluções padrão de trabalho

Para o preparo das soluções de trabalho, pipetou-se 300, 250 e 300 μL das soluções estoque II, completando volume para 4,0 mL, obtendo soluções de 7,5, 10,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivos à lamivudina, nevirapina e zidovudina.

3.2.3. Preparo das amostras comerciais

Calcularam-se os pesos médios de comprimidos de lamivudina e zidovudina em associação e comprimidos de nevirapina. Os comprimidos foram triturados separadamente. Pesaram-se quantidades referentes à 10/20 mg de lamivudina/zidovudina e foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL em etanol, obtendo concentrações de 100/200 $\mu\text{g/mL}$ para lamivudina e zidovudina, respectivamente. As soluções foram colocadas em ultrassom por 15 minutos e filtradas a seguir. Aliquotou-se 300 μL e transferiu-se para tubos de ensaio, completando volume com 3700 μL de água destilada, obtendo as concentrações finais de 7,5 e 15 $\mu\text{g/mL}$ de lamivudina e zidovudina, respectivamente.

Pesaram-se também quantidade de comprimidos triturados referente à 16 mg da nevirapina para balão volumétrico de 100 mL em etanol, obtendo uma concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$. Uma alíquota de 250 μL foi transferida para tubos de ensaio, completando volume para 4,0 mL com água destilada, obtendo a concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ de nevirapina.

3.2.4. Desenvolvimento e otimização do método estatístico

Foram realizados vários testes de solubilidade, concentrações e comprimentos de onda analisados durante o desenvolvimento analítico. Para otimização do método, optou-se por realizar análise pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS). Para isso, foram pré-definidas quatro concentrações de cada fármaco e combinadas utilizando delineamento fatorial multinível, com três fatores e 64 combinações, representados na Tabela 1. Para o volume final de cada amostra foi completado volume até 4,0 mL em tubo de ensaio com auxílio de pipetadores automático. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimentos de onda selecionados previamente, através de estudos e observações.

A definição do delineamento fatorial e a análise dos mínimos quadrados parciais foram realizadas utilizando o software Minitab.

Tabela 1. Preparo das amostras para otimização do método espectrofotométrico.

Amostra	Volume 3TC (μL)	Volume NVP (μL)	Volume AZT (μL)	Concentração 3TC ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração NVP ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração AZT ($\mu\text{g/mL}$)
1	120	100	120	1,5	2	3
2	120	100	240	1,5	2	6
3	120	100	600	1,5	2	15
4	120	100	840	1,5	2	21
5	120	200	120	1,5	4	3
6	120	200	240	1,5	4	6
7	120	200	600	1,5	4	15
8	120	200	840	1,5	4	21
9	120	500	120	1,5	10	3
10	120	500	240	1,5	10	6
11	120	500	600	1,5	10	15
12	120	500	840	1,5	10	21
13	120	700	120	1,5	14	3
14	120	700	240	1,5	14	6
15	120	700	600	1,5	14	15
16	120	700	840	1,5	14	21
17	240	100	120	3	2	3
18	240	100	240	3	2	6
19	240	100	600	3	2	15
20	240	100	840	3	2	21
21	240	200	120	3	4	3
22	240	200	240	3	4	6
23	240	200	600	3	4	15
24	240	200	840	3	4	21
25	240	500	120	3	10	3
26	240	500	240	3	10	6
27	240	500	600	3	10	15
28	240	500	840	3	10	21
29	240	700	120	3	14	3
30	240	700	240	3	14	6
31	240	700	600	3	14	15
32	240	700	840	3	14	21
33	600	100	120	7,5	2	3
34	600	100	240	7,5	2	6
35	600	100	600	7,5	2	15
36	600	100	840	7,5	2	21
37	600	200	120	7,5	4	3
38	600	200	240	7,5	4	6
39	600	200	600	7,5	4	15
40	600	200	840	7,5	4	21
41	600	500	120	7,5	10	3
42	600	500	240	7,5	10	6
43	600	500	600	7,5	10	15

44	600	500	840	7,5	10	21
45	600	700	120	7,5	14	3
46	600	700	240	7,5	14	6
47	600	700	600	7,5	14	15
48	600	700	840	7,5	14	21
49	840	100	120	10,5	2	3
50	840	100	240	10,5	2	6
51	840	100	600	10,5	2	15
52	840	100	840	10,5	2	21
53	840	200	120	10,5	4	3
54	840	200	240	10,5	4	6
55	840	200	600	10,5	4	15
56	840	200	840	10,5	4	21
57	840	500	120	10,5	10	3
58	840	500	240	10,5	10	6
59	840	500	600	10,5	10	15
60	840	500	840	10,5	10	21
61	840	700	120	10,5	14	3
62	840	700	240	10,5	14	6
63	840	700	600	10,5	14	15
64	840	700	840	10,5	14	21

3TC: lamivudina; NVP: nevirapina; AZT: zidovudina.

3.2.5. Validação da metodologia analítica

Validação analítica pode ser definida como um processo pelo qual se estabelece as características de performance de um método que atende às necessidades do método para o qual o trabalho vai ser aplicado. A validação ocorre através de estudos laboratoriais (PINTO *et al.*, 2003).

A metodologia foi avaliada de acordo com a RE nº 899 de 2003, sendo essa a legislação vigente no Brasil para tal fim, seguindo os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), robustez e intervalo. A metodologia foi desenvolvida utilizando espectrofotômetro com detector de UV, utilizando os comprimentos de onda selecionados durante a otimização de 234 nm, 267 nm e 295 nm, sendo para determinação de lamivudina, zidovudina e nevirapina, respectivamente.

3.2.6. Especificidade

De acordo com a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, ANVISA. A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um

composto em presença de outros componentes tais, como impurezas, produtos de degradação, e componentes da matriz.

A especificidade pode ser definida como a capacidade de medir especificamente o fármaco na presença de outros componentes, como placebo ou em uma solução contendo impurezas (VALENTINI *et al.*, 2003).

Os excipientes presentes na formulação dos comprimidos de lamivudina e zidovudina são: amidoglicolato de sódio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal, opadry white, etilcelulose, álcool etílico e água deionizada, conforme as proporções (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Os excipientes presentes na formulação dos comprimidos de nevirapina são: celulose microcristalina, lactose monohidratada, povidona K26/28 ou K/25, amido glicolato de sódio, dióxido de silício coloidal e estearato de magnésio. Os espectros obtidos com a solução placebo e os fármacos podem ser vista a seguir na Figura 6.

3.2.7. Linearidade

A linearidade se refere à capacidade do método de gerar resultados proporcionais em relação à concentração do analito, dentro de uma faixa específica (BRITO *et al.*, 2003).

A partir dos testes de otimização, escolheu-se as faixas de linearidade ideais dos fármacos. Foram preparadas sete concentrações para cada, onde os intervalos escolhidos para as leituras foram: 3; 4,5; 6; 7,5; 9; 10,5; 12 µg/mL para a lamivudina; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 µg/mL para a nevirapina; e 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24 µg/mL para a zidovudina. O preparo dessas soluções foi realizado a partir das soluções estoque II e diluídas conforme necessário. Com a utilização do software minitab, foi programado o teste full fatorial, onde 64 corridas foram programadas com todas as combinações possíveis, afim de ter o melhor perfil de linearidade. Utilizou-se os mesmos comprimentos de ondas já citados anteriormente de 234, 295 e 267 nm, respectivamente.

3.2.8. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003).

O teste de precisão foi realizado de acordo com o estabelecido pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

A precisão intradia foi executada utilizando 6 amostras na mesma concentração dos comprimidos disponíveis para teste frente a solução padrão de mesma concentração, referente à 7,5 / 15 µg/mL de lamivudina e zidovudina e 10 µg/mL para nevirapina. A precisão intermediária foi obtida utilizando desenho experimental full factorial 3², combinando três fatores (analistas, amostras, dias) e duas variáveis em cada fator.

3.2.9. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). O guia ICH recomenda que a exatidão deve ser estabelecida ao longo da faixa de calibração somente depois que a precisão e a linearidade estejam estabelecidas (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A exatidão foi executada em triplicata como demonstrado na Tabela 3, utilizando as concentrações referentes a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho de ambos os fármacos e comparadas com a solução padrão da mistura de lamivudina / zidovudina e nevirapina.

3.2.10. Robustez

A robustez foi realizada com amostras contendo 7,5/15 µg/mL de lamivudina / zidovudina e 10 µg/mL de nevirapina utilizando delineamento fatorial completo com 3 fatores.

Foram realizadas as seguintes alterações:

- Comprimento de onda: os comprimidos de ondas utilizados foram, 233, 234 e 235nm para lamivudina, 266, 267 e 268 referente a zidovudina e 294, 295 e 296 para nevirapina.
- Temperatura: as amostras foram analisadas nas temperaturas de 5 a 23 °C
- Diluente: a última diluição foi realizada com HCl 0,1M e mistura de etanol e água (1:1, v/v).

As combinações e as análises posteriores foram realizadas utilizando o software Minitab. As amostras foram analisadas frente à solução padrão preparada nas mesmas condições.

4. Resultados e Discussão

4.1 Desenvolvimento e otimização do método

A identificação de fármacos por espectrofotometria UV é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Mesmo não sendo um método seletivo, possui ampla aplicação nos códigos oficiais (WATSON, 2005).

Para a escolha do solvente, os critérios empregados foram a sensibilidade do método, a facilidade no preparo da amostra e, principalmente, a solubilidade da substância a ser analisada. O etanol foi o diluente escolhido devido à adequada solubilidade dos fármacos, no preparo inicial da amostra. Para redução da utilização do solvente orgânico, proporcionando um método menos oneroso, tóxico e poluente, foi empregada água como diluente final.

Os espectros de absorção no UV referentes à lamivudina, zidovudina e nevirapina SQR e à forma farmacêutica, preparados em água na concentração de 7,5, 15 e 10 µL/mL estão apresentados na Figura 6.

Foram realizados vários testes de solubilidade, concentrações e comprimentos de onda analisados durante o desenvolvimento analítico. Para otimização do método, optou-se por realizar análise pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS). Para isso, foram pré-definidas 4 concentrações de cada fármaco e combinadas utilizando delineamento fatorial multinível, com 3 fatores 64 combinações. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimentos de onda selecionados previamente. A seguir, a Figura 7 ilustra os fatores e as combinações na otimização do método. A definição do delineamento fatorial e a análise dos dados parciais foram realizadas utilizando o software Minitab.

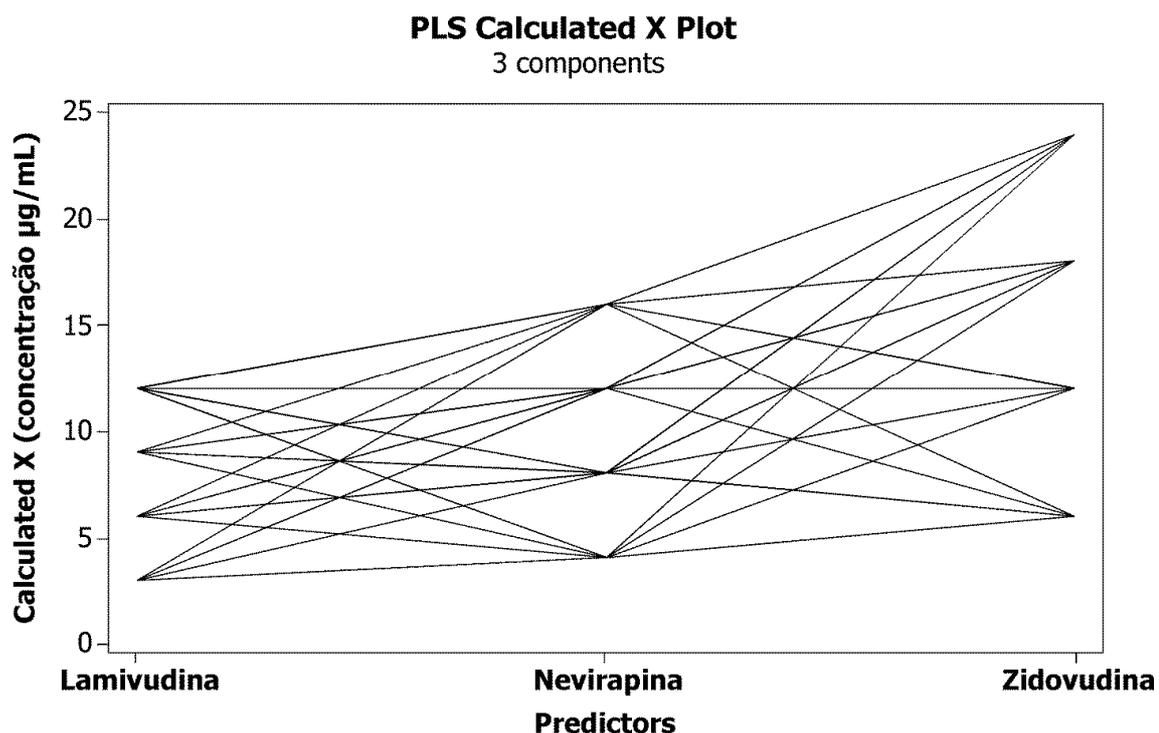


Figura 6 - Esquema das combinações das diferentes concentrações dos fármacos empregadas na otimização da metodologia espectrofotométrica utilizando método dos quadrados mínimos parciais (PLS).

4.2. Especificidade

Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes. A Figura 7 tem representado o espectro de absorção da mistura de excipientes.

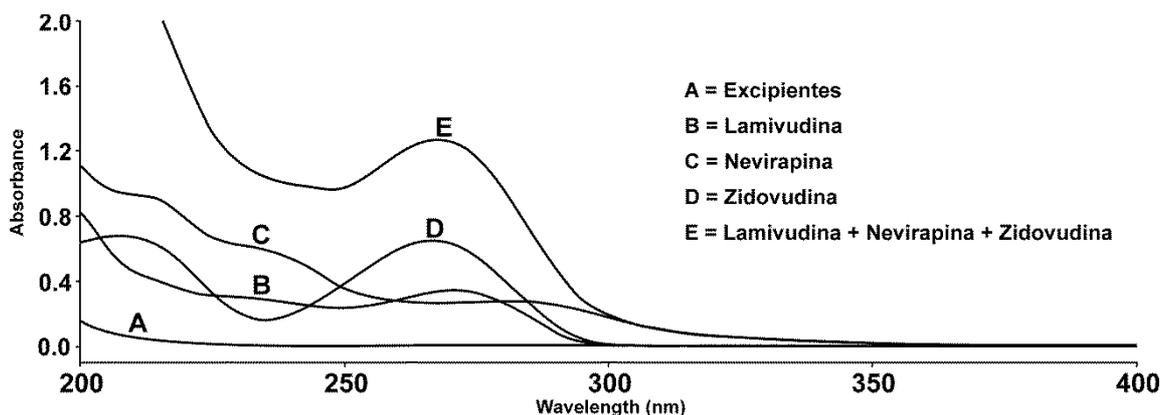


Figura 7 - Espectros das soluções contendo mistura de excipiente, fármacos individuais e em mistura.

4.3. Linearidade

Conforme a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, ANVISA. Que estabelece os parâmetros mínimos exigidos para a realização do teste de linearidade, um dos testes exigidos para a validação.

A linearidade deve ser determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual ou superior a 0,99. A seguir, segue a curva média obtida a partir das leituras da lamivudina, nevirapina e zidovudina juntamente com o valor do coeficiente de determinação (R) e a equação da reta.

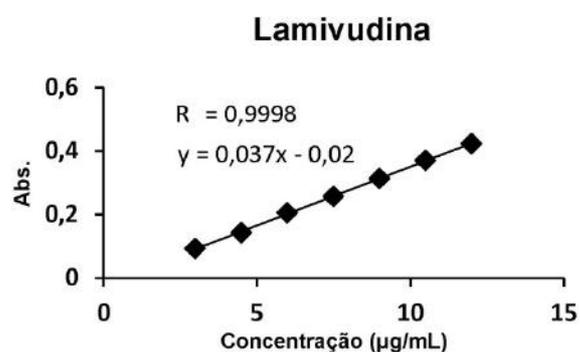


Figura 8 - Gráfico de linearidade da lamivudina

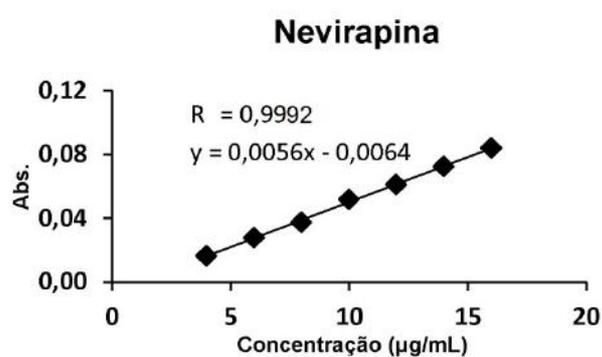


Figura 9 - Gráfico de linearidade da Nevirapina

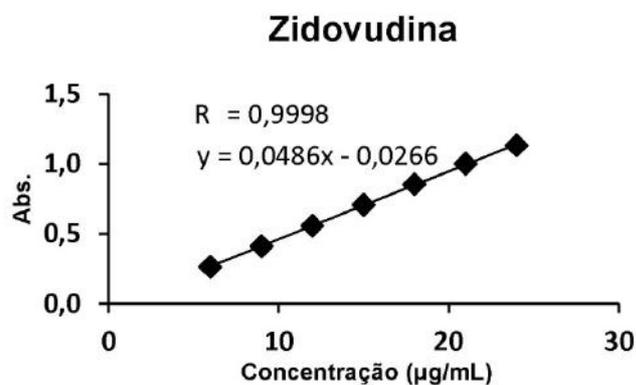


Figura 10 - Gráfico de linearidade da zidovudina

4.4. Precisão

Os resultados da precisão intradia estão representados na Tabela 2.

Os resultados da precisão intermediária estão ilustrados em gráficos de resíduos e de probabilidade normal dos resíduos nas Figuras 11, 12 e 13 para lamivudina, zidovudina e nevirapina, respectivamente.

Tabela 2. Valores encontrados no ensaio de precisão intradia para os fármacos.

Amostra	Teor de lamivudina (234 nm)	Teor de zidovudina (267 nm)	Teor de nevirapina (295 nm)
1	98,80%	98,01%	99,29%
2	93,49%	96,37%	100,00%
3	97,11%	100,00%	97,86%
4	97,83%	97,89%	96,43%
5	98,31%	98,36%	101,43%
6	97,59%	100,35%	97,14%
Média	97,19%	98,50%	98,69%
DP	1,9	1,47	1,88
CV%	1,95%	1,49%	1,91%

Tabela 3. Valores encontrados no ensaio de precisão intermediária para os fármacos.

Amostra	Dia	Analista	Equipamento	NVP (%)	3TC (%)	AZT (%)
1	1	2	1	93,82	106,25	108,6
2	2	2	2	95,04	102,79	102,75
3	1	2	2	93,52	105,98	108,78
4	2	1	1	96,89	107,69	103,93
5	1	2	2	93,16	104,73	108,05
6	1	1	2	92,34	108,43	108,81
7	2	2	1	98,89	100,84	102,86
8	2	2	1	102,44	99,66	103,85
9	2	1	2	94,2	107,74	104,23
10	2	2	1	100,62	104,66	103,32
11	1	1	1	94,48	109,09	109,01
12	2	1	2	98,25	102,85	102,01
13	1	2	1	92,93	103,85	106,35
14	1	1	2	96,4	104,77	109,35
15	2	1	1	102,57	101,14	101,61
16	2	1	1	99,35	104,11	102,98
17	2	2	2	98,14	102,09	103,5
18	1	1	2	94,45	106,2	108,23
19	1	2	1	93,3	104,82	107,45
20	2	1	2	95,74	105,61	103,62
21	1	1	1	98,49	105,26	106,49
22	1	2	2	93,49	104,82	108,22
23	1	1	1	96,7	107,22	107,68
24	2	2	2	97,16	103,02	103,25

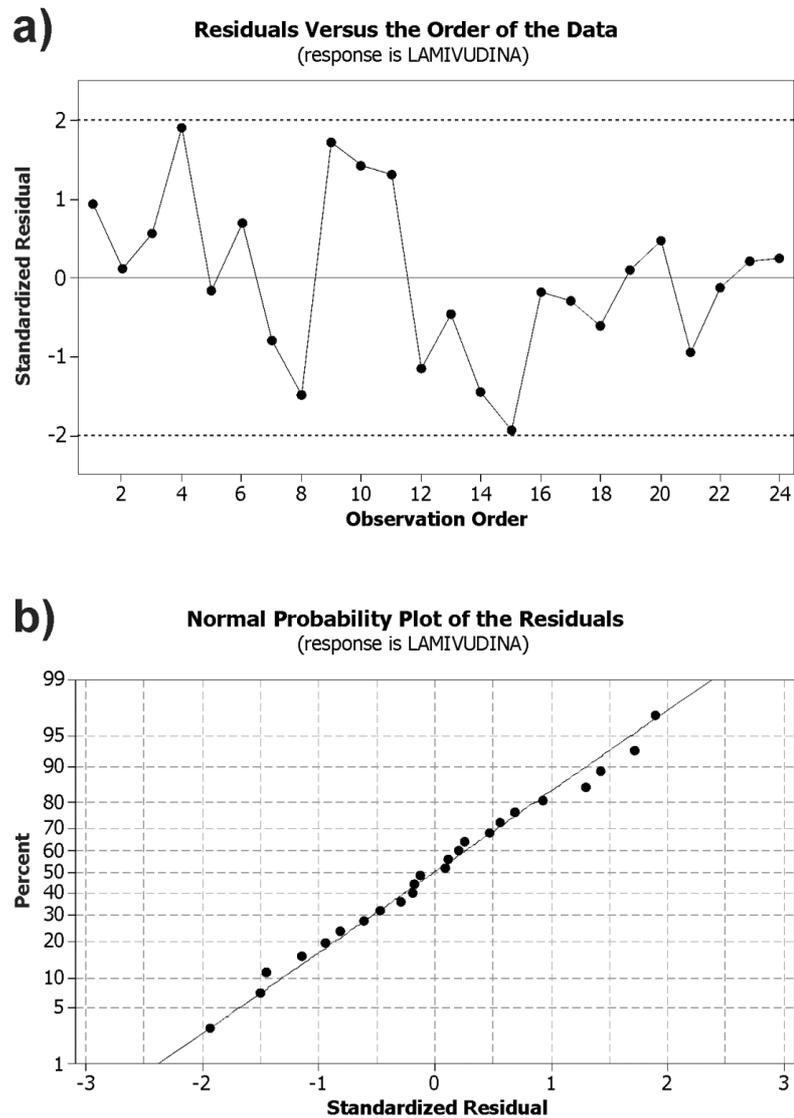


Figura 11 - Gráfico referente ao teste de precisão da lamivudina, mostrando os resíduos em relação à concentração. A) Resíduo padronizado X Ordem de observação. B) Porcentagem X Resíduo padronizado.

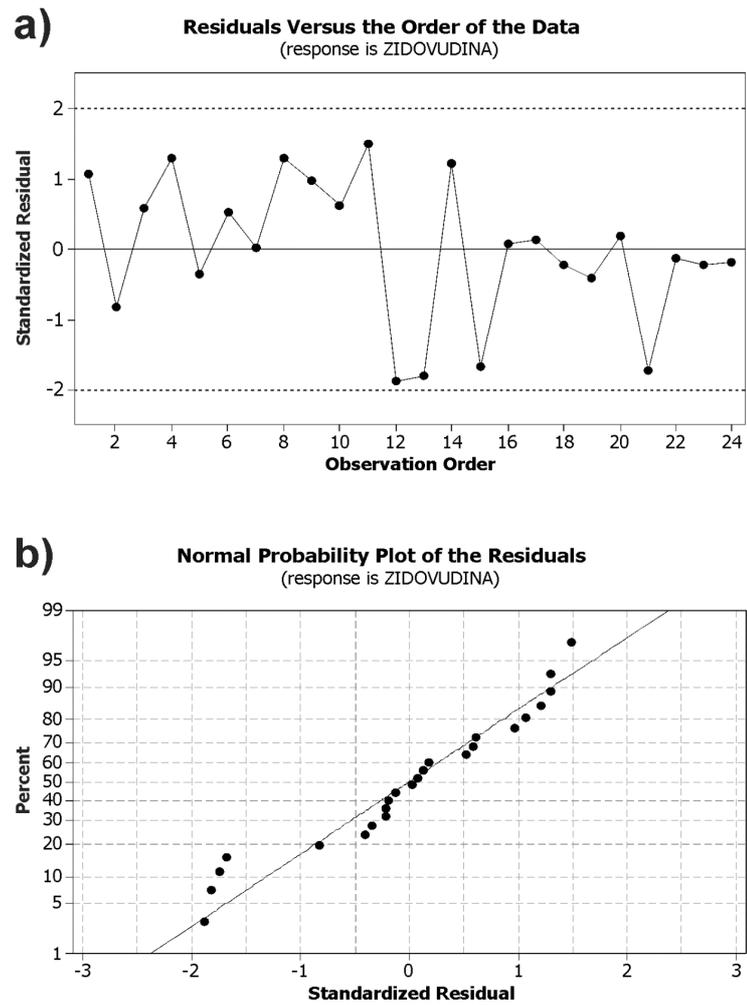


Figura 12 - Gráfico referente ao teste de precisão da zidovudina, mostrando os resíduos em relação a concentração. A) Resíduo padronizado X Ordem de observação. B) Porcentagem X Resíduo padronizado.

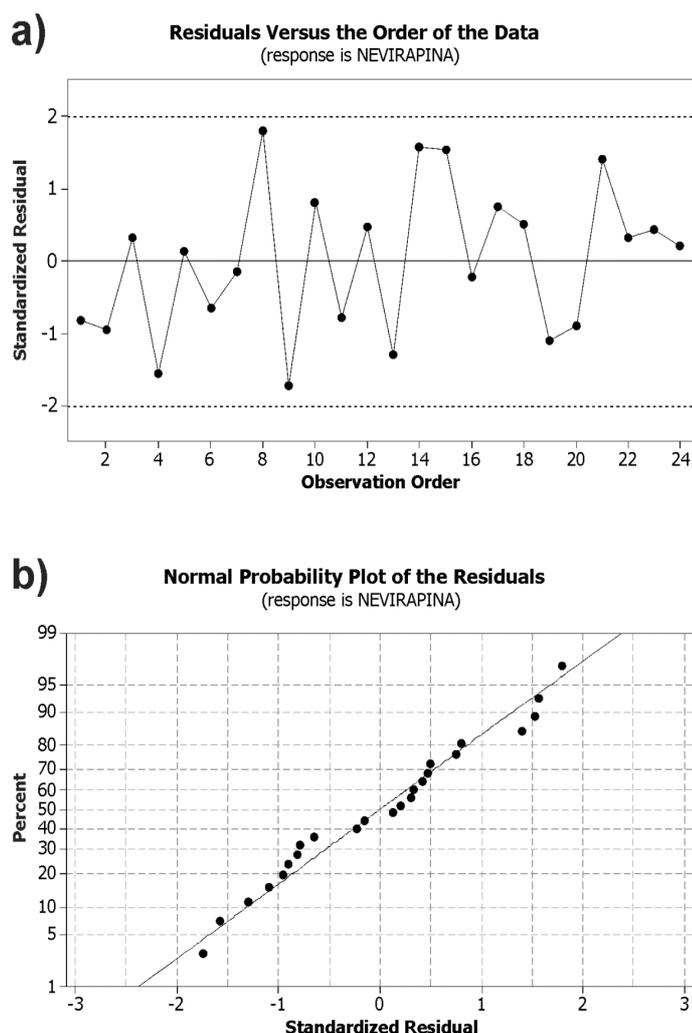


Figura 13 - Gráfico referente ao teste de precisão da Nevirapina, mostrando os resíduos em relação a concentração. A) Resíduo padronizado X Ordem de observação. B) Porcentagem X Resíduo padronizado.

Os valores apresentados no teste de precisão, para lamivudina, zidovudina e nevirapina apresentaram valores próximos à normalidade e valores de resíduos entre, -2 e 2. Como a ANVISA preconiza apenas que os valores de DPR estejam abaixo de 5% (POLONINI *et al.*, 2011), os valores encontrados da precisão intradia e intermediária foram adequados, comprovando a precisão do método.

4.5. Exatidão

A partir dos resultados obtidos na avaliação da linearidade e precisão, realizaram-se os testes de exatidão obtendo os seguintes resultados, apresentados na Tabela 4.

Tabela 2. Valores encontrados no ensaio de exatidão para os fármacos.

Lamivudina			
Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	DPR	Exatidão
6,0	6,03	1,96%	100,52%
7,5	7,44	1,64%	99,20%
9,0	8,89	1,33%	98,80%
Nevirapina			
Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	DPR	Exatidão
8,0	8,09	1,66%	101,14%
10,0	9,86	0,45%	98,68%
12,0	11,93	1,28%	99,49%
Zidovudina			
Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	DPR	Exatidão
12,0	11,95	1,60%	99,60%
15,0	15,16	1,21%	101,07%
18,0	17,83	1,75%	99,07%

Foram obtidos valores de exatidão entre 98,68 e 101,14% e valor máximo de DPR obtido foi de 0,020%. Sendo assim, o método analítico pode ser considerado exato, de acordo com as normas vigentes.

Os resultados de exatidão também foram expressos como gráficos para melhor compreensão, apresentados nas Figuras 14 a 16. O eixo x é representado pelas concentrações baixa, média e alta, respectivamente.

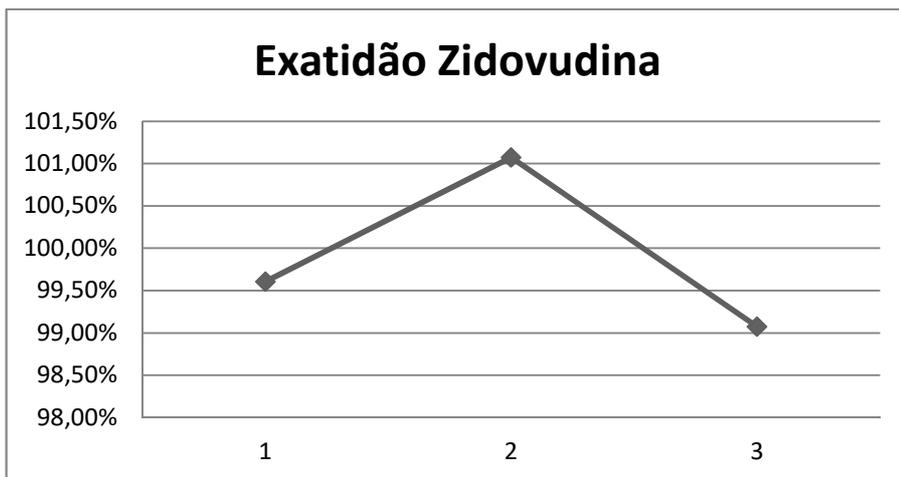


Figura 14 - Gráfico referente ao teste de exatidão da zidovudina.

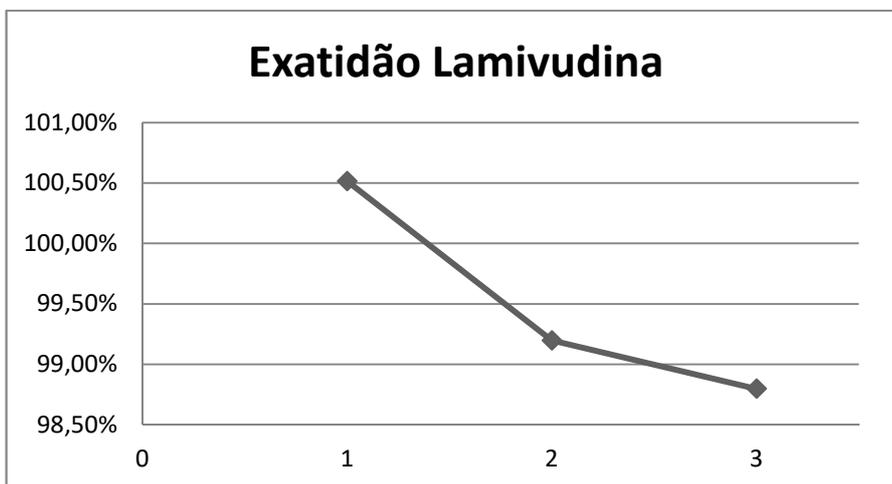


Figura 15 - Gráfico referente ao teste de exatidão da lamivudina.

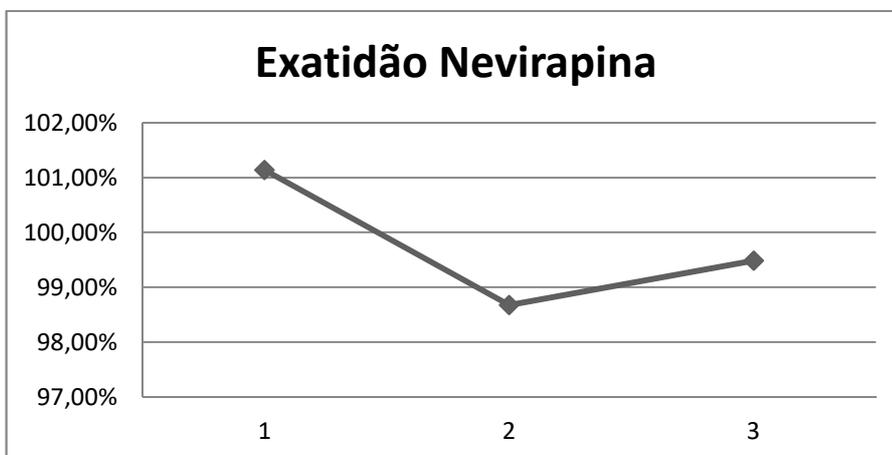


Figura 16 - Gráfico referente ao teste de exatidão da nevirapina.

4.6. Robustez

A utilização de desenhos estatísticos experimentais está em bastante evidência atualmente na análise de fármacos, mais especificamente, na avaliação da robustez de um método analítico (GABRIELSSON et al., 2002; WISSMANN; GROVER, 2009). Seguindo esta direção, neste trabalho foram utilizados alguns modelos experimentais para avaliação da precisão e/ou robustez dos métodos, possibilitando reduzir significativamente o número de análises e o tempo necessário para realização dos testes, além de diminuir o gasto de solventes e reagentes. O delineamento dos ensaios e os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por modelos matemáticos, propiciando significativa qualidade dos resultados, demonstrado pelos valores tabelados e também, pela resposta gráfica obtida, principalmente pelos gráficos de Pareto.

De acordo com os parâmetros avaliados na Tabela 5 como comprimentos de onda, diluentes e temperaturas diferentes, estes foram modificados adequadamente para a realização do teste. Posteriormente, os resultados obtidos foram analisados pelo Minitab e diferentes gráficos foram apresentados para confirmação da robustez do método para a determinação dos fármacos em análise. Nas Figuras 17, 18 e 19 estão dispostos os gráficos, de Resíduo padronizado X Ordem Observada, indicado pela letra A, Porcentagem X Resíduo padronizado indicado pela letra B e Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados) pela letra C, que ilustram a robustez do método para determinação de lamivudina, zidovudina e nevirapina.

Os resíduos padronizados são indicativos da presença de *outlier*. Estes são pontos atípicos e aberrantes que apresentam um grande afastamento das demais da série ou que é inconsistente. A presença destes implica em prejuízos a interpretação dos resultados dos testes estatísticos aplicados às amostras. Se os erros têm distribuição normal, então aproximadamente 95% dos resíduos padronizados devem estar no intervalo de (-2 a 2).

Tabela 3. Valores de teor encontrados no ensaio de robustez para os fármacos.

Ordem	Varição do comp. onda	Diluyente	Temp. (°C)	3TC (%)	AZT (%)	NVP (%)
1	-1	EtOH:H2O	5	95,82	101,22	98,89
2	+1	HCl 0,1M	23	98,92	102,76	100,61
3	+1	HCl 0,1M	5	102,86	100,54	99,55
4	+1	EtOH:H2O	23	99,95	97,74	100,15
5	+1	EtOH:H2O	5	103,75	97,22	100,31
6	-1	HCl 0,1M	5	95,93	99,59	100,70
7	+1	EtOH:H2O	5	101,91	96,52	99,10
8	-1	EtOH:H2O	23	100,03	103,83	99,96
9	-1	EtOH:H2O	23	99,52	102,23	99,27
10	-1	HCl 0,1M	5	97,15	101,12	101,92
11	-1	HCl 0,1M	23	101,18	99,24	99,24
12	+1	HCl 0,1M	23	99,19	100,75	100,75

3TC: lamivudina; NVP: nevirapina; AZT: zidovudina.

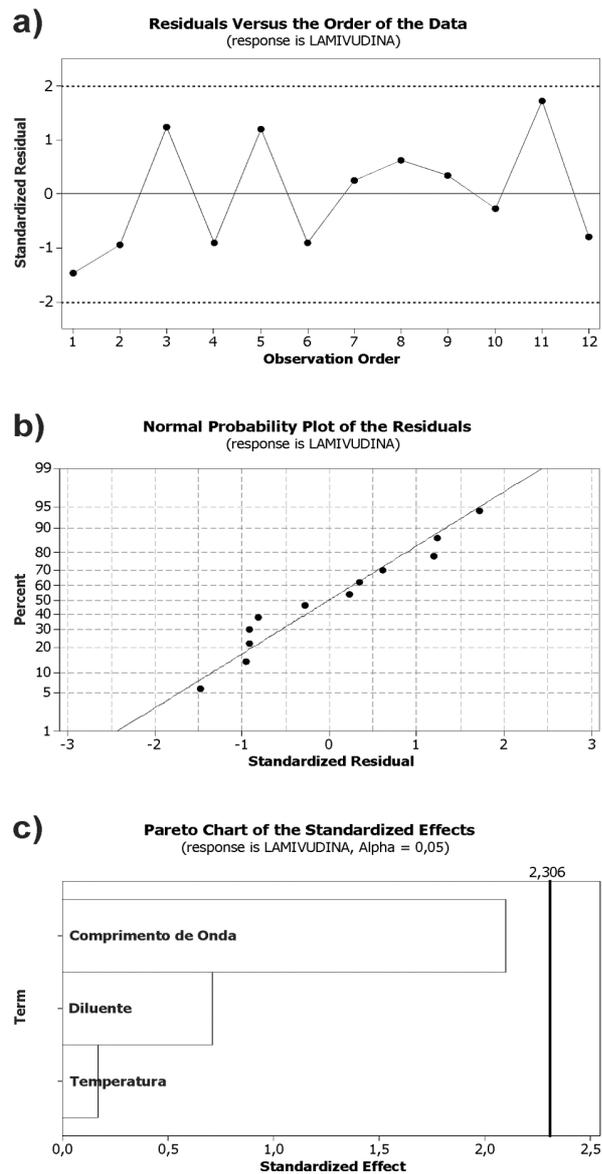


Figura 17 - Gráfico de robustez, referente à lamivudina. A) Resíduo padronizado X Ordem Observada. B) Porcentagem X Resíduo padronizado. C) Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados).

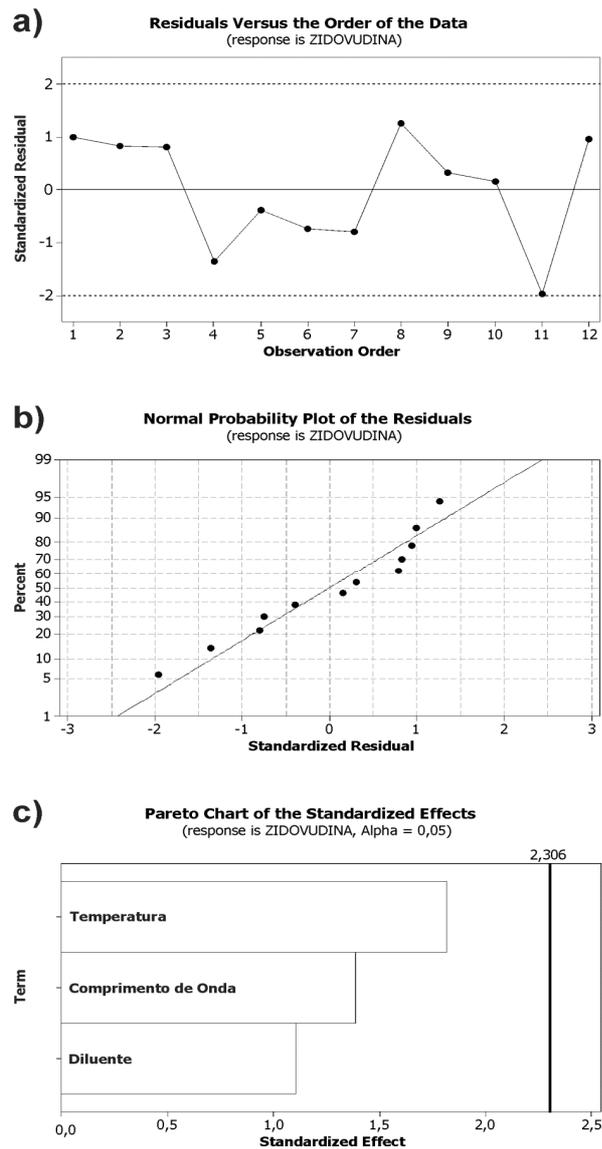


Figura 18 - Gráfico de robustez, referente à zidovudina. A) Resíduo padronizado X Ordem Observada. B) Porcentagem X Resíduo padronizado. C) Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados).

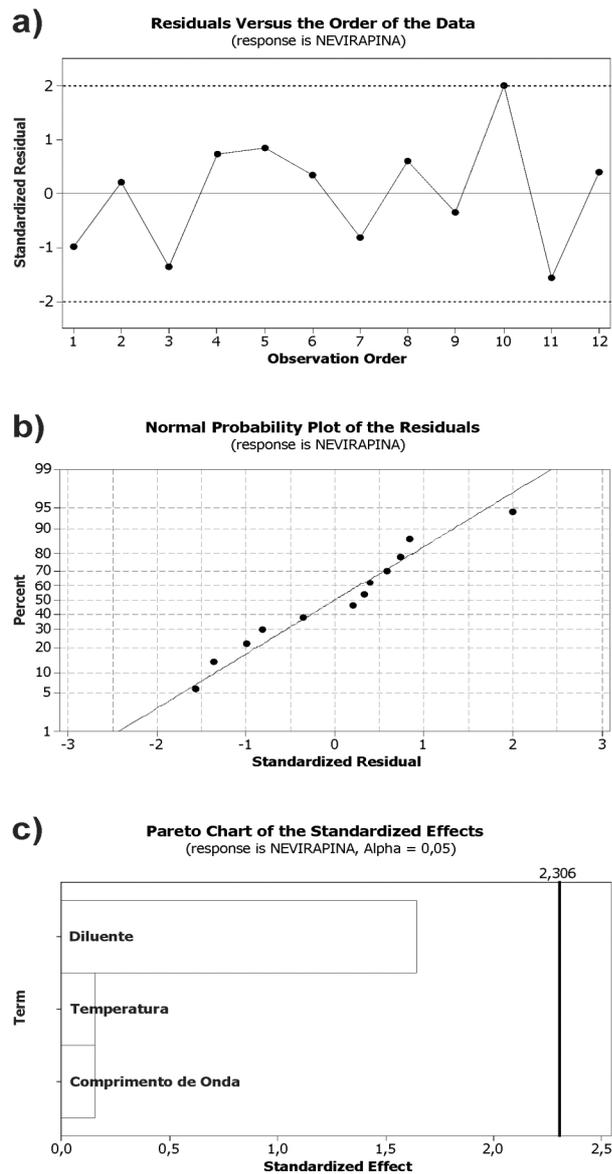


Figura 19 - Gráfico de robustez, referente à Nevirapina. A) Resíduo padronizado X Ordem Observada. B) Porcentagem X Resíduo padronizado. C) Diagrama de Pareto (Temperatura X Efeitos padronizados).

De acordo com o diagrama de pareto, o parâmetro crítico para a lamivudina é o comprimento de onda; para a zidovudina, a temperatura; e o parâmetro crítico para a nevirapina é o diluente. A linha vertical representa o limite de interferência obtido estatisticamente. Como observado nas figuras, nenhum dos parâmetros para cada fármaco não atingiu esta linha, indicando a robustez do método.

5. Conclusão

O método por UV demonstrou possuir sensibilidade suficiente para determinação qualitativa e quantitativa de lamivudina, zidovudina e nevirapina simultaneamente, com uma vantagem de ser um método barato e utilizar baixa quantidade de resíduos contaminantes.

O método analítico foi validado, comprovado pelos resultados obtidos e explanados neste trabalho, cumprindo os parâmetros preconizados de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, não tendo nenhum valor em dissonância com o exigido pelas normas brasileiras para validação de métodos analíticos.

O desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico por UV para a determinação simultânea dos fármacos, assim como, a otimização do método por análise multivariada e a identificação e doseamento das formulações por UV, também foi atingido de forma satisfatória conforme os resultados obtidos.

Dessa forma, este trabalho contribui para o desenvolvimento técnico-científico das ciências farmacêuticas, proporcionando o desenvolvimento de metodologia analítica inovadora que pode ser aplicada para análise de rotina de formulações contendo de lamivudina, zidovudina e nevirapina. Tendo em vista que na literatura vigente alguns autores, dizem que o mesmo não é possível com a utilização de tal técnica.

Referências Bibliográficas

ALIMONTI, J. B.; BALL, T. B; FOWKE, K. R. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Journal Of General Virology**. p. 1649-1661, 2003.

ANVISA. Resolução nº 899, 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; **Resolução Re Nº 899, 2003**. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 17025**: Requisitos Gerais Para A Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. 5 ed. 2005.

AYMARD, G., LEGRAND, M., TRICHEREAU, N., DIQUET, B. Determination of twelve antirretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 744, n. 2, p. 227-240, 2000.

BARRÉ-SINOUSI, F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p.868-871, 1983.

BASAVAPATHRUNI, A; ANDERSON, K. S; Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. **The FASEB Journal: The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. V.21, n. 14, p. 3795-3808. 2007.

BATISTA, J. C. R. **Mecanismos de Ação de Substâncias Antivirais**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, 2011.

Beck, R. C. R. Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1225-1228, 2007.

BORBA, P. A. A., et al. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico por espectrofotometria UV para Quantificação de Carvedilol. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 582-586, 2013.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 31, p. 129-146, 2003.

CARVALHO, G. dos S. **Pessoas Vivendo com HIV/AIDS: Vivências do Tratamento Antirretroviral**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Coletiva, Universidade Estadual de Londrina, 2008.

CASSIANO, N. M., et al. Validação em Métodos Cromatográficos para Análises de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

CAMILO, F.C.; RODRIGUES, P.O.; WAGNER, T.M. Validação de um método analítico para análise simultânea de estavudina (D4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) em matéria-prima. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p. 22-29, 2008.

Corbeil, J., D. Sheeter, D. Genini, S. Rought, L. Leoni, P. Du, M. Ferguson, D. R. Masys, J. B. Welsh, J. L. Fink, R. Sasik, D. Huang, J. Drenkow, D. D. Richman, and T. Gingeras. 2001. *Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4+ T cells*. **Genome Research**. v. 7, n. 11, p.1198-1204, jul. 2001.

LA ROCA, Mônica Felts de et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 88, p.177-180, jul. 2007.

ENÉAS, P. C. R.; PIANETTI, Dr. G. A.; FIALHO, Dra. S. L. **Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação, de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma**. 2014. 256 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

FAN, B., STEWART, J T. Determination of zidovudine / lamivudine / nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, v. 38, n. 5, p. 903–908, 2002.

FERNANDES, C.; CAMPOS, L. M. M.; PIANETTI, G. A. Validação de metodologia para doseamento e estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 4, p. 381-389, 2003.

FONSECA, B. A. L. da; BOLLELA, VALDES R.; PIRES N., Roberto da J. Sarcoma de Kaposi e Síndrome da imunodeficiência adquirida: características desta associação, incluindo novos conceitos sobre a patogênese e tratamento. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, n. 1, p.26-39, 1999.

GALLO, Robert Charles. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p.865-867, 1983.

GILBERT, Peter B.; MCKEAGUE, Ian W.; EISEN, Geoffrey. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. **Statistics In Medicine**, v. 22, n. 4, p.573-593, 2003.

GOODMAN, L. S.; GOLDMAN, Alfred. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Yale: McGraw Hill 2112 p., 2012.

GU Z., Salomon H., Cherrington J. M., Mulato A. S., Chen M. S., Yarchoan R., Foli A., Sogocio K. M., Wainberg M. A. K65R Mutation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Encodes Cross-Resistance to 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. Foster, ago. 1995. V. 39, n. 8, p. 1888-1891.

HANDBOOK. Properties and selection. 10th ed. Ohio, ASM International. 1990. V. 2

HORWITZ, J. P., Chua, J.; Noel, M. Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl) thymine. **The Journal Organic Chemistry**. v.29 n.7 p. 2076-2078. 1964.

HAIR, J. F.; BLACK, William C.; BABIN, Barry J.. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2009. Cap. 15. p. 91-92.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Guanabara-Koogan, 10^a ed. 2007.

LAVRA, Z. M. M. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação Simultânea de lamivudina, zidovudina e Nevirapina em Comprimidos de Dose Fixa Combinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 969 – 974. 2008.

LÖWEN, Teresa Cristina Raposo. **Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Análise do Teor de lamivudina e do Ensaio Limite do Enantiômero (+) BCH-189 em Comprimidos de lamivudina**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Curso de Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, 2003.

MACHADO, Paulo R. L.. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p.647-662, 2004.

MARX, Preston A.; ALCABES, Phillip G.; DRUCKER, Ernest. Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. **Philosophical Transactions B**. v. 356, n. 14 p. 911-920. 2001.

Ministério da Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. **Boletim Epidemiológico – Aids e DST**. 2(1-16). 2013.

NOTARI, S., BOCEDI, A., IPPOLITO, G., NARCISO, P., PUCILLO, L P., TOSSINI, G., DONNORSO, R P, GASPARRINI, F., ASCENZI, P. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 831, p. 258–266, 2006.

OLIVEIRA, M. T. da C. **O diagnóstico tardio e óbito por aids de pacientes internados em 2005 em um hospital de referência para doenças infecciosas em Belo Horizonte, Minas Gerais**. 2007. 75 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais.

Organización Mundial de la Salud. **Expansión del Tratamiento Antirretroviral en entornos con recursos limitados**. Revisión de 2003. OMS; 2004.

OSTERTAG, W.; ROESLER, G.; KRIEG, C. J. Induction of Endogenous Virus and of Thymidine Kinase by Bromodeoxyuridine in Cell Cultures Transformed by Friend Virus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 71, n. 12, p.4980-4985, 1974.

PEREIRA, Leandro Soares Alves; SENA, Prof. Dr. Marcelo Martins de. **Transferência de calibração de misturas de pós para comprimidos intactos: um novo uso em análise farmacêutica para uma ferramenta quimiométrica conhecida**. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais., Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

PETRELLA, M. & WAINBERG. M. A. 2002. Might the M184V substitution in HIV-1 RT confer clinical benefit. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.4, n. 4, p. 224-232, 2004.

PINTO, A. C. S; PINHEIRO, P. N. C; VIEIRA, N. F. C; ALVES, M. D. S. **Compreensão da Pandemia da AIDS nos Últimos 25 Anos**. 2007.

RACHID M.; SCHECHTER M. Manifestações Clínicas. **Manual de HIV/Aids**. 8a Edição Revista e Ampliada. Revinter; 2005.

REIS, R. K.; GIR, Elucir. Caracterização da produção científica sobre doenças sexualmente transmissíveis e HIV/AIDS publicados em periódicos de enfermagem do Brasil. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, n. 4, p.376-385, 2003.

REZK, N L., TIDWELL, R R., KASHUBA, A D M. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 791, n. 2, p. 137–147, 2003.

ROWE, R. C; SHESKEY, Paul J; QUINN, Marian e. Excipients of lamivudine and zidovudine. In: ROWE, Raymond C et al. **Handbook of excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 134-329.

RIBANI, M., et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, 2004.

SCOTT, Lesley J.; PERRY, Caroline M.. Delavirdine: A Review of its Use in HIV Infection. **Drugs**. Auckland, v. 60, n. 6, p. 1411-1444. set. 2012.

SILVA, R. M. da; NOBRE, F. F.; BRINDEIRO, Rodrigo de Moraes. **Algoritmo genético e kernel discriminante de fisher aplicado a identificação de mutações de resistência do HIV-1 aos inibidores antirretrovirais da protease**. 2009. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

SOUSA, João Dinis de; MÜLLER, V.; LEMEY, Philippe. High GUD Incidence in the Early 20th Century Created a Particularly Permissive Time Window for the Origin and Initial Spread of Epidemic HIV Strains. **Plos One**. V. 5, n. 4, p. 3-20. 2010.

SOUZA, J. de; STORPIRTIS, Sílvia. Atividade antirretroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p.9-19, 2004.

United States Pharmacopia. 31th ed. Rockville: **United States Pharmacopieial Convention**, 2008.

VAN LEEUWEN, ROBERT; KATLAMA C; MURPHY, Robert L. A randomized trial to study first-line combination therapy with or without a protease inhibitor in HIV-1-infected patients. **AIDS: Official of the international AIDS society**, v. 7, n. 17, p.987-999, 2003.

VERWEIJ-VAN WISSEN, C P W G M., AARNOUTSE, R E., BURGER, D M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 121–129, 2005.