

Leandro Vinicius Soares de Oliveira

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
determinação do teor de lamivudina, zidovudina e suas substâncias
relacionadas em associação por CLUE-DAD**

Rio de Janeiro

2013

Leandro Vinicius Soares de Oliveira

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de lamivudina, zidovudina e suas substâncias relacionadas em associação por CLUE-DAD

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

O482d

Oliveira, Leandro Vinicius Soares de

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
determinação do teor de lamivudina, zidovudina e suas substâncias
relacionadas em associação por CLUE-DAD. / Leandro Vinicius Soares
de Oliveira – Rio de Janeiro, 2013.

XVIII, 81f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Leandro Vinicius Soares de Oliveira

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de lamivudina, zidovudina e suas substâncias relacionadas em associação por CLUE-DAD

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovada em xx de xx de xx.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ
(Presidente da Banca)

Prof^a. Dr^a Kátia Christina Leandro
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –
FIOCRUZ

Prof. Dr. José Luiz Mazzei
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. Helvécio Vinicius Antunes Rocha
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2013

Dedico este trabalho à Bianca, por todo amor, por sempre me incentivar e me dar forças pra continuar seguindo em frente e a minha mãe, Denise, por todo sacrifício que fez para que eu estudasse e tivesse melhores oportunidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e todos os **Espíritos de Luz** que caminharam comigo nesta estrada e me trouxeram ventos favoráveis para que eu tivesse força, perseverança e paz de espírito para concluir mais esta etapa na minha vida.

Muitíssimo obrigado ao meu orientador, **Leonardo Lucchetti**, pela imensa e exemplar solicitude em tudo que precisei. Agradeço-o pela parceria, pela compreensão com as minhas dificuldades, pela confiança e principalmente pela paciência. Tenho muito orgulho de ser seu aluno e parabéns pelo grande orientador que você é.

Aos três pilares que sustentam minha vida: a minha mais que amada **Bianca**, por ter sido mais que minha namorada, companheira e melhor amiga. Por ter sido também a minha maior incentivadora e a pessoa que mais acreditou que conseguiria alcançar este objetivo (eu te amo!). À senhora que me deu a vida e que me ama incondicionalmente, “dona **Denise**”, a quem tenho grande orgulho de chamar de mãe. Muito obrigado pela fé no meu potencial e por ter facilitado muito as coisas para mim. E também a minha avó, “dona **Tita**”, por toda preocupação e por todo carinho e amor que só uma mãe pode dar, porém com mais açúcar.

Ao meu irmão, **Adriano**, e meu pai **Jorge**, pela confiança, incentivo e amizade.

Agradeço imensamente ao meu querido amigo **Victor Bornstein** e aos “caveiras”, **Fausto, André, Alexandre e Raquel** por todo incentivo, pela grande amizade e companheirismo e por me provarem que grandes amizades podem ser construídas em local de trabalho. Em especial, ao “capitão” **Fernando**, pois além de ter sido um dos meus maiores incentivadores, foi o grande responsável por eu ter me matriculado no curso – meu nobre, sem sua força, nada disso teria acontecido.

Muito obrigado a minha ex-chefe, **Renata**, não só pela solicitude, mas também por ter convencido a diretoria a autorizar a realização do trabalho no laboratório da empresa. Agradeço também aos meus ex-colegas de trabalho e atuais amigos **Ceimara, Monique, Cide, Eduardo Costa** pela ajuda, carinho e amizade. Em especial a **Carolina**, por ter me ajudado a dar meus primeiros passos em um laboratório de controle de qualidade e por ter sido minha “analista 2” nos testes de validação; a **Eduardo Manfredini** por ser o responsável por hoje eu atuar em um laboratório farmacêutico e por ser também meu “guia interativo de validação analítica”; a **Diogo** por me ensinar como fazer desenvolvimento analítico, pelo incentivo e por acreditar no meu potencial.

Agradeço também aos meus colegas de curso, **Ana Paula, André, Fábio, Fernanda, Fernando, Janine, Leonardo, Lyca, Marcelo, Simone e Vitor**, por este período incrível de aprendizado, aperfeiçoamento e amizade. Em especial à **Diva**, pelas caronas diárias, pelas conversas e sábios conselhos; a **Érika** pelas dicas e eficiente revisão do texto deste trabalho.

Agradeço a **Demétrio**, por sempre dizer que “acredita que tudo vai dar certo” e a **Sabrina** pela primorosa ajuda com a revisão. Muito obrigado pelo carinho de vocês. Seu incentivo sempre foi muito importante.

Aos **membros da banca examinadora**, por dispor de seu precioso tempo e gentilmente aceitar o convite à participar desta avaliação.

E finalmente, mas não menos importante, agradeço a **todos os meus amigos** que acreditaram e torceram por mim, me incentivaram e principalmente, compreenderam minha ausência em muitos momentos importantes. Em especial, **Maíra, Rodrigo, Felipe, Henrique, João Carlos, João César, César, Renato, Fernanada, Roberta, Renata, Leonardo, Juliana, Rafael, Lívia, Bruno Morieval, Natália, Geisiane, Ricardo, Cintia, Bruno André, Thiago, Fádua, Flávio, Renata Caldwell...** Eu sei que sumi, mas estou voltando! Amo vocês!

“Lutam melhor aqueles que têm belos sonhos.”

Ernesto “Che” Guevara

"Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito."

Pastor Martin Luther King

"Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades, devemos nos lembrar de que o carvalho cresce forte através de ventos contrários e que os diamantes são formados sob pressão."

Peter Marshall

RESUMO

OLIVEIRA, LEANDRO VINICIUS SOARES DE. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de lamivudina, zidovudina e suas substâncias relacionadas em associação por CLUE-DAD.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) – Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fiocruz, 2013.

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), é uma das mais importantes doenças infecciosas atualmente no mundo. Embora ainda não haja uma forma cientificamente comprovada de eliminar totalmente o vírus do organismo humano, a qualidade de vida dos portadores melhorou significativamente com a introdução da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART). A associação de lamivudina e zidovudina em comprimidos foi a primeira a ser aprovada pelo FDA e ainda é a mais utilizada no início do tratamento em pacientes *naive*. Por se tratar de um medicamento de importância estratégica para o combate à doença, é importante que os custos agregados à sua produção sejam minimizados, a fim de repassar tal redução ao seu preço final. O presente trabalho apresenta uma metodologia analítica por cromatografia a líquido de ultra eficiência para o doseamento simultâneo de ambos os fármacos, assim como de suas substâncias relacionadas, de forma mais rápida e econômica que os outros métodos cromatográficos descritos pelos documentos oficiais que contemplam tal produto. Tal método mostrou-se mais conveniente para a rotina de controle de qualidade e para estudos de estabilidade em uma indústria farmacêutica. O método foi desenvolvido e validado com sucesso nos níveis de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez, conforme determina a resolução RE 899 de 2003 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para testes de teor e substâncias relacionadas.

Palavras-chave: Lamivudina. Zidovudina. Substâncias relacionadas. CLUE. Validação.

ABSTRACT

OLIVEIRA, LEANDRO VINICIUS SOARES DE. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de lamivudina, zidovudina e suas substâncias relacionadas em associação por CLUE-DAD.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) – Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fiocruz, 2013.

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), caused by human immunodeficiency virus (HIV), currently is one of the most important infectious disease in the world. Although there is not yet a scientifically proven manner to completely eliminate the virus from the human body, the life quality of patients have significantly improved with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). The first association of drugs approved by the FDA was lamivudine and zidovudine and still is the most applied to begin the treatment of *naïve* patients. The costs associated with the production of this medicine must be minimized because it has a strategic importance to the treatment. This work presents a faster and cheaper analytical method by ultra performance liquid chromatography to assay and related substances than others described in the official papers. Therefore, it brings more convenience to be employed in quality control routine and stability analysis in a pharmaceutical industry. The method was developed and successfully validated in levels of selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of quantification and robustness, as determined by the RE 899/2003 resolution for testing of content and related substances.

Keywords: Lamivudine. Zidovudine. Related substances. UPLC. Validation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AEPT –	Altura equivalente a um prato teórico
AIDS –	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> ou síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA –	<i>Analysys of variance</i> ou análise de variância
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18 –	Octadecil
C8 –	Octil
CD4 –	<i>Cluster of differentiation 4</i> ou grupamento de diferenciação 4
CAS –	<i>Chemical Abstract Service</i>
CE _{50%} –	Metade da concentração máxima efetiva
CLAE –	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE –	Cromatografia líquida de ultra eficiência
C _{max} –	Concentração máxima
DNA –	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
DPR –	Desvio padrão relativo
EUA –	Estados Unidos da América
FDA –	<i>Food and Drug Administration</i>
HAART –	<i>Highly active antiretroviral therapy</i> ou terapia antirretroviral altamente ativa
HIV –	<i>Human immunodeficiency vírus</i> ou vírus da imunodeficiência humana
HPLC –	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH –	<i>International Conference on Harmonization</i> ou Conferência Internacional sobre Harmonização
IFA –	Insumo farmacêutico ativo

IUPAC –	<i>Internation Union of Pure and Applied Chemistry</i> ou União Internacional de Química Pura e Aplicada
INRT –	Inibidor nucleosídeo/nucleotídeo da transcriptase reversa
IUPAC –	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ou União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD –	Limite de detecção
LQ –	Limite de quantificação
MS –	Ministério da Saúde
ng/mL –	Nanograma por mililitro
PEEK –	Poliéter éter cetona
PVDF –	<i>Polyvinylidene fluoride</i> ou fluoreto de polivinilideno
pH –	Potencial hidrogeniônico
r –	Coefficiente de correlação
r ² –	Coefficiente de determinação
RNA –	<i>Ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucleico
SQR –	Substância química de referência
UPLC –	<i>Ultra performance liquid chromatography</i> ou cromatografia líquida de ultra eficiência
UHPLC –	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i> ou cromatografia líquida de ultra alta eficiência
USP –	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV –	Ultravioleta
WELAC –	<i>Western European Laboratory Accreditation Cooperation</i> ou Cooperação Européia Ocidental para Acreditação de Laboratórios
WHO –	<i>World Health Organization</i> ou Organização Mundial de Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	40
Tabela 2 –	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	41
Tabela 3 –	Parâmetros cromatográficos do método de análise.....	52
Tabela 4 –	Preparo das soluções de lamivudina e zidovudina para avaliação da linearidade.....	55
Tabela 5 –	Preparo das soluções de timina para avaliação da linearidade.....	56
Tabela 6 –	Principais condições cromatográficas apresentadas nos artigos e monografias consultados.....	60
Tabela 7 –	Colunas utilizadas no desenvolvimento dos métodos analíticos...	62
Tabela 8 –	Percentual de degradação x tempo para lamivudina e zidovudina.....	69
Tabela 9 –	Fator de cauda para lamivudina e zidovudina após testes de degradação forçada.....	70
Tabela 10 –	Possíveis produtos de degradação de lamivudina e zidovudina, com base nos testes de degradação forçada.....	71
Tabela 11 –	Resultado do teste de linearidade do teor de lamivudina.....	73
Tabela 12 –	Resíduos do teste de linearidade de teor da lamivudina.....	74
Tabela 13 –	ANOVA para linearidade de lamivudina.....	75
Tabela 14 –	Intervalo de confiança para interseção e inclinação da reta para linearidade de teor da lamivudina.....	75
Tabela 15 –	Resultado do teste de linearidade do teor de zidovudina.....	76
Tabela 16 –	Resíduos do teste de linearidade de teor da zidovudina.....	77
Tabela 17 –	ANOVA para linearidade do teor de zidovudina.....	78
Tabela 18 –	Intervalo de confiança para interseção e inclinação da reta para linearidade de teor da zidovudina.....	78

Tabela 19 – Resultados do teste de linearidade do teor de timina.....	80
Tabela 20 – Resíduos do teste de linearidade de teor da timina.....	81
Tabela 21 – ANOVA para linearidade de teor de timina.....	82
Tabela 22 – Intervalo de confiança para interseção e inclinação da reta para linearidade de teor da timina.....	82
Tabela 23 – Recuperações do teste de exatidão.....	84
Tabela 24 – Análise de variâncias para teste de exatidão do teor de lamivudina.....	84
Tabela 25 – Análise de variâncias para teste de exatidão do teor de zidovudina.....	84
Tabela 26 – Análise de variâncias para teste de exatidão do teor de timina.....	85
Tabela 27 – Resultados do teste de precisão do sistema.....	85
Tabela 28 – Repetitividade e precisão intermediária para produto fabricado pelo Laborvida.....	87
Tabela 29 – Repetitividade e precisão intermediária para produto fabricado pela GlaxoSmithKline.....	87
Tabela 30 – Repetitividade e precisão intermediária para timina.....	88
Tabela 31 – Resultados do teste de robustez.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura molecular da lamivudina.....	23
Figura 2 –	Estrutura molecular da zidovudina.....	25
Figura 3 –	Histórico do desenvolvimento de partículas de fase estacionária.	27
Figura 4 –	Eletromicrografia de partículas de fase estacionária.....	28
Figura 5 –	Ilustração esquemática de típica partícula de núcleo fundido.....	32
Figura 6 –	Eletromicrografia de partícula <i>Halo</i> e de partícula <i>Kinetex</i>	33
Figura 7 –	Eletromicrografia mostrando corte de partícula <i>Halo</i> e de partícula <i>Kinetex</i>	33
Figura 8 –	Produtos de degradação de lamivudina.....	38
Figura 9 –	Mecânica de formação da timina como principal produto de degradação da zidovudina.....	39
Figura 10 –	Ilustração com os vários níveis de precisão e suas contribuições	43
Figura 11 –	Cromatograma demonstrando a seletividade do método para lamivudina, zidovudina e suas impurezas conhecidas.....	62
Figura 12 –	Amostra de lamivudina submetida a estresse hidrolítico ácido.....	63
Figura 13 –	Amostra de lamivudina submetida a estresse hidrolítico alcalino.	63
Figura 14 –	Amostra de lamivudina submetida a estresse hidrolítico neutro...	64
Figura 15 –	Amostra de lamivudina submetida a estresse térmico.....	64
Figura 16 –	Amostra de lamivudina submetida a estresse fotolítico.....	64
Figura 17 –	Amostra de lamivudina submetida a estresse oxidativo.....	65
Figura 18 –	Amostra de zidovudina submetida a estresse hidrolítico ácido.....	65
Figura 19 –	Amostra de zidovudina submetida a estresse hidrolítico alcalino.	66
Figura 20 –	Amostra de zidovudina submetida a estresse hidrolítico neutro...	66
Figura 21 –	Amostra de zidovudina submetida a estresse térmico.....	66
Figura 22 –	Amostra de zidovudina submetida a estresse fotolítico.....	67

Figura 23 –	Amostra de zidovudina submetida a estresse oxidativo.....	67
Figura 24 –	Curva de calibração – Lamivudina.....	71
Figura 25 –	Representação gráfica dos resíduos do teste de linearidade de teor de lamivudina.....	72
Figura 26 –	Ajuste de linha para relação entre y previsto e y calculado para linearidade de lamivudina.....	73
Figura 27 –	Curva de calibração – Zidovudina.....	74
Figura 28 –	Representação gráfica dos resíduos do teste de linearidade de teor de zidovudina.....	75
Figura 29 –	Ajuste de linha para relação entre y previsto e y calculado para linearidade de zidovudina.....	76
Figura 30 –	Curva de calibração – Timina.....	78
Figura 31 –	Representação gráfica dos resíduos do teste de linearidade de teor de timina.....	79
Figura 32 –	Ajuste de linha para relação entre y previsto e y calculado para linearidade de timina.....	80

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1	A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	20
1.2	O Vírus da Imunodeficiência Humana.....	20
1.3	A terapia antirretroviral.....	21
1.3.1	<u>Lamivudina.....</u>	23
1.3.2	<u>Zidovudina.....</u>	25
1.4	A cromatografia a líquido de ultra eficiência.....	26
1.4.1	<u>Colunas de núcleo fundido.....</u>	31
1.5	Metodologia analítica indicativa de estabilidade e estudos de degradação forçada.....	35
1.5.1	<u>Estudo de degradação forçada da lamivudina.....</u>	37
1.5.2	<u>Estudo de degradação forçada da zidovudina.....</u>	38
1.6	Validação de métodos analíticos.....	39
1.6.1	<u>Especificidade e seletividade.....</u>	41
1.6.2	<u>Linearidade.....</u>	42
1.6.3	<u>Exatidão.....</u>	42
1.6.4	<u>Precisão.....</u>	42
1.6.5	<u>Limites de quantificação e detecção.....</u>	44
1.6.6	<u>Robustez.....</u>	45
2	JUSTIFICATIVA.....	46
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	Objetivo geral.....	47
3.2	Objetivos específicos.....	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1	Substâncias de referência.....	48
4.2	Amostras.....	48
4.3	Reagentes.....	49
4.4	Vidrarias.....	49
4.5	Balança analítica.....	50
4.6	Câmara de fotoestabilidade.....	50

4.7	Estufa	50
4.8	Sistema cromatográfico	50
4.9	Preparo das amostras, padrões, e solução de adequação do sistema	51
4.10	Condições cromatográficas	52
4.11	Validação das metodologias	53
4.11.1	<u>Seletividade</u>	53
4.11.1.1	Teste de degradação forçada.....	54
4.11.2	<u>Linearidade</u>	55
4.11.3	<u>Limite de quantificação</u>	56
4.11.4	<u>Exatidão</u>	56
4.11.5	<u>Precisão</u>	57
4.11.6	<u>Robustez</u>	57
5	RESULTADOS/DISCUSSÃO	59
5.1	Histórico do desenvolvimento da metodologia	59
5.2	Validação da metodologia	63
5.2.1	<u>Seletividade</u>	63
5.2.1.1	Produtos de degradação.....	70
5.2.2	<u>Linearidade</u>	71
5.2.2.1	Lamivudina.....	72
5.2.2.2	Zidovudina.....	76
5.2.2.3	Timina.....	79
5.2.3	<u>Limite de quantificação</u>	83
5.2.4	<u>Exatidão</u>	83
5.2.5	<u>Precisão</u>	85
5.2.6	<u>Robustez</u>	88
6	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

INTRODUÇÃO

A AIDS foi reconhecida como uma síndrome possivelmente infecciosa em 1981, a partir de pacientes homoafetivos masculinos que apresentavam comprometimento imunológico, sarcoma de Kaposi e pneumonia provocada por *Pneumocystis carinii* (MS, 2002). Em 1982, foi batizada como doença 5H, pois foi diagnosticada primariamente em pacientes homoafetivos, hemofílicos, haitianos, heroinômanos e em prostitutas [que em Inglês são chamadas de *hookers* (MS, 2011)].

O primeiro caso notificado em solo nacional ocorreu no mesmo ano em São Paulo. Posteriormente, em 1984 os médicos Luc Montagnier, da França, e Robert Gallo, dos Estados Unidos, chegaram à conclusão de que o agente causador, da até então desconhecida moléstia, tratava-se de um retrovírus. Concluiu-se que o conjunto de manifestações clínicas era o estágio final da doença provocada pelo HIV (*human immunodeficiency virus* – vírus da imunodeficiência humana), agora batizada de AIDS, que no idioma Inglês significa *acquired immunodeficiency syndrome*, e para o Português é traduzido como síndrome da imunodeficiência adquirida (MS, 2011).

Nos anos seguintes, muito pouco para o tratamento da doença pôde ser feito, visto que não se conhecia medicamento que combatesse o vírus. Foram iniciados importantes programas de prevenção e a terapia disponível aplicava-se apenas às infecções oportunistas (MS, 2011).

A esperança de tratamento medicamentoso da AIDS surgiu em 1987 com a aprovação pelo FDA (*Food and Drugs Administration* – Administração de Alimentos e Drogas) da zidovudina como agente antirretroviral, que contribuiu significativamente para aumentar a sobrevida dos portadores do vírus e diminuir a morbidade da doença. Naquele ano o número de pessoas infectadas passou de 2700 no Brasil (MS, 2011).

O fim da década de 80 e início da década de 90 foram marcados por importantes descobertas como a didanosina e lamivudina. Os medicamentos à base destes fármacos foram rapidamente incorporados aos esquemas terapêuticos e renderam bons lucros às grandes indústrias farmacêuticas, muito devido aos altíssimos preços praticados pelos fabricantes.

O número crescente de casos de portadores do HIV na década de 90 obrigou o governo brasileiro a adotar políticas públicas de saúde que permitissem o acesso universal aos medicamentos de combate ao vírus. Na mesma década também foi sancionada a Lei dos Genéricos (BRASIL, 1999), que tem como objetivo facilitar o acesso da população a medicamentos mais baratos e, de certa forma, impulsionar o parque industrial farmacêutico nacional.

O rigor da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), principal órgão fiscalizador e regulador, cresce a cada ano e os medicamentos oferecidos à população precisam provar-se cada vez mais eficazes e seguros. Sua orientação é que os medicamentos sejam analisados de acordo com metodologias descritas em compêndios oficiais com a finalidade de garantir a eficácia e segurança de tais produtos (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010). Porém, nem sempre tais procedimentos são adequados à rotina de uma empresa farmacêutica devido a diversos fatores (como tempo e custo, por exemplo) e alternativamente podem ser desenvolvidas e empregadas metodologias que se provem equivalentes ou superiores, desde que sejam validadas de acordo com os critérios mínimos estabelecidos pela ANVISA.

Os recentes avanços na tecnologia empregada na técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE, uma das técnicas analíticas mais empregadas nas indústrias farmacêuticas de todo o mundo) e o conseqüente advento da sua versão mais moderna, chamada de cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE), tornaram o desenvolvimento e a adaptação de métodos analíticos compendiais uma alternativa atraente para indústrias farmacêuticas. Tais modificações objetivam, sobretudo, a diminuição do tempo de análise, a economia e diminuição da emissão de solventes, possibilitando a análise de um maior número de lotes em um menor espaço de tempo além de provocar menos danos ao meio ambiente.

Deve-se considerar também que os equipamentos mais modernos são normalmente mais sensíveis e conseguem detectar menores concentrações de impurezas e produtos de degradação, que podem ser tóxicos, colaborando para aumentar e garantir a segurança do esquema terapêutico ministrado ao paciente.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A AIDS consiste das manifestações clínicas desenvolvidas por portadores do vírus HIV, caracterizada principalmente pela depleção de células do sistema imunológico CD4+, causando sérios problemas à resposta imune dos portadores e facilitando a ocorrência de infecções oportunistas.

A transmissão do vírus se dá por vias sexuais, transfusão de sangue, cortes ou perfurações com objetos contendo sangue infectado, podendo também ser transmitido pela mãe para o filho durante a gravidez ou no parto (MS, 2002).

1.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana

O HIV é membro do gênero *Lentivirus* da família Retroviridae. Assim como os outros lentivírus, é responsável por processos infecciosos crônicos, muitas vezes de longa incubação (FLEXNER, 2008). Seu genoma, assim como dos outros membros desta família, apresenta uma característica única entre todas as outras famílias: é composto por RNA no lugar de DNA (REQUEJO, 2006). São divididos em dois grupos principais: HIV-1, que é o principal responsável pela AIDS em todo mundo; e o HIV-2, antes restrito às regiões central e ocidental africanas, porém agora também encontrada em Portugal, França, Brasil e Índia (HOLMES *et al.*, 2011; REQUEJO, 2006). Ambos apresentam sensibilidades semelhantes à maioria dos agentes antirretrovirais, com exceção dos inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa e da enfurvitida, ineficazes contra o HIV-2 (FLEXNER, 2008).

O vírus apresenta um genoma RNA pequeno, com aproximadamente 18600 pares de bases distribuídas em duas cópias, dispostas no interior de um nucleocapsídeo que, por sua vez, é envolvido por uma dupla camada fosfolipídica oriunda da célula hospedeira (FLEXNER, 2008). Possui tropismo por células que apresentam receptor CD4+ (linfócitos T, macrófagos, monócitos e células

dendríticas) usando o maquinário celular para sua replicação o que, de acordo com Knysz, Szetela e Gladysz (2007), leva a interações de vírus e hospedeiro que facilitam e dificultam a replicação. Ainda de acordo com a autora, o vírus utiliza mecanismos que inutilizam as proteínas de restrição, o que permite sua replicação. O processo de intensa replicação é extremamente danoso à célula hospedeira e faz com que a mesma ative mecanismos autolíticos.

As manifestações clínicas mais graves têm início quando a contagem de linfócitos CD4+ fica abaixo de 200 células por mm³ de sangue, pois devido à resultante imunossupressão, microrganismos que antes não tinham poder de causar qualquer dano agora se tornam perigosos para o portador do vírus (FLEXNER, 2008).

1.3 A terapia antirretroviral

A terapia medicamentosa foi possível a partir da aprovação da zidovudina pelo FDA em 1987 (BRODER, 2009). Em 1994, foi introduzida a terapia com dois agentes antirretrovirais (BONOLO; GOMES; GUIMARÃES, 2007) e finalmente, em 1996, foi introduzido um modelo terapêutico semelhante ao aplicado nos casos de tuberculose ativa, batizado de terapia antirretroviral altamente ativa [em inglês, *highly active anti-retroviral therapy* (HAART)]. O modelo revolucionou o tratamento da doença tornando-se padrão mundial e caracteriza-se pelo uso de no mínimo, três agentes antirretrovirais diferentes (HARRIES; MAHER; GRAHAN, 2004) e com base no mesmo, alguns medicamentos de dose fixa contendo múltiplos agentes foram desenvolvidos. A Gilead Sciences por exemplo, desenvolveu o Atripla (composto de emtricitabina, efavirenz e tenofovir) e o Truvada (composto de tenofovir e emtricitabina) enquanto a GlaxoSmithKline lançou o Epizicom (abacavir e lamivudina), o Combivir (no Brasil chamado de Biovir, composto de lamivudina e zidovudina) e o Trizivir (abacavir, lamivudina e zidovudina). De acordo com Flexner (2008), o regime do tratamento visa dificultar o desenvolvimento de resistência por parte da população viral e dessa forma, muitos médicos preferem atacar pelo menos dois alvos moleculares diferentes, fazendo assim o uso de, no mínimo, duas classes de agentes antirretrovirais diferentes. A interrupção do tratamento deve ser evitada

a qualquer custo, pois pode favorecer o desenvolvimento de resistência por parte do vírus, diminuindo a eficácia do esquema terapêutico. Ainda de acordo com o autor, HAART com mais de três agentes antirretrovirais são indicados para pacientes que já portam vírus com resistência a algum deles.

A Organização Mundial de Saúde recomenda que o tratamento deva ser iniciado quando a contagem de leucócitos CD4+ esteja inferior a 350 células/mm³ de sangue, mesmo em portadores assintomáticos. O esquema recomendado para portadores do HIV que ainda não tenham iniciado o tratamento é constituído de dois inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa e um inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa. Devido à grande toxicidade, a estavudina só é aceita pela Organização Mundial de Saúde como componente do esquema terapêutico (apesar de não recomendada), pois muitos países ainda fazem uso da substância por conta do seu baixo custo. Obviamente, os esquemas HAART devem ser adequados às condições e necessidades individuais (OMS, 2010).

Os agentes antirretrovirais são divididos em cinco classes:

- Inibidor de entrada: droga que se liga à glicoproteína gp41 impedindo a fusão da partícula viral com a membrana da célula CD4+. É ineficaz contra o HIV-2. Esta categoria é representada pela enfurvitida (FLEXNER, 2008).
- Inibidores da protease: categoria propositalmente desenvolvida com base na estrutura tridimensional da enzima protease. Quando combinada com outros agentes antirretrovirais, reduz a progressão da doença, eleva a contagem de CD4+ e favorece a supressão da viremia. A esta categoria pertencem oritonavir (mais potente), atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, e saquinavir (FLEXNER, 2008).
- Inibidores da integrase: esta é a mais nova classe de agentes antirretrovirais, que tem como mecanismo de ação a inibição da enzima integrase, responsável por catalisar a ligação estável do DNA viral com o DNA da célula hospedeira (EVERING; MARKOWITZ, 2008). O único representante da classe aprovado pelo FDA e pelo Ministério da Saúde é o raltegravir.

- Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR): ligam-se à enzima através de uma área hidrofóbica distante do sítio ativo, porém induzindo uma importante mudança estrutural da mesma. Não requerem fosforilação intracelular para que tenham atividade. Os representantes desta classe são nevirapina, delavirdina, efavirenz e etravirina (FLEXNER, 2008).
- Inibidores nucleosídeos/nucleotídeos da transcriptase reversa (INTR): impedem o alongamento da cadeia de DNA do genoma viral ao serem incorporadas à mesma, impedindo a replicação do vírus. É a classe mais antiga de agentes antirretrovirais e normalmente são selecionados dois membros desta classe para a composição do HAART de primeira linha. São eles a zidovudina (primeiro agente antirretroviral aprovado pelo FDA), abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina, zalcitabina e tenofovir (FLEXNER, 2008).

1.3.1 Lamivudina

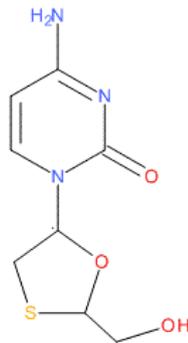


Figura 1 – Estrutura molecular da lamivudina.

- Fórmula molecular: $C_8H_{11}N_3O_3S$
- Nome IUPAC: *4-amino-1-[(2R,5S)-2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2-diidropirimidin-2-ona*
- Massa molar: 229,26 g/mol
- pKa: 4,3
- CAS: 134678-17-4

A lamivudina (2'-desóxi-3-tiacitidina) é um potente INRT utilizado com frequência nos esquemas terapêuticos anti-HIV, assim como em casos de hepatite B. Apresenta-se como pó branco ou branco amarelado, facilmente solúvel em água, podendo aparecer em medicamentos monodroga (inicialmente comercializado pela GlaxoSmithKline sob o nome de Epivir) ou em associações com zidovudina, tenofovir e nevirapina. Foi aprovado em 1995 pelo FDA. A lamivudina é um fármaco que exerce atividade contra o HIV-1 e HIV-2 e contra o vírus da hepatite B. Trata-se de um pró-fármaco que penetra na célula por difusão passiva. No citoplasma, sofre fosforilação e é convertido em sua forma ativa, o trifosfato de lamivudina. Esta forma compete com o trifosfato de desoxicitidina pela ligação com a transcriptase reversa e esta ligação interrompe a cadeia de DNA (FLEXNER, 2008). A concentração efetiva 50% (CE_{50%}) *in vitro* é da ordem de 230 ng/mL, mas alguns subfatores influenciam esse fator, como o subtipo de vírus e o tipo de célula usada no teste (ANDERSON; ROWER, 2010).

A biodisponibilidade oral é da ordem de 85%, sua taxa de ligação com proteínas plasmáticas é de 36% e o pico de concentração plasmática é atingido após aproximadamente uma hora (ANDERSON; ROWER, 2010). A alimentação provoca redução na máxima concentração plasmática por atraso na absorção, mas não a diminui de forma significativa (WHISHART *et al.*, 2011a). É eliminada primariamente em sua forma original por via renal (FLEXNER, 2008) juntamente com o metabólito identificado como trans-sulfóxido, que é eliminado na taxa de aproximadamente 5% do volume total depurado (ANDERSON; ROWER, 2010; WHISHART *et al.*, 2011a).

As interações descritas referem-se ao antagonismo entre lamivudina e zalcitabina (FLEXNER, 2008), emtricitabina e apricitabina (inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa ainda em fase de estudo clínico) (ANDERSON; ROWER, 2010).

A lamivudina é bem tolerada, mas em casos de doses mais altas pode ocorrer cefaleia e náuseas (ANDERSON; ROWER, 2010; FLEXNER, 2008). Apesar de todos os INTR serem associados com acidose láctica, sua incidência relacionada à lamivudina é rara (ANDERSON; ROWER, 2010).

1.3.2 Zidovudina

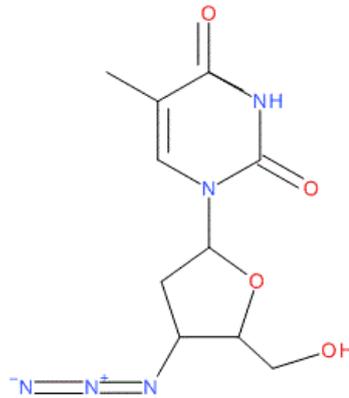


Figura 2 – Estrutura molecular da zidovudina.

- Formula molecular: $C_{10}H_{13}N_5O_4$
- Nome IUPAC: 1-[(2*R*,4*S*,5*S*)-4-azido-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-5-metil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-2,4-diona
- Massa molar: 267,24 g/mol
- pKa: 9,8
- CAS: 30516-87-1

A zidovudina (3'-azido-3'-desoxitimidina) foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA para o combate ao HIV trazendo grande esperança aos portadores do HIV e colaborando para diminuir o estigma que a AIDS tinha de “sentença de morte”. Apresenta-se como pó cristalino branco ou branco acastanhado, pouco solúvel em água e está associada à lamivudina em duas das quatro associações mais recomendadas para início da terapia contra HIV, juntamente com efavirenz ou nevirapina (OMS, 2010).

Após sua penetração na célula, a zidovudina (que, assim como a lamivudina, é um pró-fármaco) sofre uma série de três fosforilações por duas enzimas e um nucleosídeo, finalmente chegando à sua forma ativa, a 5-trifosfato de zidovudina. A forma ativa interrompe o alongamento da cadeia de DNA ao competir com o trifosfato de timidina pela incorporação ao DNA (FLEXNER, 2008). A $CE_{50\%}$ *in vitro* é de aproximadamente 2,7 ng/mL, mas assim como a lamivudina, alguns fatores podem interferir neste valor (ANDERSON; ROWER, 2010).

A biodisponibilidade abrange a faixa 52-75% e sua taxa de ligação a proteínas plasmáticas é da ordem de 30-38% (FLEXNER, 2008; WHISHART *et al.*, 2011b). A alimentação atrasa a absorção, mas não a impede, podendo diminuir a C_{max} , que é atingida após aproximadamente uma hora. Atravessa a barreira hematoencefálica, podendo ser detectada também no sêmen, tecidos fetais e leite materno. Seu principal metabólito é 5-glicuronil zidovudina, de origem hepática, que corresponde a 90% da eliminação urinária (FLEXNER, 2008).

Foram observadas interações com agentes potencialmente mielossupressores, como ganciclovir, interferon α , dapsona, flucitosina, vincristina e vimblastina. Os níveis séricos de zidovudina podem ser aumentados pelo fluconazol, probenecida, atovaquona e ácido valpróico, mas sua atividade não é modificada. A estavudina e a ribavirina competem com a zidovudina pela ativação intracelular (FLEXNER, 2008).

As reações adversas mais comuns são cefaleia, anorexia, fadiga, náusea com vômitos, mialgia e insônia. Pode também ocorrer depressão, ansiedade, confusão mental, sangramentos cutâneos e mudança de cor de unhas (FLEXNER, 2008). Também são descritas desordens sanguíneas, causadas por efeitos citotóxicos sobre as células-tronco eritroides. Além da série vermelha, também é observada interferência na população de neutrófilos. A administração crônica pode causar hiperpigmentação das unhas, hepatotoxicidade com ou sem esteatose, miopatias e acidose láctica (ANDERSON; ROWER, 2010).

Ao menor sinal destes sintomas, a droga deve ser substituída por outro agente no esquema terapêutico (ANDERSON; ROWER, 2010).

1.4 A cromatografia a líquido de ultra eficiência

Desde o seu surgimento na década de 60 do século passado, a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) sofreu diversos aprimoramentos, sobretudo com a introdução da microinformática e com a evolução na engenharia da fase estacionária. Esta última, desde o início da popularização da técnica, vem sofrendo constantes modificações visando o aumento da eficiência da mesma. As pesquisas neste campo levaram a avanços importantes, como ao advento da CLAE em fase

reversa, o desenvolvimento de fases estacionárias com diferentes seletividades para compostos específicos, o aumento da estabilidade química e física das partículas; porém, o que mais chamou a atenção dos pesquisadores e usuários da técnica foi a uniformização e miniaturização das partículas (MAJORS, 2006, MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Os esforços que foram empregados visando alcançar tal evolução podem ser explicados por um clássico trabalho publicado por van Demmter, Zuiderweg e Klinkenberg (1956), onde os autores afirmam que a eficiência da separação cromatográfica – expressa pela altura de um prato teórico em μm – é diretamente relacionada à diminuição do tamanho da partícula do recheio da coluna e a velocidade linear de fase móvel ideal para interação com tal partícula.

Desde então, gradualmente as partículas diminuíram de diâmetro (figura 3), até o advento das partículas com diâmetro inferior a $2\ \mu\text{m}$. Com base no trabalho supracitado, sobre tais partículas Maldaner e Jardim (2008) destacam:

“Uma vantagem do uso de partículas menores que $2\ \mu\text{m}$ é que a eficiência da coluna pode ser mantida com a diminuição do seu comprimento. Uma coluna menor permite separações mais rápidas, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna. Além disso, uma coluna menor, comparada a uma maior, empregando-se a mesma vazão de fase móvel, gasta uma menor quantidade de solvente, de amostra e de fase estacionária.” (MALDANER; JARDIM, 2008, P. 215)

Figure 3: History of HPLC particle development.

Years of acceptance	Particle size	Most popular nominal size	Plates / 15 cm (approximate)
1950s	 Irregular-Shaped	100 μm	200
1967	 Glass bead	50 μm (pellicular)	1000
1972		10 μm	6000
1985		5 μm	12000
1992		3–3.5 μm	22000
1996*		1.5 μm (pellicular)	30000
1999		5.0 μm (poroshell)	8000**
2000		2.5 μm	25000
2003		1.8 μm	32500

*Non-porous silica or resins ** For protein MW 5700

Figura 3 – Histórico do desenvolvimento de partículas de fase estacionária. Adaptada de MAJORS, 2006.

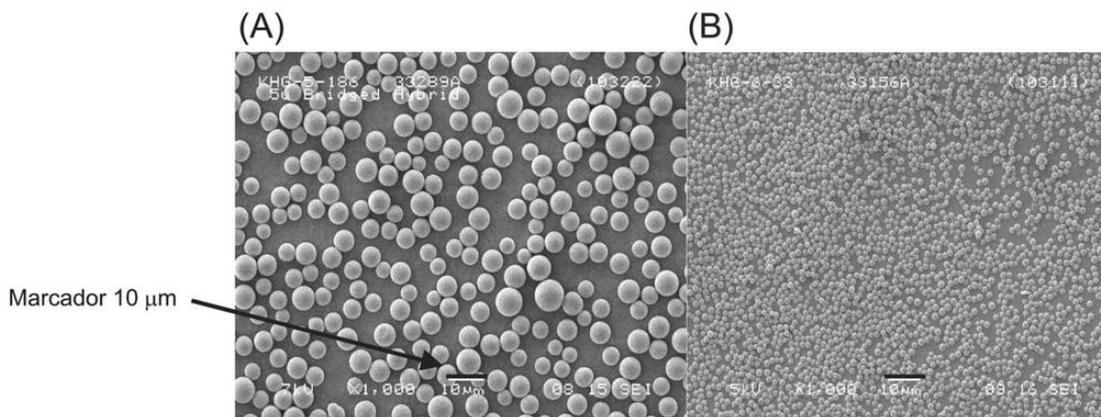


Figura 4 – Eletromicrografia de partículas de fase estacionária: (A) partículas tradicionais de 5 μm e (B) partículas de 1,7 μm . Extraído de MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Após o desenvolvimento de partículas tão diminutas, percebeu-se que o uso da coluna com a mesma velocidade linear das convencionais só seria possível com temperaturas muito altas (objetivando diminuir a viscosidade da fase móvel) já que sua permeabilidade é bem menor que das partículas tradicionais, ou com comprimentos bem reduzidos, conforme apresentado em trabalho publicado por Spáčil, Nováková e Solich (2008). O problema é que nem sempre o analito apresenta estabilidade térmica, principalmente no caso de compostos orgânicos, que são a grande maioria das substâncias analisadas nesta modalidade instrumental. Ainda assim, as velocidades lineares que foram alcançadas não permitiam o aproveitamento de todo potencial que tais colunas oferecem e desta forma foram necessárias modificações nos equipamentos cromatográficos. As principais modificações necessárias foram:

- Otimização no sistema de gerenciamento de fase móvel, visto que as bombas passaram a trabalhar com pressões de até 15000 psi (sendo que antes a pressão chegava no máximo a 6000) e a grande necessidade de diminuir o volume extra coluna, pois o mesmo é fundamental pra diminuição do alargamento de banda (MALDANER; JARDIM, 2008).
- O sistema de injeção passou a ser do tipo *needle-in-needle* – uma agulha dentro de outra – onde a externa é de aço inoxidável e a interna de *PEEK* (sigla em inglês para poliéter éter cetona). A primeira é usada para perfurar o septo do *vial* enquanto a última aspira a amostra. Isso

se deve ao fato de que a adsorção de amostra no *PEEK* é menor que no aço inox. O volume de injeção também foi diminuído para evitar o espalhamento da amostra e um conseqüente alargamento de banda (MALDANER; JARDIM, 2008).

- O sistema de detecção precisou também ser aprimorado, pois devido ao grande aumento na velocidade de eluição das substâncias analisadas, havia o risco do pico cromatográfico não ser detectado caso a taxa de aquisição não fosse alta o suficiente – há relatos de picos com largura de base menor que 1 segundo (MALDANER; JARDIM, 2008).
- O sistema de condicionamento térmico da coluna também precisou ser aperfeiçoado, visto que com a diminuição do diâmetro das partículas e dos poros da fase estacionária, com concomitante aumento de velocidade linear e pressão, gradientes térmicos são gerados pelo atrito resultante (GRITTI; GUIOCHON, 2008), o que pode causar problemas na reprodutibilidade dos resultados das análises com injeções consecutivas, além de comprometer a vida útil das colunas.

As modificações acima não resultaram em mudanças nos fundamentos teóricos da CLAE, contudo os resultados obtidos pelas mesmas no aumento de eficiência da técnica foram muito expressivos para serem considerados como simples aprimoramento. Como o primeiro equipamento comercialmente disponível foi desenvolvido pela Waters Technologies™ sob o nome de *Aquity UPLC™* (*Ultra Performance Liquid Chromatography™* – em português, cromatografia a líquido de ultra eficiência), a técnica passou a ser usualmente chamada de UPLC (MALDANER; JARDIM, 2008), apesar da nomenclatura não ser oficial, principalmente pelo fato de que a sigla foi registrada como marca pela empresa. Por este motivo, posteriormente outras empresas que desenvolveram equipamentos semelhantes, batizaram-nos com seus nomes comerciais, seguidos da sigla UHPLC, que significa *ultra-high performance liquid chromatography* (cromatografia a líquido de ultra-alta eficiência).

Ocorre que tal situação leva a um equívoco, pois a primeira técnica que recebeu a nomenclatura de UHPLC foi desenvolvida para o uso de partículas não porosas de 1,0–1,5 μm e colunas capilares com diâmetro de 10–150 μm , alcançando

pressão de 60000 psi (WREN; TCHELITCHEFF, 2006; JORGENSON, 2010), enquanto que na CLUE a pressão máxima obtida está na casa de 15000 psi e as colunas apresentam diâmetros que vão de 1,0–2,1 μm (MALDANER; JARDIM, 2008). Porém, o equipamento necessário para a obtenção de tal desempenho ainda não está disponível comercialmente, sendo restrito aos laboratórios de pesquisa, apesar de ter servido de base para o desenvolvimento dos CLUE comercializados atualmente (MALDANER; JARDIM, 2008).

A técnica por CLUE ganhou grande destaque devido ao seu potencial para resolver algumas questões limitantes da tradicional CLAE. Tal evento torna-se evidente ao avaliar um trabalho que compara a análise de compostos fenólicos realizados em um CLAE e um CLUE (SPÁČIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008). O resultado mostrou que o CLUE realizou o mesmo trabalho que o CLAE, porém de 2 a 8 vezes mais rápido e consumindo de 5–15 vezes menos solventes, além de ter mostrado uma maior sensibilidade, que foi comprovada pelas áreas das amostras que foram de 1,5–2 vezes maiores (para as mesmas soluções). Para a indústria farmacêutica, estas são características bem importantes, pois apesar de a técnica mais antiga apresentar grandes pontos positivos, como a boa sensibilidade e grande seletividade, as pesquisas de impurezas relativas aos fármacos apresentam normalmente um tempo muito longo, o que é incompatível com a competitividade do mercado nos dias atuais, que precisa de resultados mais rápidos e assertivos, no menor tempo possível (WREN; TCHELITCHEFF, 2006).

As questões ambientais e econômicas também merecem destaque quando comparamos ambas as técnicas. A técnica por CLAE, apesar de eficiente, normalmente demanda grandes quantidades de solventes tóxicos, poluentes, além de dispendiosos (neste último caso, devido à necessidade de grande grau de pureza). Um estudo comparativo demonstra que a economia de solventes pode ser de 80% (CHEN; KORD, 2009), podendo chegar a 95% (SPÁČIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008) quando a metodologia é otimizada e transferida de um CLAE para um CLUE. Assim, a análise por CLUE se mostrou não apenas ecologicamente favorável, mas também mais barata no que diz respeito ao gasto dos insumos.

Outro aspecto que merece destaque é a possibilidade de execução de análises com metodologias por CLAE no mesmo equipamento. Apesar do menor volume extra coluna, o mesmo pode ser compensado e os resultados podem ser iguais aos esperados em um CLAE tradicional (FOLEY; GILDEA; WHEAT, 2010).

Essa característica é importante para laboratórios que realizam análises que não podem ser adaptadas para CLUE, como no caso de laboratórios que terceirizam análises ou no caso da necessidade de execução de algum método farmacopeicos.

1.4.1 Colunas de núcleo fundido

No fim da década de 60, Kirkland (1969) publicou um trabalho onde relatou o uso de colunas para cromatografia gasosa e líquida cuja fase estacionária era fruto de uma nova tecnologia. De acordo com o referido trabalho, tais colunas eram responsáveis por uma eficiência até 30% maior que colunas com empacotamento de terra diatomácea e suas partículas eram formadas com base em um núcleo sólido e não poroso de sílica com diâmetro médio de 30 μm , coberto por um revestimento de sílica porosa de 1 μm .

Em 2000, Kirkland e colaboradores, descreveram uma nova partícula de núcleo fundido com base em um núcleo de sílica ultra pura não porosa e não ligada, com diâmetro aproximado de 3 – 6 μm envolto por uma camada de sílica porosa de 0,1 – 1 μm ligada à uma cadeia de C18, sendo batizada de *Poroshell*. Tal fase estacionária mostrou maior eficiência em relação às colunas de partículas totalmente porosas na separação de macromoléculas como polipeptídeos, porém nenhum ganho foi percebido na separação de micromoléculas (WANG; BARBER; CARR, 2006).

Posteriormente, em 2007, Kirkland obteve partículas fundidas menores, desta vez com diâmetro de 1,7 μm revestidas por uma camada de sílica porosa ligada de 0,5 μm , comercialmente chamadas de *Halo-C18* (demonstradas no desenho esquemático da figura 5 e na eletromicrografia presente na figura 6, à esquerda). Desta vez foram obtidos excelentes resultados na eficiência de separação substâncias de baixo e médio peso molecular (avaliados pelos baixos valores da altura do prato teórico), sobretudo quando comparados aos resultados obtidos por colunas totalmente porosas de 3 μm . Contudo, os resultados não foram satisfatórios para separação de substâncias de alto peso molecular, como albumina de soro bovino, devido ao reduzido diâmetro dos poros (GRITTI *et al.*, 2010).

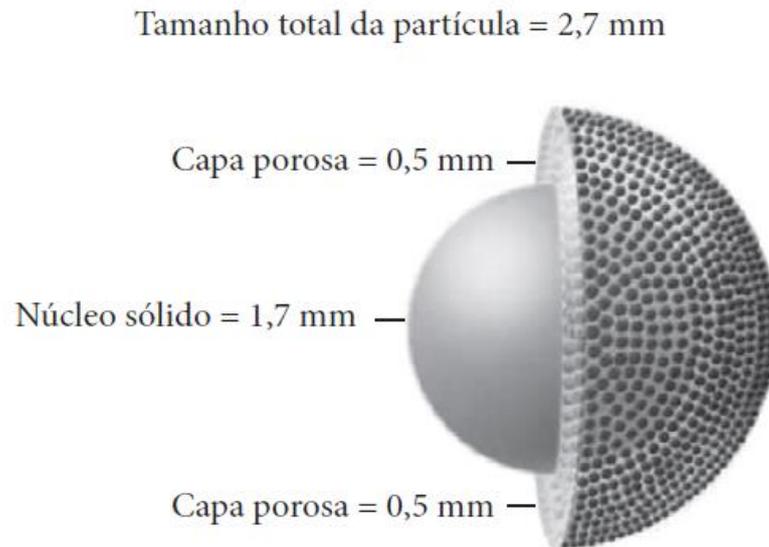


Figura 5 – Ilustração esquemática de típica partícula de núcleo fundido. Extraído de SANTOS NETO, 2011.

Uma nova geração de partículas de núcleo fundido surgiu em 2009, trazendo significativas melhorias e conseqüentemente dando grande notoriedade às colunas empacotadas com este tipo de fase estacionária. Conforme pode ser observado nas eletromicrografias apresentadas na figura 6, a principal melhoria se deu na morfologia da partícula. A Phenomenex desenvolveu uma partícula sólida não porosa com diâmetro médio de 1,9 μm , revestida por um filme de sílica porosa ligada a C18 de aproximadamente 0,35 μm , sendo chamada *Kinetex*. Tal partícula apresenta uma forma quase perfeitamente esférica, isenta de irregularidades, com revestimento bem uniforme. Sua antecessora por outro lado apresenta aspecto rugoso e seu revestimento apresenta maior irregularidade de espessura (figura 7). Gritti e seus colaboradores (2010) atribuem a tais características principalmente a diferença de desempenho entre as mesmas.

As colunas de núcleo fundido sub-3 μm alcançaram grande destaque no mercado cromatográfico analítico atual por atingirem um maior número de pratos teóricos que suas concorrentes sub-2 μm (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), porém sem provocar os grandes aumentos de pressão no sistema, podendo ser utilizadas em equipamentos com bombas convencionais (GRITTI *et al.*, 2010).

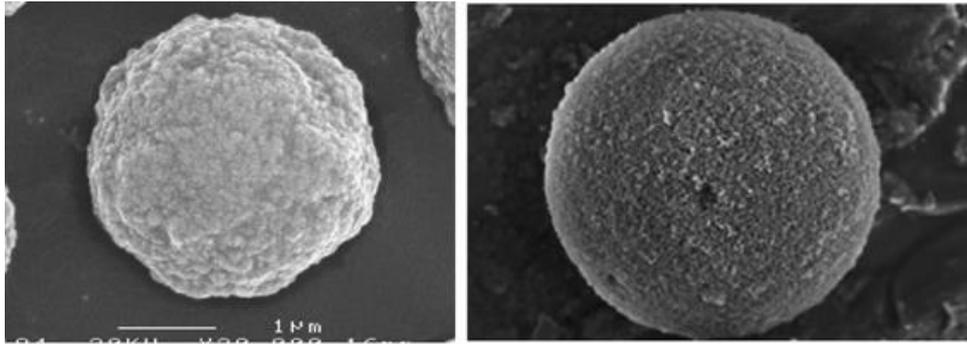


Figura 6 – À esquerda, eletromicrografia de uma partícula *Halo* (primeira geração) e à direita, de uma partícula *Kinetex* (segunda geração). Extraído de GRITTI *et al.*, 2010.

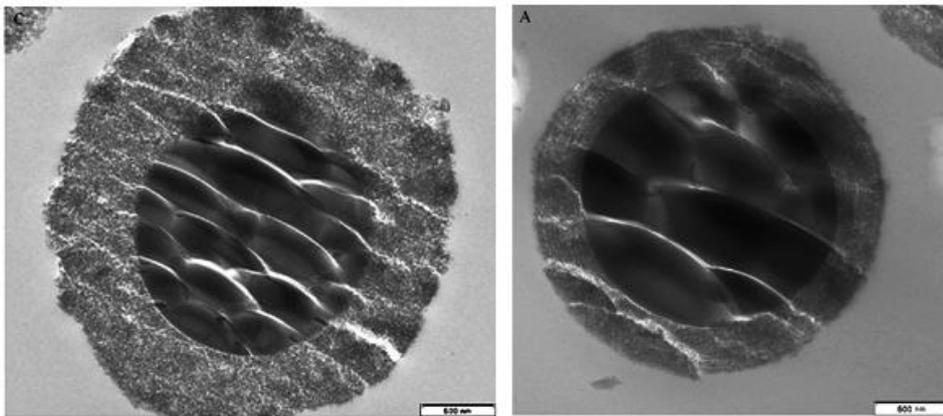


Figura 7 – À esquerda, eletromicrografia mostrando corte de uma partícula *Halo* (primeira geração) e à direita, de uma partícula *Kinetex* (segunda geração). Extraído de GRITTI *et al.*, 2010.

As causas da eficiência destas colunas podem ser explicadas com base em um trabalho publicado por Gritti (2010) e seus colaboradores:

“O número de pratos teóricos de uma coluna depende muito de sua AEPT (altura equivalente a um prato teórico), que é controlada por três fatores independentes, primeiro discutido por Giddings em seus estudos de fundamentos do fenômeno de transferência de massa em colunas empacotadas, mas de quarenta anos atrás. Estes fatores incluem: a difusão longitudinal de um soluto através da coluna (cuja contribuição é o clássico termo B na equação de van Deemter); a dispersão da amostra devido ao seu transporte e troca através e entre as vias de fluxo anastomosado por partículas empacotadas (explicado pelo clássico termo A da equação de van Deemter); e a transferência da massa do soluto entre a fase móvel percolando através do leito da coluna e a fase líquida estagnada no interior da estrutura porosa das partículas sólidas (o clássico termo C na equação de van Deemter). As contribuições destes três termos são aditivas (pois os três fatores

ocorrem devido a fenômenos independentes) e determinam a AEPT final da coluna.” (GRITTI *et al.*, 2010 p.289).

Para melhor compreensão, a equação de van Deemter e colaboradores é apresentada abaixo:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Como as partículas são feitas de um núcleo de sílica ultra pura não porosa e não ligada, revestidas de sílica porosa ligada a hidrocarbonetos, os termos *B* e *C* são significativamente reduzidos, pois a cinética ocorre apenas na região periférica da partícula. O termo *A* é diminuído devido à baixa variabilidade no tamanho da partícula, o que contribui para um melhor empacotamento da fase estacionária e um leito cromatográfico mais uniforme, quando comparado com colunas de partícula totalmente porosa. Assim, o fluxo de fase móvel torna-se menos turbulento, com menos caminhos preferenciais.

Desta forma, o caminho das moléculas através das partículas é bem mais curto e, conseqüentemente, pela coluna também. Este fenômeno contribui significativamente para o estreitamento da base da banda cromatográfica, o que contribui para picos mais altos, conseqüentemente aumentando as chances de detectar substâncias em concentrações muito baixas e aumentando o poder de separação da coluna, quando comparando com partículas de mesmo tamanho totalmente porosas (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Os ganhos também são expressivos na velocidade da análise e na economia de solventes.

Apesar de não necessitar de sistema de bombas especiais para sua utilização, para a obtenção do máximo desempenho destas colunas, algumas melhorias nos sistemas cromatográficos tradicionais se fazem necessários, sobretudo no sistema fluídico, visando à minimização do volume extra coluna, que normalmente provocam alargamento de bandas, com conseqüente diminuição da altura dos picos e possível co-eluição de substâncias (ALEXANDER *et al.*, 2011; SANTOS NETO, 2011).

1.5 Metodologia analítica indicativa de estabilidade e estudos de degradação forçada

A estabilidade de um medicamento é um dos parâmetros mais importantes a serem avaliados, pois impactam diretamente sobre sua eficácia e segurança. Após cuidadoso estudo, a partir do mesmo é possível determinar qual material de embalagem deve ser utilizado, o prazo de validade do produto farmacêutico, os tipos de interação físico-química que o produto está sujeito e as substâncias oriundas da degradação do produto (MELVEGER; HUYNH-BA, 2009).

As mudanças que o fármaco ou o produto podem sofrer ao longo do estudo, podem ser percebidas visualmente, como mudança de cor, aspecto ou integridade, não necessitando, para esses casos, qualquer metodologia de grande complexidade. Porém, algumas mudanças podem ocorrer e não serem perceptíveis ao olho humano, como a mudança de estado cristalino do fármaco e excipientes (ainda não monitoradas de forma obrigatória pelas agências reguladoras) e modificações químicas do fármaco e do produto. O monitoramento deste último caso é considerado obrigatório pelas principais agências reguladoras, e para sua execução, as indústrias farmacêuticas em todo o mundo aplicam geralmente metodologias cromatográficas, principalmente por CLAE visando monitorar o decaimento do teor do fármaco no produto e o surgimento de substâncias oriundas de sua degradação (BAKSHI; SINGH, 2002; AUBRY; TATTERSALL; RUAN, 2009).

De uma forma ideal, para o desenvolvimento de um método cromatográfico capaz de monitorar o fármaco e seus produtos de degradação, precisamos de substâncias de referência de ambos. Porém, raramente é possível a obtenção de padrões químicos das impurezas das drogas. Neste caso, a solução é empregar o teste de degradação forçada (AUBRY; TATTERSALL; RUAN, 2009).

A degradação forçada é um estudo complexo onde o fármaco é submetido a condições forçadas de hidrólise (ácida, neutra e alcalina), oxidação, pirólise e fotólise, visando acelerar a formação de subprodutos que podem surgir da exposição ambiental do fármaco e durante os estudos de estabilidade. Não há ainda um texto oficial que regulamente a condução do estudo, porém alguns autores publicaram textos que norteiam a forma racional de conduzir os testes (REYNOLDS *et al.*, 2002; ALSANTE; MARTIN; BAERTISCHI, 2003; BAERTSCHI; JANSEN, 2005; KATS,

2005; KLICK *et al.*, 2005; AUBRY; TATTERSALL; RUAN, 2009; NGWA, 2011; PATEL; PATEL; PATEL, 2011).

De acordo com tais autores, os testes devem ser conduzidos de forma que sejam gerados produtos que potencialmente possam surgir durante os estudos de estabilidade e conseqüentemente, durante o prazo de validade do medicamento. Não é interessante que ocorram excessos que contribuam para a geração de subprodutos dos produtos de degradação, que podem dificultar o desenvolvimento do método analítico indicativo de estabilidade e provocar falsas interpretações dos resultados dos testes.

Baertschi e Jansen (2005) mencionam que estes estudos de degradação podem impactar nas seguintes áreas:

- Desenvolvimento de método analítico – a falta de padrões certificados de impurezas pode ser compensada pelo teste, principalmente para validar o parâmetro seletividade do método.
- Desenvolvimento de formulação e embalagem – neste caso, a degradação forçada pode indicar a suscetibilidade do fármaco a determinados estímulos físico-químicos, como hidrólise ou oxidação, orientando o tipo e material de embalagem que deverá ser utilizado para proteção da formulação, bem como quais excipientes devem ser utilizados e evitados, devido a possível interação de ambos.
- Determinar as condições apropriadas de estocagem e prazo de validade – a determinação de tais condições depende do conhecimento dos mecanismos de degradação do fármaco e a velocidade de ocorrência da mesma.
- Parâmetros de fabricação – a degradação do fármaco pode ocorrer durante o processo de fabricação do medicamento. Conhecer os mecanismos de degradação de um fármaco pode levar ao desenvolvimento de um processo fabril menos nocivo à estabilidade do produto.
- Toxicologia – durante os testes de degradação forçada é possível detectar substâncias de conhecido potencial toxicológico e, assim, trabalhar em formas de evitar que as mesmas sejam formadas durante o prazo de validade do medicamento.

- Estudos metabólicos – alguns metabólitos do fármaco podem se formar durante os estudos de degradação. Neste caso, torna-se mais fácil obter estes metabólitos estressando a molécula do que os isolando de organismos vivos. Este evento é importante para a compreensão das rotas de degradação do fármaco *in vivo*.
- Exposição ambiental – é importante compreender como a droga se degradará quando exposta ao meio ambiente e provavelmente tal evento ocorrerá conforme os testes de degradação forçada.

Uma questão importante e que deve ser considerada é que o teste de degradação forçada aponta para potenciais produtos de degradação. É possível que muitas impurezas surgidas do teste não se formem durante os estudos de estabilidade, assim como o contrário também pode ser verdade. Este evento é previsto pelo guia ICH Q1A R2 (2003, p.2) que diz:

“Contudo, pode não ser necessário pesquisar por determinados produtos de degradação se for demonstrado que os mesmos não se formam durante as condições de armazenamento dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração”.

1.5.1 Estudo de degradação forçada da lamivudina

Em 2008, Bedse, Kumar e Singh publicaram um trabalho demonstrando os resultados obtidos do estudo de degradação forçada da lamivudina. As estruturas dos produtos gerados foram postuladas com base nos dados obtidos da espectrometria de massas.

Foi observada significativa sensibilidade a oxidação e hidrólise, gerando cinco produtos de degradação diferentes. A rota de degradação e a estrutura dos produtos gerados são apresentados na figura 8.

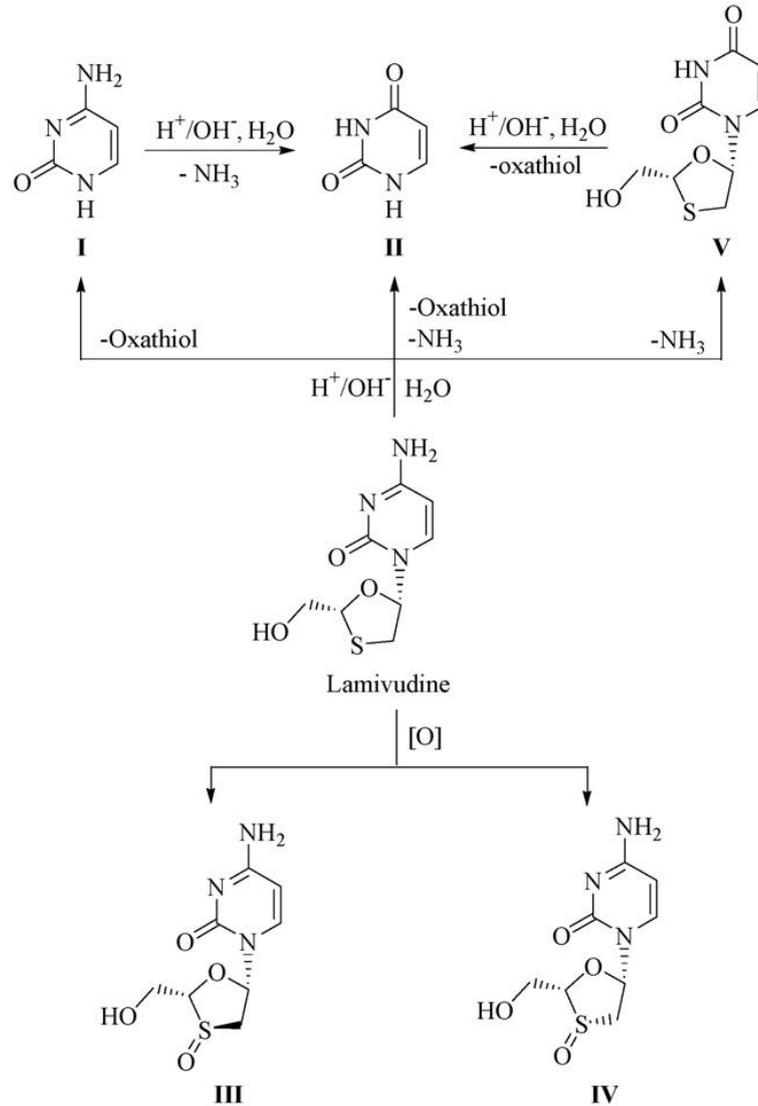


Figura 8 – Produtos de degradação de lamivudina. Os produtos I, II e V são oriundos da degradação por via hidrolítica, enquanto III e IV têm origem na oxidação do grupo tioéter (extraído de BEDSE; KUMAR; SINGH, 2008, p. 61).

1.5.2 Estudo de degradação forçada da zidovudina

A mecânica de degradação da zidovudina foi estudada em conjunto com a estavudina (devido à grande semelhança estrutural) e leva majoritariamente à formação de timina, uma conhecida base nitrogenada que participa na formação do DNA (DUNGE; CHAKRABORTI; SINGH, 2004).

Durante os estudos de degradação para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade para o fármaco, foi determinada sua sensibilidade à hidrólise e fotólise e estabilidade frente a condições de estresse térmico e oxidativo. Porém, a forma como o estudo fotolítico foi conduzido coloca em dúvida se a molécula degradou-se por estímulo luminoso ou pelas condições potencialmente hidrolíticas do teste, visto que o mesmo foi conduzido em soluções ácida, alcalina e neutra (DUNGE *et al.*, 2004).

A rota de degradação com consequente formação de timina é demonstrada na figura 9.

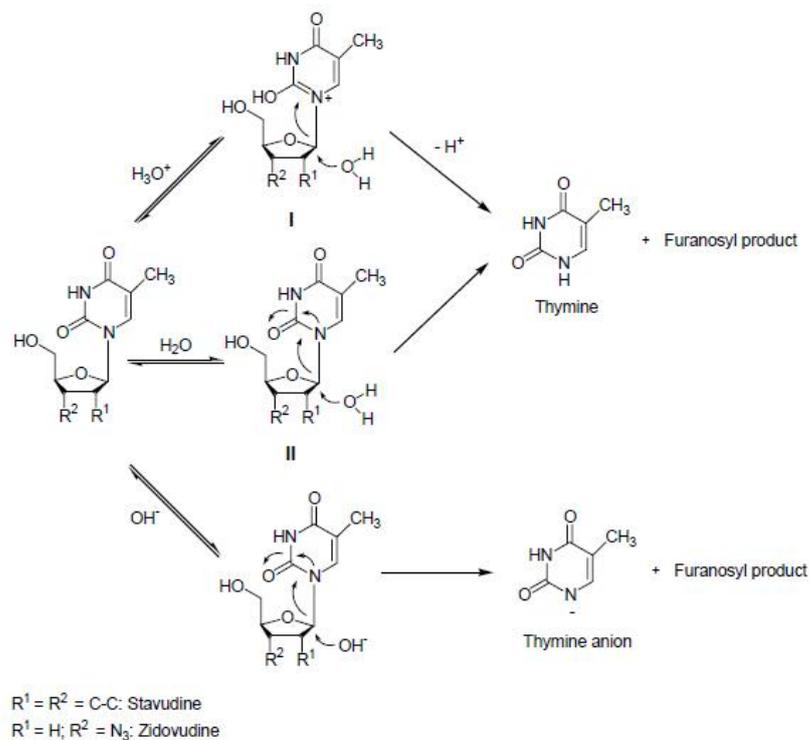


Figura 9 – Rota de formação da timina como principal produto de degradação da zidovudina. O mesmo mecanismo pode ser atribuído à degradação da estavudina (extraído de BEDSE; KUMAR; SINGH, 2004).

1.6 Validação de métodos analíticos

De acordo com *International Conference on Harmonization* (ICH) em seu guia Q2(R1), “o objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado para sua finalidade.” (ICH, 2005, p.1).

As metodologias analíticas empregadas pelas indústrias farmacêuticas podem ser compendiais ou não compendiais. No primeiro caso, as mesmas vêm descritas em documentos oficiais reconhecidos pelos órgãos reguladores e são considerados validados, legalmente necessitando apenas de verificação [tal procedimento é descrito no capítulo <1226> da 35ª edição da farmacopeia norte-americana (2011)]. Já no segundo caso são desenvolvidas por não estarem incluídas nas monografias compendiais ou quando os métodos oficiais não atendem as necessidades operacionais do laboratório. Desta forma, ao fim do desenvolvimento, precisam ser validados para provar que são adequados ao seu propósito (BRASIL, 2003).

A validação de um método analítico é um conjunto de procedimentos que visa determinar se o referido método cumpre seu propósito de forma eficiente e segura. Existem diversos guias que orientam quanto à forma de conduzir os testes e para as indústrias farmacêuticas atuantes no Brasil, o documento oficial a ser seguido é a resolução RE 899, publicada em 23 de maio de 2003 pela ANVISA. Neste documento os métodos são classificados em 4 categorias, de acordo com sua finalidade, conforme é apresentado na tabela 1. Os testes necessários para validar um método analítico são determinados pela categoria à qual o mesmo pertence como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade (BRASIL,2003).

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Tabela 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetitividade	Sim	Sim	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

1.6.1 Especificidade e seletividade

A RE 899 (BRASIL, 2003) define a especificidade e a seletividade como “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 terminologia aplicada a esta categoria de testes não apresenta um significado universal entre as organizações internacionais como a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - União Internacional de Química Pura e Aplicada), WELAC (*Western European Laboratory Accreditation Cooperation* – Cooperação para Acreditação de Laboratórios da Europa Ocidental) e ICH, porém é um parâmetro de suma importância, pois determina se o resultado de um método analítico é capaz de determinar cada substância de interesse e se o mesmo pode ser adulterado pela presença de outros componentes, como solventes utilizados ou placebo, por exemplo (VESSMAN, 1996).

1.6.2. Linearidade

Esta característica é definida na RE 899 como “a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais á concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado”.

Mais uma vez, o termo não é universalmente aplicado, visto que existem métodos que apresentam respostas proporcionais, porém não lineares, como cromatografia em camada delgada quantitativa e CLAE com detecção por fluorescência (ERMER, 2005a).

1.6.3 Exatidão

O teste de exatidão determina o quão próximo o valor experimental se aproxima do valor real. Este parâmetro, quando verificado em métodos analíticos destinados a formas farmacêuticas, normalmente é feito através da contaminação do placebo com quantidades conhecidas do fármaco ou impureza em questão, resultando em três concentrações distintas, que vão desde o menor ao maior ponto da curva de linearidade do método (BRASIL, 2003). A recuperação é então determinada e recomenda-se a faixa 98–102% para o fármaco e de 80–120% para impurezas [devido a baixas concentrações (DIANA, 2009)].

1.6.4. Precisão

A RE 899 define a precisão como “[...] a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra” (BRASIL, 2003 p. 4). Quando avaliada juntamente com a exatidão, indica o quão próximo o valor experimental estará do valor teórico em medições repetidas.

Pode ser determinada utilizando o teste de exatidão ou através de no mínimo seis medições a 100% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2003). Deve-se usar preferencialmente amostras do produto (ERMER, 2005b).

A precisão pode ser dividida em quatro níveis: precisão do sistema, repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Conforme explicado pela figura 10, em casos de métodos cromatográficos cada nível testa a contribuição que determinados elementos adicionam para o aumento da variabilidade dos resultados.

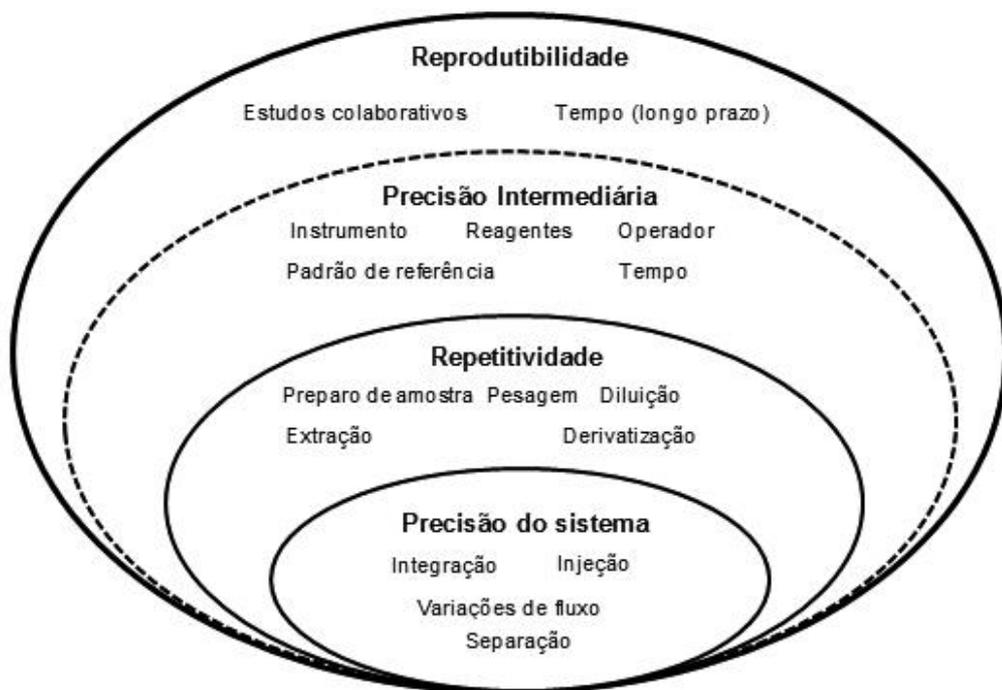


Figura 10 – Ilustração com os vários níveis de precisão e suas contribuições. Adaptado de ERMER, 2005b.

A RE 899 determina que, de uma forma geral, a precisão seja medida a partir do desvio padrão relativo medido entre as amostras e que seu valor seja inferior a 5% (BRASIL, 2003). Porém, para métodos cromatográficos, devido à grande precisão dos instrumentos atuais, recomenda-se que a precisão em nenhum nível seja superior a 2% (DIANA, 2009).

1.6.5 Limites de quantificação e detecção

Estes parâmetros são avaliados em métodos analíticos que fazem determinação de concentrações muito baixas, normalmente de produtos de degradação, solventes residuais e validações de limpeza.

O limite de quantificação (LQ - também chamado de limite inferior de quantificação) é definido como “a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas” (BRASIL, 2003).

Já o limite de detecção (LD) é a menor concentração detectável mas que não pode ser quantificada de forma a garantir precisão e exatidão confiáveis (DIANA, 2009).

Para ensaios cromatográficos, ambos podem ser determinados das seguintes formas:

- Através de sucessivas diluições, até que se alcance a menor concentração cuja determinação seja possível com precisão e exatidão para o LQ e a menor concentração cujo exame visual permita a identificação consistente da substância para o LD (BRASIL, 2003).
- Após encontrar o valor do ruído em uma área do cromatograma livre de picos (ou em uma amostra de branco de solventes), encontrar a concentração que tenha um sinal três vezes maior, para determinação do LD; para determinação do LQ, a razão deve ser dez vezes maior (BRASIL, 2003).
- O LD e LQ também podem ser determinados por extrapolação, usando o valor da inclinação da curva de calibração (S) obtida no teste de linearidade e o valor do desvio padrão da resposta (σ) baseado em repetidas medições do branco de solventes ou em amostras com concentração aproximada ao limite de detecção ou quantificação. O LD é então calculado a partir de $3,3\sigma/S$ e o LD $10\sigma/S$ (DIANA, 2009).

1.6.6 Robustez

Durante o desenvolvimento do método analítico e durante os testes de validação supracitados, as análises ocorrem sob condições ideais. Ocorre que durante a rotina em um laboratório de controle de qualidade, que é para onde normalmente os métodos desenvolvidos são destinados, nem sempre tais condições serão encontradas.

A robustez de um método visa determinar sua resistência a pequenas e deliberadas mudanças nos parâmetros operacionais, assim como a estabilidade das soluções (amostras e padrões) empregadas nos testes (DIANA, 2009).

De acordo com a RE 899 (BRASIL, 2003), para cromatografia líquida, os principais parâmetros que devem ser avaliados são:

- Variação do pH da fase móvel.
- Variação na composição da fase móvel.
- Diferentes lotes e/ou fabricantes de colunas.
- Temperatura.
- Fluxo de fase móvel.

A estabilidade das soluções deve ser avaliada frente a parâmetros como tempo, exposição à luz e temperatura. Uma abordagem que pode ser utilizada é descrita por Diana (2009), onde as soluções são preparadas e divididas, sendo uma parte mantida sob refrigeração e a outra parte à temperatura ambiente.

2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho propõe uma metodologia analítica alternativa às presentes em compêndios oficiais para análise de lamivudina, zidovudina e suas impurezas em formulação, visto que os métodos encontrados são de lenta execução, sendo considerados dispendiosos e inconvenientes para a rotina do laboratório de controle de qualidade da empresa.

Como a empresa patrocinadora do presente trabalho (Laborvida Laboratórios Farmacêuticos) investiu na aquisição de cromatógrafos a líquido de ultra eficiência e colunas analíticas mais modernas, sua gerência do corpo técnico considerou uma opção favorável o desenvolvimento de uma metodologia analítica alternativa às presentes nos compêndios oficiais, que se mostrasse mais rápida e econômica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consiste em desenvolver e validar uma metodologia para análise em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência para determinação de lamivudina, zidovudina e suas substâncias relacionadas em formulação.

3.2 Objetivos específicos

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Propor e validar um método cromatográfico com viabilidade de execução para uso nas análises de rotina e estudo de estabilidade.
- Realizar o estudo de degradação forçada para avaliar a formação de potenciais produtos que poderão formar-se durante os estudos de estabilidade.
- Descrever as vantagens da metodologia desenvolvida em relação às metodologias presentes nos documentos oficiais, justificando sua aplicação na rotina analítica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias de referência

Neste trabalho foram utilizados os seguintes padrões de referência certificados:

- Lamivudina – padrão certificado distribuído pela Farmacopeia Americana, lote G0F114, teor de 0,997 mg/mg.
- Zidovudina – padrão certificado distribuído pela Farmacopeia Brasileira, lote 1023, teor de 0,994 mg/mg.
- Mistura de resolução lamivudina + diastereoisômero de lamivudina – padrão certificado distribuído pela Farmacopeia Americana contendo aproximadamente 5% de diastereoisômero e 95% de lamivudina, lote H01145, teor de 1 mg/mg.
- Timina – padrão certificado distribuído pela Farmacopeia Americana, lote G0F181, teor de 1 mg/mg.

Além dos supracitados, também foram utilizadas as seguintes substâncias químicas não certificadas:

- Citosina – Sigma-Aldrich, lote 06K1542 (EUA).
- Uracila – Sigma-Aldrich, lote 019K0033 (EUA).
- Timidina – Sigma-Aldrich, lote 118K0012 (EUA).
- Ácido Salicílico – Synth, lote 121585 (Brasil).

4.2 Amostras

Amostras de lamivudina (matéria-prima) foram obtidas da indústria farmoquímica Globe Química (Brasil); de zidovudina (matéria-prima), da indústria farmoquímica Nortec Química (Brasil); o placebo (constituído de celulose

microcristalina, hidroxipropilmetilcelulose, estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal e sistema de revestimento Opadry branco), a mistura para compressão e comprimidos revestidos do Laborvída Laboratórios Farmacêuticos (Brasil). Amostras do medicamento de referência (Biovir, lote R527954) foram adquiridas da GlaxoSmithKline (Inglaterra).

4.3 Reagentes

A água utilizada no processo de diluição dos padrões e amostras foi obtida de um sistema de osmose reversa (Millipore Elix 5, EUA) acoplado a um purificador de água (Millipore, Milli-Q Gradient A10, EUA). O metanol (grau HPLC) utilizado na diluição do padrão de zidovudina e na composição da fase móvel foi obtido da Tedia (EUA). O acetato de amônio, ácido acético glacial, o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico (os dois últimos utilizados na degradação forçada dos fármacos) foram obtidos da Merck (Alemanha). O peróxido de hidrogênio, utilizado nos testes de oxidação dos fármacos, foi adquirido da Vetec Química (Brasil).

4.4 Vidrarias

Todas as vidrarias de precisão utilizadas eram de borossilicato (balões volumétricos e pipetas volumétricas) e estavam devidamente calibradas.

A pipeta automática utilizada foi uma Researcher Plus da Eppendorf (Alemanha), também devidamente calibrada.

4.5 Balança analítica

Foi utilizada neste trabalho uma balança analítica Mettler Toledo, modelo XS205 Dual Range (Suíça), devidamente calibrada.

4.6 Câmara de fotoestabilidade

A exposição das substâncias à luz foi realizada em câmara de fotoestabilidade modelo 6540-2, da Caron (EUA), por uma empresa terceirizada, devido à indisponibilidade do equipamento no laboratório do Laborvída.

4.7 Estufa

Neste trabalho foi utilizada uma estufa modelo 1370P fabricada pela VWR Scientific durante os testes de degradação forçada.

4.8 Sistema cromatográfico

Os primeiros testes de desenvolvimento foram realizados em um CLAE Shimadzu Prominence (Japão) composto por degaseificador DGU-20A, sistema de bombas LC-20AT, autoinjeter SIL-20AC, forno para colunas CTO-20A, detector por arranjo de diodos SPD-M20A e interface de comunicação CBM-20A. Para aquisição dos dados, foi empregado o *software* LC-Solution.

O método proposto foi desenvolvido em um CLUE Acquity H-Class desenvolvido pela Waters Technologies (EUA), composto por sistema de bombas com degaseificador embutido modelo ACQ-QSM, sistema de autoinjeção ACQ-SM-FTN, condicionador de colunas CH-30A e detector por arranjo de diodos PDA-e. O *software* utilizado para aquisição dos dados foi o Empower 3.

4.9 Preparo das amostras, padrões, e solução de adequação do sistema

Para a análise de doseamento dos comprimidos foram transferidos cinco comprimidos da associação de lamivudina e zidovudina, 150 mg e 300 mg respectivamente, a um balão volumétrico de 500 mL. Em seguida foram adicionados 25 mL de metanol ao balão, que permaneceu em agitação magnética por 5 minutos. Ao fim da agitação, aproximadamente 300 mL de água purificada foram adicionados e novamente o balão foi submetido à agitação magnética, desta vez por 15 minutos. O volume foi completado até a marca de referência com água purificada. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 5 mL que foi transferida e diluída em balão volumétrico de 50 mL. Desta forma, foram obtidas amostras nas concentrações teóricas de 0,15 mg/mL de lamivudina e 0,30 mg/mL de zidovudina.

Os padrões de referência foram preparados por meio de duas soluções-estoque, uma contendo lamivudina e a outra zidovudina. Para lamivudina foram pesados cerca de 15 mg da SQR que, posteriormente, foram transferidos e diluídos com água purificada em balão volumétrico de 25 mL. Para zidovudina, aproximadamente 30 mg da SQR foram inicialmente solubilizados com 2,5 mL de metanol em balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume posteriormente completado até a marca de referência com água purificada. Em seguida, 5 mL de cada solução-estoque foram transferidos para balão volumétrico de 20 mL e finalmente diluídos com água purificada. A concentração final do padrão de referência foi de aproximadamente 0,15 mg/mL de lamivudina e 0,30 mg/mL de zidovudina.

Para preparar a solução de adequação do sistema, foram pesados aproximadamente 1,5 mg do padrão de mistura de lamivudina e seu diastereoisômero sendo posteriormente transferido para balão volumétrico de 10 mL. O balão foi avolumado até a marca de referência com água purificada.

Todas as soluções foram filtradas em membranas de PVDF com poros de 0,22 µm antes de serem transferidos para o *vial*.

4.10 Condições cromatográficas

Os parâmetros cromatográficos do método desenvolvido são apresentados na tabela 3.

A solução tampão utilizada na porção aquosa da fase móvel foi preparada pesando aproximadamente 1,9 gramas de acetato de amônio que posteriormente foram transferidos para balão volumétrico de 1000 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 3,3 com uso de ácido acético glacial 10%. O balão foi finalmente avolumado até sua marca de referência e a solução resultante filtrada em um kitassato através de membrana de PVDF com poros de 0,22 µm. A tabela 3 sumariza os parâmetros cromatográficos utilizados.

Tabela 3 – Parâmetros cromatográficos do método de análise

Cromatógrafo:	CLUE (Waters)		
Coluna:	Kinetex C18 150 mm x 4,6 mm 2,6 µm		
Fase móvel:	Ver gradiente abaixo		
Fluxo:	Ver gradiente abaixo		
Volume de injeção:	5 µL		
Temperatura:	20°C		
Detector:	UV com leitura em 270 nm		
Solvente de lavagem do sistema injetor:	Água purificada / metanol (7:3)		
Gradiente			
Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)	Tampão (%)	Metanol (%)
Inicial	1,5	95	5
3,20	1,5	95	5
3,21	1,0	95	5
3,30	1,0	95	5
3,60	1,0	65	35
6,00	1,0	65	35
6,01	1,0	95	5
8,00	1,5	95	5

Os parâmetros de adequação do sistema que foram seguidos para garantir a qualidade da análise cromatográfica foram as mesmas descritas pela monografia oficial presente na Farmacopeia Americana para análise de teor e impurezas desta associação de fármacos (USP, 2011, p. 3633) e são as seguintes:

- A resolução verificada entre os picos de lamivudina e seu diastereoisômero na solução de adequação do sistema não deve ser menor que 1,5.
- O desvio padrão relativo entre as injeções das soluções dos padrões não deve ser maior que 2,0%.

Por se tratar de um método indicativo de estabilidade, o fator de cauda também avaliado como parâmetro de adequação do sistema, visto que é um importante parâmetro para avaliação de separações cromatográficas. Seu valor não deve ser maior que 2,0 (FDA, 1994).

4.11 Validação da metodologia

A validação do método proposto foi realizada de acordo com as determinações da RE 899 de 2003 para testes da categoria 1, onde se enquadram os quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, e para categoria 2, que são testes quantitativos ou ensaios limite para determinação de substâncias relacionadas em produtos farmacêuticos. Portanto, os testes realizados foram: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez. Para complementar a análise estatística proposta para os testes foram utilizados como guias os livros “*Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*” (MILLER; MILLER; 2010), “*Method Validation in Pharmaceutical Analysis*” (ERMER; MILLER 2005) e “Estatística – Teoria e Aplicações” (LEVINE *et al.*, 2005). Os cálculos foram realizados através do *software* Microsoft Excel 2010.

4.11.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram realizadas análises com o placebo, com os insumos ativos do produto e com amostras de impurezas conhecidas disponíveis

comercialmente. Também foi realizado o teste de degradação forçada (descrito na seção 4.11.1.1.), objetivando comprovar que o método apresenta seletividade adequada para quantificar os potenciais produtos de degradação que podem se formar durante os testes de estabilidade.

4.11.1.1 Teste de degradação forçada

Amostras de lamivudina e zidovudina foram submetidas à hidrólise e oxidação e para ambos os fármacos, foi preparada uma solução estoque na concentração de 6 mg/mL. Em seguida, esta solução foi diluída em ácido clorídrico 0,1 M (hidrólise ácida), hidróxido de sódio 0,1 M (hidrólise alcalina), água purificada (hidrólise neutra) e peróxido de hidrogênio a 3% v/v, no caso da lamivudina, e 30% v/v, no caso da zidovudina (para oxidação). Neste último caso, a diferença de concentração entre as soluções de peróxido se deu pela sensibilidade de cada molécula ao estímulo do estresse oxidativo (em testes preliminares, a lamivudina se mostrou muito mais suscetível à oxidação do que a zidovudina).

As amostras submetidas ao estresse hidrolítico foram acondicionadas em estufa sob temperatura de 70° C enquanto as que foram submetidas a estresse oxidativo foram mantidas sob temperatura ambiente, abrigadas da luz. Todas foram analisadas periodicamente (1, 2, 4 e 8 horas, posteriormente em intervalos de 24 horas) e o teste foi finalizado após 5 dias ou quando a amostra perdeu de 5 a 20% da sua concentração inicial. Ao final do teste, as amostras submetidas à hidrólise ácida e hidrólise alcalina foram neutralizadas com hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M, respectivamente.

Amostras de ambos os fármacos também foram submetidas a estresse térmico e luminoso. Para o primeiro caso, aproximadamente 15 mg de cada fármaco foram acondicionados em um tubo hermeticamente fechado e levados à estufa, onde permaneceram 15 dias a 70°C. Após este período, foram solubilizados e analisados. No segundo caso, a mesma massa de cada fármaco foi acondicionada em placa de Petri e ambas foram expostas à radiação luminosa de 3600000 lux.hora e radiação UV de no mínimo 600 watts.hora/m². Em seguida, também foram diluídas e analisadas.

Posteriormente o teste foi novamente executado, porém desta vez utilizando cada fármaco misturado ao placebo da formulação para investigar a possibilidade de interação química entre qualquer dos ativos com os excipientes.

4.11.2 Linearidade

As linearidades da lamivudina e da zidovudina foram avaliadas no intervalo entre 80–120% da concentração teórica do teste (que compreende a faixa entre 120 e 180 µg/mL para lamivudina e 240 e 360 µg/mL para a zidovudina) enquanto que, para a timina, o intervalo foi do limite inferior de quantificação inferior até 120% da especificação limite determinada pela 35ª edição da Farmacopeia Americana (USP, 2011), sendo a faixa de 0,045 a 5,4 µg/mL.

Para tanto, para balões volumétricos de 10 mL distintos, foram transferidos 15,01 mg de lamivudina e 30,51 mg de zidovudina (matéria-prima em ambos os casos). Água purificada foi utilizada para solubilizar ambos os fármacos, assim como para avolumar os balões. Em seguida utilizando uma pipeta automática foram feitas diluições de acordo com a tabela 4 para a obtenção das concentrações determinadas.

Tabela 4 – Preparo das soluções de lamivudina e zidovudina para avaliação da linearidade.

Nível	Alíquota (µL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração (µg/mL)	
			Lamivudina	Zidovudina
80%	800	10	120	244
90%	900	10	135	275
100%	1000	10	150	305
110%	1100	10	165	336
120%	1200	10	180	366

Para a timina, a massa de SQR de 4,53 mg foi transferida para balão volumétrico de 100 mL. Água purificada foi utilizada para solubilizar a SQR e avolumar o balão. As diluições e respectivas concentrações obtidas são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Preparo das soluções de timina para avaliação da linearidade.

Nível	Alíquota (µL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração de timina (µg/mL)
1%	100	100	0,045
5%	500	100	0,227
10%	100	10	0,453
25%	250	10	1,133
50%	500	10	2,265
70%	700	10	3,171
100%	1000	10	4,530
110%	1100	10	4,983
120%	1200	10	5,436

As soluções foram preparadas em triplicata, filtradas em membrana de PVDF com poros de 0,22 µm e injetadas nas condições cromatográficas descritas na tabela 3.

4.11.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação para a timina foi determinado através das injeções de consecutivas diluições da mesma solução estoque utilizada no teste de linearidade, até que foi alcançada a menor precisão e exatidão aceitável (DPR menor que 5%). Tais diluições foram utilizadas na curva de calibração para avaliação da linearidade de resposta da timina e a relação sinal-ruído foi avaliada no ponto de menor concentração da curva.

4.11.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição das matérias-primas lamivudina e zidovudina ao placebo, resultando em concentrações equivalentes a 80, 100 e 120%. No caso da timina, por se tratar de uma impureza e, por consequência, apresentar uma concentração muito reduzida no teste, foram preparadas 3 soluções com concentrações distintas, que foram usadas para fortificar

o placebo e assim foram obtidas as concentrações equivalentes ao limite de quantificação inferior, 100 e 120% da especificação limite para a substância.

As soluções para cada concentração foram preparadas em triplicata.

4.11.5 Precisão

A precisão foi avaliada através da análise de seis amostras da associação de lamivudina e zidovudina (150 mg e 300 mg respectivamente) fabricadas pelo Laborvida, realizadas por dois analistas diferentes em dias diferentes, para a avaliação da repetitividade e da precisão intermediária. Ambos os analistas também analisaram amostras do medicamento de referência, para verificar se o método se mostrava adequado para a análise de outros produtos com a mesma associação. A precisão da timina foi determinada juntamente com o teste de exatidão por se tratar de uma impureza.

Foram feitas seis injeções consecutivas da solução padrão do teste de repetitividade para avaliação da precisão do sistema, visto que as mesmas apresentam aproximadamente 100% da concentração teórica do teste.

4.11.6 Robustez

A robustez foi avaliada através da influência das mudanças deliberadas nas condições cromatográficas, nos parâmetros de adequação do sistema (descritos na seção 4.10). Foram avaliadas a robustez do método frente à modificação de pH no tampão da fase móvel, visto que pequenas variações neste parâmetros podem ser provocadas por erros do analista e à variação na temperatura da coluna, pois o condicionador térmico do equipamento pode sofrer pequenas variações no ajuste da temperatura.

Para realização desta análise foi preparada uma solução contendo aproximadamente 7,5 µg/mL do diastereoisômero de lamivudina, 142,5 µg/mL de

lamivudina e 300 µg/mL de zidovudina. A solução foi injetada em triplicata nas condições supracitadas.

5 RESULTADOS/DISCUSSÃO

5.1 Histórico do desenvolvimento da metodologia

Além das edições vigentes em 2012 das Farmacopeias Brasileira, Americana e Internacional, alguns artigos científicos foram consultados como referência para o desenvolvimento de uma metodologia que apresentasse seletividade e especificidade suficientes para uma metodologia indicativa de estabilidade para a associação de lamivudina e zidovudina (BECK *et al.*, 2007; BEDSE; KUMAR; SINGH 2008; DUNGE; CHAKRABORTI; SINGH, 2004; DUNGE *et al.*, 2004; FERNANDES; CAMPOS; PIANETTI, 2003; LOWEN, 2003). Porém, dentre os documentos e manuais consultados, as Farmacopeias Americana (USP, 2011) e Internacional (IP, 2011) foram os únicos a apresentar metodologias para o produto que determinam impurezas e doseamento dos fármacos simultaneamente, podendo desta forma, ser utilizadas em testes de estabilidade. Ocorreu que tais métodos demonstraram algumas inconveniências, como longo tempo de análise e o grande gasto de solventes, o que contribui para onerar a análise e conseqüentemente o produto.

A tabela 6 apresenta as principais características dos métodos apresentados em cada artigo ou monografia. O uso de qualquer das metodologias adequadas faria com que uma análise de doseamento levasse um pouco mais de 14 horas devido à sequência analítica padronizada pela empresa e a adequação de sistema proposta pela farmacopeia americana (USP, 2011), além do gasto de solventes poder passar de 800 mL por lote analisado e, assim, uma nova alternativa mostrou-se necessária.

Tabela 6 – Principais condições cromatográficas apresentadas nos artigos e monografias consultados.

Autores	Beck <i>et al.</i> (2007)	Bedse, Kumar e Singh (2008)	Dunge, Chakraborti e Singh (2004)	Dunge <i>et al.</i> (2004).	Fernandes, Campos e Pianetti (2003)	Lowen (2003)	Farmacopeia Brasileira (2011)	Farmacopeia Internacional (2011)	Farmacopeia Americana (2011)
Determina	Lamivudina e zidovudina	Lamivudina e produtos de degradação	Zidovudina, estavudina e produtos de degradação	Zidovudina e produtos de degradação	Lamivudina	Lamivudina e impureza BCH -189	Lamivudina e zidovudina	Lamivudina, zidovudina e produtos de degradação	Lamivudina, zidovudina e produtos de degradação
Coluna	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C18, 125 x 4,0 mm, 5 µm	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	C18, 250 x 3,0 mm, 5 µm
Detector	UV / 270 nm	UV / 277 nm	UV / 265 nm	UV / 265 nm	UV / 270 nm	UV / 270 nm	UV / 270 nm	UV / 270 nm	UV / 270 nm
FM (A:B:C)	Tampão acetato pH 6,5 / Metanol	Tampão acetato pH 3,8 / Metanol	Água purificada / Metanol	Tampão acetato pH 4,5 / Metanol	Tampão acetato pH 3,8 / Metanol	Tampão acetato pH 5,0 / Metanol	Acetato de amônio / Metanol / Ácido acético glacial	Tampão acetato pH 3,8 / Metanol	Tampão acetato pH 4,0 / Metanol / Acetonitrila
Eluição	Isocrática (50:50)	Gradiente	Isocrática (77:23)	Isocrática (77:23)	Isocrática (95:5)	Isocrática (85:15)	Isocrática (63:35:0,1)	Gradiente	Gradiente

Verificando as metodologias apresentadas nos textos dos autores e monografias supracitados, podem ser feitas as observações abaixo:

- Fase móvel: exceto pelo trabalho de Dunge, Chakraborti e Singh, em todos os casos, é composta por metanol e tampão acetato. A Farmacopeia Americana (USP, 2011, p. 3633) incluiu acetonitrila na composição da fase móvel, porém pelo que pode ser observado pela forma como a mesma participa do gradiente, sua finalidade seria purgar da coluna qualquer impureza que insistisse em permanecer, visto que o distúrbio por ela gerado na linha de base impediria a quantificação de qualquer substância de forma satisfatória.
- Coluna com fase estacionária composta de C18, normalmente longas.
- Comprimento de onda: 270 nm foi eleito em seis dos nove trabalhos ou documentos. Nos outros casos, a diferença foi menor que 10 nm.

A troca da coluna cromatográfica tradicional com partículas de 5 µm por uma coluna que oferece a mesma eficiência na separação, porém de uma forma mais rápida, foi a primeira estratégia adotada, sendo escolhida uma C18 de 150 x 2,1 mm, com partículas de 2,6 µm de núcleo fundido (Phenomenex, EUA). As condições cromatográficas da Farmacopeia Americana (tabela 6) foram testadas e otimizadas

utilizando esta coluna e foi obtida uma resolução de 2,1 na separação da lamivudina e seu diastereoisômero, teoricamente o par de difícil separação nos métodos farmacopeicos supracitados. Os parâmetros inicialmente modificados foram:

- Aumento do fluxo de 0,5 para 1,5 mL/minuto, pois além de diminuir o tempo de eluição das substâncias de interesse, neste tipo de coluna tal condição tende a melhorar a eficiência da separação.
- Modificação do tipo de gradiente, que inicialmente era linear e foi modificado para o tipo *stepwise*, por se mostrar uma opção mais rápida e muitas vezes tão eficiente quanto o modelo linear (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), porém sem modificações nas proporções tampão/metanol propostas pelos documentos oficiais.
- Foi excluída do gradiente a etapa com acetonitrila, visto que a mesma não apresentava finalidade de quantificação, causava grande distúrbio na linha de base do cromatograma e dificultava o reequilíbrio da coluna à condição inicial do gradiente.

O primeiro problema detectado durante a adaptação do método à nova coluna foi a impossibilidade de elevar satisfatoriamente o fluxo de fase móvel devido à incapacidade do sistema de suportar a pressão resultante, decorrente do reduzido tamanho de partícula da coluna e da considerável viscosidade da mistura tampão aquoso/metanol na etapa com maior concentração do solvente orgânico. Outra questão que também pode ser observada foi que as bandas apresentavam alargamento maior que o esperado para esse tipo de coluna, provavelmente provocado pelo volume extra-coluna consideravelmente elevado em equipamentos tradicionais não modificados (SANTOS NETO, 2011).

Com a aquisição de um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, este passou a ser o foco para o desenvolvimento de um método rápido. Assim, seis diferentes colunas foram testadas (tabela 7), todas com empacotamento C18, sendo duas com diâmetro médio de 2,6 μm e quatro com diâmetro médio de 1,7 μm .

Tabela 7 – Colunas utilizadas no desenvolvimento do método analítico.

Fase estacionária/ tamanho de partícula/ tipo de partícula	Fabricante	Modelo
C18 / 1,7 µm / porosa	Waters	BEH 50 mm x 2,1 mm
C18 / 1,7 µm / porosa	Waters	BEH HSS 50 mm x 2,1 mm
C18 / 1,7 µm / porosa	Waters	BEH 30 mm x 2,1 mm
C18 / 1,7 µm / núcleo fundido	Phenomenex	Kinetex 50 mm x 2,1 mm
C18 / 2,6 µm / núcleo fundido	Phenomenex	Kinetex 100 mm x 4,6 mm
C18 / 2,6 µm / núcleo fundido	Phenomenex	Kinetex 150 mm x 4,6 mm

O principal parâmetro avaliado no início do desenvolvimento foi a resolução entre o par lamivudina e seu diastereoisômero, pelo fato de ser o principal parâmetro de adequação do sistema na metodologia da Farmacopeia Americana e por se tratar do par de separação mais difícil.

Após diversos testes constatou-se que, para uma separação ótima desse par e de outras impurezas conhecidas de lamivudina e zidovudina, foram necessárias alterações em outros parâmetros além da coluna cromatográfica, tais como a necessidade de resfriamento da coluna para uma temperatura de 20°C e a diminuição da faixa de pH do tampão que compõe a fase móvel de 3,8 - 4,0 para 3,3.

Das colunas testadas, a que apresentou melhor desempenho na separação do par crítico foi a Kinetex de 150 x 4,6 mm com partículas de 2,6 µm que, apesar de suportar menor pressão do sistema (que no caso deste aparelho é bem maior, devido à grande redução no diâmetro das tubulações para conseqüente redução do volume extra-coluna), apresentou um bom desempenho na separação do par crítico, alcançando resolução de 3,78 contra 2,18 do melhor desempenho alcançado com coluna de partícula com diâmetro de 1,7 µm.

O tempo de análise foi o mesmo para todas as colunas testadas, mas o consumo de fase móvel foi até seis vezes menor com as colunas de partículas de 1,7 µm. Isso se dá devido ao fato de que colunas com essas partículas alcançam grandes separações com dimensões reduzidas, conseqüentemente com volumes reduzidos. Tal evento poderia ter sido determinante para a escolha de tal coluna, visto que mesmo com o preço um pouco mais elevado, tal diferença poderia ser

compensada pela economia no consumo de solventes e ajudaria também a diminuir sua emissão, o que é ecologicamente favorável. Porém, foi notado que a resolução do par crítico foi diminuindo significativamente ao longo dos testes realizados após poucas injeções, evento que não foi notado com as outras colunas de maior tamanho de partícula e desta forma, a coluna de escolha de acordo com os bons resultados obtidos foi a Kinetex C18 de 150 x 4,6 mm com partículas de 2,6 µm.

5.2 Validação da metodologia

5.2.1 Seletividade

O primeiro teste de seletividade foi realizado ainda na fase de desenvolvimento do método, no qual foi preparada uma solução contendo substâncias relacionadas conhecidas listadas pela Farmacopeia Americana (USP, 2011) de lamivudina e zidovudina (citosina, uracila, diastereoisômero e ácido salicílico, relativos à lamivudina; timina e timidina, relativos à zidovudina) e os próprios fármacos. O cromatograma obtido é exibido na figura 11. A menor resolução foi de 3,78, obtida da separação da lamivudina e seu diastereoisômero.

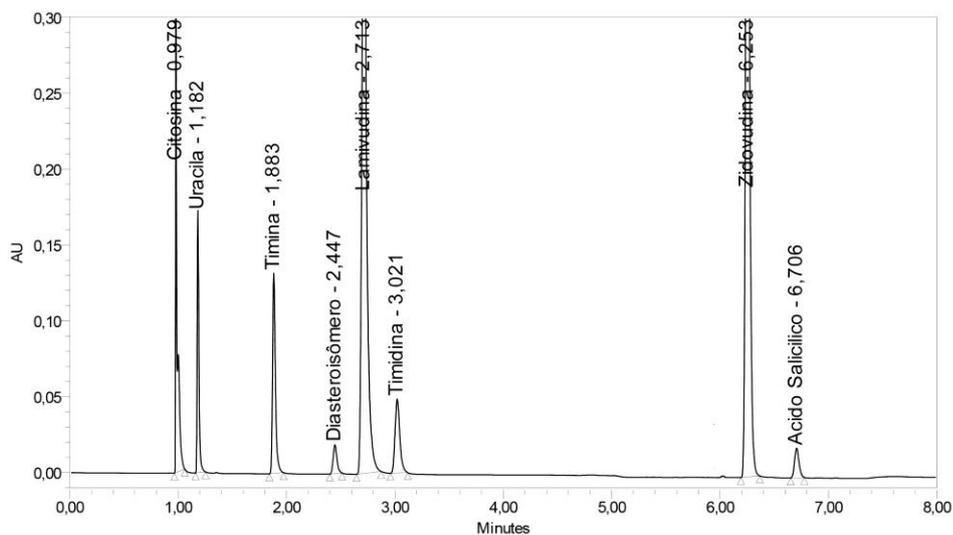


Figura 11 – Cromatograma demonstrando a seletividade do método para lamivudina, zidovudina e suas impurezas conhecidas.

Em seguida, amostras dos fármacos foram submetidas a estresse físico-químico em testes de degradação forçada. As amostras foram estressadas inicialmente na ausência do placebo e posteriormente na presença do mesmo. Não foi observada qualquer diferença nos cromatogramas quando comparados, nem o surgimento de picos cromatográficos diferentes dos que originalmente surgiram, permitindo concluir que não há interação físico-química de placebo e fármaco que possa gerar produtos de degradação.

Os cromatogramas com os resultados do teste são apresentados nas figuras abaixo.

A lamivudina apresentou um perfil de degradação semelhante ao descrito por Bedse, Kumar e Singh (2008), mostrando suscetibilidade à hidrólise e oxidação e resistência à pirólise e fotólise. Os cromatogramas com os resultados do teste são apresentados nas figuras 12 a 17.

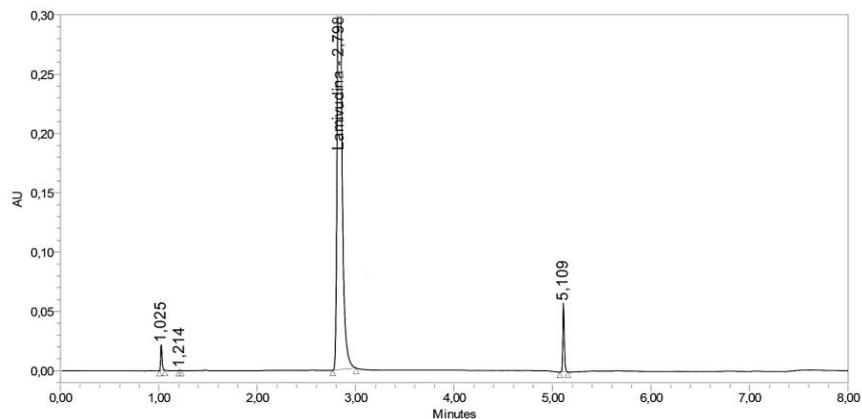


Figura 12 – Cromatograma da amostra de lamivudina submetida a estresse hidrolítico ácido (matéria-prima solubilizada em HCl 0,1 M, mantida em estufa a 70°C por 1 dia).

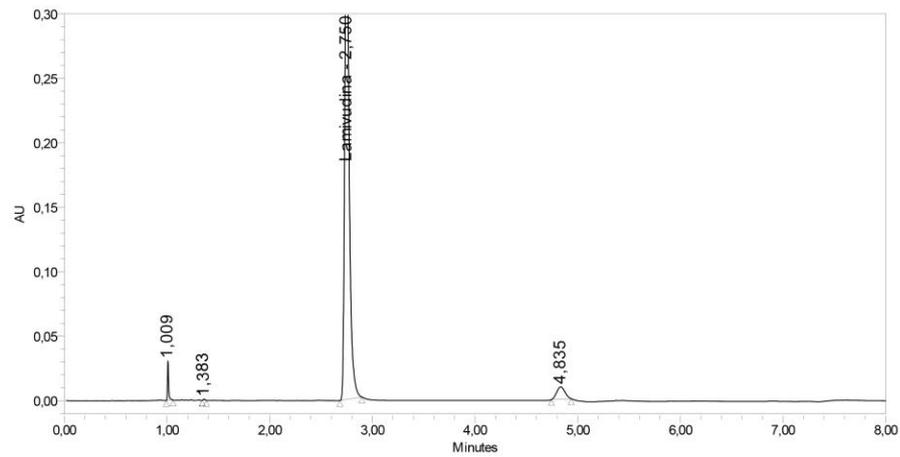


Figura 13 – Cromatograma da amostra de lamivudina submetida a estresse hidrolítico alcalino (matéria-prima solubilizada em NaOH 0,1 M, mantida em estufa a 70° C por 4 horas).

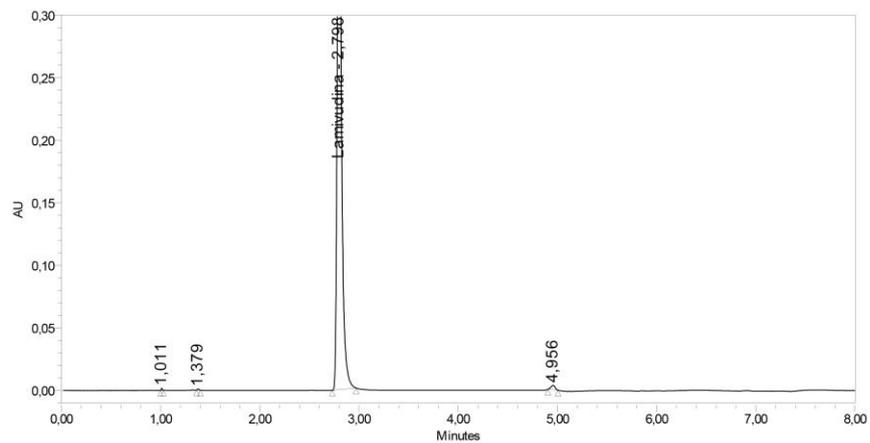


Figura 14 – Cromatograma da amostra de lamivudina submetida a estresse hidrolítico neutro (solubilizada em água purificada mantida em estufa a 70° C por 7 dias).

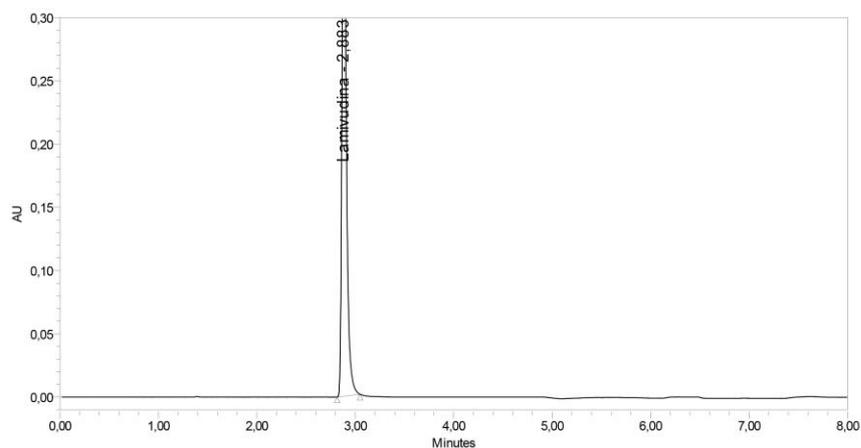


Figura 15 – Cromatograma da amostra de lamivudina submetida a estresse térmico (matéria-prima mantida em estufa a 70° C por 15 dias).

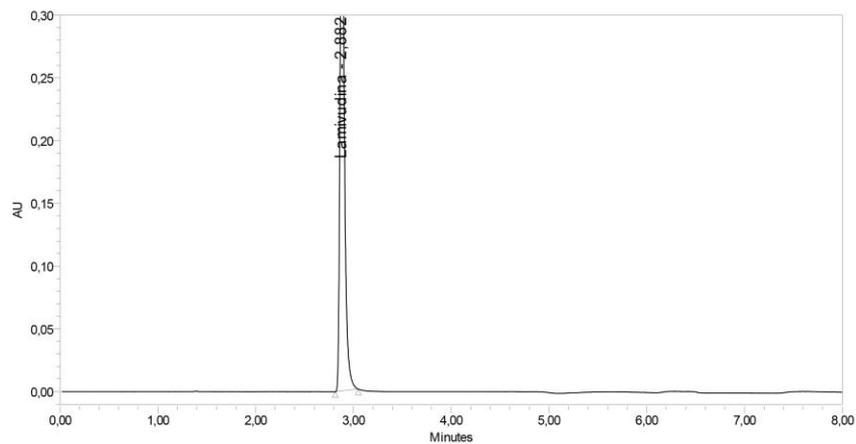


Figura 16 – Cromatograma da amostra de lamivudina submetida a estresse fotolítico (mantida em câmara de fotoestabilidade a temperatura ambiente por 15 dias).

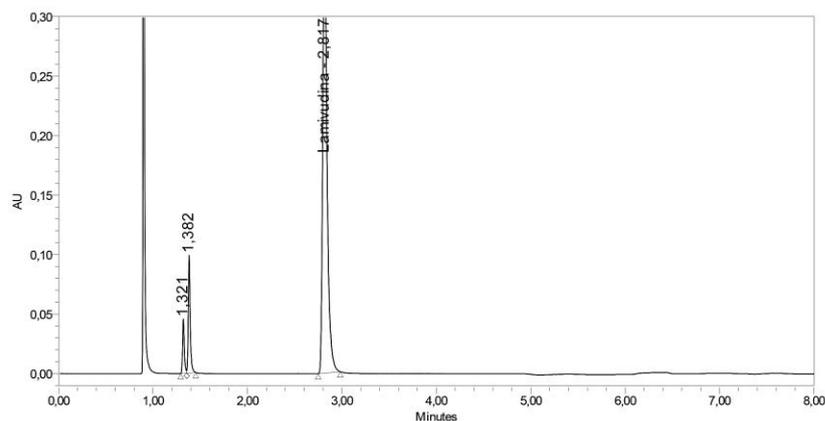


Figura 17 – Cromatograma da amostra de lamivudina submetida a estresse oxidativo (matéria-prima solubilizada em peróxido de hidrogênio a 3%, mantida a temperatura ambiente, abrigada da luz por 15 minutos).

A zidovudina apresentou sensibilidade às condições hidrolíticas, porém em intensidade significativamente inferior a lamivudina, sendo a hidrólise ácida a condição mais agressiva para o fármaco. A substância se mostrou resistente ao calor e oxidação, porém, contrariando trabalho publicado por Dunge *et al.* (2005), não demonstrou sensibilidade à exposição à luz. Ocorre que no referido trabalho, o pesquisador e seus colaboradores expuseram soluções de zidovudina solubilizadas em meio ácido, alcalino e água (expondo a substância a mais de uma condição estressante com conhecido poder de degradação sobre a mesma), enquanto que

neste teste, apenas o fármaco seco foi exposto. As figuras 18 a 22 demonstram os cromatogramas com os resultados do teste para zidovudina.

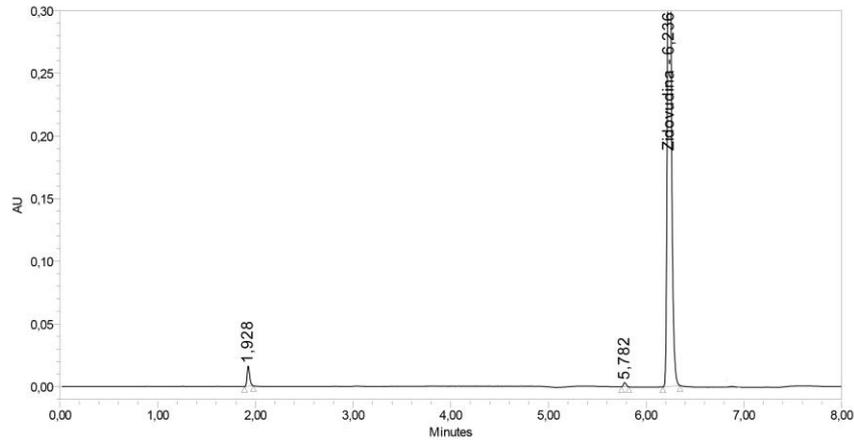


Figura 18 – Cromatograma da amostra de zidovudina submetida a estresse hidrolítico ácido (matéria-prima solubilizada em HCl 0,1 M, mantida em estufa a 70°C por 7 dias).

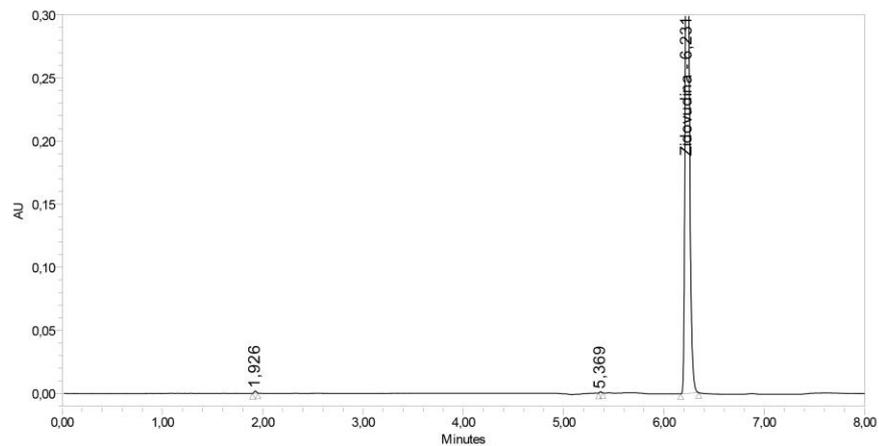


Figura 19 – Cromatograma da amostra de zidovudina submetida a estresse hidrolítico alcalino (matéria-prima solubilizada em NaOH 0,1 M, mantida em estufa a 70° C por 7 dias).

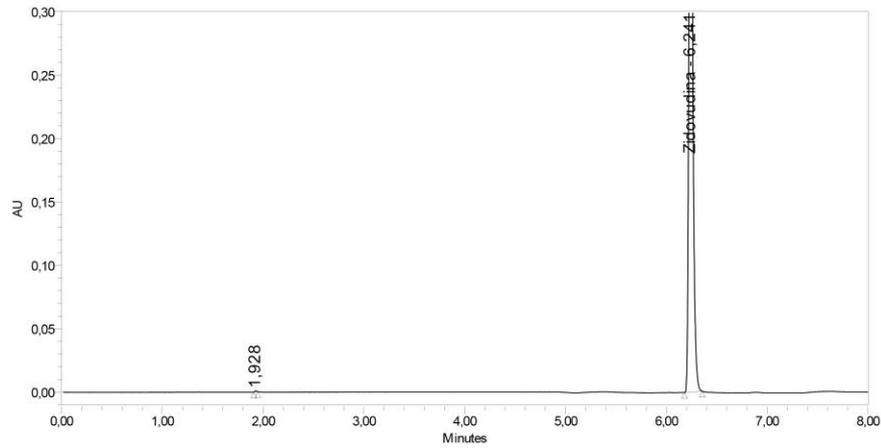


Figura 20 – Cromatograma da amostra de zidovudina submetida a estresse hidrolítico neutro (solubilizada em água purificada mantida em estufa a 70° C por 7 dias).

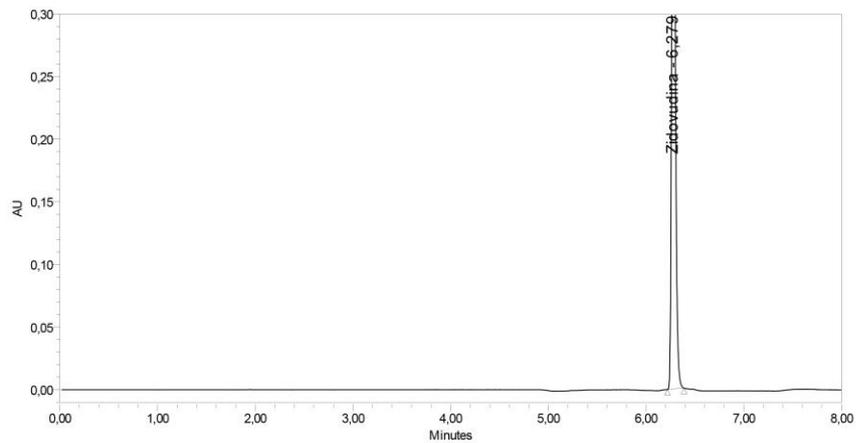


Figura 21 – Cromatograma da amostra de zidovudina submetida a estresse térmico (matéria-prima mantida em estufa a 70° C por 15 dias).

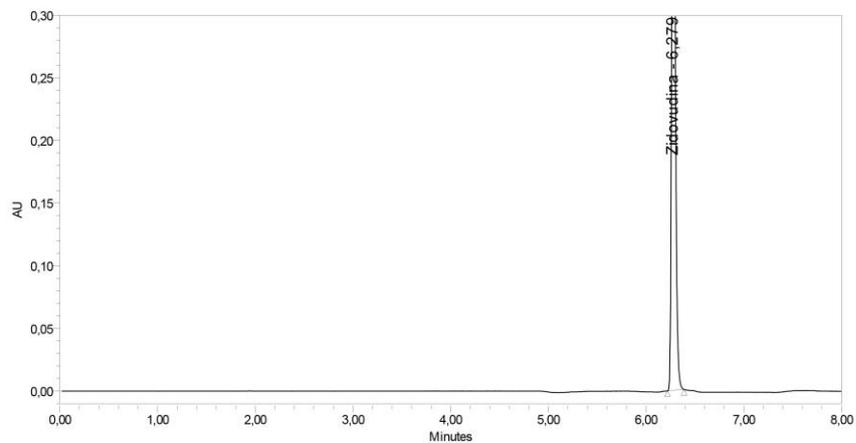


Figura 22 – Cromatograma da amostra de zidovudina submetida a estresse fotolítico (mantida em câmara de fotoestabilidade a temperatura ambiente por 15 dias).

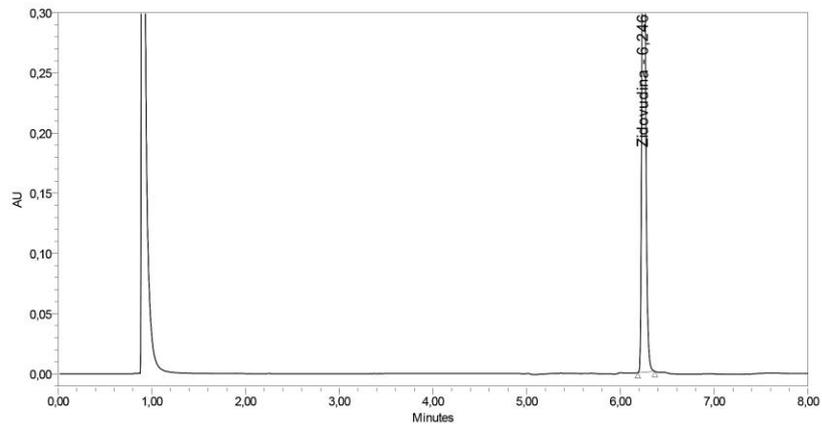


Figura 23 – Cromatograma da amostra de zidovudina submetida a estresse oxidativo (matéria-prima solubilizada em peróxido de hidrogênio a 3%, mantida a temperatura ambiente, abrigada da luz por 7 dias).

O percentual de degradação e o tempo necessário para a ocorrência do fenômeno tanto para lamivudina quanto para zidovudina encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Percentual de degradação x tempo para lamivudina e zidovudina.

Condição	Degradação total (%) x Tempo	
	Lamivudina	Zidovudina
Hidrólise Ácida	6,10% / 1 dia	2,68% / 7 dias
Hidrólise Alcalina	6,33% / 4 horas	0,30% / 7 dias
Hidrólise Neutra	1,00% / 7 dias	0,07% / 7 dias
Oxidação	14,17% / 15 minutos	0,00% / 7 dias
Termólise	0,00% / 15 dias	0,00% / 15 dias
Fotólise	0,00% / 15 dias	0,00% / 15 dias

Os resultados acima apresentados demonstram que a lamivudina apresenta grande sensibilidade à hidrólise ácida, alcalina e oxidação enquanto que a zidovudina demonstrou um perfil mais estável.

O cálculo do fator de cauda foi efetuado para confirmar que nenhuma solução utilizada na degradação forçada causou qualquer dano à coluna. Os valores são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Fator de cauda para lamivudina e zidovudina após testes de degradação forçada.

Condição	Lamivudina	Zidovudina
Hidrólise Ácida	1,41	1,20
Hidrólise Alcalina	1,43	1,22
Hidrólise Neutra	1,40	1,20
Oxidação	1,40	1,21
Termólise	1,45	1,21
Fotólise	1,46	1,20

Todos os picos presentes nos cromatogramas dos testes de degradação (tanto da lamivudina, quanto da zidovudina) foram aprovados no teste de pureza.

5.2.1.1 Produtos de degradação

O teste de degradação forçada resultou em possíveis produtos de degradação que devem ser monitorados durante os testes de controle de qualidade e estabilidade. Os tempos de retenção relativos foram calculados com base no tempo de retenção do fármaco de origem, ou seja, os produtos de degradação relativos à lamivudina foram calculados com base em seu tempo de retenção, assim como as impurezas da zidovudina. Os tempos de retenção relativos citados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Possíveis produtos de degradação de lamivudina e zidovudina e seus tempos de retenção relativos, com base nos testes de degradação forçada.

Lamivudina	Zidovudina
IDL1 – 0,37	Timina – 0,31
IDL2 – 0,42	IDZ1 – 0,86
IDL3 – 0,43	IDZ2 – 0,93
IDL4 – 0,44	IDZ3 – 1,10
IDL5 – 0,49	
IDL6 – 1,80	

5.2.2 Linearidade

Para o método proposto, foi avaliada a linearidade de resposta dos fármacos lamivudina e zidovudina por serem os analitos de principal interesse e da timina, por ser a única impureza oriunda da degradação dos ativos que apresenta substância química de referência certificada por uma farmacopeia.

Com base nos resultados obtidos, foi traçada uma linha de regressão relacionando a concentração das substâncias (eixo y) com a resposta do detector (eixo x), objetivando a avaliação visual da referida relação.

Além do exame visual do gráfico, a RE 899 (BRASIL, 2003) delibera que também sejam determinados os coeficientes angular, linear e de correlação, a interseção com o eixo y, a soma residual dos mínimos quadrados e o desvio padrão relativo para confirmar a relação linear. Porém, outras referências (ERMER; MILLER, 2005; MILLER; MILLER, 2012) citam a necessidade de realizar outros testes para tal confirmação, pois de acordo com os mesmos, apenas os parâmetros supracitados não são capazes de garantir por si só uma verdadeira relação linear.

Com base no argumento destes autores, também foram calculados os seguintes parâmetros:

- Teste de Cochran, para verificar a homocedasticidade do método, isto é, se a resposta do equipamento independe da variância da concentração da amostra dentro do intervalo investigado (LOWEN, 2003).
- Teste F para inclinação, que foi realizado com base no teste ANOVA entre a média dos quadrados devida à regressão (que representa a diferença entre y esperado e o valor médio de y calculado) e a soma dos quadrados dos resíduos. A hipótese nula é de que não existe relação linear entre x e y e a hipótese alternativa é de que há relação linear (LEVINE *et al.*, 2005).
- Intervalo de confiança da inclinação, objetivando confirmar que todos os valores possíveis para a inclinação da reta estão acima de zero (LEVINE *et al.*, 2005).

5.2.2.1 Lamivudina

A avaliação da linearidade de resposta para o teor de lamivudina foi realizada através dos resultados apresentados na tabela 11.

O valor encontrado no teste de Cochran foi $C = 0,342$, que é menor que o valor crítico tabelado ($C = 0,684$), comprovando assim a homocedasticidade da linearidade para lamivudina.

A equação da reta encontrada é $y = -24233x + 9321$ e o coeficiente de correlação $r = 0,99999$, o que atende a determinação da RE 899 (BRASIL, 2003) onde $r \geq 0,99$ e confirma a relação linear entre concentração de lamivudina e a resposta do detector. O coeficiente de determinação r^2 colabora para validar o argumento da relação linear, demonstrando que 99,998% da variação em y são determinados por uma variação de igual proporção em x (LEVINE *et al.*, 2005). A figura 24 expõe graficamente a relação linear da concentração de lamivudina e a resposta do detector.

Tabela 11 – Resultados do teste de linearidade do teor de lamivudina.

Concentração		Áreas	Média	Variância	DPR %
%	µg/mL				
80	120	1096116	1095123	745389	0,079
	120	1094703			
	120	1094550			
90	135	1233019	1233456	181424	0,035
	135	1233870			
	135	1233478			
100	150	1372223	1372814	278897	0,038
	150	1372981			
	150	1373239			
110	165	1514605	1514316	498096	0,047
	165	1513512			
	165	1514832			
120	180	1652963	1653756	475596	0,042
	180	1654218			
	180	1654086			
Estatística de regressão					
Coeficiente angular		9321			
Coeficiente linear		-24233			
R		0,99999			
r^2		0,99998			
Erro padrão		980			

O valor encontrado no teste de Cochran foi $C = 0,342$ que é menor que o valor crítico tabelado ($C = 0,684$), comprovando assim a homocedasticidade da linearidade para lamivudina.

Os resíduos foram calculados (tabela 12) e representados graficamente (figura 25) para confirmar a normalidade de sua dispersão e confirmar a ausência de tendência, corroborando que o modelo de linear não ponderado é o mais adequado.

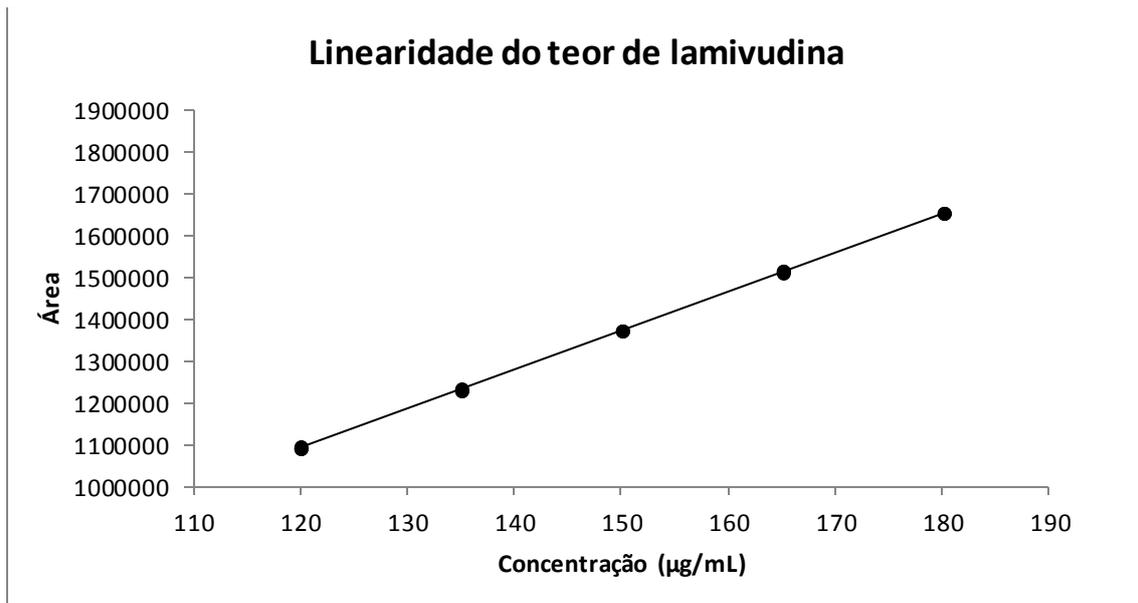


Figura 24 – Curva de calibração – Lamivudina.

Tabela 12 – Resíduos do teste de linearidade de teor da lamivudina.

Observação	y previsto	Resíduos
1	1094268	1848
2	1094268	435
3	1094268	282
4	1234080	-1061
5	1234080	-210
6	1234080	-602
7	1373893	-1670
8	1373893	-912
9	1373893	-654
10	1513706	899
11	1513706	-194
12	1513706	1126
13	1653518	-555
14	1653518	700
15	1653518	568

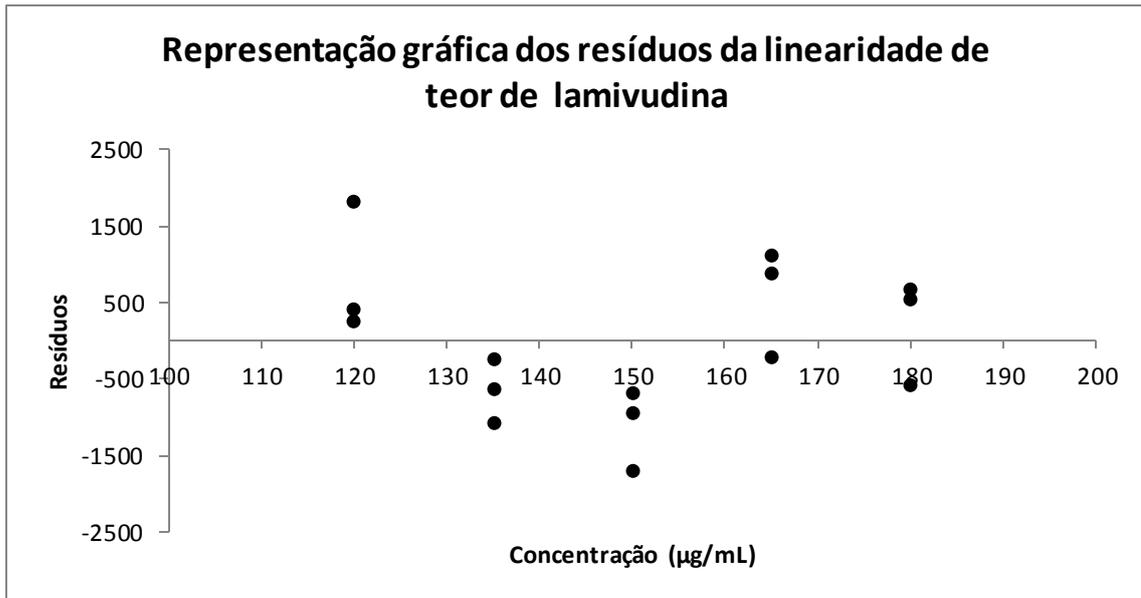


Figura 25 – Representação gráfica dos resíduos do teste de linearidade de teor de lamivudina.

O teste de ANOVA foi realizado com o fim de confirmar a relação linear e seu resultado é apresentado na tabela 13. Como pode ser observado, valor de F é superior a F crítico (4,667), assim como o valor-p é muito inferior a 0,05 e, assim, conclui-se que deve ser mantida a hipótese alternativa (a inclinação é diferente de zero) e descartada a hipótese nula (a inclinação é igual a zero).

Tabela 13 – ANOVA para linearidade de lamivudina.

	gl	SQ	MQ	F	Valor-p
Regressão	1	5,8643E+11	5,86427E+11	609762	9,41151E-32
Resíduo	13	12502505	961731		
Total	14	5,8644E+11			

Na tabela 10 são apresentados os resultados do intervalo de confiança para a interseção e inclinação com o grau de significância (α) de 0,05%. Os valores máximo e mínimo contribuem para evidenciar a relação linear, visto que dentro deste intervalo, o valor de zero não é contemplado.

Tabela 14 – Intervalos de confiança para interseção e inclinação.

	Coefficientes	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-24233	-28140	-20326
Inclinação	9320	9295	9347

Na figura 26, pode-se observar o ajuste de linha, que relaciona os valores obtidos e os valores calculados para a resposta do método frente a cada concentração dentro do intervalo linear.

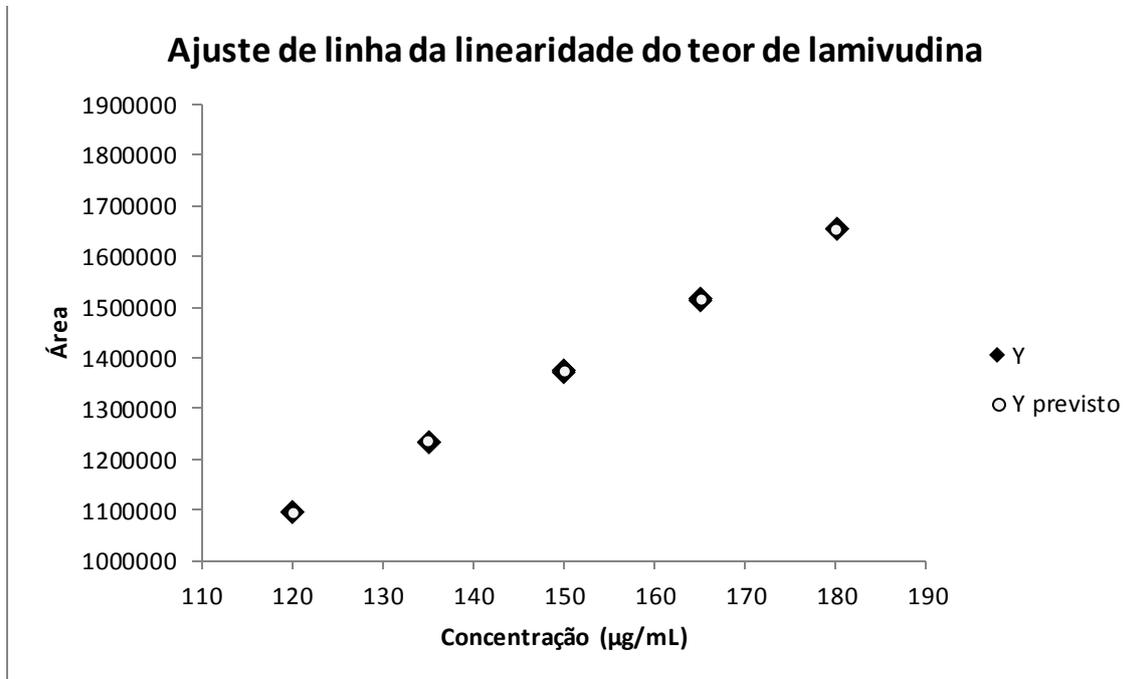


Figura 26 – Ajuste de linha para relação entre y previsto e y calculado para linearidade de lamivudina.

5.2.2.2 Zidovudina

A avaliação da linearidade de resposta para o teor de zidovudina foi realizada através dos resultados apresentados na tabela 15.

Assim como para lamivudina, o valor encontrado no teste de Cochran foi inferior ao valor crítico, sendo o primeiro $C = 0,342$ e o último $C = 0,684$. Desta forma, o método foi considerado homocedástico também para zidovudina.

A equação da reta determinada foi $y = 14007x + 10579$, $r = 0,99999$, atendendo aos critérios legais assim como no caso da lamivudina.

A figura 27 expõe graficamente a relação linear da concentração de zidovudina e a resposta do detector.

Tabela 15 – Resultados do teste de linearidade do teor de zidovudina.

Concentração		Áreas	Média	Variância	RSD %
%	µg/mL				
80	244	2597427	2596236	2774129	0,06
	244	2596949			
	244	2594333			
90	274,5	2916502	2915912	694039	0,03
	274,5	2914959			
	274,5	2916275			
100	305	3241299	3241165	51883	0,01
	305	3241294			
	305	3240902			
110	335,5	3564579	3564907	524746	0,02
	335,5	3564404			
	335,5	3565737			
120	366	3881735	3885064	8605952	0,08
	366	3886184			
	366	3887272			

Estatística de regressão

Coeficiente angular	10579
Coeficiente linear	14007
r	0,99999
r ²	0,99998
Erro padrão	1993

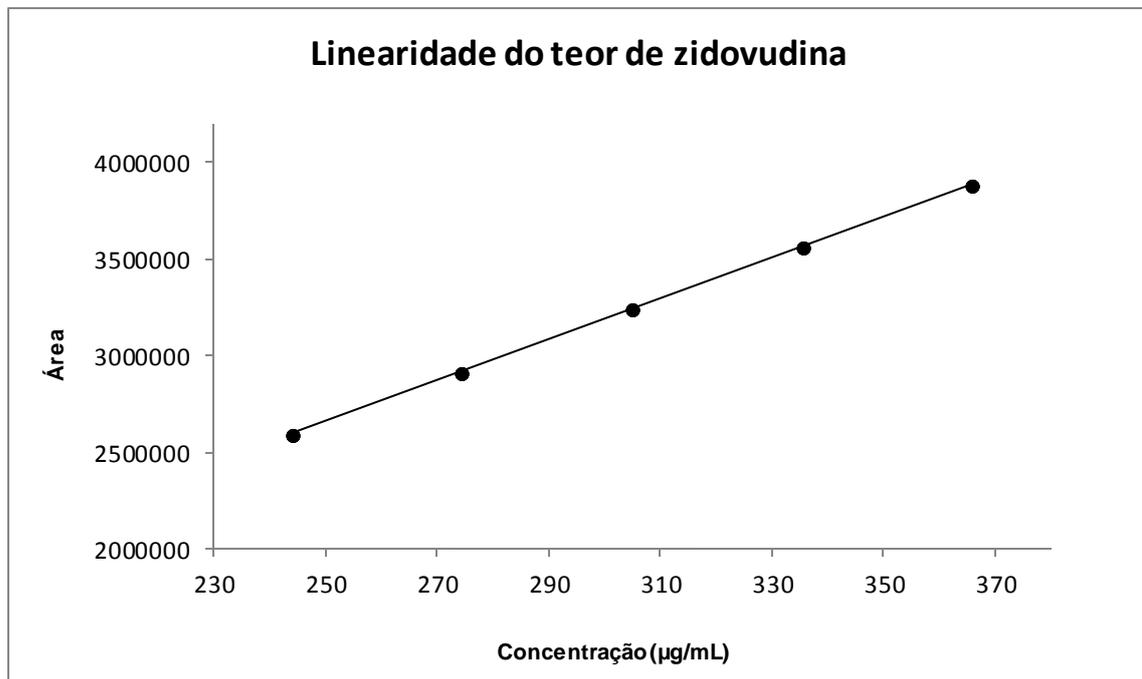


Figura 27 – Curva de calibração – Zidovudina.

O cálculo dos resíduos, presente na tabela 16 e sua representação gráfica (figura 25), demonstram a ausência de tendência, porém levantou dúvidas quanto à possibilidade da presença de um ponto aberrante no nível de maior concentração da curva. Para resolver o problema, foi aplicado o teste de Grubs para um nível de

significância de 0,05% (MILLER; MILLER, 2010). O valor encontrado foi $G = -1,135$ enquanto que o valor crítico para $n = 3$ é $G = 1,115$. Como o valor calculado é inferior ao valor crítico, o ponto em questão não é considerado aberrante.

Tabela 16 – Resíduos do teste de linearidade de teor da zidovudina.

Observação	Y previsto	Resíduos
1	2595327	2100
2	2595327	1622
3	2595327	-994
4	2917992	-1490
5	2917992	-3033
6	2917992	-1717
7	3240657	642
8	3240657	637
9	3240657	245
10	3563322	1257
11	3563322	1082
12	3563322	2415
13	3885987	-4252
14	3885987	197
15	3885987	1285

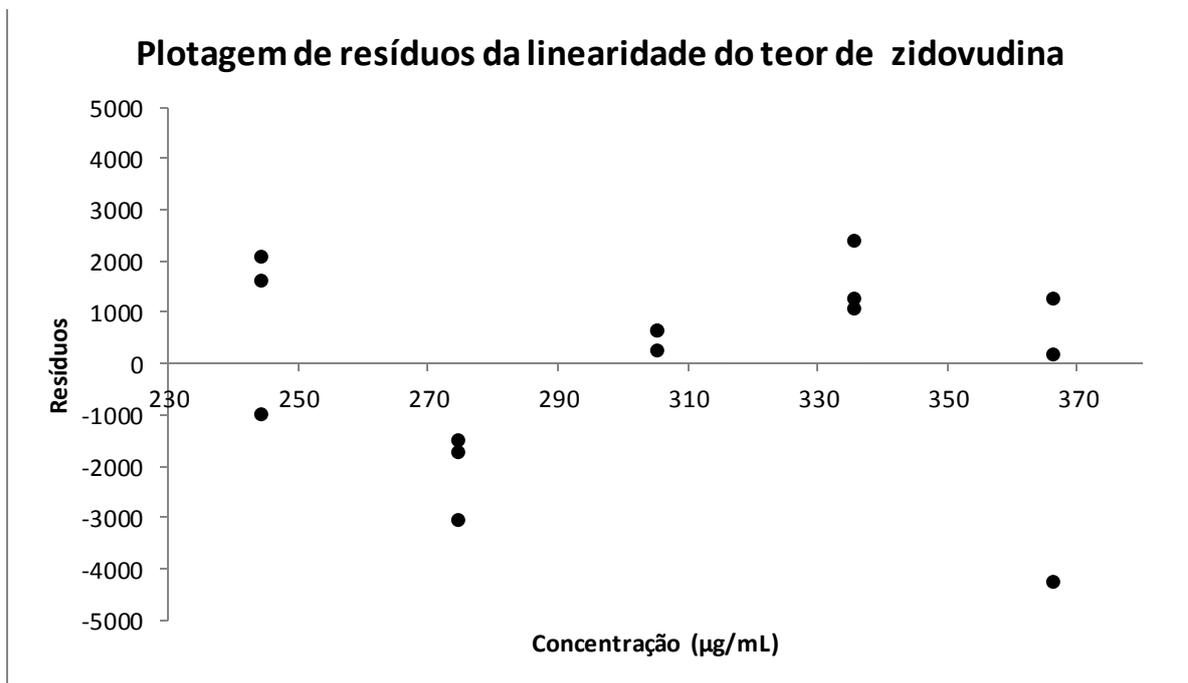


Figura 28 – Representação gráfica dos resíduos do teste de linearidade de teor de zidovudina.

O teste de ANOVA foi realizado com sucesso pra confirmar a relação linear. O valor encontrado para F (apresentado na tabela 17) é superior ao valor crítico, assim como o valor- p é inferior a 0,05. Novamente, conclui-se que a inclinação é diferente de zero.

Tabela 17 – ANOVA para linearidade de zidovudina.

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	3,12338E+12	3,12338E+12	786491	1,79971E-32
Resíduo	13	51626691	3971284		
Total	14	3,12343E+12			

Também como na determinação da linearidade da lamivudina, o intervalo de confiança da inclinação da reta na curva de calibração de zidovudina não inclui zero.

Tabela 18 – Intervalos de confiança para interseção e inclinação.

	Coefficientes	Inferior 95 %	Superior 95%
Interseção	14007	6069	21946
Inclinação	10579	10553	10605

O ajuste de linha para a relação linear encontra-se na figura 29.

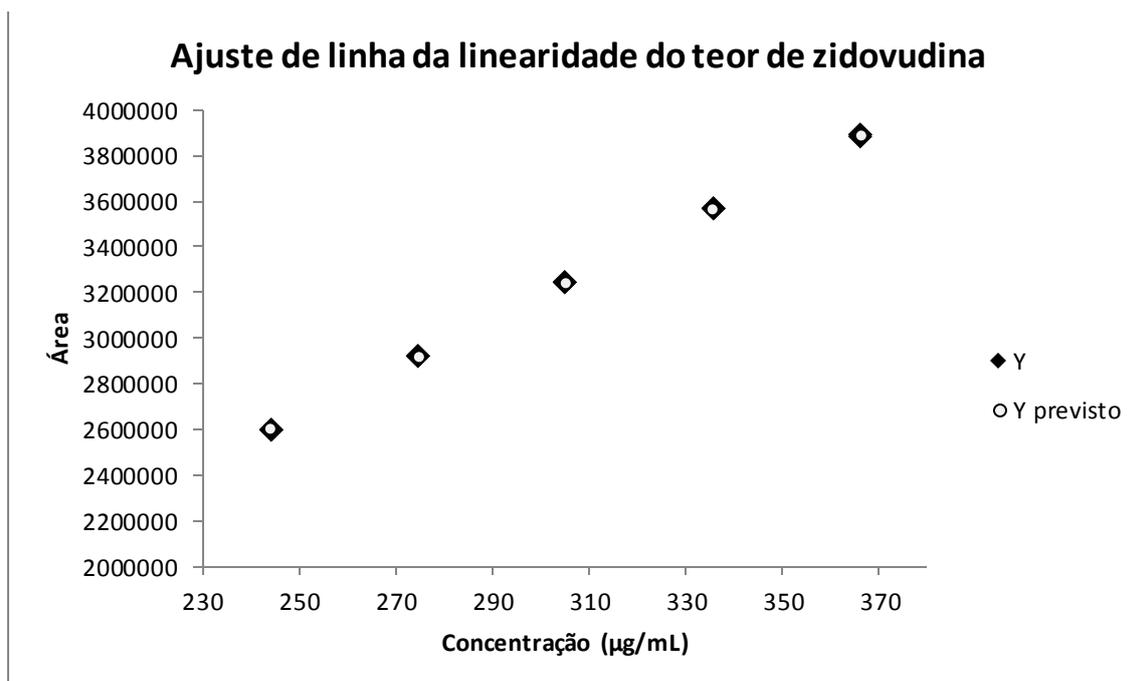


Figura 29 – Ajuste de linha para relação entre y previsto e y calculado para linearidade de zidovudina.

5.2.2.3. Timina

Por se tratar de uma impureza, a linearidade da timina contemplou um intervalo maior, indo do limite de quantificação inferior até 120% da especificação

limite para o teor da impureza no comprimido. Os resultados são apresentados na tabela 19.

Mais uma vez, o teste de Cochran foi aplicado e demonstrou a homocedasticidade do método. O valor calculado foi $C = 0,334$, enquanto que para este caso o valor crítico é $C = 0,478$.

A equação da reta encontrada foi $y = -217x + 10449$ e o coeficiente de correlação foi $r = 0,999$.

Tabela 19 – Resultados do teste de linearidade do teor de timina.

Concentração		Áreas	Média	Variância	RSD %
%	µg/mL				
1	0,0453	377	380	21	1,217
	0,0453	385			
	0,0453	377			
5	0,2265	2275	2280	3157	1,701
	0,2265	2227			
	0,2265	2339			
10	0,4530	4851	4841	252	0,328
	0,4530	4823			
	0,4530	4850			
20	0,9060	9089	9181	12464	1,216
	0,9060	9148			
	0,9060	9305			
50	2,2650	24226	24140	12946	0,472
	2,2650	24001			
	2,2650	24084			
70	3,1710	33618	33703	7312	0,254
	3,1710	33701			
	3,1710	33789			
100	4,5300	48656	48665	965	0,064
	4,5300	48700			
	4,5300	48640			
110	4,9830	53393	53265	19364	0,261
	4,9830	53117			
	4,9830	53286			
120	5,4360	58232	58272	1561	0,068
	5,4360	58311			
	5,4360	58273			
Estatística de regressão					
Coeficiente angular		10749			
Coeficiente linear		-226			
r		0,999			
r ²		0,999			
Erro padrão		194			

O cálculo e a demonstração gráfica dos resíduos (presentes na tabela 16 e figura 31 respectivamente), como nas seções anteriores, indicam ausência de tendência.

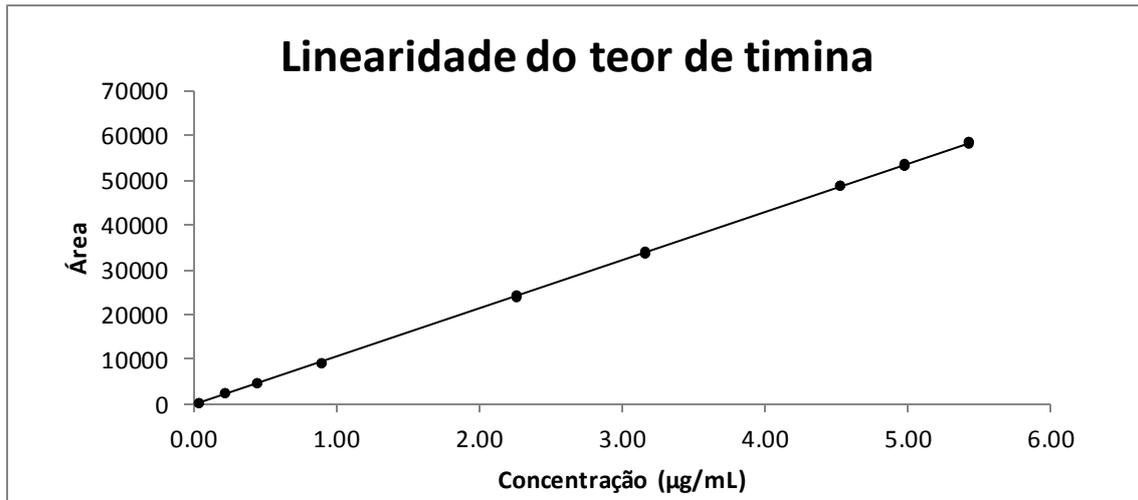


Figura 30 – Curva de calibração – Timina

Tabela 20 – Resíduos do teste de linearidade de teor da timina.

Observação	Y previsto	Resíduos
1	261	116
2	261	124
3	261	116
4	2209	66
5	2209	18
6	2209	130
7	4643	208
8	4643	180
9	4643	207
10	9513	-424
11	9513	-365
12	9513	-208
13	24121	105
14	24121	-342
15	24121	-37
16	33860	-242
17	33860	-159
18	33860	-71
19	48468	188
20	48468	232
21	48468	172
22	53337	56
23	53337	-220
24	53337	-51
25	58207	25
26	58207	104
27	58207	66

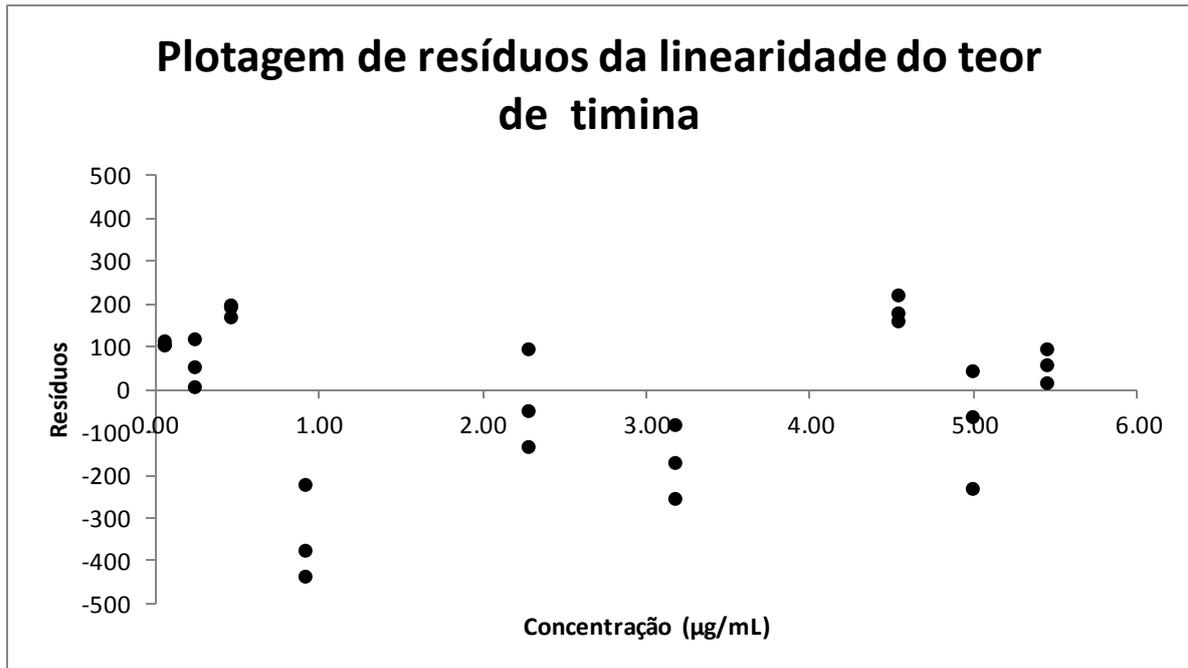


Figura 31 – Representação gráfica dos resíduos do teste de linearidade de teor de timina.

Também como no caso da linearidade da lamivudina e da zidovudina, o teste de ANOVA foi realizado e o intervalo de confiança foi calculado. Ambos os resultados foram considerados satisfatórios (tabelas 21 e 22) e, assim, a relação linear entre concentração e resposta pode ser confirmada também para a timina.

Tabela 21 – ANOVA para linearidade de timina.

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,2933E+10	12933365371	342176	3,1215E-53
Resíduo	25	944933	33625		
Total	26	1,2933E+10			

Tabela 22 – Intervalos de confiança para interseção e inclinação.

	Coefficientes	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-226	-347	-106
Inclinação	10749	10711	10787

Na figura 32 é apresentado o ajuste de linha para relação linear concentração resposta para timina.

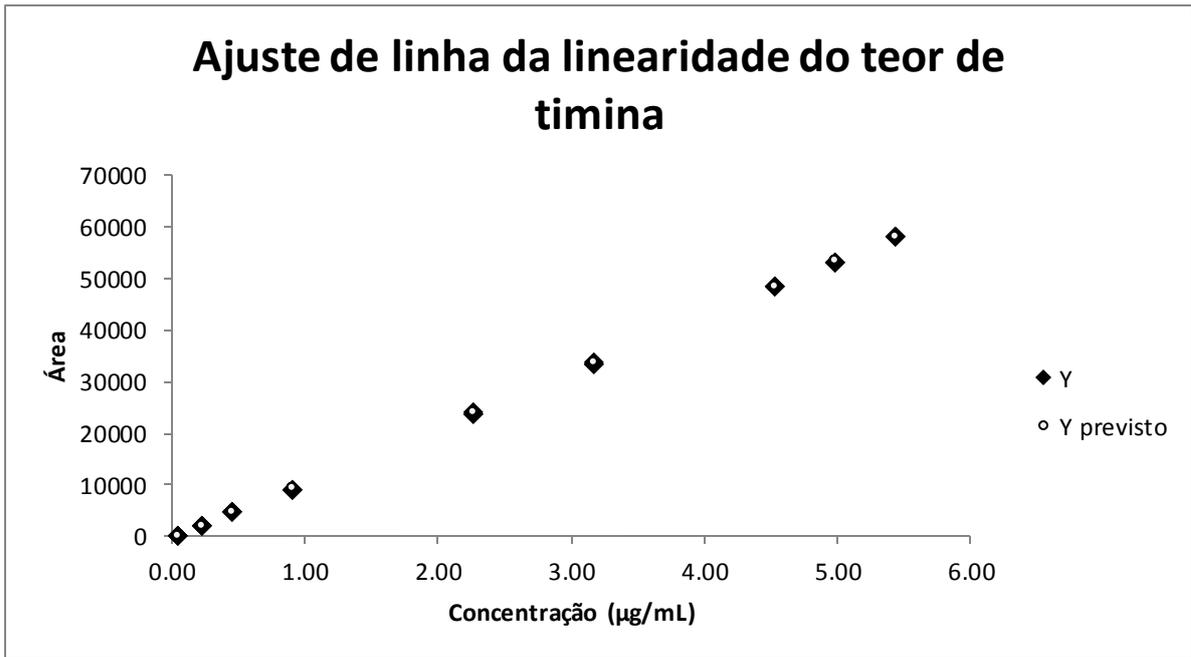


Figura 32 – Ajuste de linha para relação entre y previsto e y calculado para linearidade de timina.

5.2.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação para timina foi determinado juntamente com a linearidade de resposta. A menor concentração com precisão e exatidão aceitável foi 45,3 ng/mL e sua relação sinal-ruído foi de 15,2:1.

5.2.4. Exatidão

A exatidão do método foi verificada através da adição ao placebo puro de quantidades conhecidas de matéria-prima de lamivudina, zidovudina e da solução preparada com padrão certificado pela farmacopeia americana de timina.

No caso da lamivudina e zidovudina, foi investigado o intervalo de 80 a 120% da concentração esperada para cada fármaco. Para a timina, os pontos investigados foram o limite inferior de quantificação, o valor referente à especificação máxima permitida para o medicamento e 120% da mesma. Sua exatidão foi calculada a partir do resultado do teste de repetitividade.

Tabela 23 – Recuperações do teste de exatidão.

	Percentual recuperado		
	Lamivudina	Zidovudina	Timina
80% / Limite de quantificação	99,16	99,20	99,1
	100,18	99,56	100,4
	99,26	99,80	99,7
100%	101,60	99,54	100,8
	100,56	99,01	100,6
	100,11	99,92	101,3
120%	99,50	100,19	101,3
	100,90	99,39	100,3
	101,13	99,66	101,3
Média	100,27	99,59	100,5
DPR (%)	0,85	0,36	0,8
Intervalo de confiança (95%)	99,71 - 100,83	99,35 - 99,83	100,0 - 101,0

O resultado da exatidão em todos os casos foi considerado satisfatório, pois de acordo com a RE 899 (BRASIL, 2003), a mesma deve se encontrar entre 98 e 102%. Em todos os casos, o DPR não ultrapassou o valor de 1%.

O teste de ANOVA foi realizado para verificar se há influência da concentração na extração dos fármacos e da impureza. O objetivo foi verificar a homogeneidade das médias das recuperações para cada substância. Os resultados estão nas tabelas 24, 25 e 26.

Tabela 24 – Análise de variâncias para lamivudina.

Lamivudina	Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
	80%	3	298,61	99,54	0,32
	100%	3	302,27	100,76	0,58
	120%	3	301,53	100,51	0,78
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Entre grupos	2,50	2	1,25	2,23	5,14
Dentro dos grupos	3,36	6	0,56		
Total	5,86	8			

Tabela 25 – Análise de variâncias para zidovudina.

Zidovudina	Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
	80%	3	298,57	99,52	0,09
	100%	3	298,47	99,49	0,21
	120%	3	299,24	99,75	0,17
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,12	2	0,06	0,38	5,14
Dentro dos grupos	0,93	6	0,16		
Total	1,05	8			

Tabela 26 – Análise de variâncias para timina.

Timina	Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
	80%	3	299,06	99,69	0,42
	100%	3	302,63	100,88	0,12
	120%	3	302,81	100,94	0,33
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Entre grupos	2,97	2	1,49	5,12	5,14
Dentro dos grupos	1,74	6	0,29		
Total	4,71	8			

Como pode ser observado, o valor de F calculado foi inferior ao valor de F crítico em todos os casos, o que confirma a hipótese nula de que não há diferença significativa entre as médias estudadas (MILLER; MILLER; 2010).

5.2.5. Precisão

Antes de avaliar a precisão do método e a precisão intermediária, é recomendável que seja feita a verificação da precisão do sistema (ERMER; MILLER, 2005). Com este propósito, a solução padrão do teste de repetitividade foi injetada seis vezes consecutivas para avaliar o desvio padrão relativo das áreas da lamivudina e da zidovudina. Os resultados foram considerados satisfatórios e são apresentados na tabela 27.

Tabela 27 – Resultados do teste de precisão do sistema.

	Áreas	
	Lamivudina	Zidovudina
	1411294	3108356
	1414399	3107312
	1412724	3101662
	1411517	3101920
	1411554	3100915
	1410155	3100645
Média	1411941	3103468
RSD(%)	0,10	0,11

Conforme recomenda o ICH (2005), a avaliação da precisão do método (repetitividade) e a precisão intermediária foram realizadas utilizando o medicamento genérico desenvolvido pelo Laborvida assim como o medicamento de referência

Biovir da GlaxoSmithKline (Inglaterra), em ensaios separados. A ideia foi comprovar que o método funciona não somente para a análise do produto do Laborvida, podendo também ser aplicado à rotina analítica de outras empresas que produzam produto com esta associação de fármacos.

A precisão da timina foi avaliada através da adição de padrão por se tratar de uma impureza. Nove amostras de placebo foram fortificadas com três concentrações distintas dentro do intervalo linear do teste, conforme determina a resolução vigente (BRASIL, 2003). Três amostras foram fortificadas resultando em concentração equivalente ao limite inferior de quantificação, três foram fortificadas para obtenção de concentração equivalente ao máximo valor permitido para esta impureza na especificação do produto e três com concentração equivalente a 120% da especificação limite.

Como pode ser observado (tabela 28), os resultados em todos os testes foi considerado satisfatório, pois o DPR foi inferior a 1% e a especificação legal para testes desta natureza é de 5% (BRASIL, 2003).

Em cada teste, inicialmente as variâncias e posteriormente as médias obtidas pelos analistas 1 e 2 foram comparadas através do teste f e do teste t respectivamente. A hipótese nula é de que não há diferença estatística entre as variâncias e médias obtidas nos resultados de cada fármaco nos produtos testados por cada analista, em seus respectivos testes (MILLER; MILLER, 2010).

As tabelas 23, 24 e 25, mostram que o valor-p é superior ao valor recomendado para $\alpha = 0,05$ em todos os pares, tanto para o teste f quanto o para teste t, mantendo em ambos os casos a hipótese nula (ERMER; MILLER, 2005; MILLER, MILLER 2010) e confirmando a precisão do método.

Tabela 28 – Repetitividade e precisão intermediária para produto fabricado pelo Laborvida.

	Lamivudina		Zidovudina	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Conteúdo (percentual relativo ao teor rotulado)				
	102,99	103,59	95,12	95,72
	102,96	103,67	94,96	95,58
	102,97	103,90	95,01	95,81
	101,99	102,69	95,25	94,90
	101,76	102,45	94,04	94,67
	101,89	102,55	94,25	94,85
Média	102,43	103,14	94,77	95,25
DPR(%)	0,59	0,63	0,53	0,53
Variância	0,36	0,42	0,25	0,25
Média geral	102,78		95,01	
DPR(%) geral	0,68		0,57	
Intervalo de confiança (95%)	102,49 - 103,16		94,72 - 95,30	
Teste F (comparação de variâncias)				
Valor-p bicaudal	0,88		1,00	
Teste T (comparação de médias)				
Valor-p bicaudal	0,08		0,13	

Tabela 29 – Repetitividade e precisão intermediária para produto fabricado pela GlaxoSmithKline.

	Lamivudina		Zidovudina	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Conteúdo (percentual relativo ao teor rotulado)				
	104,36	104,48	98,91	98,96
	104,40	104,50	98,94	98,93
	104,57	104,61	99,02	99,05
	104,53	104,60	98,03	99,03
	104,20	104,30	98,76	98,76
	104,17	104,27	98,77	98,76
Média	104,37	104,46	98,74	98,91
DPR(%)	0,16	0,14	0,37	0,13
Variância	0,03	0,02	0,13	0,02
Média geral	104,42		98,83	
DPR(%) geral	0,15		0,28	
Intervalo de confiança (95%)	104,34 - 104,50		98,68 - 98,98	
Teste F (comparação de variâncias)				
Valor-p bicaudal	0,82		0,50	
Teste T (comparação de médias)				
Valor-p bicaudal	0,08		0,13	

Tabela 30 – Repetitividade e precisão intermediária para timina.

	Timina	
	Analista 1	Analista 2
	Percentual recuperado	
	99,06	101,12
	100,35	99,99
	99,65	100,10
	100,81	100,00
	100,56	99,01
	101,80	100,23
	101,28	99,80
	100,27	101,65
	101,25	100,57
Média	100,56	100,27
DPR(%)	0,85	0,76
Variância	0,73	0,59
Média geral		100,42
DPR(%) geral		0,80
Intervalo de confiança (95%)		100,06 - 100,78
Teste F (comparação de variâncias)		
Valor-p bicaudal		0,77
Teste T (comparação de médias)		
Valor-p bicaudal		0,46

5.2.6 Robustez

O método mostrou robustez satisfatória às mudanças deliberadamente impostas. Conforme pode ser observado na tabela 31, os parâmetros de adequação do sistema continuaram a mostrar valores adequados após as alterações.

Tabela 31 – Resultados do teste de robustez.

Condições	Injeção	Resolução Diastereoisômero- Lamivudina	Fator de cauda	
			Lamivudina	Zidovudina
Normal	1 ^a	3,95	1,41	1,20
	2 ^a	3,89	1,43	1,20
	3 ^a	3,91	1,43	1,20
Temp. Coluna = 18°C	1 ^a	3,83	1,48	1,21
	2 ^a	3,73	1,47	1,22
	3 ^a	3,73	1,47	1,22
Temp. Coluna = 22°C	1 ^a	3,96	1,21	1,19
	2 ^a	3,93	1,24	1,20
	3 ^a	3,93	1,24	1,20
Tampão pH 3,5	1 ^a	3,55	1,20	1,22
	2 ^a	3,56	1,17	1,22
	3 ^a	3,55	1,21	1,22
Tampão pH 3,1	1 ^a	3,73	1,51	1,21
	2 ^a	3,74	1,52	1,21
	3 ^a	3,75	1,52	1,21

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das metodologias farmacopeicas mostrarem-se seguras e eficazes para análise de produtos acabados, nem sempre as mesmas mostram-se convenientes para as empresas que, por força de regulamentação, veem-se induzidas a utilizar métodos compendiais em suas rotinas.

A metodologia analítica desenvolvida demonstrou de forma satisfatória que cumpre com os requisitos exigidos pela legislação vigente para a validação de um método para análise de medicamentos, assim como evidenciou que pode ser utilizada em testes de rotina e estabilidade.

O preparo das amostras foi executado conforme o procedimento determinado pelo método da monografia oficial da Farmacopeia Americana, visto que o mesmo mostrou-se rápido e de fácil execução. Já a metodologia cromatográfica desenvolvida mostrou um grande ganho de velocidade na execução da análise. Durante o tempo de análise de uma amostra seguindo o método descrito na Farmacopeia Americana (60 minutos) é possível analisar sete amostras utilizando o método desenvolvido (8 minutos). Em um cenário competitivo, como o caso do mercado farmacêutico, onde a velocidade de liberação dos produtos é de grande importância, essa diferença deve ser levada em consideração.

Outra questão que deve ser considerada é o consumo dos solventes por ser um ponto que impacta diretamente no custo da análise. Para testar uma amostra da associação de lamivudina e zidovudina por CLUE o consumo é de aproximadamente 9,5 mL, que é pouco mais que 3 vezes menor que o gasto pelo método da Farmacopeia Americana e 6 vezes menor para o caso da Farmacopeia Internacional (que consomem aproximadamente por amostra 30 e 55 mL, respectivamente).

O baixo consumo de solventes e o menor tempo de análise também colaboram para tornar a análise ecologicamente mais favorável, pois assim o equipamento permanece ligado por um período mais curto, consumido menos energia e substâncias normalmente poluentes e tóxicas, como o metanol por exemplo.

O custo da coluna utilizada neste trabalho foi semelhante ao custo de outras colunas de dimensões e partículas tradicionais. O equipamento CLUE é mais caro,

porém o seu custo deve ser cautelosamente avaliado devido aos grandes benefícios acima citados, além da economia a médio ou longo prazo.

Desta forma, foi possível concluir que, apesar das farmacopeias apresentarem metodologias analíticas seguras e eficazes, deve-se avaliar a viabilidade de aprimoramentos nas mesmas ou o desenvolvimento de novas alternativas, visando maior economia, rapidez e conveniência para empresa e contribuindo assim para a redução do custo final do medicamento.

7 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, A. J.; WAEGHE, T. J.; HILMES, K. W.; TOMASELLA, F. P.; HOOKER, T. F.. Modifying conventional high-performance liquid chromatography systems to achieve fast separations with Fused-Core columns: A case study. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], p. 5456-5469. 17 jun. 2011. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 05 ago. 2012.

ALSANTE, K. M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, Steven W. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical Technology**, [s.l.], p.60-72, fev. 2003. Disponível em: <www.pharmtech.com>. Acesso em: 03 jan. 2011.

ANDERSON, Peter L.; ROWER, Joseph E. Zidovudine and Lamivudine for HIV infection. **Clinical Medicine Reviews in Therapeutics**. Estados Unidos da América, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2954111/>>. Acesso em 05 jan 2013.

AUBRY, Anne-Françoise; TATTERSALL, Peter; RUAN, Joan. Development of stability indicating methods. In: HUYNH-BA, Kim (Editor). **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. Nova Iorque: Springer, 2009. Cap. 7, p. 139-160.

BAERTSCHI, Steven W.; JANSEN, Patrick J.. Stress Testing: a predictive tool. In: SWARBRICK, James (Comp.). **Pharmaceutical Stress Testing**. [s.l.]: Taylor & Francis Group, 2005. Cap. 02, p. 13-49.

BAKSHI, Monika; SINGH, Saranjit. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biotechnology Analysis**, [s.l.], p. 1011-1040. 19 jan. 2002. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 02 jan. 2011.

BECK, Ruy Carlos Ruver; CARDOSO, Simone Gonçalves; ATHAYDE, Margareth Linde; CODEVILLA, Cristiane; DE OLIVEIRA, Fernanda Kreutz; DALMORA, Sérgio Luiz. Validação de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. **Química Nova**, [s.l.], v. 5, n. 30, p.1225-1228, 2007.

BEDSE, Gaurav; KUMAR, Vijay; SINGH, Saranjit. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC-MS/TOF and MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], p. 55-63. 15 out. 2008. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jan. 2011.

BONOLO, Palmira de Fátima; GOMES, Raquel Regina de Freitas Magalhães; GUIMARÃES, Mark Drew Crosland. Adesão à terapia anti-retroviral (HIV/AIDS): fatores associados e medidas de adesão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, p.261-278, 13 maio 2007. Trimestral.

BRASIL. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de fevereiro de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_9787_99.htm>. Acesso em: 29 de out. de 2011.

BRASIL. Resolução RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 de abril de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso em: 03 de jan. de 2013.

BRASIL. Resolução (RE) nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 03 de jan. de 2011.

BRODER, Samuel. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiretroviral Research**, [s.l.], p. 1-18. 10 out. 2009. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/antiviral>. Acesso em: 01 set. 2011.

CHEN, Shujun; KORD, Alireza. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], p. 6204-6209. 07 jul. 2009. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 06 jan. 2012.

DIANA, Frank J. Method Validation and Transfer. In: HUYNH-BA, Kim (Editor). **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. Nova Iorque: Springer, 2009. Cap. 7, p. 164 - 187.

DUNGE, A.; CHAKRABORTI, A. K.; SINGH, S. Mechanistic explanation to the variable degradation behavior of stavudine and zidovudine under hydrolytic, oxidative and photolytic conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], p. 965-970. 18 mai. 2004. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 25 jan. 2011.

DUNGE, Ashenafi; SHARDA, Nishi; SINGH, Baljinder; SINGH, Saranjit. Validated specific HPLC method for determination of zidovudine during stability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], p. 1109-1114. 14 set. 2004. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 25 jan. 2011.

ERMER, Joachim; MILLER, John Mcb. (Comp.). **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. Darmstadt: Wiley-vch, 2005. 403 p.

ERMER, Jochim. Linearity. In: ERMER, Joachim; MILLER, John Mcb. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. Darmstadt: Wiley-vch, 2005a. p. 80-98.

ERMER, Jochim. Precision. In: ERMER, Joachim; MILLER, John Mcb. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. Darmstadt: Wiley-vch, 2005b. p. 21-51.

EVERING, Teresa H.; MARKOWITZ, Martin. HIV-1 Integrase inhibitors. **The PRN Notebook**, Nova Iorque, v. 13 , p.1-9, 23 jun. 2008. Disponível em: <www.prn.org>. Acesso em: 10 out. 2011.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed, vol. 2, p. 1381-1382, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 15 ago. 2011.

FDA (FOOD and Drug Administration) Reviewer Guidance – Validation of Chromatographic Methods, nov. 1994. Disponível em: <[http://google2.fda.gov/search?q=validation+of+chromatographic+methods&client=FDAGov&site=FDAGov&lr=&proxystylesheet=FDAGov&output=xml_no_dtd&getfields="](http://google2.fda.gov/search?q=validation+of+chromatographic+methods&client=FDAGov&site=FDAGov&lr=&proxystylesheet=FDAGov&output=xml_no_dtd&getfields=)>. Acesso em: 15 ago. 2011.

FERNANDES, Christian; CAMPOS, Ligia Maria Moreira de; PIANETTI, Gérson Antônio. Validação de metodologia para doseamento e estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 4, n. 39, p.381-389, 2003.

FLEXNER, Charles. Antiretroviral agents and treatment of HIV infection. In: BURTON, Laurence L.; PARKER, Keith L.. **Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics**. 11. ed. [s.l.]: McGraw-Hill, 2008. Cap. 50, p. 837-852.

FOLEY, Willian; GILDEA, Beth; WHEAT, Thomas E. **The Missing Link Between HPLC and UPLC Technology**. Disponível em: <<http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/457-The-Missing-Link-Between-HPLC-and-UPLC-Technology/>>. Acesso em: 01 fev. 2012.

GRITTI, Fabrice; GUIOCHON, Georges. Ultra high pressure liquid chromatography. Column permeability and changes of eluent properties. **Journal of Chromatography A**. [s.l.] p. 165 – 179, 15 fev 2008. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 20 jan. 2012.

GRITTI, Fabrice; CAVAZZINI, Alberto; MARCHETTI, Nicola. Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], p. 289-303. 16 maio 2007. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 10 jan. 2013.

GRITTI, Fabrice; LEONARDIS, Irene; SHOCK, David; STEVENSON, Paul; SHALLIKER, Andrew; GUIOCHON, Georges. Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], p. 1589-1603. 07 jan. 2010. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 07 mar. 2012.

HARRIES, Anthony; MAHER, Dermont; GRAHAM, Stephen. **TB/HIV – A clinical manual**. 2 ed. Organização Mundial de Saúde, Genebra, 2004.

HOLMES, Harvey; BERRY, Neil; HEATH, Alan; MORRIS, Clare. Preparation and evaluation of the 1st international standard for the quantitation of HIV-2 RNA in plasma. **Journal of Virological Methods**, [s.l.], p. 246-252. 26 abr. 2011. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jviromet>. Acesso em: 22 ago. 2011.

ICH (INTERNATIONAL Conference on Harmonization) Harmonized Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2), 6 fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-asguidelines.html>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

ICH (INTERNATIONAL Conference on Harmonization) Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia (IP). 4 ed. 2011. Disponível em: <<http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>>. Acesso em: 09/06/2011.

JORGENSON, James W. Capillary Liquid Chromatography at Ultrahigh Pressures. **Annual Reviews of Analytical Chemistry**, [s.l.], n. 3, p.129-150, 2010. Anual. Disponível em: <www.annualreviews.org>. Acesso em: 23 nov. 2012.

KATS, Michael. **Forced Degradation Studies: Regulatory Considerations and Implementation.** 01 jul. 2005. Disponível em: <<http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=170505>>. Acesso em: 05 abr. 2011.

KIRKLAND, J. J.. Controlled Surface Porosity Supports for High Speed Gas and Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.218-220, jan. 1969.

KIRKLAND, J. J.; TRUSZKOWSKI, F. A.; DILKS JUNIOR, C. H.; ENGEL, G. S.. Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], p. 3-13. 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 07 mar. 2012

KLICK, Silke; MUJSELAAR, Pim G.; EICHINGER, Thomas; KORN, Christian; GERDING Thijs K.; DEBETS, Alexander J.; SANDER-VAN DER BELD, Cari; VAN DER BELD, Cas; SOMSEN, Govert W.; JONG Gerhardus J. De. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, [s.l.], p.48-66, fev. 2005. Disponível em: <www.pharmtech.com>. Acesso em: 02 jan. 2011.

KNYSZ, Brigida; SZETELA, Bartosz; GLADYSZ, Andrzej. Pathogenesis of HIV-1 infection. **AIDS and HIV Review**. v. 6, n 1, p. 7-11. Polônia, 2007.

LEVINE, David M.; STEPHAN, David; KREHBIEL, Timothy C.; BERENSON, Mark L. **Statistics for Managers Using MS Excel**. 3. ed. [s.l.]: Pearson, 2005. 819 p.

LOWEN, 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. 80 f. Dissertação (Mestrado) – INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

MAJORS, Ronald E.; **Fast and Ultrafast HPLC on sub-2 µm Porous Particles — Where Do We Go From Here?** 1 jun 2006. Disponível em: <www.chromatographyonline.com>. Acesso em: 1 jun. 2011.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida em fase reversa. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1559-1568, 29 jun. 2010.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.214-222, 5 dez. 2008.

MELVEGER, Alvin J. ; HUYNH-BA, Kim. Critical Regulatory Requirements for a Stability Program . In: HUYNH-BA, Kim (Editor). **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. Nova Iorque: Springer, 2009. Cap. 2, p. 10-19.

MILLER, James N.; MILLER, Jane C.. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. Essex: Pearson, 2010. 273 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **A História da AIDS**. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em: 10 de out. de 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), Biblioteca Virtual em Saúde. "Aids: Etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento", 2002. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/php/index.php>> Acesso em: 10 de out. de 2011.

NGWA, George. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. **Drug Delivery Technology**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.20-23, jun. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents**: Recommendations for a public health approach. Genebra, 2010.

PATEL, Riddhiben M.; PATEL, Piyushbhai M.; PATEL, Natubhai M.. Stability indicating HPLC method development - A review. **International Research Journal of Pharmacy**, [s.l.], p. 79-87. 30 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.irjonline.com>>. Acesso em: 10 set. 2011.

REQUEJO, Henry I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista de Saúde Pública**. v. 2, n 40, p. 331-345. São Paulo, 2006.

REYNOLDS, Dan W.; FACCHINE Kevin L.; MULLANEY, June F.; ALSANTE Karen M.; HATAJIK, Todd D.; MOTTO, Michael G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, [s.l.], p.48-56, fev. 2002. Disponível em: <www.pharmtech.com>. Acesso em: 03 jan. 2011.

SANTOS NETO, Álvaro José dos . Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.65-87, 2011.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W.. The Column. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. Nova Jersey: Wiley, 2010. p. 199-246.

SPÁČIL, Zdeněk; NOVÁKOVÁ, Lucie; SOLICH, Petr. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. **Talanta**. [s.l.] n. 76, p. 189 -199, 2008.

UNITED States Pharmacopeia (USP). 35 ed. Rockville, 2011.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERBERG F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**. v. 5, p. 271 – 289. Pergamon Press, 1956.

VESSMAN, Jorgen. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,[s.l.], p. 867-869. jan. 1996. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 23 nov. 2012.

WANG, Xiaoli; BARBER, Willian E.; CARR, Peter W.. A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research. **Journal of Chromatography A**,[s.l.], p. 139-151. 10 jan. 2006. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 12 dez. 2012.

WISHART D.S.; KNOX C.; GUO A.C.; CHENG D.; SHRIVASTAVA S.; TZUR D; GAUTAM B; HASSANALI M.; **Drugbank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets:** Lamivudine. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00709>>. Acesso em 04 jul. 2011a.

WISHART D.S.; KNOX C.; GUO A.C.; CHENG D.; SHRIVASTAVA S.; TZUR D; GAUTAM B; HASSANALI M.; **DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets:** Zidovudine. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>>. Acesso em 04 jul. 2011b.

WREN, Stephen A. C.; TCHELITCHEFF, Pierre. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], p. 140-146. 27 mar. 2006. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chroma>. Acesso em: 03 jan. 2012.