UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Validação de métodos para análise e estudos de
estabilidade de anti-retrovirais em preparações
farmacêuticas**

Andréia Montoro Taborianski

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Validação de métodos para análise e estudos de
estabilidade de anti-retrovirais em preparações
farmacêuticas**

Andréia Montoro Taborianski

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

T114v Taborianski, Andréia Montoro
Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade
de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas / Andréia
Montoro Taborianski. -- São Paulo, 2003.
143p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Fármaco : Controle de qualidade I. T. II. Santoro,
Maria Inês Rocha Miritello, orientador.

615.19015 CDD

Andréia Montoro Taborianski

Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de
anti-retrovirais em preparações farmacêuticas

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Orientadora/presidente

Prof^a. Dr^a. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann
1^o. examinador

Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado Marchetti Hernades
2^o. examinador

São Paulo, 11 de Agosto de 2003.

"Sua vida pode ser o que você quer que ela seja

Conte suas bênçãos, não seus problemas.

Você os superará, venha o que vier.

Dentro de você há muitas respostas.

Compreenda, tenha coragem, seja forte.

Não coloque limites em si mesmo.

Muitos sonhos estão esperando para serem realizados..."

Autor desconhecido

Dedico esta dissertação a meus pais,
que sempre confiaram em mim,
apoiaram meus sonhos e deram toda a base e
força para enfrentar os desafios da vida
e sair sempre vitoriosa!

AGRADECIMENTOS

À Professora Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, sinceros agradecimentos pela orientação, amizade e constante incentivo durante todas as etapas deste trabalho.

À Professora Doutora Érika R. M. Kedor-Hackmann, pelo convívio e sugestões no transcorrer do trabalho.

Ao Professor Doutor Anil K. Singh, pelo convívio e preciosas sugestões no transcorrer do trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge S. Martins, pelo convívio no transcorrer do trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, em especial a Andréia, Daniella, Elizângela, Regina, Fátima, Ixis, Nájla e Tatiana, pelo convívio e cooperação.

À Iria e Regina, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, pela compreensão, apoio e estímulo durante todos estes anos em São Paulo.

Ao Jorge e sua família, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os meus projetos e sonhos.

À Mariana, Melissa, Beth e Cecília pela amizade sincera, apoio e incentivo durante todos esses anos.

Ao Amilcar, pela paciência e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação Para o Remédio Popular - FURP, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A Bristol-Myers Squibb, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A Beth que me ajudou durante esses anos que estive no mestrado.

A bibliotecária Leila, pela correção das referências bibliográficas.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

E finalmente, a Deus, que me proporcionou e continuará proporcionando grandes vitórias.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1 – Diagrama esquemático do HIV.	10
Figura 2 - Vírus HIV em sua forma imatura e em sua forma madura.	11
Figura 3 - Ciclo celular do HIV.	12
Figura 4 - Mecanismos de ação dos anti-retrovirais.	14
Figura 5 - Estruturas químicas da zidovudina, estavudina, didanosina, zalcitabina, lamivudina e abacavir.	17
Figura 6 - Estruturas químicas da nevirapina, delavirdina, loviride e efavirenz.	18
Figura 7 - Estruturas químicas do saquinavir, indinavir, ritonavir e nelfinavir.	19/20
Figura 8 - Espectro no infravermelho da zidovudina, utilizando pastilhas de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .	78
Figura 9 - Espectro no infravermelho da estavudina, utilizando pastilhas de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .	79
Figura 10 - Espectro no infravermelho da timina, utilizando pastilhas de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .	80
Figura 11 - Espectros de absorção no UV, no intervalo de 200 a 400 nm: (A) zidovudina (15,0 $\mu\text{g/mL}$) em H_2O ; (B) estavudina (12,0 $\mu\text{g/mL}$) em H_2O .	81
Figura 12 - Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta a 266 nm da zidovudina em água, nas concentrações de 6,0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$.	82
Figura 13 - Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta a 266 nm da estavudina em água, nas concentrações de 8,0 a 22,0 $\mu\text{g/mL}$.	83

- Figura 14** - Curvas de calibração no comprimento de onda de 266 nm, utilizando; água como solvente de concentração de: (A) 6,0 a 30,0 µg de zidovudina/ mL, (B) 8,0 a 22,0 µg de estavudina/ mL. 84
- Figura 15** - Espectros da zidovudina padrão, amostra e placebo (cápsulas) no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando água como solvente. 85
- Figura 16** - Espectros da zidovudina padrão, amostra e placebo (solução oral) no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando água como solvente. 86
- Figura 17** - Espectros da estavudina padrão, amostra e placebo (cápsulas), no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando água como solvente. 87
- Figura 18** - Curvas de calibração de padrões de zidovudina e de timina, no comprimento de onda de 265 nm, fase móvel metanol: água (25:75 v/v) e vazão de 1,0 mL/min: (A) concentração de 70,0 a 150,0 µg de zidovudina/ mL e (B) concentração de 0,5 a 4,0 µg de timina/ mL. 88
- Figura 19** - Curvas de calibração de padrões de zidovudina e de timina, no comprimento de onda de 264 nm, fase móvel acetato de amônio: metanol (75:25 v/v), pH 5,0 e vazão de 1,0 mL/min: (A) concentração de 70,0 a 150,0 µg de zidovudina/ mL e (B) concentração de 1,0 a 4,0 µg de timina/ mL. 89
- Figura 20** - Curvas de calibração de padrões de estavudina e de timina, no comprimento de onda de 266 nm, fase móvel água: metanol (85:15 v/v), e vazão de 1,0 mL/min: (A) Concentração de 30,0 a 100,0 µg de estavudina/ mL e (B) Concentração de 0,8 a 2,0 µg de timina/ mL. 90
- Figura 21** - Cromatogramas obtidos por CLAE: A- Padrão de zidovudina e timina; B- Amostra de cápsulas; C- Placebo. (1) Timina; (2) Zidovudina. Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm (MERCK). Fase móvel: Metanol/ Água (25:75). Vazão: 1,0 mL/min. Detector UV ajustado a 265 nm. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura: 24°C ± 1°C. 94
- Figura 22** - Cromatogramas obtidos por CLAE: A- Padrão de zidovudina e timina; B- Amostra de solução oral; C- Placebo. (1) Timina. (2) Zidovudina. Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm (MERCK). Fase móvel: Acetato de amônio/Metanol (75:25) pH 5. Vazão: 1,0 mL/min. Detector UV ajustado a 264 nm. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura: 24°C ± 1°C. 95

- Figura 23** – Cromatogramas obtidos por CLAE: A- Padrão de estavudina e timina; B- Amostra de cápsulas; C- Amostra de cápsulas do medicamento de referência; D- Placebo. (1) Timina. (2) Estavudina. Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm (MERCK). Fase móvel: Água/Metanol (85:15). Vazão: 1,0 mL/min. Detector UV ajustado a 266 nm. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura: 24°C ± 1°C. 96
- Figura 24** - Perfil de decaimento cinético da zidovudina cápsulas submetida à degradação térmica a 50 °C e 90% UR, calculado a partir de valores obtidos na análise por CLAE. 109
- Figura 25** – Perfil de decaimento cinético da estavudina cápsulas (Fabricante A) submetida à degradação térmica a 50 °C e 90% UR, calculado a partir de valores obtidos na análise por CLAE. 110
- Figura 26** – Perfil de decaimento cinético da estavudina cápsulas (Fabricante B) submetida à degradação térmica a 50 °C e 90% UR, calculado a partir de valores obtidos na análise por CLAE. 111

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
Tabela 1 - Medicamentos anti-retrovirais disponíveis para o tratamento da AIDS.	15
Tabela 2 - Métodos analíticos para a determinação de zidovudina.	34
Tabela 3 - Métodos analíticos para a determinação de estavudina.	35
Tabela 4 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação.	62
Tabela 5 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação.	63
Tabela 6 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação.	64
Tabela 7 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação.	65
Tabela 8 - Pontos de fusão da zidovudina e estavudina.	70
Tabela 9 - Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da zidovudina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH ₃ OH:H ₂ O (25:75 v/v).	91
Tabela 10 - Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da timina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH ₃ OH: H ₂ O (25:75 v/v).	91
Tabela 11 - Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da zidovudina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH ₃ COONH ₄ : CH ₃ OH (75:25 v/v) pH 5.	92

Tabela 12 - Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da timina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH ₃ COONH ₄ : CH ₃ OH (75:25 v/v) pH 5.	92
Tabela 13 - Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da estavudina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH ₃ OH: H ₂ O (15:85 v/v)	93
Tabela 14 - Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da timina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH ₃ OH: H ₂ O (15:85 v/v).	93
Tabela 15 - Resultados obtidos na determinação de zidovudina em amostras comerciais de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2), utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm.	97
Tabela 16 - Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comerciais de zidovudina cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2), utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm.	97
Tabela 17 - Resultados obtidos na determinação de zidovudina em amostras comerciais de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.	98
Tabela 18 - Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comerciais de zidovudina cápsulas (amostra 1) e xarope (amostra 2), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.	98
Tabela 19 - Resultados obtidos na determinação de estavudina em amostras comerciais de cápsulas, utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm (Método 1) e cromatografia líquida de alta eficiência (Método 2).	99
Tabela 20 - Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comerciais de estavudina cápsulas, utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm (Método 1) e cromatografia líquida de alta eficiência (Método 2).	99
Tabela 21 - Teste de recuperação da solução padrão de zidovudina adicionada às amostras de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2) e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 266 nm.	100
Tabela 22 - Teste de recuperação da solução padrão de zidovudina adicionada às amostras de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.	101

Tabela 23 - Teste de recuperação da solução padrão de estavudina adicionada às amostras de cápsulas e analisadas por espectrofotometria no UV/VIS (método 1) e por cromatografia líquida de alta eficiência (método 2).	102
Tabela 24 - Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para cápsulas de zidovudina.	103
Tabela 25 - Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para solução oral de zidovudina.	103
Tabela 26 - Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para cápsulas de estavudina.	103
Tabela 27 - Valores de pH das amostras de solução oral de zidovudina nas condições estudadas.	104
Tabela 28 - Teores de zidovudina em cápsulas analisadas por espectrofotometria no UV.	104
Tabela 29 - Teores de zidovudina em solução oral analisada por espectrofotometria no UV.	105
Tabela 30 - Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante A) analisadas por espectrofotometria no UV.	105
Tabela 31 - Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante B) analisadas por espectrofotometria no UV.	106
Tabela 32 - Teores de zidovudina em cápsulas analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.	106
Tabela 33 - Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante A) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.	107
Tabela 34 - Teores de timina em cápsulas de estavudina (Fabricante A) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.	107
Tabela 35 - Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante B) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.	108
Tabela 36 - Teores de timina em cápsulas de estavudina (Fabricante B) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.	108
Tabela 37 - Valores experimentais médios obtidos no estudo de estabilidade térmica a 50 °C e 90% UR de cápsulas de zidovudina, analisadas por CLAE e respectivas ordens de reação.	109
Tabela 38 - Valores experimentais médios obtidos no estudo de estabilidade térmica a 50 °C e 90% UR de cápsulas de estavudina (Fabricante A), analisadas por CLAE e respectivas ordens de reação.	110

Tabela 39 - Valores experimentais médios obtidos no estudo de estabilidade térmica a 50 °C e 90% UR de cápsulas de estavudina (Fabricante B), analisadas por CLAE e respectivas ordens de reação.	111
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC = abacavir

ABS = absorbância

ACN = acetonitrila

ADN / DNA = ácido desoxirribonucléico

AOAC = Association of Official Analytical Chemists.

ARN / RNA = ácido ribonucléico

ARV = anti-retrovirais

AZT = zidovudina

CH_3COONa = acetato de sódio

CH_3COOH = ácido acético

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = acetato de amônio

CH_3OH = metanol

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CV = coeficiente de variação

ddC = zalcitabina

ddl = didanosina

DOSS = dioctil sulfosuccinato de sódio

DLV = delavirdina

DP = desvio padrão

d4T = estavudina

EFA = efavirenz

FURP = Fundação para o Remédio Popular

HIV = vírus da imunodeficiência humana

H₂O = água

H₂PO₄ = ácido fosfórico

ICH= International Conference on Harmonization.

IQUEGO = Indústria Química do Estado de Goiás

IND = indinavir

k = constante da velocidade de degradação

K₂HPO₄ = fosfato de potássio dibásico

KH₂PO₄ = fosfato de potássio monobásico

LAFEPE = Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

LVD = lovirida

NaH₂PO₄ = fosfato de sódio

NEL = nelfinavir

NH₄H₂PO₄ = fosfato de amônio

NVP = nevirapina

pH = potencial hidrogeniônico

pKa = logaritmo da constante de dissociação ácido-base

PMEA = adefovir

r = coeficiente de correlação

RIT = ritonavir

RT = transcriptase reversa

SAQ = saquinavir

SIDA / AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida.

SIV = vírus da imunodeficiência símia

T.A. = temperatura ambiente

TEA = trietilamina

THF = tetrahidrofurano

TR = tempo de retenção

UR = umidade relativa

USP = United States Pharmacopeia.

UV = ultravioleta

3TC = lamivudina

λ = comprimento de ondas

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 A ORIGEM DO HIV	6
3.2 MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV	9
3.3 CICLO CELULAR	11
3.4 MEDICAMENTOS ANTI-RETROVIRAIS	13
3.4.1 INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA	16
3.4.1.1 ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS	16
3.4.1.2 NÃO ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS	18
3.4.2 INIBIDORES DA PROTEASE	19
3.5 ZIDOVUDINA	21
3.5.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	22
3.5.1.1 MECANISMO DE AÇÃO	22
3.5.1.2 FARMACOCINÉTICA	22
3.5.1.3 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS	23
3.5.1.4 CONTRA-INDICAÇÕES	24
3.5.1.5 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS	24
3.5.1.6 EFEITOS COLATERAIS	25
3.5.1.7 POSOLOGIA	26
3.5.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	27
3.6 ESTAVUDINA	28
3.6.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	28
3.6.1.1 MECANISMO DE AÇÃO	28
3.6.1.2 FARMACOCINÉTICA	29

3.6.1.3 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS	29
3.6.1.4 CONTRA-INDICAÇÕES.....	30
3.6.1.5 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS	30
3.6.1.6 EFEITOS COLATERAIS	31
3.6.1.7 POSOLOGIA	31
3.6.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	31
3.7 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DA ZIDOVUDINA E ESTAVUDINA	33
3.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	36
3.8.1 INTRODUÇÃO.....	36
3.8.2 METODOLOGIA PARA O ESTUDO DA ESTABILIDADE	37
3.8.2.1 CINÉTICA	37
3.8.2.2 ORDEM DAS REAÇÕES	38
3.8.2.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ORDEM DAS REAÇÕES	39
3.8.2.4 MÉTODOS QUÍMICOS UTILIZADOS EM ESTUDOS DE ESTABILIDADE	39
3.8.2.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 MATERIAIS	42
4.1.1 EQUIPAMENTOS.....	42
4.1.2 SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS	43
4.1.3 PADRÕES	43
4.1.4 AMOSTRAS	44
4.1.5 PLACEBOS	44
4.2 MÉTODOS	44
4.2.1 DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE FUSÃO E ESPECTROS NO IV	44
4.2.2 PADRÕES DE REFERÊNCIA	45
4.2.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE ZIDOVUDINA	46
4.2.3.1 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	46
4.2.3.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	46
4.2.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE ESTAVUDINA	47
4.2.4.1 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	47
4.2.4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	47
4.2.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TIMINA	48
4.2.6 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE AMOSTRAS	48
4.2.6.1 CÁPSULAS DE ZIDOVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	48
4.2.6.2 CÁPSULAS DE ZIDOVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	49
4.2.6.3 SOLUÇÃO ORAL A 1% - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	49
4.2.6.4 SOLUÇÃO ORAL A 1% - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	49
4.2.6.5 CÁPSULAS DE ESTAVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	50
4.2.6.6 CÁPSULAS DE ESTAVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	50
4.2.7 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL	51
4.2.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	51
4.2.9 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	52
4.2.9.1 ZIDOVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	52
4.2.9.2 ZIDOVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	53

4.2.9.3	ESTAVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	53
4.2.9.4	ESTAVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	54
4.2.9.5	TIMINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA SIMULTÂNEA COM A ZIDOVUDINA	55
4.2.9.6	TIMINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA SIMULTÂNEA COM A ESTAVUDINA	55
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO E CROMATOGRÁFICO NA DETERMINAÇÃO DA ZIDOVUDINA EM CÁPSULAS E SOLUÇÃO ORAL E DA ESTAVUDINA EM CÁPSULAS.....	56
4.3.1	PESQUISA DE INTERFERENTES DOS EXCIPIENTES A PARTIR DOS PLACEBOS	56
4.3.2	TESTE DE PRECISÃO ATRAVÉS DE REPETIBILIDADE	57
4.3.2.1	ZIDOVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	57
4.3.2.2	ZIDOVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	57
4.3.2.3	SOLUÇÃO ORAL A 1% - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	58
4.3.2.4	ESTAVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	59
4.3.2.5	ESTAVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	59
4.3.3	DETERMINAÇÃO DE EXATIDÃO DO MÉTODO	60
4.3.3.1	ZIDOVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	61
4.3.3.2	ZIDOVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	62
4.3.3.3	ESTAVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	63
4.3.3.4	ESTAVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	64
4.3.4	DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DA TIMINA	66
4.3.5	DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DA TIMINA	67
4.4	ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE ZIDOVUDINA CÁPSULAS E SOLUÇÃO ORAL E DE ESTAVUDINA CÁPSULAS	68
4.4.1	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	68
4.4.2	ANÁLISE DAS AMOSTRAS	69
4.4.3	DETERMINAÇÃO DO PH DAS SOLUÇÕES ORAIS	69
5.	RESULTADOS.....	70
5.1	DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE FUSÃO	70
5.2	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO IV	70
5.3	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV	71
5.4	CURVAS DE CALIBRAÇÃO	71
5.5	LINEARIDADE	72
5.6	ESPECIFICIDADE / SELETIVIDADE	72
5.7	PRECISÃO	73
5.7.1	ZIDOVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	73
5.7.2	ZIDOVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	73
5.7.3	ESTAVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA.....	73
5.8	TESTE DE RECUPERAÇÃO – EXATIDÃO	74
5.8.1	ZIDOVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	74
5.8.2	ZIDOVUDINA - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	74
5.8.3	ESTAVUDINA - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA.....	74
5.9	LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO - TIMINA.....	75
5.10	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	75
5.11	ANÁLISE DE PH	75
5.12	DETERMINAÇÃO DO TEOR DAS AMOSTRAS	76
5.13	DETERMINAÇÃO DA ORDEM DAS REAÇÕES	76

5.14 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	76
6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÕES	126
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

RESUMO

A síndrome da imunodeficiência adquirida é causada pelo vírus da imunodeficiência humana e é caracterizada por provocar depleção física e funcional do sistema imune do organismo, através da infecção citopática de células CD4⁺. Muitos fármacos anti-retrovirais tem sido desenvolvidos e estão disponíveis comercialmente. Para atuar no controle de qualidade de medicamentos deve-se continuamente estudar o desenvolvimento e a validação de novas metodologias para quantificação de fármacos, para serem aplicadas nos estudos de estabilidade de formulações farmacêuticas e na análise de produtos de degradação. Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas analíticas, a espectrofotometria direta no UV/VIS e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação quantitativa de zidovudina (AZT) e estavudina (d4T).em medicamentos. Ambos os métodos foram validados com relação à linearidade, exatidão, precisão, especificidade e limite de detecção e quantificação. O método validado para a CLAE foi também empregado para a determinação quantitativa da timina, produto de degradação do AZT e da d4T. A metodologia validada por CLAE foi utilizada na realização de estudos de estabilidade acelerada dos anti-retrovirais contidos nas diferentes preparações farmacêuticas. Realizou-se o estudo da estabilidade em três diferentes condições: temperatura ambiente, 40 °C / 75% UR e 50 °C / 90% UR. Tanto a zidovudina (Fabricante A) e estavudina (Fabricante B) apresentaram decaimento cinético de zero ordem com prazos de validade a 50 °C / 90% UR de 10, 3 e 2 meses, respectivamente.

ABSTRACT

The acquired immunodeficiency syndrome is characterized by causing physical and functional depletion of the organism's immune system, through the cytopathic infection of CD4⁺ cells. Several antiretroviral drugs have been developed and commercially made available. In order to assure the quality control of drugs it is necessary to develop and validate new analytical methodologies to perform the quantitative determination of drugs and stability studies of pharmaceutical formulations by determining the drug itself and its degradation products. In this research two analytical techniques, direct UV/VIS spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC), were used for the quantitative determination of zidovudine (AZT) and stavudine (d4T) in pharmaceutical preparations. Both methods were validated and parameters like linearity, precision, accuracy, specificity, limit of detection and limit of quantification, were determined. The validated HPLC method was also applied for quantitative determination of timine, a degradation product of AZT and d4T. The validated HPLC method was applied to accelerate stability studies of AZT and d4T in different pharmaceutical preparations. The stability studies were performed at three different conditions: room temperature, 40 °C / 75% RH and 50 °C / 90% RH. Both AZT and d4T (Industry A) and d4T (Industry B) pharmaceutical preparations presented a zero order degradation reaction. The three formulations presented a shelf-life of 10, 3 and 2 months, respectively, at 50 °C / 90% RH.

I. INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença infecto contagiosa, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), recentemente descrito pela comunidade científica. Porém, não se trata de uma doença comum, pois é responsável pela pandemia de maior impacto em curso atualmente (Amato et al., 1996).

O HIV apresenta alta afinidade pelos receptores $CD4^+$, causando a depleção física e funcional do sistema imune do organismo, através da infecção citopática de células $CD4^+$ (Martindale & Reynolds, 1996). A remoção efetiva dessas células do sistema de defesa do hospedeiro resulta em estado de deficiência imune, deixando o indivíduo susceptível a infecções oportunistas, como as por *Pneumocystis carinii* e o raro neoplasma, Sarcoma de Kaposi (Ziegler et al., 1984).

A ocorrência de doenças infecto contagiosas não era mais considerada uma ameaça no mundo desenvolvido, em tempos recentes, como a quase quatro décadas e os principais desafios da saúde pública eram condições não infecciosas, tais como câncer, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas. Este dogma, no entanto, caiu no

início dos anos 80 com o advento da AIDS (Barré-Sinoussi et al., 1983; Farthing et al., 1989; Gallo et al., 1984; Gallo et al., 1989).

O HIV é um retrovírus que é transmitido pelo contato sexual, sangue e hemoderivados, pelo uso de agulhas contaminadas e para o feto, através da mãe. A transmissão do HIV, através da transfusão de sangue e hemoderivados, perdeu significativa importância, em consequência da realização prévia de testes sorológicos para seleção de todos os doadores de sangue e devido ao tratamento térmico dos concentrados de fatores de coagulação (Serb & Yeung, 1994). Dois subtipos de HIV foram identificados: o mais comum é o HIV-1, que ocorre em todo o mundo; o HIV-2 é encontrado principalmente na África e sua infecção está associada à progressão mais lenta da doença (Balint, 2001; Martindale & Reynolds, 1996).

O número de casos de AIDS tem crescido assustadoramente e o mais perverso e evidente crescimento está atualmente no continente africano. Na região subsaariana, formada por 45 dos países mais pobres, vivem mais de 28 milhões dos mais de 40 milhões de infectados pelo HIV no mundo. Naqueles países, morrem mais de 2 milhões de pessoas por ano, o que representa 80% do total de mortos pela epidemia (Balint, 2001; UNAIDS/WHO, 2000; UNAIDS/WHO, 2002). A América Latina, incluindo o Caribe, também experimenta aumento na incidência. Porém, a situação mais preocupante está ocorrendo no sudeste da Ásia, que está sofrendo uma epidemia explosiva, semelhante à que ocorreu na África cerca de duas décadas atrás, onde a principal via de transmissão é o contato heterossexual (Amato et al., 1996).

A epidemia de AIDS foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1982, na Região Sudeste. Considerando-se os conhecimentos sobre a história natural e período de latência da infecção pelo HIV, podemos deduzir que a introdução do vírus no País deve ter ocorrido no final da década de 70,

e a sua difusão, em um primeiro momento, esteve concentrada nas principais áreas metropolitanas da Região Sul e Sudeste. Logo em seguida, iniciou-se um processo de disseminação para as demais regiões do País (Brasil, 1999).

No Brasil, cerca de 610 mil pessoas têm o HIV. Desde a descoberta da doença, foram registrados 203 mil casos de AIDS no País, com 113 mil mortes (Brasil, 1999; UNAIDS/WHO, 2002).

Para garantir qualidade de vida adequada aos doentes infectados pelo vírus HIV é necessária a administração de combinação de fármacos antivirais, o chamado “coquetel”. Como estes medicamentos são dispendiosos, países como o Brasil e a Índia estão sendo beneficiados com a produção de genéricos contra a AIDS, pois atualmente, mesmo pagando os *royalties* aos detentores da patente, o Brasil reduziu o custo anual do tratamento de US\$ 15.000 para US\$ 3.000. O Ministério da Saúde tem conseguido obter anti-retrovirais a um custo mais baixo do que o praticado pela indústria farmacêutica em outros países. Este fato deve-se ao programa de aquisição em larga escala e a produção em laboratórios estatais (Farmanguinhos, LAFEPE, IQUEGO, FURP), que estão fornecendo medicamentos com custo inferior (Chequer et al., 2001). Só no quadriênio 1996-2000, os ARV, produzidos no Brasil, apresentaram uma média de redução de 72,5% no seu custo, quando comparados aos produtos importados, que apresentaram uma média de redução de 9,6% (Chequer et al., 2001).

No entanto, segundo a Resolução nº 10, de 2 de janeiro de 2001, que regulamenta os medicamentos genéricos é necessário que se realizem estudos experimentais para a validação dos métodos analíticos para assegurar a confiabilidade dos resultados em relação aos parâmetros de validação como precisão, exatidão, linearidade, entre outros; e aplicação

destes métodos em estudos de estabilidade das diferentes especialidades farmacêuticas existentes comercialmente.

Além disso, vários estudos de quantificação e de estabilidade de anti-retrovirais são realizados em plasma e fluídos biológicos (Knupp et al., 1990; Langtry & Campoli-Richards, 1989; Tan & Boudinot, 2000), mas poucos estudos são feitos em formulações farmacêuticas contendo estes fármacos isolados ou em associações.

II. OBJETIVOS DA PESQUISA

Os objetivos da pesquisa foram:

1. Padronizar e validar métodos analíticos empregando espectrofotometria no UV/VIS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação dos anti-retrovirais e de seu produto de degradação, a timina em medicamentos comercializados no Brasil;
2. Aplicar os métodos validados nos estudos de estabilidade acelerada dos anti-retrovirais utilizados na pesquisa.

III. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A origem do HIV

O primeiro caso de AIDS foi identificado em 1979, após descrições de casos de sarcoma de Kaposi (CDC, 1981; Friedman-Kien, 1981) e pneumonia por *Pneumocystis carinii* (CDC, 1981; Gottlieb et al., 1981; Jaffe et al., 1983) em homens homossexuais previamente saudáveis na Califórnia e em Nova Iorque. O vírus do HIV foi identificado pela primeira vez em 1983/84 por cientistas do *National Cancer Institute* (EUA) e do Instituto Pasteur (França). Estes pesquisadores desenvolveram um teste para determinar a presença dos anticorpos no sangue e conseguiram investigar a origem e modos de transmissão da doença.

A AIDS, foi identificada, praticamente, ao mesmo tempo na América do Norte e na África. Não há evidências de que a origem da pandemia tenha ocorrido na África ou que fosse endêmica nesse continente, antes de sua eclosão. Em estudo retrospectivo, nos Estados Unidos, cerca de 1,2% de amostras de soro obtidas de usuários de drogas injetáveis, apresentavam anticorpos para o HIV no ano de 1971. Soros africanos, anteriores a 1975, não apresentavam anticorpos para o HIV, mostrando que na África, a

epidemia emergiu também recentemente. A maior parte dos cientistas admite que o HIV é originário de primatas, tendo de alguma maneira, se transmitido para a espécie humana. O vírus da imunodeficiência dos Símios, como o SIV, isolado do macaco *Rhesus* e do macaco *Mangabey* são intimamente relacionados com o HIV-2. A semelhança entre o HIV-2 e o SIV é tal que é provável que esses vírus tenham evoluído de épocas recentes, a partir de um ancestral comum. Especula-se que o SIV tenha infectado o homem há cerca de 30 a 40 anos e evoluído para o HIV-2. São relatados casos de infecção humana após exposição ocupacional ao SIV, com soroconversão indistinguível da infecção por HIV-2 e com persistência do vírus. Outra evidência é a de um primata (*Pan troglodytes troglodytes*), na África Central, que apresenta um tipo de SIV, cujo genoma é intimamente ligado ao HIV-1, mais do que qualquer retrovírus de origem símia conhecido, podendo ser considerado subtipo do mesmo vírus. Inclusive anticorpos encontrados nesse primata são capazes de reagirem com as proteínas do HIV-1. A transmissão inicial de retrovírus de primatas, a saber, SIV, para o homem, o que explicaria a origem da AIDS, pode ter ocorrido de várias maneiras. Primatas, em geral, devem ser considerados potenciais transmissores de retrovírus ao homem. O risco potencial de contaminação com primatas já está presente por ocasião da captura (mordidas, escoriações, etc.), ou quaisquer contatos com seu sangue, o que poderia explicar alguns casos de infecção humana, esporádicas, na África. Entretanto, coincidentemente, a pandemia de AIDS acompanhou a utilização, em larga escala, de primatas em experimentação biológica, inclusive xenotransplantes. Na década de 60 e início da década de 70, vários xenotransplantes (rim, fígado, coração) de primatas, principalmente chimpanzés, para o homem, foram realizados e alguns pacientes em coma hepático foram tratados com perfusão de seu sangue em fígado de chimpanzés, ou mesmo, circulação cruzada com primatas.

Recentemente, durante a VII Conferência sobre Retrovírus e Infecções oportunistas (Chicago, EUA, 2000), novos elementos sobre a

provável conexão com chimpanzés foram apresentados, demonstrando que diferentes subespécies de chimpanzés são portadores de diferentes subespécies de vírus análogos ao HIV. O estudo de amostras de tecidos de um chimpanzé, armazenado há mais de 10 anos e que, na época apresentava anticorpos para o HIV-1, quando em cativeiro nos Estados Unidos, revelou a presença do mesmo vírus.

Tais vírus podem estar presentes em chimpanzés há milhares de anos e aparentemente não causarem doença nesses animais, provavelmente por pressão seletiva, em que animais suscetíveis foram sendo eliminados, restando os resistentes. É possível que, pelo menos três transmissões independentes, de chimpanzé para o homem, tenham ocorrido, para explicar os três grupos principais de HIV-1. Uma vez que ocorreram as contaminações, qualquer que tenham sido as formas, vários fatores da sociedade humana tais como promiscuidade sexual, hemodiálises, uso de drogas injetáveis, transfusões de sangue e hemoderivados, etc. provocaram a eclosão da epidemia, agravada pela transmissão vertical materno-fetal.

3.2 Morfologia e organização genômica do HIV

O HIV está entre os lentivírus, gênero pertencente à família *Retroviridae*, que inclui um grande número de diferentes vírus que causam infecção em animais (Amato et al., 1996). Retrovírus são vírus RNA que através da enzima DNA-polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa – RT), são capazes de copiar seu genoma de RNA em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira. Possuem em comum o fato de infectarem primariamente células do sistema mononuclear fagocitário (linfócitos T e macrófagos) e de comprometerem, preferencialmente, os sistemas nervoso central e imunológico. Podemos classificar o HIV em dois tipos (1 e 2), sendo que o HIV-1 é subdividido em três grupos: M (Major), O (Outlier) e N (New). O grupo M do HIV-1 representa a maior parte da pandemia e atualmente já foram descritos 10 subtipos de A até J. No Brasil, pelo menos quatro subtipos foram encontrados até o momento (B,C,D e F).

O HIV é um vírus esférico, de aproximadamente 100 nm de diâmetro, envelopado apresentando na superfície uma membrana lipídica oriunda da membrana externa da célula do hospedeiro e duas glicoproteínas (gp41 e gp120). Internamente a essa membrana, está a matriz protéica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral de forma cônica composto pela proteína p24. O material genético, assim como o tRNA e as enzimas necessárias para os primeiros eventos da replicação viral, encontram-se dentro do capsídeo viral. O genoma do HIV, de aproximadamente 10 kb, contém nove genes e duas regiões denominadas LTR (*Long Terminal Repeats*), onde estão presentes elementos de controle para integração, transcrição e poliadenilação dos RNA mensageiros (Cullen, 1991; Essex et al., 1989; Poli et al., 1993). Os genes podem ser divididos em dois grupos: os que codificam as proteínas estruturais (gag, pol e env), e os que codificam proteínas não estruturais (tat, rev, nef, vif, vpu, vpr e vpx). O gene gag (antígeno de grupo) codifica a matriz protéica (MA ou p17), o capsídeo viral (CA ou p24) e as proteínas nucleares (NC ou p6 e p9). O gene pol (polimerase) codifica as enzimas virais: transcriptase reversa (RT ou

p51/p66), que também possui atividade de RNase H, protease (PR ou p10) e integrase (IN ou p32). O gene *env* (envelope) codifica uma proteína que é clivada dando origem a glicoproteína de membrana (TM ou gp41) e a glicoproteína de superfície (SU ou gp120) (Cullen, 1991; Ho et al., 1987; Madhok et al., 1987). Os genes não-estruturais são divididos em regulatórios (*tat*, *rev* e *nef*), que são necessários para a replicação viral *in vitro* e em genes acessórios (*vif*, *vpu*, *vpr* e *vpx*), que não são essenciais. O gene *tat* ou p14 é um transativador da transcrição, o *rev* ou p19 atua no processamento, transporte e tradução dos RNA mensageiros (transativador pós transcricional), o *vif* ou p23 atua na maturação da proteína do envelope (fator de infectividade), o *vpu* ou p15 atua na liberação da partícula viral e está presente somente no HIV-1, o *vpr* ou p15 atua na replicação viral, o *nef* ou p27 parece diminuir a expressão de CD4 na superfície (função controversa na literatura; pode reduzir ou aumentar a replicação viral) e o *vpx* ou p16 atua precocemente no ciclo da replicação viral e está presente somente no HIV-2.

Figura 1 – Figura esquemática do HIV (Disponível em

www.cipladoc.com/medicalslides/download/hivapico.ppt. Acesso em 5 ago. 2002.)

3.3 Ciclo celular

A infecção do HIV dá-se pela ligação de alta afinidade da gp120 do vírus com o receptor na superfície da célula (molécula CD4). A entrada ocorre através da fusão do vírus com a membrana da célula, mediada pela gp41. Porém a molécula de CD4 não é o único receptor do HIV, sendo seus co-receptores, as moléculas CXCR4, quando em linfócitos, e CCR5 quando em macrófagos.

Após a entrada na célula, o RNA é convertido a DNA pelas enzimas transcriptase reversa e ribonuclease H. Essa reação ocorre no citoplasma nas primeiras seis horas de infecção. A dupla fita de DNA, assim formada, é integrada de forma randômica ao genoma do hospedeiro através da enzima integrase. Uma vez integrado, o DNA viral permanece na célula enquanto ela estiver viva.

Proteínas celulares e virais controlam a expressão gênica do HIV. Inicialmente, apenas as proteínas tat, rev e nef são sintetizadas, sendo a seguir sintetizadas as proteínas estruturais e o RNA genômico. A liberação do vírus é por brotamento; durante esta fase, a enzima protease processa as proteínas precursoras de gag e pol, tornando a partícula viral madura e capaz de infectar uma nova célula.

Figura 2 – Vírus HIV em sua forma imatura e em sua forma madura.

(Disponível em http://www.virology.net/Big_Virology/BVretro.html. Acesso em 12 nov. 2002)

A replicação viral ocorre principalmente nos órgãos linfóides, na região perifolicular dos centros germinativos. A meia vida da partícula viral no plasma é de seis horas e são produzidas cerca de 10^9 a 10^{10} partículas virais por dia.

A transcriptase reversa é um dos mecanismos responsáveis pela variabilidade genética do HIV, uma vez que incorpora erroneamente em torno de 4 a 10 bases em cada ciclo de replicação. Como o HIV tem 104 pares de bases em seu genoma, ocorre uma substituição nucleotídica por genoma por ciclo replicativo, fazendo com que sua população contenha poucos ou nenhum genoma idêntico no hospedeiro.

Figura 3 – Ciclo celular do HIV (Disponível em

www.csc.vill.edu/~vsri/2002/ExcelEx/vsrihiv aids.ppt. Acesso em 12 nov. 2002)

3.4 Medicamentos anti-retrovirais

Embora a AIDS seja uma moléstia incurável, combinações de fármacos com propriedades antivirais, podem estender e dar qualidade à vida dos pacientes.

Desde a descoberta do HIV, um grande número de fármacos vem sendo identificado por apresentarem atividade anti-retroviral *in vitro* (Mitsuya et al., 1990; Vogt & Hirsch, 1986). Até hoje, o maior número de informações sobre terapêutica específica contra o HIV concentrou-se na classe de fármacos, análogos a nucleosídeos, que inibem a transcriptase reversa, principalmente a zidovudina, a didanosina, a zalcitabina e a estavudina.

A procura por fármacos efetivos no combate à infecção pelo HIV fundamenta-se no entendimento do ciclo celular do vírus. É compreendendo cada passo da replicação viral que se podem direcionar novas estratégias para combater a infecção.

A utilização da terapia combinada de anti-retrovirais (ARV), vem mostrando resultados positivos em todos os países nos quais os pacientes infectados pelo HIV têm tido acesso a esses medicamentos (Chequer et al., 2001). Atualmente, cerca de 90.000 pacientes recebem ARV da Rede Pública de Saúde (95% adultos adolescentes e 5% crianças) (Chequer et al., 2001). O primeiro anti-retroviral distribuído na Rede Pública foi a zidovudina (AZT). Em setembro de 1998, já estavam disponíveis na Rede Pública comprimidos ou cápsulas de didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), nevirapina, delavirdina, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir e zidovudina injetável (MS, 1999).

Atualmente existem três classes de ARV no mercado: os inibidores da protease; os inibidores da transcriptase reversa, análogos de nucleosídeos e

os inibidores da transcriptase reversa, não análogos de nucleosídeos (Chequer et al., 2001; Mark et al., 1999; Markowitz, 1996).

Todos estes fármacos previnem a reprodução do vírus deixando o progresso da doença mais lento. O vírus do HIV freqüentemente desenvolve resistência a todos estes medicamentos, quando empregados isoladamente, após um período que varia de poucos dias a anos, dependendo do fármaco e do paciente (Markowitz, 1996).

Uma estratégia terapêutica muito promissora para combater a AIDS é combinar dois inibidores da protease, e/ou um inibidor da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos e pelo menos dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (Aymard et al., 2000; Martindale & Reynolds, 1996).

Figura 4 – Mecanismos de ação de cada classe de anti-retrovirais.

(Disponível em www.cipladoc.com/medicalslides/download/hivapico.ppt. Acesso em 5 ago. 2002.)

Na **Tabela 1** podem ser vistos os medicamentos anti-retrovirais disponíveis atualmente para o tratamento da AIDS (DEF, 2000; Mark et al., 1999).

Tabela 1 - Medicamentos anti-retrovirais disponíveis para o tratamento da AIDS.

Nome genérico	Abreviação	Posologia para adultos (oral)	Possíveis efeitos colaterais ¹	Posição do FDA até 1998
Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos				
Zidovudina	ZDV, AZT	300 mg duas vezes ao dia	Anemia e leucopenia ² , raramente pancreatite	Aprovado
Didanosina	ddl	200 mg duas vezes ao dia se > 60 kg; 125 mg duas vezes ao dia se < 60 kg	Neuropatia periférica ³ , pancreatite ⁴	Aprovado
Zalcitabina	ddC	0,75 mg três vezes ao dia	Neuropatia periférica ³ , pancreatite ⁴	Aprovado
Estavudina	d4T	40 mg duas vezes ao dia se > 60 kg; 30 mg duas vezes ao dia se < 60 kg	Neuropatia periférica ³ , raramente pancreatite	Aprovado
Lamivudina	3TC	150 mg duas vezes ao dia	Neuropatia periférica ² , raramente pancreatite	Aprovado
Abacavir	ABC	300 mg duas vezes ao dia	Hipersensibilidade severa	Pesquisa
Inibidores da protease ⁵				
Saquinavir	SAQ	600 mg três vezes ao dia	Pedras nos rins, causando dores nas costas, hematúria ou obstrução dos rins com decréscimo da função	Aprovado
Indinavir	IND	800 mg três vezes ao dia	?	Aprovado
Ritonavir	RIT	600 mg duas vezes ao dia	?	Aprovado
Nelfinavir	NEL	750 mg três vezes ao dia	?	Aprovado
Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos				
Nevirapina	NVP	200 mg por dia por duas semanas, depois 200 mg duas vezes ao dia	Manchas vermelhas na pele	Aprovado
Delavirdina	DLV	400 mg três vezes ao dia	Manchas vermelhas na pele	Aprovado
Lovirida	LVD	?	?	Pesquisa
Efavirenz	EFA	600 mg por dia	Distúrbios do SNC	Pesquisa
Inibidor da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos				
Adefovir	Bis-POM PMEA	125 mg por dia	Síndrome de Fanconi	Pesquisa

¹ Outros efeitos colaterais que podem ser causados por vários ou todos os fármacos incluem dor de cabeça, náuseas, dor abdominal, diarreia, anorexia, febre, perda e/ou anomalia do paladar.

² A anemia pode ser tratada com transfusões ou outros fármacos como a eritropoietina recombinante e a leucopenia pode ser tratada com fator estimulante de colônias (G-CSF, GM-CSF).

³ A neuropatia periférica pode ser reversível quando o medicamento é suspenso e pode ser tratada sintomaticamente com alívio parcial, se for severa.

⁴ Sintomas de pancreatite como, náuseas, vômitos ou dores nas costas e abdômen, indicam a suspensão da ddl ou ddC até que o diagnóstico de pancreatite seja confirmado ou excluído.

⁵ Inibidores da protease podem causar elevação dos níveis de triglicérides no soro, com significância clínica desconhecida.

? Dados insuficientes ou não disponíveis.

3.4.1 Inibidores da transcriptase reversa

Os fármacos utilizados com melhores resultados até o momento são os que inibem a ação da enzima transcriptase reversa. Apesar de exercerem ação parcial, são capazes de diminuir a carga viral, melhorar sintomas clínicos, retardar a progressão da doença e prolongar a sobrevivência de pacientes com AIDS.

Apesar dos agentes inibidores da transcriptase reversa apresentarem um mecanismo de ação comum, os agentes anti-retrovirais diferem substancialmente quanto às suas propriedades farmacológicas, inclusive quanto às vias de ativação intracelular e perfis toxicológicos (Goodman et al., 1996).

Estes fármacos são divididos em dois grupos: os análogos de nucleosídeos e os não-análogos de nucleosídeos.

3.4.1.1 Análogos de nucleosídeos

Os análogos de nucleosídeos foram a primeira classe de fármacos que demonstraram atividade anti-retroviral em pacientes tratados (Balint, 2001). Atuam colocando-se como “falsos nucleosídeos” na formação da molécula de DNA pela transcriptase reversa. Quando ocupam o lugar de um verdadeiro nucleosídeo na formação da molécula do DNA viral, impedem que um novo nucleosídeo se ligue, interrompendo o processo. Portanto, têm a característica de serem inibidores competitivos.

Porém, a transcriptase reversa possui grande capacidade de mutação. Com o passar do tempo, ocorre alteração de sua estrutura nos sítios de ligação dos análogos de nucleosídeos, sobrevivendo então a resistência (OMS, 1998).

Os medicamentos inibidores da transcriptase reversa, análogos de nucleosídeos incluem a zidovudina, a didanosina, a zalcitabina, a estavudina, a lamivudina, e o abacavir (DEF, 2000; Merck, 1996).

Figura 5 – Estruturas químicas da zidovudina, estavudina, didanosina, zalcitabina, lamivudina e abacavir.

3.4.1.2 Inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos:

Diferem dos análogos de nucleosídeos por inibirem a transcriptase reversa não competitivamente, bloqueando a reação química de duplicação da molécula de RNA viral pela transcriptase reversa sem interferir na ligação dos nucleosídeos (Spence et al., 1995). Não atuam contra o HIV-2 ou outras retrovíroses animais (Kopp et al., 1991; Starnes & Cheng, 1989).

Os inibidores da transcriptase reversa, não análogos de nucleosídeos incluem a nevirapina, a delavirdina, o lovirida e o efavirenz (DEF, 2000; Merck, 1996).

Nevirapina

Delavirdina

Lovirida

Efavirenz

Figura 6 – Estruturas químicas da nevirapina, delavirdina, loviride e efavirenz.

3.4.1.3 Inibidores de protease

No final de 1995, após diversas pesquisas, foi liberada para uso esta nova classe de medicamentos. Esses fármacos atuam na inibição da protease, enzima responsável por clivar a poliproteína codificada pelos genes gag e pol, formada no ribossomo da célula hospedeira. É essencial para a consolidação da replicação viral, já que a região pol é a transcriptase reversa e a gag, a proteína p24, levando à formação de partículas virais defectivas, incapazes de montar outro vírus completo.

Os inibidores da protease incluem o saquinavir, o ritonavir, o indinavir, e o nelfinavir (DEF, 2000; Merck, 1996).

Saquinavir

Indinavir

Ritonavir

Nelfinavir

Figura 7 – Estruturas químicas do saquinavir, indinavir, ritonavir e nelfinavir.

3.5 Zidovudina

A zidovudina foi primeiramente sintetizada por Horwitz et al., 1964 e foi descrita como um fármaco antineoplásico. Sua atividade anti-retroviral foi descoberta por Ostertag et al., 1974, no entanto, seu efeito inibitório contra o HIV só foi provado em 1985 por Mitsuya et al., 1985. A zidovudina foi o primeiro medicamento empregado no tratamento da AIDS, que comprovadamente proporcionou benefícios clínicos importantes, estando disponível desde 1987 (Goodman et al., 1996), logo após a observação de sua atividade anti-retroviral *in vitro* (Yarchoan et al., 1989). No entanto, a zidovudina só começou a ser produzida no Brasil em 1993 (Chequer et al., 2001). A zidovudina é uma substância antivirótica sistêmica indicada como fármaco preferencial no tratamento da AIDS. É a precursora da terapia anti-retroviral e integrante fundamental da terapia combinada de fármacos correntemente utilizados (Bronker et al., 1990; Langtry & Campoli-Richards, 1989; Tan & Boudinot, 2000).

Vários estudos mostraram a eficácia clínica da zidovudina no prolongamento da sobrevida média e no aumento do período livre do aparecimento de doenças oportunistas em pacientes com AIDS ou com sintomas constitucionais sem doenças oportunistas (Creagh-Kirk et al., 1988; Fischl et al., 1989; Graham et al., 1992; Kahn et al., 1992a; Moore et al., 1991, Moore et al., 1992), freqüentemente em associação com profilaxia para pneumonia por *Pneumocystis carinii*. A partir destes dados, ficou evidente o benefício da zidovudina quando administrada em pacientes que já apresentavam sintomas constitucionais ou doenças oportunistas, o que geralmente ocorre quando a contagem de linfócitos CD4 está abaixo de 200 células/mm³ (OMS, 1998). Porém, a indicação do emprego da zidovudina em pacientes com linfócitos CD4 entre 200 a 500 células/mm³ que são assintomáticos é ainda campo de grandes controvérsias (OMS, 1998).

A monoterapia com AZT não é indicada, pois o fármaco apenas inibe a infecção de novas células, enquanto que a produção de novos vírus e a imunossupressão não são afetadas. Além disso, Larder et al., 1989 documentaram que a resistência pode se desenvolver depois de um período longo de tratamento (mais que 1 ano).

3.5.1 Propriedades farmacológicas (DEF, 2000; Martindale & Reynolds, 1996)

3.5.1.1 Mecanismo de ação

A zidovudina é um agente antivirótico que é altamente ativo *in vitro* contra retrovírus, inclusive o HIV. Este fármaco é inativo contra o vírus em sua forma natural, portanto tem que ser fosforilado no interior das células afetadas e não afetadas pela timidinaquinase em zidovudina monofosfato. Esta se converte em difosfato, por ação da timidilatoquinase celular e então é convertida em trifosfato por outras enzimas celulares não específicas. O trifosfato de zidovudina age como um inibidor da transcriptase reversa virótica e como seu substrato. A formação do DNA provirótico adicional é bloqueada pela incorporação do trifosfato de zidovudina na cadeia e no término subsequente da cadeia. A competição do trifosfato de zidovudina pela transcriptase reversa do HIV é aproximadamente 100 vezes maior do que para a DNA alfa-polimerase celular. A dose necessária para causar 95% de inibição viral é abaixo de 1 $\mu\text{mol/L}$ (Sandstrom & Oberg, 1993a e 1993b).

3.5.1.2 Farmacocinética

A zidovudina é bem absorvida no intestino, em todos os níveis de doses estudados, a biodisponibilidade foi de 69% a 70%, mas isso difere grandemente entre cada paciente. As concentrações plasmáticas médias de pico e de depressão, após doses orais de solução a 5 mg/kg, a cada 4 horas

foram de 7,1 e 0,4 M, respectivamente (ou 1,9 e 0,1 µg/mL). A zidovudina entra na célula por difusão passiva e apresenta meia-vida plasmática de 1 hora, mas a meia-vida intracelular é em torno de 3 a 4 horas (Henry et al., 1988; Kuster et al., 1991; McLeod & Hammer, 1992). O *clearance* renal da zidovudina excede muito o *clearance* da creatinina, indicando que significativa secreção tubular se faz presente. O 5'-glicuronídeo de zidovudina é o principal metabólito, tanto no plasma como na urina e é responsável por mais ou menos 50% a 80% da dose eliminada pela via renal. Nenhum outro metabólito foi detectado. Os níveis de zidovudina no líquido cefalorraquidiano apresentaram uma média de mais ou menos 50% dos níveis plasmáticos correspondentes, após a administração de doses sucessivas. A ligação a proteínas plasmáticas é relativamente baixa (34-38%) e assim, as interações do fármaco, envolvendo o deslocamento do local de ligação, são imprevisíveis (Klecker et al., 1987). Deve ser administrada preferencialmente sem alimentos ou com alimentos não gordurosos.

3.5.1.3 Indicações terapêuticas

A zidovudina é indicada para pacientes assintomáticos ou com sintomas leves de infecção pelo vírus HIV e pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana adquirida. A evidência de sua eficácia foi demonstrada em pacientes com AIDS, os quais se recuperaram de seus primeiros episódios de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, dentro de 4 meses e em pacientes com ARC, com sinais múltiplos de infecção pelo HIV, inclusive candidíase mucocutânea, perda de peso, linfadenopatia e febre inexplicável.

Maiores benefícios são obtidos quando a medicação é administrada antes que os pacientes atinjam a fase avançada da doença.

3.5.1.4 *Contra-indicações*

É contra-indicada em pacientes que potencialmente apresentam hipersensibilidade a zidovudina.

Não deve ser administrada à pacientes com neutrófilos periféricos inferiores a $750/\text{mm}^3$ ou hemoglobina inferior a 7,5 g/dl e recém-nascidos com hiperbilirrubinemia que requerem tratamento com fototerapia.

A relação risco/benefício deve ser cuidadosamente avaliada na presença de depressão da medula óssea, deficiência de ácido fólico ou de vitamina B12, de comprometimento hepático e disfunção renal.

A zidovudina atravessa parcialmente a placenta e atinge concentrações fetais similares àsquelas observadas em adultos. Por este motivo, só deve ser usado durante a gravidez se o benefício para a mãe justificar o possível risco para o feto. A administração à gestante soropositiva diminui a incidência de AIDS em recém-nascidos.

Não se conhece ainda se a zidovudina é excretada no leite materno, por este motivo, recomenda-se que as pacientes em tratamento com este medicamento não amamentem ao seio, a menos que mãe e filho estejam infectados pelo HIV.

3.5.1.5 *Interações medicamentosas*

O uso do paracetamol durante o tratamento com zidovudina aumenta a incidência de neutropenia, particularmente após tratamento crônico, presumivelmente por reduzir o metabolismo da zidovudina.

O ácido acetilsalicílico, benzodiazepínicos, cimetidina, codeína, indometacina, morfina e sulfadiazina podem inibir competitivamente a

glucuronização hepática ou diretamente o metabolismo microssômico hepático, reduzindo o *clearance* de zidovudina, devendo-se, portanto, evitar o emprego simultâneo.

A anfotericina B, sulfametoxazol + trimetoprima, dapsona, doxorubicina, flucitosina, interferon A, ganciclovir, fluconazol, pentamidina, vimblastina e vincristina reduzem a capacidade de eliminação renal e hepática, causando elevação do nível plasmático de zidovudina e aumento do risco de toxicidade.

A probenicida inibe a eliminação da zidovudina pelos rins.

O aciclovir pode desencadear neurotoxicidade, caracterizada por profunda letargia e fadiga.

A aplicação concomitante de radioterapia amplia o risco de mielodepressão.

A concentração de fenitoína pode aumentar com a zidovudina e não se deve utilizar concomitantemente a estavudina e a ribovirina, pois estas substâncias diminuem a atividade da zidovudina.

3.5.1.6 Efeitos colaterais

Seus principais efeitos colaterais são dependentes da dose e do grau de progressão da doença (Fischl et al., 1987; Fischl et al., 1989; Kahn et al., 1992b; Yarchoan et al., 1989).

Os efeitos secundários mais freqüentes da zidovudina são leucopenia, neutropenia e anemia. Estas ocorrem com maior freqüência nos pacientes com AIDS do que naqueles tratados com ARV e em especial, em

pacientes com baixas contagens de células T4, inferiores a $100/\text{mm}^3$. A redução da dose ou suspensão do tratamento pode ser necessária. A incidência de neutropenia foi também aumentada em pacientes com neutropenia ou anemia preexistentes, naqueles com baixos níveis de vitamina B12 e nos que tomavam paracetamol concomitantemente. A ocorrência de toxicidade hematológica apresentou-se relacionada inversamente ao número de linfócitos CD4, hemoglobina e contagem de granulócitos, e diretamente relacionada à dose e duração do tratamento.

Podem ainda ocorrer desconforto abdominal, cefaléia, “rash” cutâneo, náuseas, vômitos, anorexia, atrofia muscular, prostração, fraqueza, confusão mental, hiperpigmentação das unhas, alterações do sabor, inchaço dos lábios e língua e feridas na boca.

Outros efeitos colaterais são convulsões, pigmentação da pele ou mucosa oral, pancitopenia, hepatomegalia, ansiedade, elevação das aminotransferases, acidose láctica com taquipnéia, febre, mialgia, parestesia e insônia.

O perfil completo dos efeitos secundários que podem ocorrer com o emprego da zidovudina não foi ainda bem definido, especialmente a longo prazo e nos casos mais avançados da doença.

3.5.1.7 Posologia

Para adultos recomenda-se usar 200 mg, 3 vezes ao dia (total de 600 mg).

Para crianças aconselham-se doses de 90 a $180 \text{ mg}/\text{m}^2$ de superfície corpórea, de 8 em 8 horas, sem exceder total diário de 600 mg.

Para recém-nascidos indica-se a dose de 2 mg/kg de peso, a cada 6 horas.

Estas doses podem mudar dependendo do estado geral do paciente, da reação frente ao tratamento e do aparecimento de reações adversas graves.

3.5.2 Propriedades físico-químicas (EUROPEAN Pharmacopeia, 1996; Merck, 1996; USP, 2000)

- Nome químico: 3'-Azido-3'-deoxitimidina;
- Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}N_5O_4$;
- Massa molecular: 267.244;
- É um pó cristalino branco a quase branco, praticamente inodoro, livre de partículas estranhas. Apresenta polimorfismo. Levemente solúvel em água, solúvel em etanol;
- Comprimento de onda máximo: 266,5 nm (em água);
- Ponto de fusão: 120-124°C.

3.6 Estavudina

A estavudina é um análogo insaturado de nucleosídeo, sintetizado por Horwitz et al., 1966. Apresenta atividade contra o HIV, *in vitro*, comparável a da zidovudina (Wong & Sawchuk, 1991). No entanto, sua toxicidade para as células de cultura, incluindo células progenitoras da medula óssea, é menor quando comparada ao AZT (Janiszewski et al., 1992; Kaul et al., 1989 Wong & Sawchuk, 1991).

Este fármaco pode ser administrado isoladamente ou em combinação com outros ARV utilizadas no tratamento da AIDS (Lacroix et al., 1990). Assim como a zidovudina é um análogo da timidina (Dudley et al., 1992).

3.6.1 Propriedades farmacológicas (DEF, 2000; Martindale & Reynolds, 1996)

3.6.1.1 Mecanismo de ação

A estavudina inibe a replicação *in vitro* do HIV em células humanas. É fosforilada pelas quinases celulares para trifosfato de estavudina, forma ativa do fármaco, que inibe a transcriptase reversa do HIV, através da competição com o substrato natural, o trifosfato de deoxitimidina.

Inibe também a síntese do DNA viral através da interrupção da cadeia de DNA devido à ausência do grupo 3'-hidroxil, que é necessário para a elongação do DNA. O trifosfato de estavudina inibe a beta e a gama polimerase do DNA celular e reduz acentuadamente a síntese de DNA mitocondrial. Sua atividade contra a alfa e a beta polimerase do DNA é 100 vezes menor que contra a transcriptase reversa do HIV.

3.6.1.2 *Farmacocinética*

A estavudina é rapidamente absorvida após administração oral. A biodisponibilidade absoluta média é de 86,4%. Os picos de concentração plasmática ocorrem após 1 hora ou menos da administração e aumentam de maneira relacionada à dose. Não foi observado acúmulo significativo de estavudina com administração repetida a cada 6, 8 ou 12 horas (Mansuri et al., 1989).

O volume médio aparente de distribuição após doses orais unitárias é de 66 litros, independente da dose. A estavudina não apresenta relação com os alimentos, podendo ser ingerida em jejum ou não. A ligação às proteínas séricas é desprezível. A estavudina é igualmente distribuída entre hemácias e o plasma. Após uma dose oral de 40 mg de estavudina administrada a pacientes saudáveis, a concentração média no líquido cérebro-espinhal foi de 63 ng/mL após 4 ou 5 horas a partir da administração. A proporção média entre a concentração no líquido cérebro-espinhal e a concentração plasmática foi de 40 %.

O metabolismo da estavudina no homem não foi elucidado. A meia-vida de eliminação terminal média é de 1,44 horas, após doses orais únicas, independente da dose. A eliminação renal é responsável pela eliminação de aproximadamente 40 % do *clearance* total. O *clearance* renal médio é aproximadamente o dobro do *clearance* de creatinina endógena média, indicando secreção tubular ativa além da filtração glomerular.

3.6.1.3 *Indicações*

A estavudina é indicada no tratamento de pacientes com infecção pelo HIV, fazendo parte de regimes de tratamento anti-retrovirais adequados.

3.6.1.4 *Contra-indicações*

A estavudina é contra-indicada a pacientes com hipersensibilidade ao fármaco. A maior toxicidade clínica da estavudina é neuropatia periférica relacionada à dose, que ocorre mais freqüentemente em pacientes com infecção pelo HIV em estágio avançado ou naqueles que tiveram neuropatia periférica anteriormente.

Assim como para outros análogos de nucleosídeos foram relatadas raras ocorrências de acidose láctica em pacientes recebendo estavudina, ocorrências estas que podem ser fatais, e em geral estão associadas com esteatose hepática grave. Não se sabe se estes eventos têm relação causal com os análogos de nucleosídeos; estas condições têm sido relatadas também como eventos relacionados à doença. Deve-se considerar a descontinuação do tratamento com análogos de nucleosídeos no caso da ocorrência de rápida elevação dos níveis de aminotransferase ou de ácido láctico.

Foram relatados casos de hepatite ou insuficiência hepática, fatais em alguns casos. Em pacientes com disfunção hepática pré-existente, deve ser considerados a interrupção do tratamento, com qualquer análogo de nucleosídeo, quando ocorrer a piora da doença hepática.

A estavudina pode ser usada durante a gravidez somente se os benefícios excederem os riscos potenciais. Não se sabe se a estavudina é secretada no leite materno.

3.6.1.5 *Interações medicamentosas*

A zidovudina pode inibir de forma competitiva a fosforilação intracelular da estavudina, portanto, não é recomendável o uso associado de zidovudina e estavudina.

Não foram observadas interações farmacocinéticas entre a estavudina e didanosina, lamivudina ou nelfinavir, quando co-administrados.

A estavudina não se liga a proteínas plasmáticas e não é esperado que afete a farmacocinética dos fármacos que se ligam a estas proteínas.

3.6.1.6 Efeitos colaterais

Os efeitos colaterais mais comuns são: neuropatia periférica (caracterizada por dormência, formigamento ou dor nos pés ou nas mãos), cefaléia, calafrios e febre, diarreia, erupção cutânea, náuseas, vômitos, dor abdominal, mialgia, insônia, anorexia, reação alérgica, pancreatite, acidose láctica e disfunção hepática.

3.6.1.7 Posologia

Para adultos com mais de 60 kg, recomenda-se usar 40 mg de estavudina, 2 vezes ao dia. Para adultos com menos de 60 kg, recomenda-se usar 30 mg de estavudina a cada 12 horas.

Para crianças com mais de 60 kg de peso, aconselha-se 40 mg a cada 12 horas e para crianças com peso entre 30 e 60 kg, aconselha-se 30 mg a cada 12 horas.

Para recém-nascidos indica-se a dose de 1 mg/kg de peso, a cada 12 horas.

3.6.2 Propriedades físico-químicas (EUROPEAN Pharmacopeia, 1996; Merck, 1996; USP, 2000)

- Nome químico: 2',3'-Didehidro-3'-deoxitimidina;
- Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}N_2O_4$;

- Massa molecular: 224.216;
- É um pó cristalino branco a quase branco, livre de partículas estranhas. Apresenta – se em três estados sólidos designados formas I, II e III. As formas I e II são polimorfos anidros, enquanto que a forma III é um hidrato (Gandhi et al., 2000). Bastante solúvel em água;
- Comprimento de onda máximo: 266 nm (em água);
- Ponto de fusão: 165-166°C.

3.7 Metodologia analítica para a determinação da zidovudina e estavudina

Muitos métodos para a determinação de zidovudina encontram-se disponíveis na literatura (*Tabela 2*). Este fármaco tem sido bastante estudado sob o ponto de vista farmacológico, sendo que a grande maioria dos trabalhos refere-se à sua determinação em fluídos biológicos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (Almudaris et al., 1995; Aymard et al., 2000; Frijus-Plessen et al., 1990, Kamali & Rawlins, 1990; Kupferschmidt & Schmid, 1989; Lacroix et al., 1990; Schrive & Plasse, 1994; Tan & Boudinot, 2000).

Na revisão da literatura efetuada para a estavudina, foram encontrados vários trabalhos que tratam da determinação deste fármaco em fluídos biológicos, utilizando principalmente CLAE com detecção no UV (*Tabela 3*).

Outros métodos também de grande importância para a determinação destes fármacos são a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectro de massa e os radioimunoensaios (RIA) (Pereira & Tidwell, 2001). Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre metodologias analíticas utilizando espectrofotometria direta no UV/VIS, tanto para a zidovudina como para a estavudina.

¹Tabela 2 – Métodos analíticos para a determinação de zidovudina.

Matriz	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL/min)	Deteção (nm)	TR (min.)	Ref.
Plasma	150x4 I.D. C18 (5µm)	ACN:K ₃ H ₂ PO ₄ 20 mmol/L pH = 2,7 (15:85)	0,4	267	16,80 (AZT) 9,30 (AZT-G)	57
Sangue/urina	Ultrasphere® ODS (3µm) 75x4,6 I.D.	A = H ₂ O:ACN:ac. tricloroacético (96:4:200µL/L) B = H ₂ O:ACN:ac. tricloroacético (90:10:15µL/L)	1,0	267	13,20 (AZT) 10,00 (AZT-G)	65
Plasma	µBondapak Phenyl 300x3.9 I.D. (10µm)	CH ₃ OH:tampão fosfato 0.005M pH = 5,0 (10:90)	1,0	265	7,00 (AMT)	15
Plasma	Apex Octyl 150x4,6 I.D. (5µm)	CH ₃ OH: CH ₃ COONH ₄ 0.01M pH = 5,0:DOSS 0.25M (60:40:4)	1,0	265	9,00 (AMT)*	16
Plasma	Hypersil NC-04 250x4 I.D. (5µm)	CH ₃ COONa (1.4 g/L): CH ₃ OH (80:20) pH 6,55	1,0	267	~9,00	35
Solução padrão	LiChrospher® 100 C18 250x4 (5µm)	CH ₃ OH:KH ₂ PO ₄ 1mM (95:5) pH = 2,4	1,5	267	~10,00	2
Sangue	Supelcosil® LC8 150 cm	170 mL/L ACN:15 mmol/L fosfato pH = 7,5	1,5	266	4,40	86
Sangue	Partisil® 5 ODS -3 200x4	ACN:tampão fosfato pH = 6,2 (13:87)	1,0	267	~8,00	62
Plasma/urina	Novapak RP18 300x3 I.D. (4µm)	CH ₃ OH:THF:tampão KH ₂ PO ₄ 0.025M pH = 3,1 (3.7:2.8:93.5)	1,0	270	11,70 (AZT-G) 16,80 (AZT)	100
Xarope	µBondapak® C18 300x3.9 (10µm)	ACN:H ₂ PO ₄ 0.2% gradiente	1,2 – 1,8	264	7,80	96
Plasma	Hypersil® ODS 150x4.6 (5µm)	ACN:tampão fosfato (2.9:7.1) pH = 7,5	1,5	267	7,20 (AZTMP) 12,60 (AZT)	109
Plasma	Ultrasphere ODS 75x4.6 I.D. (3µm)	tampão fosfato 25 mM pH = 6,55:ACN gradiente	1,0	266	3,60 (AZT) 5,00 (AZT-G)	87
Plasma	Novapak® C8 150x3.9 I.D. (5µm)	Tampão NaH ₂ PO ₄ 20 mM:ACN (86:14) pH = 3,2	1,0	265	3,10	30
Sangue	Luna® C ₁₈ 150x4,6	H ₂ O:ACN gradiente	0,85	250	~11,50	103
MP/Cápsulas	Octadecylsilyl 250x4	CH ₃ OH:H ₂ O (20:80)	1,0	265	0,20 (timina) 1,00 (AZT)	115
Xarope	Octadecylsilyl 125x4	CH ₃ COONa 0.04 M: CH ₃ OH:ACN:CH ₃ COOH (900:90:10:2)	1,0	240	0,12 (timina) 1,00 (AZT)	115

Continua

MP***	Octadecylsilyl sílica gel 250x4,6 (5µm)	CH ₃ OH:H ₂ O (20:80)	1,2	265	—	29
-------	--	---	-----	-----	---	----

* TR = tempo de retenção.

** Não apresentou interferentes no mesmo TR.

*** MP = matéria-prima.

Tabela 3 – Métodos analíticos para a determinação de estavudina.

Matriz	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL/min)	Detecção (nm)	TR* (min.)	Ref.
Sangue	Supelcosil® LC ₁₈ 250 cm	40 mL/L ACN: 10 mmol/L fosfato pH = 6,9	1,5	248	22,20	86
Plasma	µBondapak® Phenyl 300x3.9 I.D. (10µm)	Tampão fosfato 0.005M pH =6,8:CH ₃ OH (90:10)	1,0	265	9,00(D4T) ~11,00 (AZT)	15
Plasma/ urina	Supelcosil® C ₁₈ 150x4,6 I.D. (5µm)	NH ₄ H ₂ PO ₄ 10 mM pH = 4,6:ACN (93.5:6.5)	0,75	264	9,76 (Plasma) 9,68 (urina)	119
Plasma/ urina	Apex octadecyl 250x4.6 I.D. (5µm)	NH ₄ H ₂ PO ₄ 10mM: ACN:TEA 7.2 mM (9:1) pH = 2,5	0,8	266	7,00 (plasma) 7,50 (urina)	53
Plasma	Apex octadecyl 250x4,6 I.D.(5µm)	CH ₃ OH:KH ₂ PO ₄ 0.05 M (20:80)	1,0	254	6,13	58
Sangue	Luna® C ₁₈ 150x4,6	H ₂ O:ACN gradiente	0,85	250	~11,50	103
Plasma/ urina	Nova pak® C ₁₈ 150x3,9 (5-m).	ACN:KH ₂ PO ₄ 10mM (3:97) + 1% de TEA pH 2,5	1,0	266	8,50	99

* TR = tempo de retenção.

3.8 Estudos de estabilidade

3.8.1 Introdução

Quando um fármaco ou princípio ativo é alterado (por dissolução, pulverização ou adição de excipientes) ou o ambiente do fármaco é modificado por mudanças nas condições de estocagem, a estabilidade do fármaco pode ser afetada (Connors et al., 1986).

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (Vadas, 2000). Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquele que sua potência está reduzida de não mais do que 10 %, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos. Caso contrário, a estabilidade de um medicamento será o período de tempo compreendido entre o momento de preparação e aquele no qual se detectam os primeiros produtos de alteração. (Casadio, 1972)

Vários fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, incluindo a estabilidade de matérias-primas ativas, o potencial de interação entre matéria-prima ativa e inativa, o processo de fabricação, a forma farmacêutica, a embalagem e condições ambientais encontradas durante o transporte, a estocagem o manuseio e a duração do tempo entre a produção e distribuição do medicamento (Vadas, 2000).

As alterações podem ser rápidas ou lentas, podendo refletir ou não nas características organolépticas. Estas alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade ou à formação de produtos cuja toxicidade é elevada. A partir dos dados obtidos com relação às modificações como, alterações de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco e presença de produtos de degradação é possível, com boa margem de segurança, estabelecer um prazo mínimo de validade, no qual a formulação será estável (Carstensen, 1990; Connors et al., 1986; Pope, 1980)

A temperatura pode acelerar a maioria dos processos que produzem degradação de fármacos e das preparações farmacêuticas e esta é a base de grande parte dos métodos de envelhecimento artificial (Dagar, 1990; Vadas, 2000)

A estabilidade sempre pode ser aumentada pela diminuição da temperatura, mas as formulações não devem ser congeladas sem um teste preliminar que mostre que o congelamento não deteriora o princípio ativo (Connors et al., 1986).

3.8.2 Metodologia para o estudo de estabilidade

3.8.2.1 Cinética

Os termos estudo de estabilidade e estudos de cinética são muitas vezes considerados idênticos, porém isto não é verdade.

Estudos de cinética pura são executados em sistemas homogêneos, com o mínimo possível de constituintes, todos os materiais são da maior ordem de pureza, com recipientes impermeáveis e inertes.

Ao contrário, as fórmulas farmacêuticas são freqüentemente heterogêneas, contendo grande número de ingredientes com pureza apenas aceitável. As embalagens nem sempre são impermeáveis à umidade e sempre é possível um grande número de interações, uma vez que o material de acondicionamento faz parte da fórmula farmacêutica. Estudos à temperatura e umidade alta e também à temperatura ambiente são executados em estufas e em recintos com gradiente de temperatura usualmente não aceitável em estudos de cinética pura.

As reações de degradação do princípio ativo em formulações farmacêuticas ocorrem com velocidades definidas e são de natureza química. Os principais fatores que influenciam a velocidade de degradação são concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiações e catálise (Nudelman, 1975).

3.8.2.2 Ordem das reações

Ordem de reação é a soma dos expoentes dos termos de concentração que comparecem na forma diferencial da lei de velocidade. A ordem da reação é uma grandeza experimental que é determinada a partir da lei de velocidade da reação química. As leis de velocidade são obtidas experimentalmente, de modo geral, medindo-se as concentrações de amostras retiradas no decorrer da reação química.

Para a maioria dos casos a degradação das substâncias ocorre de acordo com reações de ordem zero, primeira ordem ou pseudoprimeira ordem, mesmo que muitas das substâncias se degradem por mecanismos complexos (Lachman et al., 2001).

3.8.2.3 Métodos para determinação da ordem das reações

a) Método de substituição: determinam-se experimentalmente as concentrações remanescentes dos produtos em estudo após vários tempos de armazenagem. De posse destes dados, faz-se a sua substituição nas diversas equações que definem as várias ordens de reação. Obtêm-se assim, diversas velocidades específicas de decomposição k para cada valor de concentração e tempo. A ordem de reação é dada pela equação para a qual os valores calculados de k permanecem constantes, dentro dos limites de erro dos métodos usados, para cada substituição dos dados obtidos experimentalmente da reação.

b) Método gráfico: representam-se graficamente os valores experimentais obtidos das concentrações em função do tempo gasto para os atingir. Quando se obtém uma reta ao relacionar as concentrações e tempos, a reação é de ordem zero, se para obter uma reta é necessário relacionar o logaritmo da concentração remanescente e o tempo, a reação é de primeira ordem; finalmente quando se relaciona o inverso das concentrações e o tempo, obtendo-se uma relação linear, a reação é de segunda ordem.

3.8.2.4 Métodos químicos utilizados em estudos de estabilidade

Os ensaios químicos devem estabelecer se as substâncias contidas nas amostras, conservadas em condições adequadas, permanecem inalteradas ou se parcial ou totalmente alteradas. Para isso é necessário identificar a substância e verificar se não há formação de produtos que inicialmente não existiam. Em seguida é necessária a determinação quantitativa das substâncias em ensaio e, se possível, seus produtos de degradação. Uma técnica insubstituível para identificação completa das substâncias inalteradas e de seus possíveis produtos de alteração é a

cromatografia em camada delgada. Os métodos de análises quantitativas devem ser, por sua vez, muito específicos de maneira a poderem distinguir entre o fármaco inalterado e o produto de degradação. Um método que não garante esta diferenciação não serve para verificar se um medicamento é estável. Métodos de análise específicos podem ser conseguidos empregando-se técnicas como cromatografia em papel ou coluna, cromatografia preparativa em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta e infravermelho e ressonância magnética nuclear (Connors et al., 1986).

É sempre recomendável antes de se tirar conclusões sobre a estabilidade fornecida pelos dados experimentais de laboratório, determinar a precisão dos métodos através de estatística. Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um produto farmacêutico. Cada componente quer terapeuticamente ativo ou inativo, dependendo da dosagem pode afetar a estabilidade. Outros fatores, chamados extrínsecos como a temperatura, radiação, luz, ar (especificamente o oxigênio, dióxido de carbono e vapores de água), umidade e local de acondicionamento, também alteram a estabilidade. Há também os fatores intrínsecos como: incompatibilidades, pH, hidrólise, racemização e oxidação (USP, 1994).

3.8.2.5 Estudo de estabilidade acelerada

São os estudos destinados a aumentar a velocidade de degradação química e a modificação física de uma substância e/ou alterações características da forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (Brasil, 2001; USP, 1994).

Já a estabilidade a longo prazo é empregada para confirmar os resultados obtidos nos estudos de degradação acelerada. A partir destes resultados é possível estabelecer os prazos de validade e determinar as condições de armazenamento.

O controle da estabilidade pode ser feito através de estudos preliminares e acelerados. De acordo com a resolução GMC 53/96 do Mercosul, 1999; ICH, 1999; Moretto, 1999; Singh, 1999, o programa de estudo de estabilidade deve levar em consideração o mercado para o qual está destinado o produto e as zonas climáticas em que será utilizado. O Brasil se enquadra na zona climática IV que é definida como quente e úmida. As condições de armazenamento são 30 °C - 70% de umidade relativa (UR) para estudos a longo prazo (12 meses) e para estudos acelerados; as condições forçadas de armazenamento são 40 ± 2 °C – $75 \pm 5\%$ de UR para 6 meses ou 50 ± 2 °C – $90 \pm 5\%$ de UR para 3 meses de estudo (GMC 53/96, 1999). Todos esses ensaios deverão ser feitos com produtos do mesmo lote ou lotes diversos, mas com substâncias obtidas pelo mesmo processo de síntese. Esses ensaios podem dar informações sobre a vida média e possíveis alterações do medicamento, permitindo a seleção de melhores formulações.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu;
- Espectrofotômetro IV – 120 Bomen;
- Balança analítica Mettler-Toledo, capacidade 210g, precisão $\pm 0,0001\text{g}$;
- Banho de ultra-som Thorton, modelo T-14;
- Aparelho para determinação do ponto de fusão SMP1 Stuart Scientific;
- Termohigrômetro Oregon Scientific®;
- Cromatógrafo a líquido Varian® modelo 5000 contendo válvula giratória de injeção, modelo 7125, Rheodyne® com “loop” fixo de 20 μL ;
- Detector de ultravioleta variável, Varian® modelo 4000;
- Integrador Varian® modelo 4400;
- Coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP – 18 (5 μm), medindo 4 mm X 12,5 cm;
- Estufa FABBE regulada a 40 °C;
- Estufa FABBE regulada a 50 °C;
- Medidor de pH DM 21 Digimed® TE 901;

- Sistema de filtração a vácuo;
- Sistema Millipore® de purificação de água MilliQ-Plus®.

4.1.2 Solventes, reagentes e outros materiais

- Água purificada obtida pelo Sistema MilliQ-Plus, Millipore®;
- Metanol grau cromatográfico Merck®;
- Acetato de amônio ACS Merck®;
- Acetato de sódio p.a. Synth®;
- Brometo de potássio p.a. Merck®;
- Cloreto de potássio p.a. Synth®;
- Ácido acético glacial 100 % p.a. Merck®;
- Membrana de filtro hidrofílico Durapore® PVDF 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm, Millipore®;
- Unidade filtrante HV Millex em polietileno com membrana Durapore® 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm não estéril, Millipore®;
- Potes de plástico de polietileno;
- Frascos de vidro âmbar;
- Filtro de vidro;
- Papel de filtro quantitativo;
- Materiais de vidraria.

4.1.3 Padrões

A zidovudina e a estavudina foram gentilmente cedidas pela Fundação para o Remédio Popular (FURP) e empregadas como substâncias químicas de referência sem ulterior purificação.

A timina é procedente da Research Chemicals Ltda.

4.1.4 Amostras

- Zidovudina em cápsulas de 100 mg (Fabricante A);
- Solução oral de zidovudina a 1% (Fabricante A);
- Estavudina em cápsulas de 40 mg (Fabricante A);
- Estavudina em cápsulas de 40 mg (Fabricante B).

4.1.5 Placebos

Os placebos, cápsulas de zidovudina e estavudina e zidovudina solução oral foram gentilmente cedidas pela Fundação para o Remédio Popular.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação do ponto de fusão e espectros no IV dos padrões secundários

As matérias-primas utilizadas como padrões secundários não compendiais foram testadas, procedendo-se à determinação dos pontos de fusão e a obtenção dos espectros no infravermelho.

Para a determinação do ponto de fusão, capilares que continham as amostras, foram aquecidos até a temperatura de fusão das amostras. Este teste foi realizado em duplicata. Os resultados estão apresentados na *Tabela 8*.

A identificação no infravermelho foi realizada como descrito na Farmacopéia Americana 24.ed, 2000, utilizando pastilhas de brometo de potássio. Os espectros no infravermelho da zidovudina, da estavudina e da timina estão apresentados nas *Figuras 8, 9 e 10*.

4.2.2 Padrões de referência

As soluções estoque dos padrões de zidovudina foram preparadas analiticamente numa concentração de 1,5 e 1,0 mg/mL, utilizando metanol como solvente e armazenada em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As soluções intermediárias de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque até concentrações finais de 15,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

As soluções estoque dos padrões de estavudina foram preparadas analiticamente numa concentração de 0,5 e 1,0 mg/mL, utilizando água como solvente e armazenada em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As soluções intermediárias de trabalho foram preparadas a partir de diluições da solução estoque até uma concentração final de 12,0 e 40,0 $\mu\text{g/mL}$.

Para a solução oral a solução estoque do padrão de zidovudina foi preparada analiticamente numa concentração de 1,0 mg/mL, utilizando acetato de amônio:metanol (75:25) pH 5, como solvente.

As soluções intermediárias de trabalho foram preparadas a partir de diluições da solução estoque até uma concentração final de 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

A solução estoque do padrão de timina foi preparada analiticamente numa concentração de 1,0 mg/mL, utilizando metanol como solvente e armazenada em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As soluções intermediárias de trabalho foram preparadas a partir de diluições da solução estoque até uma concentração final de 2,0 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.3 Preparação das soluções padrão de zidovudina

4.2.3.1 Para a análise espectrofotométrica

Foram pesados cerca de 150,0 mg de zidovudina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Após a adição de 50 mL de metanol, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com metanol. Foi transferida alíquota de 10,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água destilada purificada, obtendo-se solução contendo 150,0 μg de zidovudina/mL.

4.2.3.2 Para a análise cromatográfica

Para as cápsulas, foram pesados cerca de 100,0 mg de zidovudina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Após a adição de 50 mL de metanol, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com metanol obtendo-se solução contendo 1000,0 μg de zidovudina /mL.

Para a análise da solução oral, foi pesada a mesma quantidade de zidovudina, obtendo-se solução contendo 1000,0 µg de zidovudina /mL. No entanto, o padrão foi diluído desde a primeira pesagem com uma mistura de acetato de amônio e metanol 75:25 ajustado com ácido acético glacial a pH 5.

4.2.4 Preparação das soluções padrão de estavudina

4.2.4.1 Para a análise espectrofotométrica

Foram pesados cerca de 100,0 mg de estavudina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Após a adição de 50 mL de água, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com água. Foi transferida alíquota de 10,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água destilada purificada, obtendo-se solução contendo 100,0 µg de estavudina/mL.

4.2.4.2 Para a análise cromatográfica

Para as cápsulas, foram pesados cerca de 50,0 mg de estavudina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Após a adição de 50 mL de água, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com água, obtendo-se solução contendo 500,0 µg de estavudina/mL.

4.2.5 Preparação das soluções padrão de timina

Foram pesados cerca de 100,0 mg de timina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Após a adição de 50 mL de metanol, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com metanol. Foi transferida alíquota de 1,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão foi completado com metanol, obtendo-se solução contendo 20,0 µg de timina/mL.

Para a análise da zidovudina foi transferida uma alíquota de 10,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com uma mistura de metanol e água 25:75, obtendo-se solução contendo 2,0 µg de timina/mL.

Para a análise da estavudina foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão foi completado com água, obtendo-se solução contendo 0,8 µg de timina/mL.

4.2.6 Preparação das soluções de amostras

4.2.6.1 Cápsulas de zidovudina – para a análise espectrofotométrica

O primeiro passo foi determinar o peso médio de 20 cápsulas de zidovudina contendo 100 mg/cápsula. O valor encontrado foi 164,03 mg.

Foi pesado o equivalente a 150,0 mg de zidovudina (246,05 mg do pó) e transferido para balão volumétrico de 100 mL. Após adição de 50 mL de, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 30 minutos. O volume foi completado com metanol. Esta solução foi filtrada em papel de filtro

quantitativo, desprezando-se os primeiros 10 mL da solução. Foi transferida alíquota de 10,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água purificada, obtendo-se soluções contendo 150,0 µg de zidovudina /mL.

4.2.6.2 Cápsulas de zidovudina – para a análise cromatográfica

Foi pesado o equivalente a 100,0 mg de zidovudina e transferido para balão volumétrico de 100 mL. Após adição de 50 mL de metanol, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 30 minutos. O volume foi completado com metanol obtendo-se soluções contendo 1000,0 µg de zidovudina /mL.

4.2.6.3 Solução oral a 1 % – para a análise espectrofotométrica

Através de informações presentes no rótulo da solução oral, sabe-se que cada mL da solução contém 10,0 mg de zidovudina. Foram pipetados volumetricamente 15,0 mL da solução oral e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água purificada. Foi transferida alíquota de 10,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água destilada purificada, obtendo-se solução contendo 150,0 µg de zidovudina /mL.

4.2.6.4 Solução oral a 1 % – para a análise cromatográfica

Foram pipetados volumetricamente 10,0 mL da solução oral e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com uma mistura de acetato de amônio e metanol (75:25) pH 5 ajustado

com ácido acético glacial obtendo-se solução contendo 1000,0 µg de zidovudina /mL.

4.2.6.5 Cápsulas de estavudina – para a análise espectrofotométrica

O primeiro passo foi determinar o peso médio de 10 cápsulas de estavudina contendo 40 mg/cápsula. O valor encontrado foi 301,86 mg, para as cápsulas do fabricante A e 373,94 mg, para as cápsulas do fabricante B.

Foi pesado o equivalente a 50,0 mg de estavudina (377,33 mg do pó) e transferido para balão volumétrico de 50 mL. Após adição de 50 mL de água, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 30 minutos. O volume foi completado com água purificada. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, desprezando-se os primeiros 10 mL da solução. Foi transferida alíquota de 10,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água purificada, obtendo-se solução contendo 100,0 µg de estavudina/mL.

4.2.6.6 Cápsulas de estavudina – para a análise cromatográfica

Foi pesado o equivalente a 50,0 mg de estavudina e transferido para balão volumétrico de 100 mL. Após adição de 50 mL de água, a solução foi agitada em banho de ultra-som por 30 minutos. O volume foi completado com água purificada obtendo-se solução contendo 500,0 µg de estavudina/mL.

4.2.7 Espectrofotometria no ultravioleta/visível

As análises por espectrofotometria no UV/VIS foram realizadas obedecendo-se as seguintes condições: limite de absorbância de 0,2 a 1,2, cubeta de quartzo de 1 cm e água purificada como solvente.

As curvas de calibração foram construídas utilizando os padrões secundários. As amostras de cápsulas, após pesagem e adição de água, foram agitadas no ultra-som por 30 minutos para solubilização dos princípios ativos. Depois que o volume foi completado, procedeu-se à filtração em papel de filtro quantitativo e obtiveram-se soluções testes contendo 15,0 µg de zidovudina/mL e 12,0 µg de estavudina/mL.

4.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência

A metodologia validada tanto para as cápsulas, como para solução oral seguiu os seguintes parâmetros cromatográficos:

1. Coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP – 18 (5µm), medindo 4 mm x 12,5 cm, em LiChroCART®;
2. Vazão: 1,0 mL/min;
3. Temperatura: considerou-se a temperatura do local de trabalho 24°C ± 1°C;
4. Volume de injeção: 20µL;
5. Detecção: 265 e 264 nm, para cápsulas e solução oral, de zidovudina, respectivamente e 266 nm, para cápsulas de estavudina;
6. Fase móvel: metanol e água (25:75 v/v), para cápsulas de zidovudina e acetato de amônio e metanol (75:25 v/v) pH 5 ajustado com ácido acético

glacial, para solução oral. Para cápsulas de estavudina utilizou-se como fase móvel metanol e água (15:85 v/v). Todas as fases móveis foram filtradas em membrana Millipore® de 0,45 µm e degaseificadas antes do uso.

4.2.9 Construção das curvas de calibração

4.2.9.1 Zidovudina – análise espectrofotométrica

A curva de calibração foi construída com a solução padrão numa concentração média de 15,0 µg de zidovudina/mL. A concentração da zidovudina foi determinada através de valores mencionados na literatura (USP, 2000).

A partir destes dados construiu-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de zidovudina (6,0, 9,0, 12,0, 15,0, 18,0, 21,0, 24,0 e 30,0 µg/mL). Determinou-se a melhor curva de calibração utilizando-se oito concentrações de maneira que correspondessem entre 0,2 a 1,2 de absorbância, no comprimento de onda de 266 nm.

Os valores de absorbância foram lidos em triplicata. A curva foi construída, relacionando-se a absorbância média das três leituras contra a concentração em cada nível. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação, parâmetros estes, importantes para a validação do método (Jenke, 1996). O cálculo da curva foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2001). Para cada concentração foram calculadas as médias das leituras, o desvio padrão e o coeficiente de variação, sendo que este último não deve ser maior do que 2% (Jenke, 1996).

4.2.9.2 Zidovudina - análise cromatográfica

As curvas de calibração foram construídas com a solução padrão de zidovudina numa concentração média de 100,0 µg de zidovudina/mL.

A partir deste valor construiu-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de zidovudina (70,0, 80,0, 90,0, 100,0, 110,0, 120,0, 130,0 e 150,0 µg/mL). Determinou-se a melhor curva de calibração utilizando-se oito diferentes concentrações.

Cada concentração foi analisada em triplicata. As curvas foram construídas, relacionando-se a área média das três injeções contra a concentração em cada nível. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação. O cálculo da curva foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2001). Para cada concentração foram calculadas as médias das injeções, o desvio padrão e o coeficiente de variação, sendo que este último não deve ser maior do que 2% (Jenke, 1996).

4.2.9.3 Estavudina - análise espectrofotométrica

A curva de calibração foi construída com a solução padrão numa concentração média de 12,0 µg de estavudina/mL.

A partir deste dado construiu-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de estavudina (8,0, 10,0, 12,0, 14,0, 16,0, 18,0, 20,0 e 22,0 µg/mL). Determinou-se a melhor curva de calibração utilizando-se oito concentrações de maneira que corresponderem entre 0,2 a 1,0 de absorbância, no comprimento de onda de 266 nm.

Os valores de absorvância foram lidos em triplicata. A curva foi construída, relacionando-se a absorvância média das três leituras contra a concentração em cada nível. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação. O cálculo da curva foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2001). Para cada concentração foram calculadas as médias das leituras, o desvio padrão e o coeficiente de variação, sendo que este último não deve ser maior do que 2% (Jenke, 1996).

4.2.9.4 Estavudina - análise cromatográfica

As curvas de calibração foram construídas com a solução padrão de estavudina numa concentração média de 60,0 µg de estavudina/mL.

A partir deste valor construiu-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de estavudina (30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 80,0, 90,0 e 100,0 µg/mL). Determinou-se a melhor curva de calibração utilizando-se oito diferentes concentrações.

Cada concentração foi injetada em triplicata. As curvas foram construídas, relacionando-se a área média das três injeções contra a concentração em cada nível. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação. O cálculo da curva foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2001). Para cada concentração foram calculadas as médias das injeções, o desvio padrão e o coeficiente de variação, sendo que este último não deve ser maior do que 2% (Jenke, 1996).

4.2.9.5 Timina - análise cromatográfica simultânea com a zidovudina

A curva de calibração foi construída com a solução padrão de timina numa concentração média de 2,0 µg de timina/mL.

A partir deste valor construiu-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de timina (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0 µg/mL). Determinou-se a melhor curva de calibração utilizando-se oito diferentes concentrações, para as cápsulas e sete diferentes concentrações para a solução oral.

Cada concentração foi injetada em triplicata. A curva foi construída, se relacionado à área média das três injeções contra a concentração em cada nível. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação. O cálculo da curva foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2001). Para cada concentração foram calculadas as médias das injeções, o desvio padrão e o coeficiente de variação, sendo que este último não deve ser maior do que 2% (Jenke, 1996).

4.2.9.6 Timina - análise cromatográfica simultânea com a estavudina

A curva de calibração foi construída com a solução padrão de timina numa concentração média de 0,8 µg de timina/mL.

A partir deste valor construiu-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de timina (0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 e 2,0 µg/mL). Determinou-se a melhor curva de calibração utilizando-se sete diferentes concentrações.

Cada concentração foi injetada em triplicata. A curva foi construída, relacionando-se a área média das três injeções contra a concentração em cada nível. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação. O cálculo da curva foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2001). Para cada concentração foram calculadas as médias das injeções, o desvio padrão e o coeficiente de variação, sendo que este último não deve ser maior do que 2% (Jenke, 1996).

4.3 Validação do método espectrofotométrico e cromatográfico na determinação da zidovudina em cápsulas e solução oral e da estavudina em cápsulas

4.3.1 Pesquisa de interferentes dos excipientes a partir dos placebos: seletividade/ especificidade

Os termos seletividade e especificidade são freqüentemente intercambiáveis. A especificidade é a habilidade de avaliar inequivocadamente o analito na presença de compostos externos, enquanto que a seletividade inclui a habilidade de separar o analito de produtos de degradação, metabólitos e fármacos co-administrados (Bressolle et al., 1996; INMETRO, 2002).

Existe uma variedade de métodos para validar a seletividade. Um teste simples para análise cromatográfica que é demonstrar a falta de resposta de um placebo. O analito não deverá apresentar interferência de componentes externos e devem ter uma boa resolução entre eles (FDA, 1994).

Com o objetivo de averiguar se há interferência dos excipientes no método proposto, os placebos das cápsulas e da solução oral foram submetidos às mesmas condições analíticas empregadas nas amostras. Este teste é realizado para constatar-se a especificidade do método.

4.3.2 Teste de precisão através da repetibilidade

4.3.2.1 Zidovudina – análise espectrofotométrica

Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução padrão contendo 150,0 µg de zidovudina/mL para três balões volumétricos de 50 mL. Os volumes dos balões foram completados com água, obtendo-se soluções contendo 15,0 µg de zidovudina/mL. Procedeu-se a leitura de cada solução padrão.

Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL das soluções das amostras contendo 150,0 µg de zidovudina/mL, para dez balões volumétricos de 50 mL. Os volumes dos balões foram completados com água, obtendo-se soluções contendo 15,0 µg de zidovudina/mL. Procedeu-se a leitura, em triplicata, de cada solução, no comprimento de onda de 266 nm.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.2.2 Cápsulas de zidovudina – análise cromatográfica

Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução padrão contendo 1000,0 µg de zidovudina/mL para três balões volumétricos de 50 mL e

alíquotas de 5,0 mL da solução padrão contendo 20,0 µg de timina/mL para os mesmos balões. Os volumes dos balões foram completados com uma mistura de metanol e água (25:75), obtendo-se soluções contendo 100,0 µg de zidovudina/mL e 2,0 µg de timina/mL. Procedeu-se à filtração e injeção de cada solução padrão em triplicata.

A solução amostra contendo 1000,0 µg de zidovudina/mL foi filtrada em papel de filtro quantitativo, desprezando-se os primeiros 10 mL da solução.

Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução de amostra contendo 1000,0 µg de zidovudina/mL, para dez balões volumétricos de 50 mL. Os volumes dos balões foram completados com uma mistura de metanol e água (25:75), obtendo-se soluções contendo 100,0 µg de zidovudina/mL. Procedeu-se à filtração e injeção, em triplicata, de cada solução, no comprimento de onda de 265 nm.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.2.3 Solução oral a 1 % de zidovudina – análise cromatográfica

Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução padrão contendo 1000,0 µg de zidovudina/mL para três balões volumétricos de 50 mL e alíquotas de 5,0 mL da solução padrão contendo 20,0 µg de timina/mL para os mesmos balões. Os volumes dos balões foram completados com uma mistura de acetato de amônio e metanol (75:55) pH 5, obtendo-se soluções contendo 100,0 µg de zidovudina/mL e 2,0 µg de timina/mL. Procedeu-se à filtração e injeção de cada solução padrão em triplicata.

Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução da amostra contendo 1000,0 µg de zidovudina/mL, para dez balões volumétricos de 50

mL. Os volumes dos balões foram completados com uma mistura de acetato de amônio e metanol (75:55) pH 5, obtendo-se soluções contendo 100,0 µg de zidovudina/mL. Procedeu-se a leitura, em triplicata, de cada solução, no comprimento de onda de 264 nm.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.2.4 Estavudina – análise espectrofotométrica

Foram transferidas alíquotas de 3,0 mL da solução padrão contendo 100,0 µg de estavudina/mL para três balões volumétricos de 25 mL. Os volumes dos balões foram completados com água, obtendo-se soluções contendo 12,0 µg de estavudina/mL. Procedeu-se a leitura de cada solução padrão.

Foram transferidas alíquotas de 3,0 mL das soluções de amostras contendo 100,0 µg de estavudina/mL, para dez balões volumétricos de 25 mL. Os volumes dos balões foram completados com água, obtendo-se soluções contendo 12,0 µg de estavudina/mL. Procedeu-se a leitura, em triplicata, de cada solução, no comprimento de onda de 266 nm.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.2.5 Estavudina – análise cromatográfica

Foram transferidas alíquotas de 3,0 mL da solução padrão contendo 500,0 µg de zidovudina/mL para três balões volumétricos de 25 mL e

alíquotas de 1,0 mL da solução padrão contendo 20,0 µg de timina/mL para os mesmos balões. Os volumes dos balões foram completados com água, obtendo-se soluções contendo 60,0 µg de estavudina/mL e 0,8 µg de timina/mL. Procedeu-se à filtração e injeção de cada solução padrão em triplicata.

A solução amostra contendo 500,0 µg de estavudina/mL foi filtrada em papel de filtro quantitativo, desprezando-se os primeiros 10 mL da solução.

Foram transferidas alíquotas de 3,0 mL da solução amostra contendo 500,0 µg de estavudina/mL, para dez balões volumétricos de 25 mL. Os volumes dos balões foram completados com água, obtendo-se soluções contendo 60,0 µg de estavudina/mL. Procedeu-se a leitura, em triplicata, de cada solução, no comprimento de onda de 266 nm.

Os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.3 Determinação de exatidão do método através de teste de recuperação

A exatidão é medida como a proximidade entre o valor real e o valor teórico (AOAC, 2002; AOAC, 1991; Green, 1996; ICH Q2b, 1994; Jenke, 1996; FDA, 1994, USP, 2000).

A exatidão pode ser determinada por quatro diferentes métodos (Green, 1996; Polesello, 1997). Pelo primeiro método pode-se avaliar a exatidão por análise da amostra de concentração conhecida comparando-se o valor mensurado com o valor teórico. O segundo método consiste na

comparação entre os resultados, obtidos com novo método com os provenientes utilizando-se um método alternativo, que já é conhecidamente exato. O terceiro e quarto métodos estão baseados na recuperação de amostras conhecidas do analito adicionadas a uma matriz. Essa matriz pode ser um placebo ou não. Se a adição é feita numa matriz que não seja o placebo esta técnica é denominada de adição de padrão.

O teste de recuperação é efetuado para comprovar-se a exatidão do método. Consiste em adicionar à amostra quantidades conhecidas da substancia padrão, empregando-se em seguida o método proposto de análise (Green, 1996; ICH Q2b, 1994; BRASIL, 2001, USP, 2000).

4.3.3.1 Zidovudina – análise espectrofotométrica

Foram transferidas alíquotas das amostras e da solução padrão para balões volumétricos de 50 mL, conforme o esquema da *Tabela 4*. Os volumes dos balões foram completados com água. Todas as soluções foram preparadas de forma que as concentrações lidas sempre estivessem dentro da faixa da curva padrão.

A porcentagem de recuperação foi calculada seguindo-se as recomendações da *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC), 1991 e *International Conference on Harmonization* (ICH), 1994.

Tabela 4 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação

Balão volumétrico	Volume adicionado de amostra em mL	Concentração da amostra em mg/mL	Volume adicionado de padrão em mL	Concentração do padrão em mg/mL	Concentração final da solução em mg/mL
P	-----	-----	5,0	15,0	15,0
A	5,0	15,0	-----	-----	-----
1	5,0	15,0	1,0	3,0	18,0
2	5,0	15,0	2,0	6,0	21,0
3	5,0	15,0	3,0	9,0	24,0
4	5,0	15,0	4,0	12,0	27,0
5	5,0	15,0	5,0	15,0	30,0

Os volumes foram então, completados com água, e em seguida procedeu-se à leitura das soluções em 266 nm.

4.3.2.2 Zidovudina – análise cromatográfica

Foram transferidas alíquotas das amostras e da solução padrão para balões volumétricos de 50 mL, conforme o esquema da *Tabela 5*. Os volumes dos balões foram completados com metanol e água (25:75), para cápsulas e com acetato de amônio e metanol (75:25) pH 5 para a solução oral. Todas as soluções foram preparadas de forma que as concentrações lidas estivessem sempre dentro da faixa da curva padrão.

Tabela 5 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação

Balão volumétrico	Volume adicionado de amostra em mL	Concentração da amostra em mg/mL	Volume adicionado de padrão em mL	Concentração do padrão em mg/mL	Concentração final da solução em mg/mL
P	-----	-----	5,0	100,0	100,0
A	5,0	100,0	-----	-----	-----
1	5,0	100,0	0,5	10,0	110,0
2	5,0	100,0	1,0	20,0	120,0
3	5,0	100,0	1,5	30,0	130,0
4	5,0	100,0	2,0	40,0	140,0
5	5,0	100,0	2,5	50,0	150,0

Os volumes foram então, completados com as respectivas fases móveis selecionadas para cápsulas e solução oral, e em seguida procedeu-se à filtração e injeção das soluções em 265 e 264 nm, para cápsulas e solução oral, respectivamente.

4.3.2.3 Estavudina – análise espectrofotométrica

Foram transferidas alíquotas das amostras e da solução padrão para balões volumétricos de 50 mL, conforme o esquema da *Tabela 6*. Os volumes dos balões foram completados com água. Todas as soluções foram preparadas de forma que as concentrações lidas sempre estivessem dentro da faixa da curva padrão.

Tabela 6 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação

Balão volumétrico	Volume adicionado de amostra em mL	Concentração da amostra em mg/mL	Volume adicionado de padrão em mL	Concentração do padrão em mg/mL	Concentração final da solução em mg/mL
P	-----	-----	6,0	12,0	12,0
A	6,0	12,0	-----	-----	-----
1	6,0	12,0	1,0	2,0	14,0
2	6,0	12,0	2,0	4,0	16,0
3	6,0	12,0	3,0	6,0	18,0
4	6,0	12,0	4,0	8,0	20,0
5	6,0	12,0	5,0	10,0	22,0

Os volumes foram então, completados com água, e em seguida procedeu-se à leitura das soluções em 266 nm.

4.3.2.4 Estavudina – análise cromatográfica

Foram transferidas alíquotas das amostras e da solução padrão para balões volumétricos de 25 mL, conforme o esquema da *Tabela 7*. Os volumes dos balões foram completados com água. Todas as soluções foram preparadas de forma que as concentrações lidas estivessem sempre dentro da faixa da curva padrão.

Tabela 7 - Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação

Balão volumétrico	Volume adicionado de amostra em mL	Concentração da amostra em mg/mL	Volume adicionado de padrão em mL	Concentração do padrão em mg/mL	Concentração final da solução em mg/mL
P	-----	-----	3,0	60,0	60,0
A	3,0	60,0	-----	-----	-----
1	3,0	60,0	0,5	10,0	70,0
2	3,0	60,0	1,0	20,0	80,0
3	3,0	60,0	1,5	30,0	90,0
4	3,0	60,0	2,0	40,0	100,0
5	3,0	60,0	2,5	50,0	110,0

Os volumes foram então, completados com água, e em seguida procedeu-se à filtração e injeção das soluções em 266 nm.

Cálculo da porcentagem recuperada de padrão

A porcentagem recuperada do padrão (R%) foi calculada através da seguinte equação:

$$R \% = \frac{Ca - Cna}{Cp} \times 100$$

onde,

R % = Porcentagem do padrão recuperada

Ca = Concentração do analito encontrado na amostra adicionada de padrão;

Cna = Concentração do analito encontrado na amostra não adicionada de padrão;

Cp = Concentração de padrão do analito.

4.3.4 Determinação do limite de detecção da timina

O limite de detecção (LD) é a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade (Bressolle et al., 1996; Green, 1996; ICH Q2b, 1994; Jenke, 1996; USP, 2000). Ele pode ser também definido como a concentração que alcança um CV de 20 % para a precisão do sistema (Jenke, 1996). Ele é normalmente aplicado às substâncias relacionadas ao fármaco (Green, 1996; FDA, 1994).

Com detectores UV, é difícil assegurar a precisão da detecção para substância com baixa concentração devido à perda gradual de sensibilidade das lâmpadas relacionadas ao tempo de uso, ou devido à variação do ruído encontrada entre diferentes fabricantes de detectores (FDA, 1994).

O limite de detecção pode ser determinado por vários métodos. O primeiro é baseado na avaliação visual, sendo que este método é aplicável tanto para métodos não instrumentais, como para os métodos instrumentais. O segundo método é baseado no ruído e só é aplicável a procedimentos analíticos que exibem uma linha de base. Neste caso o LD é aceitável para substâncias que tenham concentração tal que apresentem um ruído 3 vezes maior do que a linha de base (Bressolle et al., 1996; Green, 1996; ICH Q2b, 1994; Jenke, 1996; BRASIL, 2001; FDA, 1994, USP, 2000). O terceiro método é baseado no desvio padrão e na inclinação da curva de calibração e é expresso como:

$$\text{Limite de detecção} = \frac{s}{b} \times 3,3$$

Onde:

σ = desvio padrão médio da resposta;

b = inclinação da curva de calibração.

O valor de b pode ser estimado a partir da curva de calibração da substância em questão, no caso, a timina, enquanto que a estimativa do valor do σ pode ser obtido por vários caminhos, como, por exemplo, baseado no desvio padrão do branco, ou na curva de calibração (FDA, 1994).

Quando a determinação do LD tiver sido obtida por cálculo ou extrapolação, é necessária, a validação analisando-se um número adequado de amostras com quantidades conhecidas e próximas às do LD do fármaco.

4.3.5 Determinação do limite de quantificação da timina

Limite de quantificação (LQ) é a concentração mais baixa da substância em exame presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitável (Green, 1996; ICH Q2b, 1994; Jenke, 1996; USP, 2000). Em alguns casos, o LQ é definido como a menor concentração apresentada na curva padrão (Jenke, 1996). Este teste também é normalmente aplicado às substâncias relacionadas ao fármaco (Green, 1996; Jenke, 1996, FDA, 1994).

Assim como o LD, o LQ pode ser determinado a partir de uma avaliação visual, a partir do ruído e a partir do desvio padrão médio e da inclinação da curva de calibração (ICH Q2b, 1994; Jenke, 1996; BRASIL, 2001, FDA, 1994), sendo que este último é expresso como:

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{S}{b} \times 10$$

Onde:

σ = desvio padrão médio da resposta;

b = inclinação da curva de calibração.

O valor de b pode ser estimado a partir da curva de calibração da substância em questão, no caso, a timina, enquanto que a estimativa do valor do σ pode ser obtido por vários caminhos, como, por exemplo, baseado no desvio padrão do branco ou na curva de calibração (FDA, 1994).

O LQ também pode ser determinado como a menor concentração do analito para as quais o CV é menor ou igual a 2 % (Jenke, 1996).

O LQ deverá ser subsequenteiramente validado pela análise de um número apropriado de amostras com concentrações conhecidas próximas a do valor calculado e do próprio valor calculado (Jenke, 1996, FDA, 1994).

4.4 Estabilidade das amostras de zidovudina cápsulas e solução oral e de estavudina cápsulas

4.4.1 Condições de armazenamento das amostras

As amostras de cápsulas foram armazenadas em três condições diferentes: temperatura ambiente (T.A.), sem controle de umidade, nem temperatura, 40 °C e 75% UR e 50 °C e 90% UR. As amostras de solução oral foram armazenadas nas mesmas condições, mas sem a umidade.

Para atingir a umidade de 75% e temperatura de 40 °C, as amostras foram armazenadas em dessecador contendo solução saturada de acetato de sódio e armazenado em estufa a 40 °C, a umidade de 75% foi medida através de termohigrômetro.

A umidade de 90% e temperatura de 50 °C foram atingidas adicionando-se água destilada no dessecador e armazenando-o em estufa a 50 °C, a umidade de 90%, também foi medida através de termohigrômetro.

4.4.2 Análise das amostras

As amostras foram coletadas e analisadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, após armazenamento.

Os parâmetros analisados foram: teor químico através do método espectrofotométrico e cromatográfico e características físicas através de sua aparência (cor) e pH (solução oral).

4.4.3 Determinação do pH das soluções orais

As amostras de solução oral foram analisadas como descrito na Farmacopéia Americana (USP) 24.ed, 2000. Os valores do pH devem estar dentro da faixa de 3,0 a 4,0.

V. RESULTADOS

5.1 Determinação dos pontos de fusão

Foi constatado que as substâncias estavam de acordo com a especificação da Farmacopéia Americana 24.ed, 2000 e com o laudo de análise do fornecedor. Os resultados podem ser vistos na *Tabela 8*.

Tabela 8 - Pontos de fusão da zidovudina e estavudina.

SUBSTÂNCIA	ESPECIFICAÇÃO ¹	FORNECEDOR	VALOR OBTIDO
Zidovudina*	~124°C	124°C	123°C
Estavudina*	162-165°C	164,2°C	161°C

* média da leitura em duplicata

¹ MERCK, 1996; USP, 2000.

5.2 Determinação dos espectros de absorção no infravermelho

Os espectros de infravermelho dos padrões secundários estão ilustrados nas *Figuras 8, 9 e 10*.

5.3 Determinação dos espectros de absorção no ultravioleta

O intervalo de onda empregado foi de 200 a 400 nm. A *Figura 11* mostra os espectros de absorção da zidovudina e da estavudina, utilizando água como solvente.

5.4 Curvas de calibração

Visando o emprego do método espectrofotométrico, foram determinadas as melhores concentrações da zidovudina e da estavudina as quais foram posteriormente utilizadas para a obtenção das curvas de calibração. Essas curvas podem ser observadas na *Figura 14*.

As *Figuras 12 e 13* referem-se aos espectros no ultravioleta da zidovudina nas concentrações de 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0; 24,0 e 30,0 µg de zidovudina/mL e da estavudina nas concentrações de 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 e 22,0 µg de estavudina/mL, respectivamente. O pico de interesse destas substâncias foi observado em aproximadamente 266 nm. Essas concentrações correspondem à leitura, em absorbâncias, entre 0,2 e 1,2, que são valores que estão dentro da sensibilidade do equipamento utilizado.

Visando o emprego da CLAE, foi determinada a melhor concentração da zidovudina e timina e da estavudina e timina que foram posteriormente utilizadas para a obtenção das curvas de calibração. Essas curvas podem ser observadas nas *Figuras 18, 19 e 20*.

Os dados estatísticos obtidos na determinação das curvas de calibração estão apresentados nas *Tabelas 9 a 14*.

5.5 Linearidade

A faixa linear de detecção que obedece a Lei de Beer é dependente do composto analisado e do tipo de detector utilizado (FDA, 1994).

A linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação (r), obtidos pelas curvas padrão, conforme ilustrados nas *Figuras 14, 18, 19 e 20*.

5.6 Especificidade / seletividade

Observou-se um pequeno pico de absorção tanto no placebo de cápsulas de zidovudina e de estavudina, como no de solução oral de zidovudina, no entanto, ele não apresenta interferência no método padronizado.

Nas *Figuras 15, 16 e 17* estão ilustrados os espectros de absorção do padrão, das amostras (cápsulas e solução oral) e dos placebos (cápsulas e solução oral) da zidovudina e da estavudina.

Não se observou nenhum pico durante 7 minutos de corrida do placebo de cápsulas de zidovudina. No entanto, observaram-se 3 picos no cromatograma do placebo da solução oral, sendo que um deles apresentou tempo de retenção bastante próximo ao da zidovudina, portanto o método proposto não se mostrou específico.

Nas *Figuras 21 e 22* estão ilustrados os cromatogramas dos placebos (cápsulas e solução oral) da zidovudina.

Não se observou nenhum pico durante 7 minutos de corrida do placebo de cápsulas de estavudina. A *Figura 23* mostra o cromatograma do placebo de cápsulas de estavudina

5.7 Precisão

5.7.1 Zidovudina – análise espectrofotométrica

As amostras de cápsulas e da solução oral foram analisadas pelo método padronizado. As *Tabelas 15 e 16* mostram os resultados obtidos após análise das amostras selecionadas, a 266 nm.

5.7.2 Zidovudina – análise cromatográfica

As amostras de cápsulas e da solução oral foram analisadas pelo método padronizado. As *Tabelas 17 e 18* mostram os resultados obtidos após análise das amostras selecionadas, a 265 e 264 nm, para cápsulas e solução oral, respectivamente.

5.7.3 Estavudina – análise espectrofotométrica e cromatográfica

As amostras de cápsulas foram analisadas pelos métodos padronizados. As *Tabelas 19 e 20* mostram os resultados obtidos após análise das amostras selecionadas, a 266 nm.

5.8 Teste de recuperação – Exatidão

5.8.1 Zidovudina – análise espectrofotométrica

A recuperação do método foi avaliada tanto em cápsulas como em solução oral, no comprimento de onda de 266 nm. As mesmas amostras utilizadas para o teste de precisão, foram empregadas para a realização do teste de recuperação. Os resultados obtidos podem ser vistos na *Tabela 21*.

5.8.2 Zidovudina – análise cromatográfica

A recuperação do método foi avaliada tanto em cápsulas como em solução oral, nos comprimentos de onda de 265 e 264 nm. As mesmas amostras utilizadas para o teste de precisão, foram empregadas para a realização do teste de recuperação. Os resultados obtidos podem ser vistos na *Tabela 22*.

5.8.3 Estavudina – análise espectrofotométrica e cromatográfica

A recuperação do método foi avaliada em cápsulas, no comprimento de onda de 266 nm. As mesmas amostras utilizadas para o teste de precisão, foram empregadas para a realização do teste de recuperação. Os resultados obtidos podem ser vistos na *Tabela 23*.

5.9 Limite de detecção e quantificação – Timina

Os valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico estão apresentados nas *Tabelas 24, 25 e 26*.

5.10 Características organolépticas

As amostras de zidovudina mantiveram sua cor branca inicial, no entanto as cápsulas armazenadas a 50 °C e 90 % UR, mostraram amolecimento desde o primeiro mês na estufa. As amostras de estavudina, tanto do Fabricante A quanto do Fabricante B, apresentaram alteração da cor após 2 meses de estabilidade em estufa a 50 °C e 90 % UR, nas outras condições mantiveram-se com a mesma cor inicial. A amostra de solução oral apresentou escurecimento da cor, que era inicialmente rosa, após 2 meses de estabilidade em estufa a 50 °C e 90 % UR.

5.11 Análise de pH

O pH inicial das amostras de solução oral foi de 3,55. A *Tabela 27* mostra os valores de pH das amostras nos determinados tempos e temperaturas.

5.12 Determinação do teor das amostras

As *Tabelas 28 a 36* mostram os valores de porcentagem de zidovudina e timina em cápsulas, de zidovudina em solução oral e de estavudina e timina em cápsulas, após terem sido submetidas a diferentes condições de armazenamento, e analisadas por espectrofotometria no UV e CLAE.

5.13 Determinação da ordem das reações

Foram calculadas as ordens das reações das amostras analisadas por CLAE durante 3 meses em estufa a 50 °C e 90% UR. As *Tabelas 37 a 39* e as *Figuras 24 a 26* mostram os valores obtidos.

5.14 Determinação da constante da velocidade de degradação, da meia-vida e tempo e prazo de validade

A constante da velocidade de degradação para cada tempo foi calculada através da equação 1, a meia-vida (t_{50}) do fármaco e o prazo de validade (t_{90}) a 50 °C e 90% UR foram calculados a partir das equações 2 e 3, respectivamente.

$$k = \frac{C_0 - C_t}{t} \quad (1)$$

Onde:

C_0 = Concentração inicial do fármaco;

C_t = Concentração do fármaco a uma dada temperatura e,
 t = tempo em meses.

$$t_{50\%} = \frac{C_0 - 50}{\bar{k}} \quad (2)$$

$$t_{90\%} = \frac{C_0 - 90}{\bar{k}} \quad (3)$$

Figura 8 – Espectro no infravermelho da zidovudina, utilizando pastilhas de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

Figura 9 – Espectro no infravermelho da estavudina, utilizando pastilhas de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

Figura 10 – Espectro no infravermelho da timina, utilizando pastilhas de brometo de potássio e varredura no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

(A)

(B)

Figura 11 – Espectros de absorção no UV, no intervalo de 200 a 400 nm:

(A) zidovudina (15,0 $\mu\text{g/mL}$) em H_2O ;

(B) estavudina (12,0 $\mu\text{g/mL}$) em H_2O .

Figura 12 – Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta a 266 nm da zidovudina em água, nas concentrações de 6,0 a 30,0 µg/mL.

Figura 13 – Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta a 266 nm da estavudina em água, nas concentrações de 8,0 a 22,0 µg/mL.

(A)

(B)

Figura 14 – Curvas de calibração no comprimento de onda de 266 nm, utilizando; água como solvente de concentração de:

(A) 6,0 a 30,0 μg de zidovudina/ mL,

(B) 8,0 a 22,0 μg de stavudina/ mL.

Figura 15 - Espectros da zidovudina padrão, amostra e placebo (cápsulas) no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando água como solvente.

Figura 16 - Espectros da zidovudina padrão, amostra e placebo (solução oral) no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando água como solvente.

Figura 17 - Espectros da estavudina padrão, amostra e placebo (cápsulas), no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando água como solvente.

(A)

(B)

Figura 18 – Curvas de calibração de padrões de zidovudina e de timina, no comprimento de onda de 265 nm, fase móvel metanol: água (25:75 v/v) e vazão de 1,0 mL/min:

(A) concentração de 70,0 a 150,0 µg de zidovudina/ mL e

(B) concentração de 0,5 a 4,0 µg de timina/ mL.

(A)

(B)

Figura 19 - Curvas de calibração de padrões de zidovudina e de timina, no comprimento de onda de 264 nm, fase móvel acetato de amônio: metanol (75:25 v/v), pH 5,0 e vazão de 1,0 mL/min:

(A) concentração de 70,0 a 150,0 μg de zidovudina/ mL e

(B) concentração de 1,0 a 4,0 μg de timina/ mL.

(A)

(B)

Figura 20 - Curvas de calibração de padrões de estavudina e de timina, no comprimento de onda de 266 nm, fase móvel água: metanol (85:15 v/v), e vazão de 1,0 mL/min:

(A) Concentração de 30,0 a 100,0 μg de estavudina/ mL e

(B) Concentração de 0,8 a 2,0 μg de timina/ mL.

Tabela 9 – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da zidovudina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH₃OH:H₂O (25:75 v/v).

Concentração mg/mL	Área média mAU	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
70,0	72740	± 249,18	0,34
80,0	82495,67	± 1405,90	1,70
90,0	91266,67	± 902,43	0,99
100,0	100425,7	± 362,56	0,36
110,0	109181	± 155,03	0,14
120,0	118927,3	± 1030,08	0,87
130,0	130639,7	± 2874,83	2,20
150,0	148653,3	± 1572,93	1,06

n = 3

Tabela 10 – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da timina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH₃OH: H₂O (25:75 v/v).

Concentração mg/mL	Área média mAU	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
0,5	946,33	± 15,18	1,60
1,0	1638,67	± 8,51	0,52
1,5	2305,00	± 3,61	0,16
2,0	3242,33	± 62,64	1,93
2,5	4092,33	± 34,39	0,84
3,0	4907,67	± 112,97	2,30
3,5	5538,33	± 48,09	0,87
4,0	6516,00	± 86,81	1,33

n = 3

Tabela 11 – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da zidovudina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH₃COONH₄: CH₃OH (75:25 v/v) pH 5.

Concentração mg/mL	Área média MAU	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
70,0	56595,33	± 529,40	0,94
80,0	64991,33	± 434,04	0,67
90,0	74268	± 319,81	0,43
100,0	81516,67	± 104,27	0,13
110,0	91664,67	± 189,16	0,21
120,0	99608	± 233,63	0,23
130,0	110029,7	± 1079,48	0,98
150,0	126609,7	± 1231,57	0,97

n = 3

Tabela 12 – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da timina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH₃COONH₄: CH₃OH (75:25 v/v) pH 5.

Concentração mg/mL	Área média MAU	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
1,0	1357,33	± 10,50	0,77
1,5	2004,67	± 39,11	1,95
2,0	2775,33	± 45,33	1,63
2,5	3598,67	± 56,15	1,56
3,0	4281,33	± 62,07	1,45
3,5	5030,67	± 95,79	1,90
4,0	5762,33	± 63,31	1,10

n = 3

Tabela 13 – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da estavudina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH₃OH: H₂O (15:85 v/v).

Concentração mg/mL	Área média mAU	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
30,0	29494,33	± 271,31	0,92
40,0	39058	± 250,34	0,64
50,0	48712,33	± 319,81	0,66
60,0	58819,67	± 213,74	0,36
70,0	68258,67	± 431,58	0,63
80,0	77816,33	± 269,85	0,35
90,0	87155,33	± 987,63	1,13
100,0	97582	± 1658,30	1,70

n = 3

Tabela 14 – Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração da timina, pela cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP –18 e fase móvel CH₃OH: H₂O (15:85 v/v).

Concentração mg/mL	Área média mAU	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
0,8	1261,00	± 24,58	1,95
1,0	1563,00	± 16,82	1,08
1,2	1813,00	± 30,35	1,67
1,4	2293,67	± 21,22	0,93
1,6	2518,00	± 26,67	1,06
1,8	2760,67	± 53,99	1,96
2,0	3130,67	± 41,76	1,33

n = 3

Figura 21 – Cromatogramas obtidos por CLAE: A- Padrão de zidovudina e timina; B- Amostra de cápsulas; C- Placebo. (1) Timina; (2) Zidovudina. Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher RP-18, 5 μ m, 125 x 4 mm (MERCK). Fase móvel: Metanol/ Água (25:75). Vazão: 1,0 mL/min. Detector UV ajustado a 265 nm. Volume de injeção: 20 μ L. Temperatura: 24°C $\pm$ 1°C.

Figura 22 – Cromatogramas obtidos por CLAE: A- Padrão de zidovudina e timina; B- Amostra de solução oral; C- Placebo. (1) Timina. (2) Zidovudina. Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher RP-18, 5 μ m, 125 x 4 mm (MERCK). Fase móvel: Acetato de amônio/Metanol (75:25) pH 5. Vazão: 1,0 mL/min. Detector UV ajustado a 264 nm. Volume de injeção: 20 μ L. Temperatura: 24°C $\pm$ 1°C.

Figura 23 – Cromatogramas obtidos por CLAE: A- Padrão de estavudina e timina; B- Amostra de cápsulas; C- Amostra de cápsulas do medicamento de referência; D- Placebo. (1) Timina. (2) Estavudina. Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher RP-18, 5 μ m, 125 x 4 mm (MERCK). Fase móvel: Água/Metanol (85:15). Vazão: 1,0 mL/min. Detector UV ajustado a 266 nm. Volume de injeção: 20 μ L. Temperatura: 24°C $\pm$ 1°C.

Tabela 15 – Resultados obtidos na determinação de zidovudina em amostras comerciais de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2), utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm.

Amostra	Valor teórico de zidovudina (µg)	Valor encontrado* (µg)	Teor percentual (%)
1	15,00	14,86	99,07
2	15,00	15,19	101,23

* média de dez determinações

Tabela 16 – Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comerciais de zidovudina cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2), utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm.

Amostra	Coefficiente de variação* (%)	Intervalo de 95 % de confiança da média
1	0,85	99,07 ± 0,08
2	0,88	101,23 ± 0,08

* média de dez determinações

Tabela 17 – Resultados obtidos na determinação de zidovudina em amostras comerciais de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Valor teórico de zidovudina (µg)	Valor encontrado* (µg)	Teor percentual (%)
1	100,00	98,20	98,20
2	100,00	102,99	102,99

* média de dez determinações

Tabela 18 – Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comerciais de zidovudina cápsulas (amostra 1) e xarope (amostra 2), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Coefficiente de variação* (%)	Intervalo de 95 % de confiança da média
1	0,79	98,20 ± 0,78
2	1,19	102,99 ± 0,11

* média de dez determinações

Tabela 19 – Resultados obtidos na determinação de estavudina em amostras comerciais de cápsulas, utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm (Método 1) e cromatografia líquida de alta eficiência (Método 2).

Método	Valor teórico de estavudina (µg)	Valor encontrado* (µg)	Teor percentual (%)
1	12,00	11,73	97,75
2	60,00	59,11	98,52

* média de dez determinações

Tabela 20 – Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comerciais de estavudina cápsulas, utilizando o método espectrofotométrico no ultravioleta a 266 nm (Método 1) e cromatografia líquida de alta eficiência (Método 2).

Método	Coefficiente de variação* (%)	Intervalo de 95 % de confiança da média
1	0,45	97,75 ± 0,03
2	1,05	98,52 ± 0,39

* média de dez determinações

Tabela 21 – Teste de recuperação da solução padrão de zidovudina adicionada às amostras de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2) e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 266 nm.

Amostra	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada* (µg/mL)	Recuperação (%)	Média da recuperação ± DP
1	3,0	3,21	105,56	99,82 ± 3,86
	6,0	5,86	96,29	
	9,0	8,98	98,30	
	12,0	12,02	98,72	
	15,0	15,23	100,22	
2	3,0	3,07	102,27	100,25 ± 2,27
	6,0	5,89	98,24	
	9,0	9,00	99,95	
	12,0	11,99	99,50	
	15,0	15,14	100,90	

* média de três determinações

Tabela 22 – Teste de recuperação da solução padrão de zidovudina adicionada às amostras de cápsulas (amostra 1) e solução oral (amostra 2) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada* (µg/mL)	Recuperação (%)	Média da recuperação ± DP
1	10,0	9,97	99,73	100,21 ± 1,60
	20,0	20,18	100,90	
	30,0	30,35	101,16	
	40,0	40,65	101,63	
	50,0	48,83	97,66	
2	10,0	9,97	99,72	100,14 ± 0,93
	20,0	20,14	100,71	
	30,0	30,26	100,87	
	40,0	40,28	100,71	
	50,0	49,35	98,70	

* média de três determinações

Tabela 23 – Teste de recuperação da solução padrão de estavudina adicionada às amostras de cápsulas e analisadas por espectrofotometria no UV/VIS (método 1) e por cromatografia líquida de alta eficiência (método 2).

Método	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada* (µg/mL)	Recuperação (%)	Média da recuperação ± DP
1	5,0	4,94	98,70	99,78 ± 1,57
	10,0	9,96	99,60	
	20,0	20,40	101,99	
	30,0	30,18	100,59	
	40,0	39,21	98,01	
2	2,0	2,06	102,92	100,34 ± 1,54
	4,0	4,03	100,65	
	6,0	5,96	99,26	
	8,0	7,95	99,39	
	10,0	9,95	99,50	

* média de três determinações

Tabela 24 – Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para cápsulas de zidovudina.

Parâmetro	Timina
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,1
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	0,3

n = 5

Tabela 25 – Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para solução oral de zidovudina.

Parâmetro	Timina
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,2
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	0,6

n = 5

Tabela 26 – Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico validado para cápsulas de estavudina.

Parâmetro	Timina
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,1
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	0,7

n = 5

Tabela 27 – Valores de pH das amostras de solução oral de zidovudina nas condições estudadas.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.*	40 °C	50 °C
Inicial	3,55	3,55	3,55
30	3,54	3,52	3,53
60	3,55	3,53	3,53
90	3,54	3,51	3,50

* T.A. = temperatura ambiente.

n = 1

Tabela 28 – Teores de zidovudina em cápsulas analisadas por espectrofotometria no UV.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	99,07%	99,07%	99,07%
30	98,64%	97,70%	97,77%
60	97,26%	97,52%	97,40%
90	96,87%	97,46%	98,64%

n = 3

Tabela 29 – Teores de zidovudina em solução oral analisadas por espectrofotometria no UV.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C	50 °C
Inicial	102,20%	102,20%	102,20%
30	102,30%	100,20%	103,60%
60	104,20%	106,40%	118,30%
90	105,70%	104,10%	122,40%

n = 3

Tabela 30 – Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante A) analisadas por espectrofotometria no UV.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	99,79%	99,79%	99,79%
30	97,42%	99,67%	100,69%
60	93,03%	94,10%	99,23%
90	95,63	96,39%	96,03%

n = 3

Tabela 31 – Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante B) analisadas por espectrofotometria no UV.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	103,83%	103,83%	103,83%
30	100,78%	100,50%	101,36%
60	93,48%	93,90%	97,43%
90	96,36%	97,80%	95,74%

n = 3

Tabela 32 - Teores de zidovudina em cápsulas analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	98,75%	98,75%	98,75%
30	97,33%	97,61%	97,25%
60	97,15%	97,22%	95,83%
90	95,79%	95,87%	94,01%

n = 3

Tabela 33 - Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante A) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	98,52%	98,52%	98,52%
30	96,60%	97,72%	96,60%
60	95,96%	96,41%	91,63%
90	94,39%	95,56%	87,74%

n = 3

Tabela 34 - Teores de timina em cápsulas de estavudina (Fabricante A) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	3,40%	3,40%	3,40%
30	3,20%	4,50%	20,65%
60	3,22%	4,11%	33,94%
90	3,21%	4,99%	45,26%

n = 3

Tabela 35 - Teores de estavudina em cápsulas (Fabricante B) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	100,88%	100,88%	100,88%
30	97,81%	99,47%	96,98%
60	96,48%	97,97%	90,72%
90	95,64%	96,18%	81,90%

n = 3

Tabela 36 – Teores de timina em cápsulas de estavudina (Fabricante B) analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (dias)	Condições de armazenamento		
	T.A.	40 °C e 75% UR	50 °C e 90% UR
Inicial	4,10%	4,10%	4,10%
30	4,95%	6,95%	26,50%
60	4,47%	5,02%	50,23%
90	5,95%	6,55%	61,15%

n = 3

Tabela 37 – Valores experimentais médios obtidos no estudo de estabilidade térmica a 50 °C e 90% UR de cápsulas de zidovudina, analisadas por CLAE e respectivas ordens de reação, valores de k, meia-vida e tempo de prateleira.

Tempo (dias)	Teor de zidovudina (mg/mL)	Percentual obtido (%)	Ordem zero	1° Ordem	K	T ₅₀ (meses)	T ₉₀ (meses)
0	98,75	98,75	98,75	1,995			
30	97,25	97,25	97,25	1,988			
60	95,83	95,83	95,83	1,982	0,85	57	10
90	94,01	94,01	94,01	1,973			

Coeficientes de correlação:

Ordem zero: 0,9970

1° Ordem: 0,9931

Figura 24 – Perfil de decaimento cinético da zidovudina cápsulas submetida à degradação térmica a 50 °C e 90% UR, calculado a partir de valores obtidos na análise por CLAE.

Tabela 38 – Valores experimentais médios obtidos no estudo de estabilidade térmica a 50 °C e 90% UR de cápsulas de estavudina (Fabricante A), analisadas por CLAE e respectivas ordens de reação, valores de k, meia-vida e tempo de prateleira.

Tempo (dias)	Teor de estavudina (mg/mL)	Percentual obtido (%)	Ordem zero	1° Ordem	K	T ₅₀ (meses)	T ₉₀ (meses)
0	39,41	98,52	98,52	1,994			
30	38,64	96,60	96,60	1,985			
60	36,65	91,63	91,63	1,962	2,99	16	3
90	35,10	87,74	87,74	1,943			

Coeficientes de correlação:

Ordem zero: 0,9745

1° Ordem: 0,9741

Figura 25 – Perfil de decaimento cinético da estavudina cápsulas (Fabricante A) submetida à degradação térmica a 50 °C e 90% UR, calculado a partir de valores obtidos na análise por CLAE.

Tabela 39 – Valores experimentais médios obtidos no estudo de estabilidade térmica a 50 °C e 90% UR de cápsulas de estavudina (Fabricante B), analisadas por CLAE e respectivas ordens de reação, valores de k, meia-vida e tempo de prateleira.

Tempo (dias)	Teor de estavudina (mg/mL)	Percentual obtido (%)	Ordem zero	1° Ordem	K	T ₅₀ (meses)	T ₉₀ (meses)
0	40,35	100,88	100,88	2,004			
30	38,79	96,98	96,98	1,987			
60	36,29	90,72	90,72	1,958	5,10	10	2
90	32,76	81,90	81,90	1,913			

Coeficientes de correlação:

Ordem zero: 0,9706

1° Ordem: 0,9586

Figura 26 – Perfil de decaimento cinético da estavudina cápsulas (Fabricante B) submetida à degradação térmica a 50 °C e 90% UR, calculado a partir de valores obtidos na análise por CLAE.

VI. DISCUSSÃO

A zidovudina é o anti-retroviral de primeira escolha para o tratamento da AIDS. Este fármaco tem sido bastante estudado sob o ponto de vista farmacológico, sendo que a grande maioria dos trabalhos refere-se à sua determinação em fluídos biológicos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (Almudaris et al., 1995; Amari et al., 1991; Aymard et al., 2000; Burger et al., 1993; Frijus-Plessen et al., 1990; Kamali & Rawlins, 1990; Klecker et al., 1987; Kupferschmidt & Schmid, 1989; Lacroix et al., 1990; Moore et al., 2000; Schrive & Plasse, 1994; Tan & Boudinot, 2000). Radwan 1994, descreve uma metodologia para análise de solução oral de zidovudina, no entanto, em análises prévias não foi possível reproduzir este método. Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre sua determinação quantitativa por espectrofotometria.

A estavudina foi o quarto da série dos dideoxynucleosídeos a ser clinicamente estudada. Este fármaco além de apresentar uma toxicidade menor do que a zidovudina às células da medula óssea, não se acumula na sua forma monofosfato (Burger et al., 1992). Vários artigos mostram validação de metodologias para sua determinação em fluídos biológicos (Aymard et al., 2000; Burger et al., 1992; Janiszewski et al., 1992; Kaul et al., 1989; Moore et al., 2000; Moyer et al., 1999; Sarasa et al., 2000; Schrive &

Plasse, 1994; Wong & Sawchuk, 1991), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detecção no UV.

Alguns ensaios preliminares foram desenvolvidos, baseando-se nos métodos já publicados. Entretanto, nem todos se mostraram reprodutíveis.

A necessidade de sistemas não isocráticos, terciários ou quaternários e equipamentos mais modernos como cromatógrafos dotados de 3 ou 4 bombas de injeção para eluições em gradiente, citadas por alguns métodos, limita sua aplicabilidade em muitos laboratórios. Além disso, muitos dos métodos discutidos na literatura consomem muito tempo para as análises, o que os tornam inviáveis para aplicação em rotina.

Foram feitos testes preliminares a fim de escolher o solvente, concentração e comprimento de onda adequado para cada amostra estudada.

A escolha do comprimento de onda adequado é importante para otimização do método. O comprimento de onda escolhido para cada fármaco foi aquele onde é máxima a absorção, pois é neste comprimento de onda onde é maior a sensibilidade.

O método espectrofotométrico proposto para o doseamento da zidovudina em preparações farmacêuticas, na forma de cápsulas e solução oral, assim como da estavudina, na forma de cápsulas, a 266 nm, destaca-se pela facilidade e rapidez de execução, boa exatidão, precisão e economia, características estas, de suma importância, no controle de qualidade de medicamentos.

Para a padronização do método espectrofotométrico no ultravioleta, empregaram-se soluções de zidovudina e estavudina em água, como

solvente. A água purificada foi obtida pelo sistema Milli-Q[®], sendo que o espectro de absorção tanto da zidovudina, como da estavudina, no intervalo de 200 a 400 nm, apresentou um pico de absorção máxima em 266 nm (*Figura 11*).

A escolha desse solvente foi em função da hidrossolubilidade dos fármacos, não interação com as amostras e também pelo baixo custo.

Atualmente, a CLAE é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na quantificação de fármacos. A maioria das farmacopéias preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens como precisão, exatidão, rapidez, seletividade e capacidade de automação. Entretanto, esta técnica apresenta um alto custo e depende do treinamento constante de uma equipe especializada para sua utilização.

Os métodos cromatográficos propostos para o doseamento da zidovudina e da estavudina em preparações farmacêuticas, na forma de cápsulas, apresentam como características facilidade de execução, boa exatidão, precisão, linearidade e economia, já que foram utilizados solventes de baixo custo como fase móvel, e uma coluna com preço acessível. Além disso, o método cromatográfico destaca-se em relação ao espectrofotométrico por ser viável para o estudo de estabilidade dos fármacos, já que consegue separar com boa resolução o pico do analito e do seu produto de degradação (*Figuras 21, 22 e 23*).

Para a padronização do método cromatográfico, empregaram-se soluções de zidovudina em diferentes fases móveis, tanto para cápsulas como para solução oral. Optou-se por solventes de baixo custo, compatíveis com as colunas de fase reversa, de fácil obtenção e por apresentarem toxicidade relativamente menor quando comparada com a de outros solventes, como dioxano, hexano e tetraidrofurano.

Para as cápsulas conseguiu-se boa separação entre a zidovudina e a timina utilizando como fase móvel uma mistura de 25:75 de metanol e água, com vazão de 1,0 mL/min e detecção a 265 nm (*Figura 21*). Optou-se por esta fase móvel, pelo fato de que o tempo de retenção da zidovudina é pequeno, assim como o tempo de retenção da timina, acelerando então o tempo de análise, o que significa para a indústria maior produtividade.

Para a solução oral foram testadas várias fases móveis, mas até o momento os métodos propostos, ou demandam muito tempo, ou são muitos complicados, ou ainda a presença dos excipientes contidos na formulação testada interferem com o pico de interesse. Nestas condições, até o presente momento, nenhum método apresentou qualidades suficientes para poder ser empregado em análises de rotina.

Radwan, 1994 padronizou uma metodologia simples e rápida para o doseamento de zidovudina em xarope, no entanto não obtivemos êxito na hora de reproduzir a análise, pois tanto a zidovudina como a timina e os excipientes, eluíram juntos. Como o autor utilizou um sistema gradiente mudando as proporções de acetonitrila e ácido fosfórico a 0,2 % no decorrer da análise, tentou-se padronizar uma fase móvel utilizando estes dois solventes com diferentes pHs, diferentes vazões e diferentes proporções da fase móvel.

Para a análise por CLAE, a força iônica do tampão utilizado na fase móvel é muito importante, pois uma força iônica maior pode ser capaz de separar vários tipos de compostos. O pH é também de suma importância, portanto o conhecimento dos pKas dos compostos (zidovudina, pKa = 9,68 e timina, pKa = 0), permite prever o comportamento destas substâncias na fase móvel e na fase estacionária, e escolher o melhor pH da fase móvel (Schrive & Plasse, 1994).

Testou-se uma fase móvel constituída de uma mistura de acetato de sódio 0,04 M: metanol: ácido acético glacial (90:10: 2) pH 5, vazão de 1,0 mL/min e detecção a 265 nm. Essa fase móvel é baseada na Farmacopéia Americana 24 ed., 2000, onde foi substituída a acetonitrila por metanol, o que tornou a fase móvel mais polar. Essa fase móvel apresentou, como maior problema, o aumento do tempo de retenção da zidovudina ($TR = 19,31$ min). Uma das formas de reduzir o tempo de retenção da zidovudina foi abaixar mais o pH, pois assim este composto permaneceu na forma menos ionizável e conseqüentemente menos retido pela coluna. Assim sendo, reduziu-se o pH da fase móvel de 5 para 4, observou-se redução no TR de mais de 3 minutos.

Assim mesmo, apesar de reduzido o TR da zidovudina, o período de tempo da análise ainda era muito longo. Por este motivo foi testada uma nova fase móvel, constituída de acetato de amônio 15 mM e metanol (75:25) pH 5. Esta fase móvel apresentou os melhores resultados e sua detecção foi efetuada a 264 nm. O cromatograma pode ser visto na *Figura 22*.

Para as cápsulas de estavudina, conseguiu-se boa separação entre a estavudina e a timina utilizando como fase móvel uma mistura de 15:85 de metanol e água, com vazão de 1,0 mL/min e detecção a 266 nm (*Figura 23*). Este método apresenta um tempo de análise bastante rápido, sendo sua utilização adequada em análises de rotina de Indústrias Farmacêuticas.

As soluções estoque dos padrões de zidovudina foram preparadas analiticamente numa concentração de 1,5 e 1,0 mg/mL, utilizando metanol como solvente e armazenada em *freezer* a -20°C . Segundo estudos realizados por Aymard et al., 2000, nestas condições, as soluções são estáveis, por pelo menos, 1 ano.

As soluções estoque dos padrões de estavudina foram preparadas analiticamente numa concentração de 0,5 e 1,0 mg/mL, utilizando água

como solvente e armazenada em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Segundo Kaul et al., 1989, nestas condições, a solução é estável, por pelos menos 21 dias e por três ciclos de descongelamento, no entanto Aymard et al., 2000, verificou que a estavudina preparada em água e armazenada em geladeira a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ permanece estável por pelos menos 1 ano.

A fim de garantir que o método forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados neste trabalho quatro parâmetros da validação para o método espectrofotométrico: linearidade, especificidade, precisão e exatidão e para o método cromatográfico além destes foram avaliados, os limites de detecção e quantificação.

Porém, fazer a validação de um método analítico não implica que ele está isento de erros e que pode ser usado indiscriminadamente, mas permite obter informações estatisticamente confiáveis, confirmando que o método está adequado para o uso proposto (Bruce et al., 1998).

Segundo Bressolle et al., 1996 é necessário o uso de um número suficiente de padrões para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta do equipamento. A curva de calibração deve ser construída usando pelo menos cinco a oito valores, excluindo valores de branco, na faixa de concentração esperada.

A linearidade do método foi determinada através da curva de calibração, na qual foi verificada a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão e as absorbâncias / áreas.

Para a análise espectrofotométrica da zidovudina foram utilizadas oito soluções padrão de diferentes concentrações. O coeficiente de correlação de 0,9999, obtido na padronização do método, demonstra que as soluções

padrão da zidovudina apresentam boa correlação linear entre a absorbância e as concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados (0,99 a 1,0) (AOAC, 2002; Jenke, 1996; Nalimov, 1963; FDA, 1994). Esta correlação é verificada na faixa de concentração de 6,0 a 30,0 µg/mL.

O fato do valor de a estar muito próximo de zero, indica que existe pouca influência dos excipientes (Burger et al., 1992; Gonçalves, 1983).

Para o método cromatográfico utilizando padrões de zidovudina e timina, foram utilizadas oito soluções de padrão de diferentes concentrações. O coeficiente de correlação foi 0,9995 para a zidovudina e 0,999 para a timina, utilizando metanol e água (25:75), como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e detecção a 265 nm. Os coeficientes de correlação para a zidovudina e para a timina foram 0,9996 e 0,9997, respectivamente, quando se utilizou acetato de amônio e metanol (75:25) pH 5, como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e detecção a 264 nm. Esta correlação é verificada na faixa de concentração de 70,0 a 150,0 µg/mL, para a zidovudina e de 0,5 a 4,0 µg/mL, para a timina.

Para o método espectrofotométrico proposto para a estavudina foram utilizadas oito soluções de diferentes concentrações do padrão secundário. O coeficiente de correlação de 0,9999, obtido na padronização do método, demonstra que as soluções padrão de estavudina apresentam boa correlação linear entre a absorbância e as concentrações. Esta correlação é verificada na faixa de concentração de 8,0 a 22,0 µg/mL.

O fato do valor de a estar muito próximo de zero, indica que existe pouca influência dos excipientes (Burger et al., 1992; Gonçalves, 1983).

Para o método cromatográfico utilizando padrões de estavudina e timina, foram utilizadas oito soluções de diferentes concentrações para o primeiro e sete soluções de diferentes concentrações do segundo. O coeficiente de correlação foi 0,99995 para a estavudina e 0,9967 para a timina, utilizando metanol e água (15:85), como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e detecção a 266 nm. Esta correlação é verificada na faixa de concentração de 30,0 a 100,0 µg/mL, para a estavudina e de 0,8 a 2,0 µg/mL, para a timina.

O estudo da influência dos excipientes foi verificado através da aplicação dos métodos propostos em placebos de cápsulas e solução oral de zidovudina (*Figuras 21 e 22*) e em placebos de cápsulas de estavudina (*Figura 23*). O espectro do placebo de cápsulas, tanto de zidovudina como de estavudina, apresentou uma absorção desprezível a 266, portanto, não parece exercer influência nos métodos propostos. Já o espectro do placebo da solução oral apresentou uma absorção um pouco maior, no comprimento de onda analisado, mas esta absorção não parece apresentar influência ao método proposto.

Os cromatogramas do placebo de cápsulas, tanto de zidovudina, como de estavudina, não apresentaram nenhum pico durante 7 minutos de corrida, logo podemos concluir que o método é específico. Já o cromatograma do placebo da solução oral apresentou um pico, com tempo de retenção de 4,05 minutos, o que é bastante próximo do tempo de retenção da zidovudina que é de 3,79 minutos. No entanto, por esse pico ficar encoberto pelo pico da zidovudina ele não parece apresentar nem adição nem subtração no valor da área da zidovudina. Este fato, no entanto, torna o método inespecífico.

Para saber a natureza exata do pico interferente, foram preparadas amostras de cada matéria-prima presente na solução oral, nas mesmas concentrações da formulação do fabricante. Essas soluções foram injetadas

e após análise de cada amostra concluímos que o benzoato de sódio, utilizado como conservante da solução oral é a substância que estava interferindo com o pico da zidovudina.

A exatidão do método, comprovada através dos testes de recuperação, pode ser definida como a proximidade dos resultados experimentais obtidos com os valores nominais (Nalimov, 1963; FDA, 1994). A média da recuperação deve ser de 98% a 102% do valor teórico (Jenke, 1994). As *Tabelas 21 e 23* mostram a porcentagem de recuperação das amostras. Os resultados obtidos são adequados tanto para cápsulas (99,82%) e para solução oral (100,25%) de zidovudina, quanto para cápsulas de estavudina (99,78%) a 266 nm.

As *Tabelas 22 e 23* mostram a porcentagem de recuperação das amostras utilizadas nos métodos cromatográficos propostos. Os resultados obtidos são adequados para a análise de cápsulas de zidovudina (100,21%), assim como cápsulas de estavudina (100,34%).

Um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados apresenta variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal (Garfield, 1991).

A precisão de um método é o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra e em condições idênticas de análise (AOAC, 1991; FDA, 1994; ICH Q2b, 1994; INMETRO, 2002; USP, 2000). Para que um método seja considerado preciso, é necessário que se faça no mínimo a leitura de 10 amostras com um CV menor ou igual a 1% (FDA, 1994). No entanto, alguns autores aceitam valores de CV menores do que 2,0 %, sendo que uma precisão menor que 1,5 % é considerada boa e valores entre 0,5 e 1,0 % são considerados excelentes (Martin-Smith & Rudd, 1990). De acordo com os resultados expressos nas *Tabelas 16, 18 e 20*, todos os métodos propostos são precisos.

As precisões, exatidões e linearidades dos métodos validados por espectrofotometria no UV e CLAE foram comparadas através da análise de variância (ANOVA). Os valores obtidos indicaram não haver diferenças significativas entre os valores obtidos nos dois métodos para um $p < 0,05$. Estes dados comprovam que os métodos desenvolvidos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa da zidovudina e da estavudina nas amostras de cápsulas.

De acordo com o *International Conference on Harmonization* (ICH), 1993, e a Resolução GMC 53/96 do Mercosul, 2000, para estudos de estabilidade, o Brasil encontra-se na região climática IV, com temperatura média de 26 °C e 70% de UR. Estes roteiros para análise da estabilidade de medicamentos sugerem a execução de estudos de degradação acelerada de acordo com a área climática em que se encontra cada País. Para os Países situados na região IV, os ensaios de degradação acelerada devem ser conduzidos a 40 °C e 75% de UR, durante o período de seis meses e a 50 °C e 90% de UR, durante o período de três meses.

Todavia, segundo estes roteiros, as condições de armazenamento sob teores de umidade relativamente altos devem ser aplicados às formas sólidas, em embalagens semipermeáveis. Para produtos acondicionados em recipientes que oferecem uma barreira física para os vapores d'água, a influência da umidade relativa sob a estabilidade do fármaco não é necessária. Por esta razão os ensaios realizados com a solução oral de zidovudina foram conduzidos apenas sob diferentes temperaturas, visto que a solução oral estava acondicionada em frascos de vidro.

Ao planejar um estudo de estabilidade é imperativo que se avalie qual ou quais técnicas analíticas podem ser empregadas na quantificação do fármaco submetido aos processos de degradação acelerada. Esta escolha não é simples, pois envolve a reunião de diversos parâmetros operacionais. Os métodos analíticos aplicados a ensaios de estabilidade requerem alta

seletividade e sensibilidade, possibilitando a quantificação do composto ativo sem interferência dos excipientes, eventuais impurezas e produtos de degradação. Estes devem ser precisos, exatos, rápidos e capazes de automação (Mehta, 1997).

Para selecionar um método apropriado é necessário também o conhecimento completo das propriedades físico-químicas do fármaco, bem como da velocidade de reação destes mecanismos. Assim, é possível desenvolver um método específico, adequado para o monitoramento da estabilidade do fármaco ou formulação farmacêutica (Mollica et al., 1978).

Para o estudo de estabilidade das amostras selecionadas neste trabalho, utilizou-se espectrofotometria direta no UV e CLAE. A metodologia proposta por espectrofotometria é bastante simples, no entanto, não é possível determinar a timina nas amostras analisadas, visto que, esta substância apresenta um comprimento de onda máximo em 264 nm, em água, o que é bastante próximo ao comprimento de onda máximo da zidovudina e estavudina (266 nm, em água).

A CLAE possibilita a análise da timina, portanto é a metodologia ideal para ser usada em estudos de estabilidade.

É amplamente reconhecido no campo das ciências farmacêuticas que a exposição de fármacos no estado sólido a altas taxas de umidade relativa bem como a associação entre o vapor d'água com as partículas sólidas pode acelerar a velocidade de degradação química do mesmo. Em geral, para reações que ocorrem com sólidos na forma amorfa, a velocidade de reação aumenta com o aumento do conteúdo de água e este fato pode ser atribuído à capacidade do sólido amorfo de absorver o vapor d'água na sua estrutura, formando uma solução amorfa. A água absorvida é responsável pela maioria dos tipos de reações de degradação de fármacos como, por exemplo, reações de hidrólise, oxidação e desaminação (Shalaev & Zografi, 1996).

A zidovudina parece ser uma substância mais estável do que a estavudina, pois nas análises feitas com a primeira não foi detectada a presença da timina, enquanto que com a estavudina a timina estava presente desde o início das análises.

A característica organoléptica cor foi mantida igual aos resultados iniciais para as cápsulas de zidovudina, no entanto as cápsulas estavam amolecidas desde o primeiro mês na temperatura de 50 °C – 90% UR.

As cápsulas de estavudina a 50 °C e 90% UR, após 2 meses na estufa, apresentaram coloração marrom e esta se acentuou ainda mais no terceiro mês de análise. É bastante provável que a estavudina tenha se degradado para timina, pois tanto nas amostras de cápsulas do Fabricante A como do Fabricante B o teor de estavudina diminuiu, enquanto que o teor de timina aumentou (*Tabelas 33 a 36*).

É demonstrado que o escurecimento dos comprimidos segue ordem cinética de zero ou primeira ordem dependendo tanto do fármaco como de sua formulação (Baltezor, 1987).

Um dos fatores que concorrem para a instabilidade de preparações farmacêuticas é a incompatibilidade dos componentes da formulação. Uma reação indesejável entre dois ou mais componentes pode ser resultante de incompatibilidade física, química ou terapêutica (Martin, 1993).

Segundo estudos realizados por Gandhi et al., 2000, amostras de estavudina expostas à alta umidade (>90%), não mostraram incidência de degradação com a formação de timina, quando analisadas por CLAE, indicando uma boa estabilidade química da estavudina. O autor verificou também, que esta substância na forma de hidrato perde água quando colocada em condições de baixa umidade. No entanto, neste estudo foi

somente empregada a estavudina matéria-prima e não formulações farmacêuticas e como a fórmula farmacêutica representa uma diluição ou dispersão de um princípio ativo com outras substâncias, o problema analítico é mais complexo e a estabilidade menos possível do que com o princípio ativo puro.

Uma solução estável mantém sua claridade original, cor e odor durante sua vida de prateleira. Soluções podem manter-se claras em faixas de temperatura entre 4 a 47 °C. Em temperaturas menores algumas substâncias podem precipitar devido à diminuição da solubilidade naquela temperatura e em temperaturas elevadas à homogeneidade pode ser perdida pelo desprendimento de partículas insolúveis dos frascos de vidros ou batoques de borracha (Vadas, 2000). Embora o vidro apresente muitas vantagens em relação a outros materiais de acondicionamento, têm, no entanto, duas desvantagens importantes: liberação de sais alcalinos e a liberação de partículas insolúveis para os líquidos armazenados nestes recipientes (Lachman et al., 2001).

Considerando-se os aspectos organolépticos da solução oral de zidovudina, a degradação acelerada ocasionou modificações significativas na cor das soluções durante o período de análise. As amostras apresentaram, ao final de dois meses de exposição à degradação térmica a 50 °C, uma coloração alaranjada, provavelmente em decorrência da formação dos produtos de degradação do anti-retroviral. A solução apresenta coloração inicial rosa, mas após três meses de análise na condição citada acima, a solução oral apresentou acentuada coloração amarelada.

As características organolépticas, apesar de desprovidas de avaliação analítica e apresentar um caráter bastante subjetivo, servem principalmente como subsídio para avaliação primária da estabilidade de preparações farmacêuticas.

O pH das amostras de solução oral não apresentou alteração significativa, mantendo-se em média no valor de 3,53.

Tanto a zidovudina, como a estavudina (A) e a estavudina (B) apresentaram decaimento cinético de zero ordem.

Foram calculadas as velocidades de degradação (k), apenas para a temperatura de 50 °C e 90% UR, porque somente nesta condição concluímos os estudos, visto que para a temperatura de 40 °C e 75% UR, faltavam ainda 3 meses. Nestas condições o prazo de validade da zidovudina, da estavudina A e da estavudina B são: 10, 3 e 2 meses, respectivamente (*Figuras 24 a 26*).

De acordo com a Farmacopéia Americana 24.ed, 2000, as cápsulas e solução oral de zidovudina não devem conter menos do que 90 % e não mais do que 110 % de zidovudina, portanto, através dos resultados expressos nas *Tabela 15, 17 e 19*, podemos verificar que nenhuma amostra está fora dos limites especificados.

Todos os resultados apresentados foram previamente corrigidos, considerando-se os teores dos padrões empregados, que são de 101,1% para a zidovudina, de 99,8 % para a estavudina e de 97,0 % para a timina.

VII. CONCLUSÕES

- * Tanto o método validado para espectrofotometria no UV, como o método validado por CLAE podem ser utilizados para análise de rotina de cápsulas de zidovudina e estavudina. No entanto, os valores apresentados nos métodos validados por CLAE, foram melhores devido a melhor sensibilidade, precisão e exatidão do método;
- * A metodologia validada para CLAE é adequada, tanto para a análise da zidovudina quanto para a estavudina e a timina;
- * Os métodos validados por CLAE são adequados para serem aplicados em estudos de estabilidade de preparações farmacêuticas de anti-retrovirais, pois conseguem separar com boa resolução o princípio ativo do produto de degradação;
- * Os estudos de degradação acelerada das amostras de zidovudina e estavudina indicaram que a degradação dos fármacos apresenta um perfil de decaimento cinético de zero ordem, como pode ser observado pelos valores de correlação de Pearson.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALMUDARIS, A.; ASHTON, D.S.; RAY, A. VALKO, K. Trace analysis of impurities in 3'-azido-3'-deoxythymidine by reversed-phase high-performance liquid chromatography and thermospray mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.689, p.31-38, 1995.
2. AMARI, J.V.; BROWN, P.RP; PIVARNIK, P.E.; SEHGAL, R.K.; TURCOTTE, J.G. High-performance liquid chromatographic analysis of 3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphate diglyceride, na anti-HIV glycerophospholipid. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam v.9, n.10/12, p.871-875, 1991.
3. AMATO, V.N.; MEDEIROS, E.A.S.; KALLAS, E.G.; LEVI, G.C.; BALDY, J.L.S.; MEDEIROS, R.S.S. **AIDS na prática médica**. São Paulo: Sarvier, 1996. p.1-6, 8, 22, 129-132.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC DRAFT 02/12/2002**. AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and other materials. Disponível em: <http://www.aoac.org>. Acesso em: 23 dez. 2002.

* De acordo com a Norma Técnica da ABNT NBR 6023 – Informação e Documentação – Referência – Elaboração (ago./2000). Abreviatura de periódicos segundo Norma Técnica da ABNT NBR 6032 – Abreviação de Título de Periódicos e Publicações Seriadas (ago./1989).

5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 15.ed. Washington, v.1, 1991. p.xvii.
6. AYMARD, G.; LEGRAND, M.; TRICHEREAU, N.; DIQUET, B. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.744, n.2, p.227-240, 2000.
7. BALINT, G.A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/ acquired immunodeficiency syndrome. **Pharmacol. Therap.**, Amsterdam, v.89, p.17-27, 2001.
8. BALTEZOR, M. Physico-chemical criteria for the stability and stability forecast of solid dosage forms. In. GRIMM, W.; THOMAE, K. eds. **Stability testing of pharmaceutical products**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1987. 238p.
9. BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Science**, Washington, v.220, p.868-871, 1983.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **Terapia anti-retroviral e saúde pública: um balanço da experiência brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 1999. 32p.
11. BRASIL. Resolução RDC n.10, de 2 de Janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.6-E, 9 jan. 2001. Seção 1, p.21, 23.
12. BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to

- pharmacokinetics. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.686, n.1, p.3-10, 1996.
13. BRONKER, M.E.; DOWEGAN, S.E.; KARNEY, W.W.; MAYERS, D.L. An updated therapeutic review: zidovudine. **Navy Med.**, Washington, v.81, n.1, p.26-28, 1990.
14. BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, Wien, v.128, p.93-106, 1998.
15. BURGER, D.M.; ROSING, H.; VAN GIJN, R.; MEENHORST, P.L.; VANTELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.H. Determination of stavudine, a new antiretroviral agent, in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.584, n.2, p.239-247, 1992.
16. BURGER, D.M.; ROSING, H.; KOOPMAN, F.J.; MEENHORST, P.L.; MULDER, J.W.; BULT, A.; BEIJNEN, J.H. Determination of 3'-amino-3'-deoxythymidine, a cytotoxic metabolite of 3'-azido-3'-deoxythymidine, in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.622, n.2, p.235-242, 1993.
17. CARSTENSEN, J.T. **Drug stability: principles and practices**. v.43. New York: Marcel Dekker, 1990. p.4-6.
18. CASADIO, S. **Tecnologia farmacêutica**. 2.ed. Milano: Cisalpino-Goliardica, 1972. p.1668-1702.
19. Centers for Disease Control – **Kaposi Sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual men** – New York. Morb. Mortal. Weekly Rep., v.30, n.305, 1981.

20. Centers for Disease Control – ***Pneumocystis carinii* pneumonia** – Los Angeles. Morb. Mortal. Weekly Rep., v.30, n.250, 1981.
21. CHEQUER, P.; SUDO, E.; VITÓRIA, M.A.A.; CUNHA, C.; VELOSO, V.G. Impacto da terapia anti-retroviral. [On line]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: 2 mar. 2001.
22. CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L.; STELLA, V.L. **Chemical stability of pharmaceuticals**: a handbook for pharmacists. New York: John Wiley, 1986. 847p.
23. CREAGH-KIRK, T.; DOI, P.; ANDREWS, E. NUSINOFF-LEHRMAN, S.; TILSON, H.; HOTH, D.; BARRY, D.W. Survival experience among patients with AIDS receiving zidovudine: follow-up of patients in a compassionate plea program. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.260, n.20, p.3009-3015, 1988.
24. CULLEN, B.R. Regulations of HIV-1 gene expression. **FASEB J.**, Bethesda, v.5, p.2361-2368, 1991.
25. DAGAR, V.D. Factors affecting the stability of pharmaceutical products. **East. Pharm.**, New Delhi, n.6, p.41-42, 1990.
26. DEF 2000/2001: dicionário de especialidades farmacêuticas. 29.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2000. p.858, 1066, 1099.
27. DUDLEY, M.N.; GRAHAM, K.K.; KAUL, S.; GELETKO, S.; DUNKLE, L.; BROWNE, M.; MAYER, K. Pharmacokinetics of stavudine in patients with AIDS or AIDS-related complex. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.166, n.3, p.480-485, 1992.
28. ESSEX, M.; KANKI, P. J. The origins of the AIDS virus. In: GALLO, R. C.; MONTAGNIER, L.; HASELTINE, W.A.; WONG-STAAAL, F.; ESSEX, M.; KANKI, J.P.; HEYWARD, W.L.; CURRAN, J.W.; MANN, J.M.; CHIN, J.; PIOT, P.; QUINN, T.; REDFIELD, R.R.; BURKE, D. S.; WEBER, J.N.; WEISS, R.A.; YARCHOAN, R.; MITSUYA, H.;

- BRODER, S.; MATTHEWS, T.J.; BOLOGNESI, D.P.; FINEBERG, H. V.; THOMAS, L. **The science of AIDS**. New York: W. H. Freeman, 1989. p.27-38.
29. EUROPEAN Pharmacopeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1996. p. 1739. (European treaty series, n.50).
30. FAN, B.; STEWART, J.T. Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam v.28, p.903-908, 2002.
31. FARTHING, C.F.; BROWN, S.E.; STAUGHTON, R.C.D. **Atlas colorido de AIDS e da doença do HIV**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. p.6-88.
32. FISCHL, M.A.; RICHMAN, D.D.; GRIECO, M.H.; GOTTLIEB, M.S.; VOLBERDING, P.A.; LASKIN, O.L.; LEEDOM, J.M.; GROOPMAN, J.E.; MILDVAN, D.; SCHOOLEY, R.T. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex: a double blind, placebo controlled trial. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.317, p.185-191, 1987.
33. FISCHL, M.A.; RICHMAN, D.D.; CAUSEY, D.M.; GRIECO, M.H.; BRYSON, Y.; MILDVAN, D.; LASKIN, O.L.; GROOPMAN, J.E.; VOLBERDING, P.A.; SCHOOLEY, R.T.; JACKSON, G.G.; DURACK, D.T.; ANDREWS, J.C.; NUSINOFFLEHRMAN, S.; BARRY, D.W. Prolonged zidovudine therapy in patients with AIDS and advanced AIDS-related complex. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.262, n.17, p.2405-2410, 1989.
34. FRIEDMAN-KIEN, A.E. Disseminated Kaposi sarcoma syndrome in young homosexual men. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Saint Louis, v.5, p.468, 1981.

35. FRIJUS-PLESSEN, N.; MICHAELIS, H.C.; FOTH, H.; KARL, G.F. Determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxycytidine, 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in biological samples by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.534, p.101-107, 1990.
36. GALLO, R.C.; SALAHUDDIN, S.Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G.M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B.F.; PALKER, T.J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B.; WHITE, G.; FOSTER, P.; MARKHAM, P.D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, Washington, v.224, p.500-503, 1984.
37. GALLO, R.C.; MONTAGNIER, L. The AIDS epidemic. In. GALLO, R.C.; MONTAGNIER, L.; HASELTINE, W.A.; WONG-STAAAL, F.; ESSEX, M.; KANKI, J.P.; HEYWARD, W.L.; CURRAN, J.W.; MANN, J.M.; CHIN, J.; WEISS, R.A.; YARCHOAN, R.; MITSUYA, H.; BRODER, S.; MATTHEWS, T.J.; BOLOGNESI, D.P.; FINEBERG, H.V.; THOMAS, L. **The science of AIDS**. New York: W. H. Freeman, 1989. p.1-12.
38. GANDHI, R.B.; BOGARDUS, J.B.; BUGAY, D.E.; PERRONE, R.K.; KAPLAN, M.A. Pharmaceutical relationships of solid state forms of stavudine. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.201, p.221-237, 2000.
39. GARFIELD, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. 2.ed. Arlington: AOAC, 1991. 196p.
40. GONÇALVES, M.L.S.S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**: análise quantitativa: espectrofotometria no visível e ultravioleta; erros em química analítica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983. p.13-82, 609-640.

41. GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; HARDMAN, J.G. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. New York: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.886, 888-889.
42. GOTTLIEB, M.S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H.M.; WEISMAN, J.D.; FAN, P.T.; WOLF, R.A.; SAXON, A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.305, p.1425-1431, 1981.
43. GRAHAM, N.M.; ZEGER, S.L.; PARK, L.P.; VERMUND, S.H.; DETELS, R.; RINALDO, C.R.; PHAIR, J.P. The effects on survival of early treatment of human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.326, p.1037-1042, 1992.
44. GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, Columbus, v.68, p.305-309, 1996.
45. HENRY, K.; CHINNOCK, B.J.; QUINN, R.P.; FLETCHER, C.V.; MIRANDA, P.; BALFOUR Jr., H.H. Concurrent zidovudine levels in semen and serum determined by radioimmunoassay in patients with AIDS or AIDS-related complex. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.259, n.20, p.3023-3026, 1988.
46. HO, D.D.; POMERANTZ, R.J.; KAPLAN, J.C. Pathogenesis of infections with human immunodeficiency virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.31, p.278-286, 1987.
47. HORWITZ, J.P.; CHUA, J.; NOEL, M. Nucleosides. 5. Monomesylates of 1-(2-deoxy-beta-D-lyxo-furanosyl)-thymidine. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.29, n.7, p.2076-2078, 1964.
48. HORWITZ, J.P.; CHUA, J.; DA ROOGE, M.A.; NOEL, M.; KLUNDT, I.L. Nucleosides. 9. Formation of 2',3''-unsaturated pyrimidine

- nucleosides via a novel β -elimination reaction. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.31, n.1, p.205-211, 1966.
49. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION Q2b. **Text on validation of analytical procedure: methodology**. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 6 nov. 1994.
50. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Stability testing of new drug substances and products**. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 7 out. 1999.
51. ouvidoria@inmetro.gov.br. **INMETRO DOQ-CGCRE-008**, outubro 2002: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Mensagem recebida por montoro@usp.br em 12 dez. 2002.
52. JAFFE, H.W.; CHOI, K.W.; THOMAS, P.A.; HAVERKOS, H.W.; AUERBACH, D.M.; GUINAN, M.E.; ROGERS, M.F.; SPIRA, T.J.; DARROW, W.W.; KRAMER, M.A.; FRIEDMAN, S.M.; MONROE, J.M.; FRIEDMANKIEN, A.E.; LAUBENSTEIN, L.J.; MARMOR, M.; SAFAI, B.; DRITZ, S.K.; CRISPI, S.J.; FANNIN, S.L.; ORKWIS, J.P.; KELTER, A.; RUSHING, W.R.; THACKER, S.B.; CURRAN, J.W. National case control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. Part 1: Epidemiologic results. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.99, n.2, p.145-151, 1983.
53. JANISZEWSKI, J.S.; MULVANA, D.E.; KAUL, S.; DANDEKAR, K.A.; BARBHAIYA, R.H. High-performance liquid chromatographic determination of 2',3'-dedehydro-3'-deoxythymidine: a new anti-human immunodeficiency virus agent, in human plasma and urine. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.577, n.1, p.151-156, 1992.
54. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation

- parameters. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, New York, v.19, n.5, p.737-757, 1996.
55. KAHN, J.O.; NORTHFELT, D.W.; MILES, S.A. AIDS-associated Kaposi's sarcoma. In: VOLBERDING, P.; JACOBSON, M.A., eds. **AIDS clinical review 1992**. New York: Marcel Dekker, 1992a. 261p.
56. KAHN, J.O. A controlled trial comparing continued zidovudine with didanosine in human immunodeficiency virus infection. **N. J. Med.**, v.327, p.581-587, 1992b.
57. KAMALI, F.; RAWLINS, M.D. Simple and rapid assay for zidovudine and zidovudine glucuronide in plasma using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.530, p.474-479, 1990.
58. KAUL, S.; DANDEKAR, A.; PITTMAN, K.A. Analytical method for the quantification of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, a new anti-human immunodeficiency virus (HIV) agent, by high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet (UV) detection in rat and monkey plasma. **Pharm. Res.**, New York, v.6, n.10, p.895-899, 1989.
59. KLECKER, R.W.; COLLINS, J.M.; YARCHOAN, R.; THOMAS, R.; JENKIS, J.F.; BRODER, S.; MYERS, C.E. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3-azido-3-deoxythymidine: a novel pyrimidine analogue with potential application for the treatment of patients with AIDS and related diseases. **Clin. Pharmacol. Ther.**, Saint Louis, v.41, n.1, p.407-412, 1987.
60. KNUPP, C.A.; STANCATO, F.A.; PAPP, E.A.; BARBHAIYA, R.H. Quantitation of didanosine in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.533, p.282-290, 1990.

-
61. KOPP, E.B.; MIGLIETTA, J.J.; SHRUTKOWSKI, A.G.; SHIH, C.; GROB, P.M.; SKOOG, M.T. Steady state kinetics and inhibition of HIV-a reverse transcriptase by a non-nucleoside dipyridodiazepinone, BI-RG-587, using a heteropolymeric template. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.19, n.11, p.3035-3039, 1991.
62. KUPFERSCHMIDT, R.; SCHMID, R.W. Specific routine determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) in plasma by partly automated liquid chromatography. **Clin. Chem.**, Washington, v.35, n.7, p.1313-1317, 1989.
63. KUSTER, H.; VOGT, M.; JOSS, B.; NADAI, V.; LUTHY, R. A method for the quantification of intracellular zidovudine nucleotides. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.164, n.4, p.773-776, 1991.
64. LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, v.2, 2001. p.1278.
65. LACROIX, C.; HOANG, T.P.; WOJCIECHOWSKI, F.; DUWOOS, H.; NOUVEAU, J. Simultaneous quantification of zidovudine and its metabolites in serum and urine by high-performance liquid chromatography using a column-switching technique. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.525, p.240-245, 1990.
66. LANGTRY, H.D.; CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Zidovudine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v.37, n.4, p.408-450, 1989.
67. LARDER, B.A.; DARBY, G.; RICHMANN, D.D. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. **Science**, Washington, v.243, p.1731-1734, 1989.

-
68. LINDSAY, S. **High performance liquid chromatography**. 2.ed. New York: Wiley, 1992. p.1-5.
69. MADHOK, R.; FORBES, C.D.; EVATT, B.L., eds. **Blood, blood products and AIDS**. London: Chapman and Hall, 1987. p.3-88. (The Johns Hopkins series in contemporary medicine and public health).
70. MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p.284.
71. MANSURI, M.M.; STARRET, J.E.; GHAZZOULI, I.; HITCHCOCK, M.J.M.; STERZYCHI, R.Z.; BRANKOVAN, V.; LIN, T. AUGUST, E.M.; PRUSOFF, W.H.; SOMMADOSSI, J. 1-(2,3-Dideoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymidine: a highly potent and selective anti-HIV agent. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.32, p.461-466, 1989.
72. MARK, H.; BEERS, M.D.; ROBERT BERKOW, M.D. The Merck manual of diagnosis and therapy. 17.ed. Section 13, Chapter 163. Disponível em: [http:// www.merck.com](http://www.merck.com). Acesso em: 2 mar. 2001.
73. MARKOWITZ, M. Inibidores da protease: o que eles são, como funcionam, quando usá-los. **International Association of Physicians in AIDS Care (IAPAC)**, 1996. Disponível em: <http://www.iapac.org>. Acesso em: 4 fev. 2002.
74. MARTIN-SMITH, M.; RUDD, D.R. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. **Acta Pharm. Jugosl.**, Zagreb, v.40, n.1/2, p.7-19, 1990.
75. MARTINDALE, W.H.; REYNOLDS, J.E.F., eds. **The extra pharmacopeia**. 31.ed.- London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. 2739p.
76. McLEOD, G.X.; HAMMER, S.M. Zidovudine: five years later. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.117, p.487, 1992.

77. MEHTA, A.C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, Letchworth, v.112, p.83R-88R, 1997.
78. MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996. p.3148, 5365, 8958, 10242, 10252.
79. MITSUYA, H.; WEINHOLD, K.J.; FURMAN, P.A.; ST. CLAIR, M.H.; LEHRMAN, S.N.; GALLO, R.C.; BOLOGNESI, D.; BARRY, D.W.; BRODER, S. 3-Azido-3-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human lymphotropic-T virus type-III lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.82, n, 20, p.7096-7100, 1985.
80. MITSUYA, H.; YARCHOAN, R.; BRODER, S. Molecular targets for AIDS therapy. **Science**, Washington, v.249, p.1533, 1990.
81. MOLLICA, J.A.; AHUJA, S.; COHEN, J. Stability of pharmaceuticals. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.67, n.4, p.443-465, 1978.
82. MOORE, J.D.; VALETTE, G.; DARQUE, A.; ZHOU, X.; SOMMADOSSI, J. Simultaneous quantitation of the 5'-triphosphate metabolites of zidovudine, lamivudine and stavudine in peripheral mononuclear blood cells of HIV infected patients by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.**, New York, v.11, p.1134-1143, 2000.
83. MOORE, R.D.; HIDALGO, J.; SUGLAND, B.W.; CHAISSON, R.E. Zidovudine and the natural history of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.324, p.1412-1416, 1991.
84. MOORE, R.D.; KERULY, J.; RICHMAN, D.D.; CREAGHKIRK, T.; CHAISSON, R.E.; BARTLETT, J.; LINK, G.; MCAVINUE, S.; BRYSON, Y.; COHEN, H.; FISCHL, M.; BOLIN, T.; KESSLER, H.; BURROUGH, Y.; MILDVAN, D.; FOX, A.; RICHMAN, D.; FREEMAN,

- B.; SIMON, G.; GRABOWY, K.W.; CHERNOFF, D.; DUFF, P.; THOMPSON, S.; BARRETT, K.; AWE, R.; CHAPMAN, R.; LEONARD, S.; TURNER, P.; HAWKINS, M.; MURRAY, H.; BOWERS, J.; TILSON, H.H.; ANDREWS, E.; SMILEY, L.; LANE, C. Natural history of advanced HIV disease in patients treated with zidovudine. **AIDS**, New York, v.6, n.7, p.671-677, 1992.
85. MORETTO, L.D. A estabilidade de fármacos e medicamentos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.3, n.4, p.46-48, 1999.
86. MOYER, T.P.; TEMESGEN, Z.; ENGER, R.; ESTES, L.; CHARLSON, J.; OLIVER, L.; WRIGHT, A. Drug monitoring of antiretroviral therapy for HIV-1 infection: method validation and results of a pilot study. **Clin. Chem.**, Washington, v.45, n.9, p.1464-1476, 1999.
87. NADAL, T.; ORTUÑO, J.; PASCUAL, J.A. Rapid and sensitive determination of zidovudine and zidovudine glucuronide in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v.721, p.127-137, 1996.
88. NALIMOV, V.V. **The application of mathematical statistics to chemical analysis**. Oxford: Pergamon Press, 1963. 294p.
89. NULDEMAN, N.E.S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. p.187.
90. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos**: medicamentos utilizados en las enfermedades de transmisión sexual y la infección por el VIH. Ginebra: OMS, 1998. p.33-40.
91. OSTERTAG, W.; ROESLER, G.; KRIEG, C.J.; KIND, J.; COLE, T.; CROZIER, T.; GAEDICKE, G.; STEINHEIDER, G.; KLIGE, N.; DUBE, S. Introduction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by friend virus.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.71, n.12, p.4980-4985, 1974.
92. PEREIRA, A.S.; TIDWELL, R.R. Separation methods for nucleoside analogues used for treatment of HIV-1 infection. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.764, n.1/2, p.327-347, 2001.
93. POLESELLO, S. How to present an analytical method. **Food Chem.**, Amsterdam, v.58, n.1/2, 1997.
94. POLI, G.; PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17 suppl 1, p.224-229, 1993.
95. POPE, D.G. Accelerated stability testing for prediction of drug product stability. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.127, n.5, p.54-62, 1980.
96. RADWAN, M.A. Stability – indicating HPLC assay of zidovudine in extemporaneous syrup. **Anal. Lett.**, New York, v.27, n.6, p.1159-1164, 1994.
97. SANDSTROM, E.; OBERG, B. Antiviral therapy in human immunodeficiency virus infections. Part I. **Drugs**, Auckland, v.45, p.488-508, 1993a.
98. SANDSTROM, E.; OBERG, B. Antiviral therapy in human immunodeficiency virus infections. Part II. **Drugs**, Auckland, v.45, p.637-653, 1993b.
99. SARASA, M.; RIBA, N. ZAMORA, L.; CARNÉ, X. Determination of stavudine in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using a reduced sample volume. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.746, n.2, p.183-189, 2000.
100. SCHRIVE, I.; PLASSE, J.C. Quantification of zidovudine and one of its metabolites in plasma and urine by solidphase extraction and high-

- performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.657, n.1, p.233-237, 1994.
101. SERB, P.; YEUNG, S. HIV infection and the dentist. 1. The presence of the HIV in saliva and its implications to the practice. **Aust. Dent. J.**, North Sydney, v.39, p.67-72, 1994.
102. SHALAEV, E.Y.; ZOGRAFI, G. How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state? **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.85, n.11, p.1137-1141, 1996.
103. SIMON, V.A.; THIAM, M.D.; LIPFORD, L.C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus suppressing drugs by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.913, p.447-453, 2001.
104. SINDICATO DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO. Resolução GMC n.53/96: estabilidade de produtos farmacêuticos. In: **Mercosul**: legislação para a indústria farmacêutica. São Paulo: SINDUSFARMA, 2000. p.141-148.
105. SINGH, S. Condições de estocagem no teste de estabilidade para Zonas III e IV: alguns aspectos não resolvidos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, v.3, n.6, p.34-41, 1999.
106. SPENCE, R.A.; KATI, W.M.; ANDERSON, K.S.; JOHSON, K.A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. **Science**, Washington, v.267, p.988, 1995.
107. SPRUANCE, S. Didanosine compared with continuation of zidovudine in HIV infection patients with signs of clinical deterioration while receiving zidovudine. A randomized, doubling clinical trial. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.120, p.360-368, 1994.

108. STARNES, M.C.; CHENG, Y.C. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.264, n.12, p.7073-7077, 1989.
109. TAN, X.; BOUDINOT, D. Simultaneous determination of zidovudine and its monophosphate in mouse plasma and peripheral red blood cells by high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.740, n.2, p.281-287, 2000.
110. TERAPIA ANTI-RETROVIRAL E SAÚDE PÚBLICA: UM BALANÇO DA EXPERIÊNCIA BRASILEIRA. **Coordenação Nacional de DST e AIDS**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 10, 1999.
111. JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (UNAIDS/WHO). **Aids epidemic update**. Disponível em: [http:// www.who.org](http://www.who.org). Acesso em: 20 fev. 2001
112. JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (UNAIDS/WHO). **Epidemiological fact sheets** on HIV/AIDS and sexually transmitted infections: Brazil, 2002. Disponível em [http:// www.who.org](http://www.who.org). Acesso em 12 nov. 2002.
113. UNITED STATES. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods**. Rockville: Food and Drug Administration, 1994. 30p.
114. UNITED States Pharmacopeia, 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1994. p.1957-163, 1994.
115. UNITED States Pharmacopeia, 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000. p.1920-1924, 2149-2151.

116. VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A. R. **Remington's: The science and practice of pharmacy**. 20.ed. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2000. p. 986-994.
117. VOGT, M.; HIRSCH, M.S. Prospects for the prevention and therapy of infectious with human immunodeficiency virus. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.8, p.991, 1986.
118. YARCHOAN, R. MITSUYA, H.; MYERS, C.E.; BRODER, S. Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 321, p. 726-738, 1989.
119. WONG, S.L.; SAWCHUK, R.J. High-Performance liquid chromatographic determination of 2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine (d4T) in human and rabbit plasma and urine and its application to pharmacokinetic studies in the rabbit. **Pharm. Res.**, New York, v.8, n.50, p.619-623, 1991.
120. ZIEGLER, J.L.; BECKSTEAD, J.A.; VOLBERDING, P.A.; ABRAMS, D.I.; LEVINE, A.M.; LUKES, R.J.; GILL, P.S.; BURKES, R.L.; MEYER, P.R.; METROKA, C.E. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men: relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.311, p.565-570, 1984.