

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

Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg

Jacqueline de Souza

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

São Paulo

2005

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

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

Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg

Jacqueline de Souza

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ



30100011168

Ficha Catalográfica

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

S829a	Souza, Jacqueline de Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150mg e zidovudina 300mg / Jacqueline de Souza. -- São Paulo, 2005. 275p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Storpirtis, Silvia 1. Biodisponibilidade : Farmacocinética 2. Bioequivalência : Farmacocinética 3. Medicamento genérico I. T. II. Storpirtis, Silvia, orientador. 615.7 CDD
-------	---

Jacqueline de Souza

Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg

Comissão Julgadora
da
Tese Para Obtenção do Grau de Doutor

Profa. Dra. Sílvia Storpirtis
Orientadora/presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, 29 de agosto de 2005

Dedico este trabalho

A minha querida filha Ágatha que sempre procurou entender as ausências e me acompanhou nesta jornada.

Aos meus pais Maria e Jaques, aos meus irmãos Jaques, Magda e a minha querida sobrinha Ana Beatriz.

Ao Marcelo, pela ternura e afeto com os quais me apoiou, incentivou e abrandou os momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sentido dado a minha vida.

A minha querida família, pelo “porto seguro”, onde existe amor, compreensão e a certeza de que possamos partir para realizar novas conquistas e voltar sempre que for preciso.

A Profa. Dra. Silvia Storpirtis pela orientação, incentivo, confiança, amizade e pelo maravilhoso exemplo de vida, que tornaram possível e menos árduo o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Valentina Porta, coordenadora do Laboratório Biofar, por possibilitar a realização deste trabalho e acompanhá-lo, sempre com valiosas sugestões.

A Profa. Tit. Terezinha Andreoli Pinto, por gentilmente concordar em fazer parte desta equipe de trabalho, atuando junto a etapa de equivalência farmacêutica e nos orientando quanto aos procedimentos legais do projeto em conjunto com a FURP.

Ao Prof. Dr. Leslie Z. Benet, que me recebeu em seu laboratório na Universidade da Califórnia em São Francisco (UCSF), para realização de estudos de permeabilidade. Agradeço a atenção e as valiosas discussões científicas.

Às Professoras Dra. Vladi Olga Consiglieri e Cristina Helena dos Reis Serra que me auxiliaram em meus primeiros percalços ao iniciar meu doutoramento em São Paulo. Obrigada pelo profissionalismo e presteza com que me atenderam.

Aos Professores da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que me apoiaram durante o meu afastamento para elaboração deste trabalho.

Aos Professores da Faculdade de Farmácia da UFMG, Dra. Cristina Duarte Vianna, Dra. Elzília de Aguiar Nunan, Dra. Lígia Maria Moreira de Campos e Dr. Gérson Antônio Pianetti com os quais comecei minhas atividades de pesquisa, e nos quais me espelho pela qualidade dos seus trabalhos e pelo comprometimento com o qual desenvolvem todas as suas atividades.

As amigas Patricia de Oliveira França e Zaida Maria Ferreira de Freitas, por nos brindar com inestimável companhia durante nossa estadia em São Paulo, pelos momentos de descontração e pelas valiosas discussões científicas.

Aos colegas do curso de pós-graduação Claudinéia, Eduardo, Geysa e Luciane pela amizade, companhia e troca de experiências.

A amiga Carla pela recepção no laboratório de farmacotécnica, pelo companheirismo e grande disponibilidade em auxiliar durante minha adaptação.

Meus sinceros agradecimentos aos funcionários do BIOFAR: Éder; Eremita; Eunice Kazue; Eunice Emiko; Simone; Tatiane; Tatiana Maria e Valdilene; que além do elevado profissionalismo, acolhem a todos como uma família.

Aos funcionários Beth, Elaine, Jorge, Majô e Susi pela disponibilidade em atenderem os alunos e pelo olhar atencioso com o qual sempre me auxiliaram nas dificuldades de cunho administrativo

Aos componentes do grupo de pesquisa do laboratório de Ciências Biofarmacêuticas da UCSF: Joseph, Yvonne, Justine, Hong, Hideaki, Yong, Frances e Mike pelo apoio técnico e pelas valorosas discussões científicas.

A secretária Angélica pelo profissionalismo, atenção e amizade que contribuíram para solucionar rapidamente as dificuldades de cunho administrativo, durante o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, pelas correções das referências bibliográficas e pela atenção dispensada.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XXIV
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XXVIII
RESUMO	XXVII
ABSTRACT	XXX
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	01
1.1 INTRODUÇÃO.....	02
1.2 OBJETIVOS	05
1.2.1 OBJETIVO GERAL	05
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	05
1.2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	06
CAPÍTULO II – AIDS: HISTÓRICO, HIV E TERAPÊUTICA	08
2.1 AIDS: CONSIDERAÇÕES GERAIS E HISTÓRICO.....	09
2.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA	11
2.2.1 MECANISMO DE REPLICAÇÃO	12
2.3 AGENTES ANTI-RETROVIRAIS	14
2.3.1 INIBIDORES DA PROTEASE	15
2.3.2 INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA NÃO-NUCLEOSÍDEOS	15
2.3.3 INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA ANÁLOGOS NUCLEOSÍDEOS	16
2.3.4 INIBIDORES DA FUSÃO	17
2.4 LAMIVUDINA	17
2.5 ZIDOVUDINA	20
2.6 TERAPÊUTICA COMBINADA UTILIZANDO LAMIVUDINA + ZIDOVUDINA ...	23
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ADEQUADO À QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA CONTIDAS EM COMPRIMIDOS	

REVESTIDOS	31
3.1 INTRODUÇÃO	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.2.1 MATERIAL	33
3.2.1.1 Medicamentos Teste	33
3.2.1.2 Medicamento Referência	34
3.2.1.3 Substâncias Químicas de Referência	34
3.2.1.4 Soluções padrão	34
3.2.1.5 Placebos	35
3.2.1.6 Reagentes e Vidraria	35
3.2.1.7 Equipamentos	35
3.2.2 MÉTODOS	36
3.2.2.1 Método analítica para quantificação conjunta de lamivudina e zidovudina	36
3.2.2.2 Desenvolvimento	36
3.2.2.3 Validação	37
3.2.2.3.1 Especificidade/Seletividade	38
3.2.2.3.2 Limite de quantificação	38
3.2.2.3.3 Linearidade	39
3.2.2.3.4 Exatidão	40
3.2.2.3.5 Precisão	42
3.3 RESULTADOS	43
3.3.1 MÉTODO ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO CONJUNTA DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA	43
3.3.1.1 Especificidade	43
3.3.1.2 Limite de quantificação	45
3.3.1.3 Linearidade	45
3.3.1.4 Exatidão.....	47

3.3.1.5 Precisão	48
3.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	49
3.5 CONCLUSÃO	50
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
Capítulo IV - Equivalência Farmacêutica: Parâmetros técnicos e aplicação do teste a comprimidos revestidos contendo lamivudina e zidovudina	52
4.1 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: HISTÓRICO E PARÂMETROS TÉCNICOS	53
4.1.1 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO	55
4.1.2 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	56
4.1.3 BIOISENÇÃO	57
4.1.4 CORRELAÇÃO <i>IN VITRO/IN VIVO</i>	58
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.2.1 MATERIAL	59
4.2.1.1 Medicamento Teste	59
4.2.1.2 Medicamento Referência	60
4.2.1.3 Substância Química de Referência	60
4.2.1.4 Soluções padrão	60
4.2.1.5 Reagentes e Vidraria	61
4.2.1.6 Equipamentos	61
4.2.1.7 Infra-estrutura	62
4.2.2 MÉTODOS	62
4.2.2.1 Avaliação físico-química	62
4.2.2.1.1 Variação de peso e peso médio	62
4.2.2.1.2 Uniformidade de conteúdo	63
4.2.2.1.3 Teor	63
4.2.2.1.4 Método cromatográfico	64

4.2.2.1.5 Teste de Dissolução de comprimidos contendo 3TC e ZDV	64
4.2.2.1.6 Perfil de Dissolução de comprimidos contendo 3TC e ZDV	65
4.2.2.1.7 Cinética de Dissolução de comprimidos contendo 3TC e ZDV	66
4.3 RESULTADOS	68
4.3.1 VARIAÇÃO DE PESO E PESO MÉDIO	68
4.3.2 UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO	70
4.3.3 TEOR	71
4.3.4 TESTE DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO 3TC E ZDV	73
4.3.5 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO 3TC E ZDV	74
4.3.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA	81
4.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	83
4.5 CONCLUSÃO	87
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA	92
5.1 INTRODUÇÃO	93
5.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BIONALÍTICOS	93
5.3 VALIDAÇÃO	95
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	97
5.4.1 MATERIAL	97
5.4.1.1 MEDICAMENTO TESTE	97
5.4.1.2 Medicamento Referência	97
5.4.1.3 Substâncias Químicas de Referência	97
5.4.1.4 Soluções padrão	98
5.4.1.5 Reagentes e Vidraria	98
5.4.1.6 Equipamentos	99

5.4.1.7 Infra-estrutura	99
5.4.2 MÉTODOS	99
5.4.2.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma	99
5.4.2.2 Procedimento de Purificação das amostras	100
5.4.2.3 Condições cromatográficas para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma	101
5.4.2.4 Fluxograma	103
5.4.2.5 Validação do método bioanalítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma	104
5.4.2.5.1 Especificidade	104
5.4.2.5.2 Recuperação	104
5.4.2.5.3 Limite de quantificação	105
5.4.2.5.4 Reta de calibração e Linearidade	105
5.4.2.5.5 Precisão	107
5.4.2.5.6 Exatidão	109
5.4.2.5.7 Estabilidade	109
5.4.2.5.8 Robustez	111
5.5 RESULTADOS	111
5.5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA	111
5.5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA	111
5.5.2.1 Especificidade	111
5.5.2.2 Recuperação	112
5.5.2.3 Limite de quantificação	113
5.5.2.4 Reta de calibração	113
5.5.2.5 Precisão e Exatidão	116
5.5.2.6 Estabilidade	117

5.5.2.6.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento	117
5.5.2.6.2 Estabilidade de longa duração	119
5.5.2.6.3 Estabilidade de curta duração	120
5.5.2.7 Robustez	121
5.10 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	124
5.11 CONCLUSÃO	129
5.12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
Capítulo VI - Biodisponibilidade Relativa: Conceitos, parâmetros técnicos e aplicação do teste a comprimidos revestidos contendo lamivudina e zidovudina	133
6.1 INTRODUÇÃO	134
6.2 BIODISPONIBILIDADE	137
6.2.1 BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA	138
6.2.2 BIODISPONIBILIDADE RELATIVA	138
6.3 BIOEQUIVALÊNCIA	139
6.4 FATORES QUE INFLUEM NA BIODISPONIBILIDADE	140
6.5 MEDICAMENTOS GENÉRICOS	141
6.6 ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA E BIOEQUIVALÊNCIA ENVOLVENDO LAMIVUDINA E/OU ZIDOVUDINA	144
6.7 MATERIAL E MÉTODOS	146
6.7.1 MATERIAL	146
6.7.1.1 Medicamento Teste	146
6.7.1.2 Medicamento Referência	147
6.7.1.3 Substâncias Químicas de Referência	147
6.7.1.4 Soluções padrão	147
6.7.1.5 Reagentes e Vidraria.....	148
6.7.1.6 Equipamentos	148
6.7.1.7 Infra-estrutura	149

6.7.2 MÉTODOS	149
6.7.2.1 Avaliação biofarmacotécnica <i>IN VIVO</i>	149
6.7.2.1.1 Procedimento de Purificação das amostras	150
6.7.2.1.2 Condições cromatográficas para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma	150
6.7.2.1.3 Fluxograma	152
6.7.2.1.4 Avaliação da bioequivalência entre medicamentos teste e referência contendo lamivudina e zidovudina, apresentados sob a forma farmacêutica de comprimidos	153
6.7.2.1.4.1 Casuística	153
6.7.2.1.4.2 Procedimento do Ensaio de Biodisponibilidade Relativa	157
6.7.2.1.4.3 Coleta de Amostras	159
6.7.2.1.4.4 Quantificação de 3TC e ZDV nas amostras plasmáticas	159
6.7.2.1.4.5 Avaliação da Biodisponibilidade Relativa entre os Medicamentos Teste e Referência	160
6.8 RESULTADOS	162
6.8.1 AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA ENTRE MEDICAMENTOS TESTE E REFERÊNCIA CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA, APRESENTADOS SOB A FORMA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS	162
6.9 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	172
6.10 CONCLUSÃO	180
6.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
6.12 ANEXOS	184
ANEXO 6.1	185
ANEXO 6.2	187
ANEXO 6.3	191
ANEXO 6.4	240
CAPÍTULO VII - Estudos de Permeabilidade Utilizando	
	243

Modelos <i>In Vitro</i>	
7.1 INTRODUÇÃO	244
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	248
7.2.1 MATERIAL	248
7.2.2 CONDIÇÕES PARA A CULTURA DE CÉLULAS	248
7.2.3 ESTUDO DE PERMEABILIDADE ATRAVÉS DAS CÉLULAS MDCK-MDR1; MDCK E CACO-2	249
7.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA UTILIZANDO LC/MS/MS	251
7.2.5 ANÁLISE DOS DADOS	251
7.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	251
7.3 RESULTADOS	252
7.3.1 TRANSPORTE BIDIRECIONAL E INIBIÇÃO DA PERMEAÇÃO DE 3TC E ZDV ATRAVÉS DE CÉLULAS MDCK-MDR1 E CACO-2	252
7.3.2 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO CONCENTRAÇÃO/PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA UTILIZANDO CÉLULAS MDCK, MDCK-MDR1 E CACO-2	259
7.3.3 EFEITOS DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE LAMIVUDINA NO TRANSPORTE DE ZIDOVUDINA ATRAVÉS DAS MEMBRANAS FORMADAS POR MONOCAMADAS DE CÉLULAS CACO-2	265
7.4 DISCUSSÃO	267
7.5 CONCLUSÃO	269
7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	269
CONCLUSÃO GERAL	274

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Preparo das soluções padrão para avaliação da linearidade do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de 3TC e ZDV em comprimidos	40
Tabela 3.2 Preparo das soluções padrão que foram adicionadas ao placebo para avaliação da exatidão do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de 3TC e ZDV em comprimidos .	41
Tabela 3.3 Preparo das soluções padrão para avaliação da precisão intra e inter-ensaio do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de 3TC e ZDV em comprimidos.	43
Tabela 3.4 Resultados estatísticos relativos aos parâmetros utilizados para avaliação da linearidade da metodologia cromatográfica desenvolvida para a quantificação de lamivudina e zidovudina a 266 nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 ml/min e temperatura de 40 °C.	47
Tabela 3.5 Resultados de concentração de lamivudina padrão recuperada, após adição de três concentrações do fármaco a uma amostra placebo, obtidos após quantificação pelo método cromatográfico desenvolvido.	47
Tabela 3.6 Resultados de concentração de zidovudina padrão recuperada, após adição de três concentrações do fármaco a uma amostra placebo, obtidos após quantificação pelo método cromatográfico desenvolvido.	48
Tabela 3.7 Resultados de coeficiente de variação obtidos após quantificação de 6 amostras de lamivudina e zidovudina, em três concentrações diferentes, pelo método cromatográfico desenvolvido.	48
Tabela 4.1 Resultados do teste de variação de peso e peso médio realizado com 20 unidades dos produtos teste e referência, conforme	69

procedimento descrito em 4.2.2.1.2

Tabela 4.2 Resultados do teste de uniformidade de conteúdo de lamivudina em dez unidades dos produtos teste e referência 70

Tabela 4.3 Resultados do teste de uniformidade de conteúdo de zidovudina em dez unidades dos produtos teste e referência 71

Tabela 4.4 Resultados da quantificação de quatro amostras de lamivudina, contida nos produtos teste e referência e quantificada por cromatografia líquida, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm. 72

Tabela 4.5 Resultados da quantificação de quatro amostras de zidovudina, contida nos produtos teste e referência e quantificada por cromatografia líquida, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm. 72

Tabela 4.6 Resultados de porcentagem de dissolução de lamivudina e zidovudina, contidas nos produtos teste e referência, submetidas a teste de dissolução utilizando 900mL de água como meio, rotação igual a 50rpm e tempo de 30 minutos, sendo a quantificação por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm. 73

Tabela 4.7 Resultados médios de porcentagem de dissolução de lamivudina e zidovudina, contidas nos produtos teste e referência, submetidas a três condições distintas e quantificadas após trinta minutos de teste, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm. 74

Tabela 4.8 Resultados médios do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio água desgaseificada, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm 75

Tabela 4.9 Resultados médios do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Ácido clorídrico 0,01 M, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.	76
Tabela 4.10 Resultados médios do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Tampão fosfato pH 6,8, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266 nm.	77
Tabela 4.11 Resultados médios do perfil de dissolução de zidovudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Água degaseificada, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266 nm.	78
Tabela 4.12 Resultados médios do perfil de dissolução de zidovudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Ácido clorídrico 0,01 M, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266 nm.	79
Tabela 4.13 Resultados médios do perfil de dissolução de zidovudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Tampão fosfato pH 6,8, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.	80
Tabela 4.14 Resultados estatísticos dos estudos de regressão, aplicando os modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, derivados dos perfis de dissolução obtidos utilizando aparato 1, meio água e velocidade de rotação de 50 rpm, relativos aos produtos referência e teste para os fármacos lamivudina e zidovudina	81
Tabela 4.15 Parâmetros da constante de velocidade de dissolução (k); da	82

meia vida de dissolução ($t_{50\%}$); do tempo necessário a dissolução de 85% dos fármacos ($t_{85\%}$) e da quantidade de cada um dos fármacos dissolvidos em 30 minutos (Q30), presentes no produto referência após dissolução utilizando aparato 1, meio de dissolução água e velocidade de rotação de 50rpm.

- Tabela 4.16 Parâmetros da constante de velocidade de dissolução (k); da meia vida de dissolução ($t_{50\%}$); do tempo necessário a dissolução de 85% dos fármacos ($t_{85\%}$) e da quantidade de cada um dos fármacos dissolvidos em 30 minutos (Q30), presentes no produto teste após dissolução utilizando aparato 1, meio de dissolução água e velocidade de rotação de 50rpm. 82
- Tabela 5.1 Obtenção de amostras de plasma padrão de lamivudina e zidovudina utilizadas na elaboração da curva de calibração. 106
- Tabela 5.2 Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de lamivudina e zidovudina. 108
- Tabela 5.3 Valores médios referentes a cinco determinações experimentais do teste de recuperação de lamivudina, zidovudina e padrão interno adicionados às amostras de plasma, empregando-se o procedimento de dupla extração com porções de 4mL de acetato de etila. 113
- Tabela 5.4 Resultados estatísticos relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel binária composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 115
- Tabela 5.5 Precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrídas referentes a método analítico para quantificação de lamivudina em plasma por 116

cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis ou três determinações, para análise intra e inter-dias, respectivamente.

Tabela 5.6 Precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrídas referentes a método analítico para quantificação de zidovudina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis ou três determinações, para análise intra e inter-dias, respectivamente. 117

Tabela 5.7 Resultados médios de precisão e exatidão de amostras de controle de qualidade, contendo lamivudina, submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 118

Tabela 5.8 Resultados médios de precisão e exatidão de amostras de controle de qualidade, contendo zidovudina, submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 118

Tabela 5.9 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade de longa duração da lamivudina em amostras de plasma mantidas a -20°C e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 119

Tabela 5.10 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade de longa duração da zidovudina em amostras de plasma 120

mantidas a -20°C e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270 nm.

Tabela 5.11 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade da lamivudina em amostras de plasma mantidas a temperatura ambiente por 24 e 48 horas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 121

Tabela 5.12 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade da zidovudina em amostras de plasma mantidas a temperatura ambiente por 24 e 48 horas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 121

Tabela 5.13 Resultados estatísticos relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma utilizando cromatógrafo 2, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 123

Tabela 5.14 Precisão e exatidão intra-corrída referentes a método analítico para quantificação de lamivudina em plasma utilizando cromatógrafo 2. Cada valor representa a média de seis determinações. 124

Tabela 5.15 Precisão e exatidão intra-corrída referentes a método analítico para quantificação de zidovudina em plasma utilizando cromatógrafo 2. Cada valor representa a média de seis determinações. 124

Tabela 6.1 Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos após administração de lamivudina e zidovudina a 24 voluntários sadios, nas seguintes condições fármacos em comprimidos distintos (1), associados (2) e associados e administrados após refeição padronizada (3) (adaptado de Moore & Shaw *et al.*, 1999). 146

Tabela 6.2 Características dos voluntários incluídos no ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 150 mg de lamivudina e 300mg de zidovudina. R = produto referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline), T = produto teste (FURP - Lamivudina lote 9007, produzido por Fundação para o Remédio Popular – FURP). 156

Tabela 6.3 Desenho do estudo para ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 150 mg de lamivudina e 300mg de zidovudina. R = produto referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline), T = produto teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg - Lote 9009, produzido por Fundação para o Remédio Popular – FURP). 158

Tabela 6.4 Valores médios de concentração plasmática de lamivudina obtidos após administração do produto referência (Biovir® lote B067171) e do produto teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadiosdeterminação experimental da concentração plasmática de lamivudina. 164

Tabela 6.5 Valores médios de concentração plasmática de zidovudina obtidos após administração do produto referência (Biovir® lote B067171) e do produto teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadiosdeterminação experimental da concentração plasmática de lamivudina. 165

Tabela 6.6 Valores médios dos parâmetros farmacocinéticos referentes a lamivudina, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, 168

lote 9009) a 24 voluntários sadios. CV = coeficiente de variação, DP = desvio padrão.

Tabela 6.7 Valores médios dos parâmetros farmacocinéticos referentes a zidovudina, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. CV = coeficiente de variação, DP = desvio padrão. 169

Tabela 6.8 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica obtidos para lamivudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. 170

Tabela 6.9 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica obtidos para zidovudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. 170

Tabela 6.10 Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) e razões para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos para lamivudina, após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. 171

Tabela 6.11 Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) e razões para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos para zidovudina, após administração dos produtos 171

referência (Biovir[®] lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios.

Tabela 6.12 Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do IC 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos para lamivudina após administração dos produtos referência (Biovir[®] lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. 172

Tabela 6.13 Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do IC 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos para zidovudina após administração dos produtos referência (Biovir[®] lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. 172

Tabela 7.1 Transporte transepitelial e inibição de Zidovudina e lamivudina através de células da monocamada 258

Tabela 7.2 Transporte transepitelial conjunto de Zidovudina e Lamivudina através de células da monocamada 264

Tabela 7.3 Resultados referentes ao transporte transepitelial de Zidovudina, através de células Caco-2, na presença de concentrações crescentes de lamivudina. 266

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura geral do <i>virion</i> com as proteínas identificadas (Amato Neto <i>et al.</i> , 1996)	12
Figura 2.2 Desenho esquemático da replicação do Vírus HIV (Amato Neto <i>et al.</i> , 1996)	14
Figura 2.3 Fórmula estrutural da Lamivudina (3TC) (Johnson, <i>et al.</i> , 1999)	18
Figura 2.4 Esquema do caminho de fosforilação intracelular da 3TC (Kewn <i>et al.</i> , 1997)	19
Figura 2.5 Fórmula estrutural da zidovudina (ZDV) (Veal & Back, 1995)	21
Figura 2.6 Esquema do caminho de fosforilação intracelular da ZDV (Kewn <i>et al.</i> , 1997)	22
Figura 3.1 Cromatograma referente aos padrões de lamivudina e zidovudina na concentração de 100ng/mL, obtidos por método cromatográfico com determinação a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C	44
Figura 3.2 Cromatograma referente aos padrões de lamivudina e zidovudina (vermelho) e ao placebo (verde), obtido por método cromatográfico com determinação a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C	45
Figura 3.3 Retas de calibração do método cromatográfico para quantificação de lamivudina a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C	46
Figura 3.4 Retas de calibração do método cromatográfico para quantificação de zidovudina a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40°C	46

- Figura 4.1 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de lamivudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução água desgaseificada. 75
- Figura 4.2 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de lamivudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução Ácido clorídrico 0,01M. 76
- Figura 4.3 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de lamivudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8. 77
- Figura 4.4 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de zidovudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução água desgaseificada. 78
- Figura 4.5 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de zidovudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução ácido clorídrico 0,01M. 79
- Figura 4.6 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de zidovudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8. 80
- Figura 5.1 Fluxograma referente ao método de purificação e preparo de amostras plasmáticas destinadas a análise cromatográfica. 103

- Figura 5.2 Cromatogramas de análises cromatográficas nas condições preconizadas pelo método, de amostras de Padrões (c - verde) e plasmas branco (b - amarelo), lipêmico (d - azul) e hemolisado (a - vermelho). 112
- Figura 5.3 Reta de calibração referente a quantificação de lamivudina em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Fase A) e metanol (Fase B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 114
- Figura 5.4 Reta de calibração referente a quantificação de zidovudina em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Fase A) e metanol (Fase B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 115
- Figura 5.5 Reta de calibração referente a quantificação de lamivudina em plasma utilizando cromatógrafo 2, com fase móvel binária composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Fase A) e metanol (Fase B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 122
- Figura 5.6 Reta de calibração referente a quantificação de zidovudina em plasma utilizando Cromatógrafo 2, com fase móvel composta uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Fase A) e metanol (Fase B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm. 123
- Figura 6.1 Fluxograma referente ao método de purificação e preparo de amostras plasmáticas destinadas a análise cromatográfica. 152
- Figura 6.2 Curvas médias "concentração plasmática de lamivudina *versus* tempo" após administração dos produtos referência (Biovir[®] lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média. 166

- Figura 6.3 Curvas médias “concentração plasmática de zidovudina *versus* tempo” após administração dos produtos referência (Biovir[®] lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média. 167
- Figura 7.1 Transporte transepitelial de zidovudina (2,5 µg/mL) através das células MDCK (a) e acúmulo intracelular (b). 253
- Figura 7.2 Transporte transepitelial de lamivudina (2,5 µg/mL) através das células MDCK (a) e acúmulo intracelular (b). 254
- Figura 7.3 Transporte transepitelial de zidovudina (5 µg/mL) através das células Caco-2 (a) e acúmulo intracelular (b). 255
- Figura 7.4 Transporte transepitelial de lamivudina (5 µg/mL) através das células Caco-2 (a) e acúmulo intracelular (b). 256
- Figura 7.5 Resultados do transporte transepitelial de lamivudina em associação com concentrações iguais e crescentes de zidovudina (de 2,5 a 15 µg/mL) através de células MDCK-MDR1, nas direções A→B (a) e B→A (b). 260
- Figura 7.6 Resultados do transporte transepitelial de zidovudina em associação com concentrações iguais e crescentes de lamivudina (de 2,5 a 15 µg/mL) através de células MDCK-MDR1, nas direções A→B (a) e B→A (b). 261
- Figura 7.7 Transporte transepitelial de lamivudina e zidovudina associadas em concentrações (5 e 10 µg/mL) iguais e crescentes através de células Caco-2, nas direções A→B (a) e B→A (b). 262
- Figura 7.8 Transporte transepitelial de Zidovudina através de células Caco-2 em associação a concentrações crescentes de lamivudina. 266

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AIDS - Acquired immunodeficiency syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida);
- ASC_{0-t} - Área sob a curva de concentração sanguínea em função do tempo que varia de 0 a t.;
- $ASC_{0-\infty}$ - Área sob a curva de concentração sanguínea em função do tempo onde o valor de ASC_{0-t} é extrapolado para infinito;
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência;
- C_{max} – Concentração plasmática máxima;
- C_{eee} - concentração média no estado de equilíbrio estacionário;
- C V – Coeficiente de variação;
- DP – Desvio padrão;
- DPR – Desvio padrão relativo;
- F_s - quantidade em porcentagem acumulada de fármaco dissolvido no tempo t;
- HAART – Highly active antiretroviral therapy ou terapia anti-retroviral altamente potente;
- HIV - Human Immunodeficiency virus ou Vírus da imunodeficiência Humana;
- HTLV-I – Human T-lymphotropic virus ou vírus da leucemia de células T humanas tipo I;
- K_d - constante de velocidade de desintegração;
- K_s - Constante de velocidade de dissolução;
- K - constante de velocidade de dissolução de primeira ordem;
- K_0 = constante de velocidade de dissolução de ordem zero;
- LAV – Lymphadenopathy associated virus (Vírus associado a linfadenopatia);
- Q_{∞} - Quantidade total dissolvida;
- t_{max} – Tempo necessário para atingir C_{max}
- $t(1/2_{\beta})$ – Meia vida de eliminação
- τ - intervalo de dose;
- UV – Ultravioleta;
- 3TC – Lamivudina;
- ZDV – Zidovudina.

RESUMO

Lamivudina (3TC) e zidovudina (ZDV) são inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa utilizados na terapêutica anti-HIV. Para avaliar a equivalência farmacêutica entre um medicamento teste contendo esta associação e o referência, foi desenvolvido um método para determinação cromatográfica simultânea de 3TC e ZDV em comprimidos. O método empregou coluna C8 Shim-pack® (150 x 4,6 mm, 5 µm), pré-coluna C18 Phenomenex® (50x4,6 mm 5µm), água e metanol 60:40 (v:v) como fase móvel e detecção a 266nm. Este mostrou-se específico, com linearidade entre 45 a 5000 ng/mL, precisão demonstrada por CV% inferior a 5%, exatidão entre 90,0 e 110,0% com recuperação superior a 90% para ambos os fármacos. Os testes de dissolução apresentaram porcentagem de cedência média superior a 85% em 30 minutos. A biodisponibilidade relativa dos produtos Biovir® (referência) e Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg (teste), foi avaliada por meio de um estudo quantitativo direto, cruzado e aberto. Para purificação das amostras biológicas contendo 3TC e ZDV foi realizada adição de acetato de amônio e dupla extração com acetato de etila. O método cromatográfico bioanalítico utilizou coluna C8 Shim-pack® (150 x 4,6 mm 5 µm) e pré-coluna C18 Phenomenex® (50 x 4,6 mm; 5 µm). Empregou-se sistema gradiente linear, combinando fase móvel A, tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) e fase móvel B, metanol, sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 270 nm. Utilizou-se como padrão interno solução 10 µg/mL de estavudina. O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 80 a 2500 ng/mL para 3TC e 80 a 5000 ng/mL para ZDV, com adequada precisão e exatidão intra-corridas e inter-corridas. As amostras plasmáticas mostraram-se estáveis a pelo menos três ciclos de congelamento e descongelamento e 48 horas à temperatura ambiente, após preparação. Os parâmetros farmacocinéticos calculados para 3TC foram: ASC_{0-t} de 4936,10 ng.h/mL e 4760,07 ng.h/mL, $ASC_{0-\infty}$ de 5305,76 ng.h/mL e 5069,16 ng.h/mL; C_{max} de 1526,33 ng/mL e 1585,61 ng/mL e t_{max} 1,04 h e 0,97 h, respectivamente, para os produtos referência e teste. Para ZDV os valores obtidos foram ASC_{0-t} de 2341,32 ng.h/mL e 2538,17 ng.h/mL, $ASC_{0-\infty}$ de 2561,68 ng.h/mL e 2770,21 ng.h/mL e C_{max} de 2406,56 ng/mL e 2652,80 ng/mL e t_{max} 0,60 h e 0,55 h, respectivamente, para os produtos referência e teste.

Os intervalos de confiança 90% para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica obtidos para ambos os fármacos após administração dos produtos referência e teste a 24 voluntários saudáveis, estiveram compreendidos entre os limites de 80 a 125% exceto pelo C_{max} para ZDV. O coeficiente de variação intra-sujeito de 47% demonstrou a alta variabilidade da ZDV em relação ao C_{max} .

Estudos de permeabilidade indicaram que a ZDV tem alta permeabilidade e alta solubilidade (Classe I) e a 3TC apresenta moderada permeabilidade e alta solubilidade (Classe III). A absorção destes não é afetada significativamente pelas glicoproteínas-P, o que não pode explicar a alta variabilidade *in vivo* da absorção de ZDV.

Palavras chave: lamivudina; zidovudina; biodisponibilidade relativa; permeabilidade; CLAE

ABSTRACT

Lamivudine (3TC) and zidovudine (ZDV) are the nucleoside reverse transcriptase inhibitors. They are used in combinations of antiretroviral therapy. The switchability between one test product and reference could be proved if they are pharmaceutically equivalents and bioequivalents. This research beginning with development and validation of chromatographic method to 3TC and ZDV simultaneous determination in tablet. The HPLC system were used to assay and 266nm wavelength ultraviolet detector. Separation was performed using a C8 column (150 x 4,6 mm, 5 μ m) Shim-pack® protected by a C18 column (50 x 4,6 mm, 5 μ m) Phenomenex®. The mobile phase is composed of water and methanol 60:40 (v:v). This method was successfully applied to simultaneous determination to 3TC and ZDV without interference. It was validated over the range of 45 a 5000 ng/mL for both drugs with accurate from 90 to 110% and precision with variation lower than 5%. Extraction recoveries of the analytes were higher than 90%.

The mean dissolution data about 3TC and ZDV were above than 85% in 30 minutes of dissolution test. The relative bioavailability between Biovir® (brand-name product) and Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg (test product), was conducted for one direct quantitative, open and crossover study. The serial plasma sample of 3TC and ZDV collected after oral administration of brand-name product and test product, were analyzed using a validated high-performance liquid chromatography assay with UV detection in wavelength of 270 nm. The double liquid-liquid extraction was realized with additions of amonio acetat. A CLC-C8 (M) column (150 x 4,6 mm 5 μ m) Shim-pack® and C18 column (50 x 4,6mm 5 μ m) Phenomenex®, was eluted with two mobile phase in a linear gradient system at a flow-rate of 1mL/min. The mobile phase A was composed by 0,01 M phosphate bufer:acetonitrile (97:3 v/v) and mobile phase B composed by methanol. A methanolic solution containing 10 μ g/mL of stavudine was used as internal standard. The method was linear over the range of 80 a 2500 ng/mL for 3TC and 80 a 5000 ng/mL for ZDV. It was shown adequate intra-day accuracy; inter-day accuracy and precision. The sample have been stable in three cycle of freezing and thawing and 48 hours in room temperature after thawing, purified and with mobile phase. The pharmacokinetic parameter estimates for 3TC, were: ASC_{0-t} de 4936,10 ng.h/mL e 4760,07 ng.h/mL, $ASC_{0-\infty}$ de 5305,76 ng.h/mL e 5069,16 ng.h/mL; C_{max} de 1526,33 ng/mL e 1585,61

ng/mL e t_{max} 1,04 h e 0,97 h, respectively for brand-name product and test product. The obtained values for ZDV were: ASC_{0-t} de 2341,32 ng.h/mL e 2538,17 ng.h/mL, $ASC_{0-\infty}$ de 2561,68 ng.h/mL e 2770,21 ng.h/mL e C_{max} de 2406,56 ng/mL e 2652,80 ng/mL e t_{max} 0,60 h e 0,55 h respectively for for brand-name product and test product. The 90% confidence intervals for C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ for log-transformed results for 3TC and ZDV after oral administration of brand-name product and test product to 24 health volunteers was between 80 to 125% except for C_{max} of ZDV. The high variability of C_{max} this was displayed by intra-individual coefficient of variation of 47%. Permeability results suggest that ZDV has a high permeability and high solubility (Class I) and Lamivudine presents moderate permeability and high solubility (Class III). These results assume that P-gp do not affect significantly lamivudine and zidovudine absorption and can not explain the high variability of zidovudine absorption.

Key word: lamivudine; zidovudine; bioavailability; permeability; HPLC

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi reconhecida inicialmente em 1981 nos Estados Unidos, embora existam evidências de que a doença tenha surgido na África há cerca de 40 anos atrás. A disseminação da doença pelo mundo ocorreu rapidamente, a partir da década de 80 (Amato Neto, 1996; Castilho & Bastos, 1997). No Brasil existe uma grande preocupação em deter este avanço e possibilitar acesso universal e gratuito ao tratamento por parte dos portadores do vírus HIV (Brasil 2002b). A lamivudina (3TC) e a zidovudina (ZDV) são agentes anti-retrovirais, indicados para a terapêutica da AIDS (Havir & Lange, 1998; Aoki, 1999). Eles são incluídos na classe dos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos e atuam inibindo a replicação do vírus HIV, ligando-se ao DNA pró-viral de linfócitos ocasionando a terminação da cadeia de aminoácidos (Veal *et al.*, 1996).

A atual expansão da utilização da terapia anti-retroviral combinada pode ser associada a possibilidade de aumento da supressão viral, prevenção da resistência aos fármacos e simplificação da posologia. Esta última é observada quando são utilizadas formulações contendo associações de agentes anti-retrovirais. Esta simplificação da posologia pode ocasionar maior adesão dos portadores do HIV ao tratamento (Montaner *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 1998; Horneff *et al.*, 1998; Moodley *et al.*, 1998).

No final da década de 80 e início de 90 ocorreu uma progressão significativa do número de pessoas infectadas pelo vírus HIV. Isto levou a Organização Mundial de Saúde a considerar a AIDS uma pandemia, resultando em várias iniciativas visando controlar a sua expansão. No Brasil criou-se um programa visando possibilitar melhor qualidade de vida aos portadores do HIV, incluindo a distribuição gratuita dos medicamentos utilizados, sendo consolidado com o Decreto nº 9.313 de 13 de novembro de 1996 (Brasil 2002b).

Os avanços no tratamento e na forma de monitorar a infecção por HIV são benefícios que vem acompanhados de altos custos e, em certos casos, de vários efeitos

adversos (Cohn, 1997). Devido a isto, é crescente o volume de pesquisas direcionadas ao estudo e descoberta de novos fármacos e esquemas posológicos. (Montaner *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 1998; Horneff *et al.*, 1998).

No mundo, cerca de 90% das pessoas infectadas pelo HIV vivem em sociedades sem recursos financeiros para o tratamento (Cohn, 1997). No Brasil, o Ministério da Saúde passou a fomentar a produção de anti-retrovirais por laboratórios nacionais (principalmente os oficiais). Atualmente existe estímulo à pesquisa de formulações que atendam aos requisitos necessários à obtenção de medicamentos genéricos para esta classe terapêutica, visando assegurar a qualidade e a intercambialidade dos mesmos. É importante ressaltar também que os medicamentos genéricos possuem preços reduzidos em comparação ao produto de marca, o que contribui para a viabilidade econômica desta iniciativa (Benson, 2001; Brasil, 2002a).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1996) e a ANVISA (Brasil, 2003a), os medicamentos genéricos devem satisfazer aos mesmos padrões de qualidade, eficácia e segurança que o produto original, ou inovador, além de serem clinicamente intercambiáveis com estes últimos. Para algumas classes de produtos, inclusive formulações parenterais de compostos altamente solúveis em água, a intercambialidade é adequadamente garantida pela implementação das Boas Práticas de Fabricação e pela evidência de conformidade com especificações farmacopéicas relevantes. Entretanto, para a maioria dos produtos, incluindo grande parte das formas farmacêuticas sólidas orais, a intercambialidade deve ser demonstrada, anexando-se esses dados à documentação para requisição da autorização de comercialização de medicamento genérico. Em geral, isso pode ser realizado por meio de ensaios de biodisponibilidade relativa e bioequivalência (Arancibia, 1991; Storpirtis & Consiglieri, 1995; Storpirtis *et al.*, 1999).

Durante os estudos de biodisponibilidade relativa e ou bioequivalência, as formulações teste e referência são administradas a voluntários sob as mesmas condições.

Posteriormente, amostras acessíveis de líquidos biológicos, tais como sangue e urina, são analisadas em relação à concentração de fármaco e ou metabólitos. São avaliados os seguintes parâmetros farmacocinéticos dos medicamentos teste e referência: área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC_{0-t}) e concentração plasmática máxima (C_{max}) que devem ser comparados estatisticamente (Moraes & Moraes, 2000; Consiglieri & Storpirtis, 2000; Storpirtis & Consiglieri, 1995)

Dessa forma, considerando-se a relevância da pesquisa aplicada ao desenvolvimento e avaliação biofarmacotécnica de medicamentos anti-retrovirais no Brasil, realizou-se, no presente trabalho, estudo comparativo empregando comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg. Para tanto, foram comparados os medicamentos teste produzido pela Fundação para o Remédio Popular (FURP), e o referência BIOVIR[®], do laboratório Glaxo SmithKline, analisando aspectos relativos às características físico-químicas dos produtos, permeabilidade (*in vitro*) e farmacocinética (*in vivo*) dos fármacos por meio do estudo de biodisponibilidade relativa.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar avaliação biofarmacotécnica *in vitro* e *in vivo* de dois medicamentos contendo uma associação de lamivudina e zidovudina. Isto inclui a execução de um estudo de biodisponibilidade relativa entre os produtos Furp – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, produzido pela Fundação para o Remédio Popular (FURP) (medicamento teste) e Biovir® produzido pela Glaxo SmithKline (medicamento referência).

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visando atender ao objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos.

- ◆ Desenvolver e validar método analítico para quantificação *in vitro* de lamivudina e zidovudina;
- ◆ Realizar ensaios físico-químicos (variação de peso e peso médio, teor de fármacos, uniformidade de conteúdo e perfis de dissolução) dos produtos avaliados;
- ◆ Desenvolver e validar método para avaliar a cinética de dissolução de lamivudina e zidovudina contidos em um único comprimido revestido;
- ◆ Desenvolver método bioanalítico adequado à quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma e às exigências normativas de um estudo de biodisponibilidade relativa;
- ◆ Avaliar a biodisponibilidade relativa entre os produtos teste e referência apresentados sob a forma de comprimidos revestidos;
- ◆ Realizar estudos de permeabilidade relativa visando caracterizar lamivudina e zidovudina segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica;
- ◆ Utilizar células MDCK; MDCK-MDR1 e CACO-2 como modelos *in vitro* para determinar a permeabilidade e prever a extensão da absorção *in vivo*.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO NETO, V.; 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. 153 p.

ARANCÍBIA, A. Calidad biofarmacêutica: estudos "in vivo" e "in vitro". *Acta Farm. Bonaerense*, La Plata, v.10, n.2, p.123-133, 1991.

AOKI, F.Y. Infecções virais. In: PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFAMAN, B.B. *Farmacologia Integrada*. São Paulo: Manole, 1999. p. 445-460.

BENSON, M.D. Therapeutic equivalents in clinical practice. *Int. J. Fertil. Women's Med.*, Washington, v. 46, n.2, p. 89-94, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Dados e Pesquisas. Documentos e Publicações. Boletim epidemiológico Aids DST. Editorial. Disponível em <http://www.aids.gov.br/sitebol/inferior.htm>. Acesso em: 01 jul. 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Documentos, recomendações e relatórios técnicos. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/documentos.htm>. Acesso em: 01 jul. 2002b.

BRASIL. Resolução RDC n.894, de 29 de maio de 2003. "Guia para protocolo e relatório técnico de estudos de bioequivalência".[A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun. 2003a.

CASTILHO, E.A.; BASTOS, F.I. AIDS (1981-97): o rastro da tormenta. *Rev. USP*, São Paulo, v. 33, p. 7-19, 1997.

COHN, J.A. Recent advances HIV infection – I. *BMJ [Br. Med. J.]*, London, v. 314, n. 7079, p. 487-491, 1997. [Review].

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2000.

HAVLIR, D.V.; LANGE, J.M.A. New antivirals and new combinations. *AIDS*, New York, v. 12, suppl. A, p. S165-S174, 1998.

HENRY, K.; ERICE, A.; TIERNEY, C.; BALFOUR Jr., H.H.; FISCHL, M.A.; KMACK, A.; LIOU, S.H.; KENTON, A.; HIRSCH, M.S.; PHAIR, J.; MARTINEZ, A.; KAHN, J.O. A randomized, controlled, double-blind study comparing the survival benefit of four different reverse transcriptase inhibitor therapies (three-drug, two-drug, and alternating

drug) for the treatment of advanced AIDS. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, New York, v. 19, n. 4, p. 339-349, 1998.

HORNEFF, G.; ADANS, O.; WAHN, V. Pilot study of zidovudine-lamivudine combination therapy in vertical HIV-infected antiretroviral-naive children. *AIDS*, New York, v. 12, n. 5, p. 489-494, 1998.

MONTANER, J.S.G.; REISS, P.; COOPER, D.; VELLA, S.; HARRIS, M.; CONWAY, B.; WAINBERG, M.A.; SMITH, D.; ROBINSON, P.; HALL, D.; MYERS, M.; LANGE, J.M.A. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine and zidovudine for HIV-infected patients. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 279, n. 12, p. 930-937, 1998.

MOODLEY, J.; MOODLEY, D.; PILLAY, K.; COOVADIA, H.; SABA, J.; VAN LEEUWEN, R.; GOODWIN, C.; HARRIGAN, P.R.; MOORE, K.H.; STONE, C.; PLUMB, R.; JOHNSON, M.A. Pharmacokinetics and antiretroviral activity of lamivudine alone or when co-administered with zidovudine in HIV-infected pregnant women and their offspring. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 178, p. 1327-1333, 1998.

MORAES, M.E.A.; MORAES, O.M. Ensaio clínico de medicamentos no Brasil. *Farmacos Med.*, São Paulo, v. 5, p. 36-40, 2000.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

STORPIRTIS, S. *Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos*. São Paulo, 1999. 72p. [Apostila].

VEAL, G.J.; HOGGARD, P.G.; BARRY, M.G.; KHOO, S.; BACL, D.J. Interaction between lamivudine (3TC) and other nucleoside analogues for intracellular phosphorylation. *AIDS*, New York, v. 10, n. 5, p. 546-548, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparation. 34 Report. Geneva: WHO, 1996. 44 p.

CAPÍTULO II

AIDS: HISTÓRICO, HIV E TERAPÊUTICA

2.1 AIDS: CONSIDERAÇÕES GERAIS E HISTÓRICO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença caracterizada por significativa imunossupressão associada a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (Cohn, 1997; Sprinz & Finkelsztejn, 1999). Ela foi detectada inicialmente em 1981, após surgimento de vários casos de Sarcoma de Kaposi e Pneumonia pelo *Pneumocystis carinii*, em pacientes homossexuais masculinos, procedentes de grandes cidades norte-americanas (Sprinz & Finkelsztejn, 1999). Embora essas fossem doenças já conhecidas, elas haviam sido detectadas antecipadamente em indivíduos idosos e pacientes com câncer em estágios avançados, respectivamente. A incidência em pacientes homossexuais masculinos, chamou a atenção do órgão de vigilância epidemiológica norte-americano, "Centers for Disease Control and Prevention", que passou a estudar a doença, definindo o seu perfil clínico e epidemiológico. Certas características sugeriam uma etiologia infecciosa, transmitida por via sexual, vertical e parenteral (Balint, 2001). No Brasil os primeiros casos surgiram em 1982 (Amato Neto *et al.*, 1996).

Em 1984, os grupos chefiados pelo Dr. Luc Montagnier, em Paris, e pelo Dr Robert Gallo, nos Estados Unidos, anunciaram a descoberta de um retrovírus que seria o agente etiológico da AIDS. Por algum tempo após sua descoberta, foram utilizadas duas denominações: LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus* ou vírus associado a linfadenopatia) e HTLV-I (*Human T-Lymphotropic Virus* ou vírus da leucemia de células T humanas tipo I). Em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia das Viroses propôs a denominação HIV (*Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana) que passou a ser adotada universalmente. Após a descoberta do HIV, um subtipo foi isolado de amostras de pacientes provenientes do leste da África. Este foi denominado HIV-2 e seu antecessor HIV-1 (Amato Neto *et al.*, 1996).

Em 1986, foi aprovado pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos FDA (Food and Drug Administration), o primeiro fármaco com atividade anti-retroviral, a azidotimidina ou zidovudina (AZT ou ZDV). As avaliações clínicas da utilização deste fármaco demonstraram impacto discreto sobre a mortalidade geral de

pacientes infectados pelo HIV, porém sua eficácia na redução do risco de transmissão vertical e no tratamento de pacientes infectados, portadores de neuropatia periférica foi reconhecida (Balint, 2001).

Entre o final da década de 80 e início de 90, pouco se conseguiu de benefício na luta contra a AIDS, e a doença alastrou-se pelo mundo, particularmente em países subdesenvolvidos da África Central (Uganda, Kênia, Tanzânia, Moçambique, entre outros) e do Sudeste Asiático (Tailândia, Laos, Indonésia, entre outros) (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2004). Na década de 80, surgiu um programa da Organização Mundial de Saúde, denominado KABP (*knowledge, attitudes, beliefs and practices*), que objetivou conhecer melhor as características da doença, definindo atitudes, prioridades e ações que poderiam diminuir sua expansão.

Entre os anos de 1996 e 1998 muitos esforços foram iniciados na Europa, visando diminuir o número de novos casos de AIDS. Nesta época foram observados avanços nos cuidados com a saúde de portadores do HIV, bem como, a difusão das terapias antiretrovirais altamente potentes (*Highly active antiretroviral therapy - HAART*). Desde 1997, as HAART se tornaram um novo padrão de terapia anti HIV, sendo introduzidas na rotina clínica em vários países do mundo. Elas consistem na combinação de três ou mais fármacos das seguintes classes de anti-retrovirais: inibidores da transcriptase reversa, inibidores da protease e os recentemente aprovados inibidores da fusão (King *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2004, Pereira & Paridaen, 2004). Este esquema de tratamento possibilita a redução da carga viral para menos de 50 cópias virais/mL em pacientes não tratados anteriormente, ocasionando a supressão da replicação do HIV de maneira eficaz e sustentável (Moatti & Souteyrand, 2000).

No Brasil, o programa de acesso universal e gratuito aos medicamentos para AIDS, criado pelo ministério da Saúde em 1996, tem contribuído para melhorar a qualidade de vida dos portadores do HIV (Brasil, 2002b). O esforço nacional em controlar a doença tem ocasionado resultados significativos tanto na área da saúde, como também da economia, uma vez que o país está gastando menos com as internações e o controle de infecções oportunistas em portadores do HIV (Brasil, 2002a).

A replicação do vírus ocorre nos linfócitos CD4 infectados. Eles são liberados para o plasma sob a forma de vírions que possuem meia vida de aproximadamente 6 horas. Estes vírions iniciam uma rota de infecção de células CD4, pelos tecidos linfóides. Cerca de 10 bilhões de novos vírions podem ser produzidos diariamente por um indivíduo infectado. Cerca de 2 bilhões de linfócitos CD4 morrem e são repostos por dia. Quando a reposição dessas células se esgota, ocorre uma imunodeficiência clínica. Com um potente tratamento ocorre um declínio significativo na replicação do vírus, com diminuição de até 99% do número de cópias detectadas no plasma. Porém há pacientes que entram em um período de latência clínica, após anos de progressiva imunossupressão e disfunção assintomática. Estes sintomas estão associados a um declínio dos linfócitos CD4 e evolução da AIDS (Cohn, 1997; Bartlett, 1996).

2.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um vírus da família *Lentiviridae*, com genoma RNA (embora durante seu ciclo celular a incorporação do material genético ocorra no núcleo da célula, ao contrário de outros vírus RNA que o fazem somente no citoplasma). Pertencente ao grupo dos retrovírus não-citopáticos e não-oncogênicos eles necessitam, para multiplicar-se, de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia DNA, que pode então integrar-se ao genoma do hospedeiro (Fauci, 1988). Estes vírus infectam células do sistema mononuclear fagocitário (linfócitos T e macrófagos) e comprometem preferencialmente os sistemas nervoso central e imunológico (Amato Neto *et al.*, 1996).

A estrutura geral do vírus HIV, conforme apresentado na Figura 2.1, é formada por glicoproteínas, como as gp120 e gp41. Estas originam complexos glicoprotéicos denominados gp160 que constituem a porção mais externa do vírus denominada "envelope". As gp160 apoiam-se sobre uma dupla camada lipídica, formando saliências na superfície do vírus. Imediatamente abaixo estão as proteínas p17, constituindo a matriz da estrutura viral, que é vital para sua integridade. A cápside é composta fundamentalmente pela proteína p24. Ela contém o material genético viral, constituído

por duas moléculas de RNA, juntamente com a enzima transcriptase reversa (p66, p12) e com as proteínas p9 e p7 (Amato Neto *et al.*, 1996).

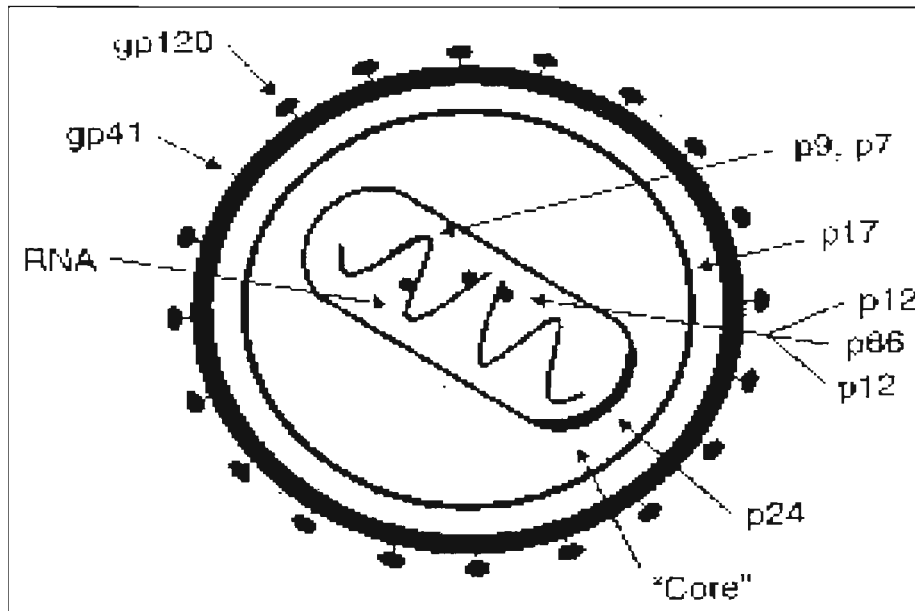


Figura 2.1 _ Estrutura geral do *vírion* com as proteínas identificadas (Amato Neto *et al.*, 1996)

O HIV é caracterizado pelo seu alto nível de infecção, o que ocasiona elevação rápida da carga viral. Estima-se que cerca de 10 bilhões de partículas de HIV são produzidas e destruídas diariamente. A meia vida plasmática do vírus é de aproximadamente 6 horas (Carpenter *et al.*, 1997). A infecção pelo vírus HIV resulta em uma profunda imunossupressão ocasionada pela depleção seletiva dos linfócitos T que expressam receptores para o vírus. Esta pode ocasionar anormalidades neuropsiquiátricas e induzir a morte celular, interferindo na função das células T4 por vários mecanismos. O vírus pode existir dentro das células sob a forma latente ou crônica ou ser convertido na forma infecciosa (Fauci, 1988).

2.2.1 MECANISMO DE REPLICAÇÃO

O mecanismo de replicação do HIV pode ser observado de modo esquemático na Figura 2.2. Ele inicia-se pela ligação de glicoproteínas virais ao receptor específico da

superfície da célula-alvo. Em seguida ocorre a fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira e a entrada da nucleocápside que caracteriza a infecção viral. A nucleocápside possui importância na prática clínica para o diagnóstico e monitoramento da doença (Fauci, 1988; Amato Neto *et al.*, 1996).

O material genético ("core") é liberado para o citoplasma da célula hospedeira ocorrendo a Transcrição do RNA viral em DNA complementar, que é dependente da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, o DNA complementar é transportado para o núcleo da célula, onde pode haver integração no genoma celular (provírus), que é dependente da enzima integrase, ou permanecer em forma circular isoladamente. O provírus reativado produz RNA mensageiro viral indo então para o citoplasma da célula. A etapa seguinte consiste na reunião das proteínas virais e formação da estrutura externa do vírus, que é liberado para o exterior das células CD4. As proteínas virais produzidas são quebradas em sub unidades através das enzimas proteases ocorrendo a maturação do vírus (Amato Neto *et al.*, 1996).

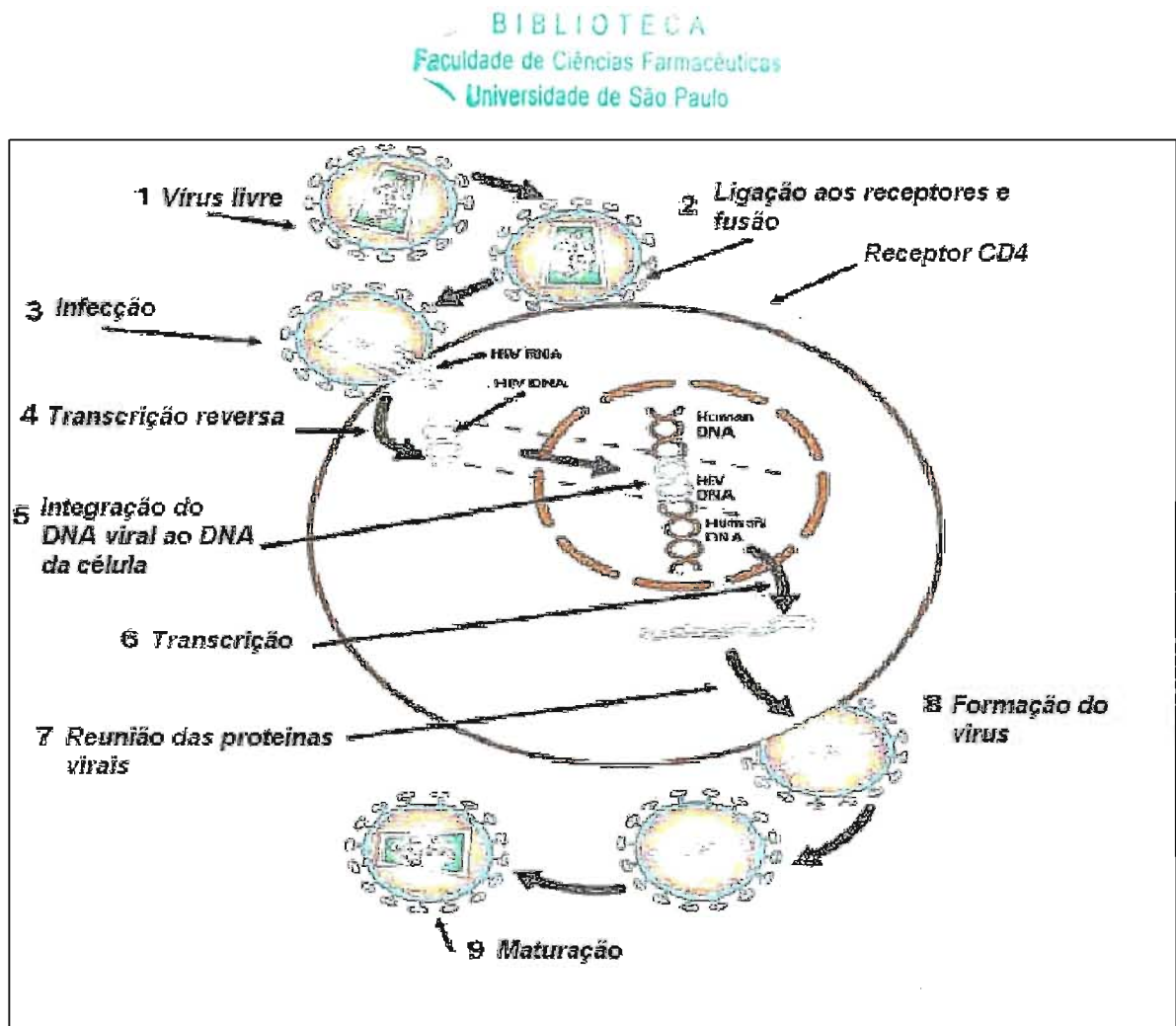


Figura 2.2 – Desenho esquemático da replicação do Vírus HIV (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2004).

2.3 AGENTES ANTI-RETROVIRAIS

Os agentes anti-retrovirais são fármacos que inibem a replicação viral, atuando em diferentes fases do processo. Até o momento já foram desenvolvidas quatro classes de fármacos, os inibidores da protease; inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos e não nucleosídeos (Aymard *et al.*, 2000) e, mais recentemente, os inibidores da fusão (Lazzarin, 2005).

2.3.1 INIBIDORES DA PROTEASE

O grupo dos fármacos anti-retrovirais inibidores da protease, surgiu em 1994 após esclarecido o mecanismo de replicação do HIV. Estes revelaram potente efeito anti-viral *in vitro*, e seu uso *in vivo*, isoladamente ou em associação com fármacos do grupo dos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos, proporcionou uma melhora considerável dos sintomas da AIDS. Esta descoberta apresentou um enorme impacto na história da infecção pelo HIV, contribuindo para a diminuição da mortalidade imediata, melhora dos indicadores da imunidade e recuperação de infecções oportunistas (Burger *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999).

Os agentes anti-retrovirais inibidores da protease atuam como um sensor molecular, determinando a clivagem de poliproteínas e proteínas funcionais. A inibição da protease, impede a maturação do “virion” e a obtenção de sua forma infecciosa (Jayeward *et al.*, 1998; Woolf *et al.*, 1997). Porém a enzima protease é, necessária para realização de determinadas reações orgânicas em humanos e sua inibição pode ocasionar interferência no metabolismo e alguns efeitos adversos pouco comuns. Dentre eles estão a redistribuição da gordura corporal, conhecida também como lipodistrofia ou uma síndrome de resistência periférica à insulina (Martin *et al.*, 1999).

Dentre os principais componentes desta classe de fármacos, podemos citar: amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir e saquinavir (Aymard *et al.*, 2000).

2.3.2 INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA NÃO-NUCLEOSÍDEOS

Os agentes anti-retrovirais, classificados como inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos, atuam inibindo potente e seletivamente a enzima transcriptase reversa do vírus HIV tipo 1 (Murphy & Montaner, 1996; Wu *et al.*, 1991). O mecanismo de ação destes fármacos consiste na competição direta pela ligação aos sítios de ação da enzima (Koop *et al.*, 1991).

Na classe dos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos, não há inibição da terminação da cadeia de ácidos nucleicos, contrariamente aos anti-retrovirais análogos nucleosídeos (Palladino *et al.*, 1994)

A necessidade da obtenção de fármacos cada vez mais potentes com ausência ou mínimas reações adversas tem motivado inúmeros pesquisadores a se dedicarem a obtenção de novos anti-retrovirais. A classe dos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos possui cerca de 25 tipos de substâncias. Dentre as quais podemos citar: 1-(2-hidroxietoximetil)-6-(pheniltio)timina (HEPT); tetraidroimidazo [4,5,1-jk][1,4]benzodiazepim-2(1H)-ona e tiona (TIBO); derivados piridinona; bis(heteroaril)piperazina (BHAP); 2',5'-bis-O-(tert-butildimetilsilil)-3'- espiro - 5''-(4''-amino-1'',2'',-oxatiol-2'',2''-dioxido)pirimidina (TSAO); derivados dos α -anilino-fenilacetamidas (α -APA); feniletilureatiazol (PETT); e mais recentemente os compostos tieno [3,4-e][1,2,4] tiadiazinas (TTDs) (Witvriuw *et al.*, 1998). Os compostos mais comercializados dessa classe são: nevirapina, delavirdina e efavirenz (Aymard, 2000).

2.3.3 INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA ANÁLOGOS NUCLEOSÍDEOS

Os inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos são análogos de nucleosídeos e atuam inibindo a transcriptase reversa por um mecanismo complexo, que inclui a terminação da cadeia de ácidos nucleicos nascente. A terapêutica empregando análogos nucleosídeos é associada clinicamente ao surgimento de neuropatias periféricas e supressão da medula óssea. Devido às diferenças no mecanismo de ação, estes efeitos adversos não são descritos durante o tratamento com inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (Palladino *et al.*, 1994).

Considerados a pedra angular da terapia antiretroviral altamente potente (HAART) são utilizados na terapêutica combinada evitando o surgimento de resistência viral ao tratamento. Para que exerçam sua ação os análogos nucleosídeos necessitam de ativação por meio de fosforilação intracelular. Durante o planejamento da terapêutica combinada é necessário escolher fármacos cujas enzimas responsáveis pelas etapas de

fosforilação sejam diferentes. Isto visa evitar a competição pelas enzimas e conseqüentemente a diminuição da eficácia dos agentes anti-retrovirais (King *et al.*, 2002).

Dentre os análogos nucleosídeos que atuam inibindo a transcriptase reversa, podemos citar: abacavir, didanosina, didesoxicitidina, lamivudina, estavudina e zidovudina (Aymard *et al.*, 2000).

2.3.4 INIBIDORES DA FUSÃO

Os inibidores da fusão constituem uma nova classe de agentes anti-retrovirais, que atuam bloqueando a entrada do vírus HIV nas células hospedeiras impedindo sua fusão com a parede celular. O primeiro componente desta classe é o Efavirtide (T-20), que apresenta potente atividade antiviral e adequada segurança, além de ser bem tolerado quando administrado conjuntamente a outros agentes antiretrovirais. Este fármaco tem sido utilizado como uma alternativa ao tratamento, quando ocorre progressão da doença, devido ao seu baixo potencial para resistência cruzada (Pereira & Paridaen, 2004; Lazzarin, 2005).

2.4 LAMIVUDINA

A Lamivudina (3TC) é uma citidina sintética 2',3' didesoxinucleosídeo com uma configuração absoluta 2R, 5S não natural (Perry & Faulds, 1997). Ela é uma dideoxipirimidina, onde o carbono 3' do anel da ribose é substituído por um enxofre, conforme pode ser observado na fórmula estrutural apresentada na Figura 2.3. A 3TC é o enantiômero (-), o enantiômero (+) possui maior toxicidade (Johnson *et al.*, 1999, Souza & Storpirtis, 2004).

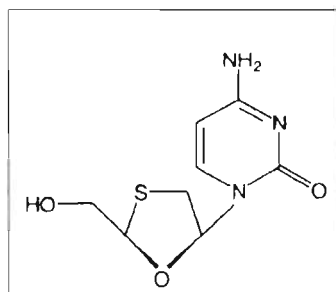


Figura 2.3 - Fórmula estrutural da Lamivudina (3TC) (Johnson, *et al.*, 1999).

A 3TC se apresenta como pó branco a branco-amarelado, com pKa igual a 4,3 (protonação do grupo NH_2). Este fármaco quando dissolvido em água predomina a forma não ionizada. O pH da solução aquosa a 1% (p/V) é 6,9. Dados da literatura afirmam que tanto em estado sólido quanto em solução aquosa ele possui elevada estabilidade à luz e à temperatura (Jozwiakowski *et al.*, 1996; Kyoko *et al.*, 1997; Fernandes, 2001).

A 3TC é usada no tratamento de infecção por HIV-1 em combinação com outros agentes anti-retrovirais (Johnson *et al.*, 1999). Estudos relatam sua atividade contra cepas de HIV resistentes à Zidovudina (ZDV) (Zhou & Sommadossi, 1997). Esquemas terapêuticos empregando a 3TC em dose de 150 mg duas vezes ao dia são indicados para adultos e adolescentes com mais de 50 kg. Em adultos com menos de 50 kg a dose deve ser ajustada para 2 mg/kg de peso duas vezes ao dia. Crianças com idade entre três meses e um ano tem como indicação de dose 4 mg/kg, duas vezes ao dia (até um máximo de 150mg duas vezes ao dia) (Perry & Faulds, 1997). A 3TC é altamente solúvel e permeável com rápida razão de dissolução. Consequentemente, as doses orais são rapidamente absorvidas por difusão passiva através da parede intestinal (Johnson *et al.*, 1999). Embora apresente alta absorção e boa biodisponibilidade sistêmica, foram observadas alterações interpacientes. A biodisponibilidade variou de 53 a 105% com uma dose de 100 mg. A biodisponibilidade absoluta da 3TC é superior a 80% em adultos e cerca de 68% em crianças (Perry & Faulds, 1997).

A 3TC é utilizada também no tratamento de pacientes com hepatite crônica. Administrada em monoterapia com dose de 100 mg por dia, ela é capaz de reduzir os níveis de HBV-DNA e normalizar a taxa de aminotransferase (Styrt *et al.*, 1996).

Para atuar, a 3TC passa por reações intracelulares de fosforilação, conforme apresentado na Figura 2.4. A desoxicitidina quinase é responsável pela formação da lamivudina monofosfato (3TC-P). A lamivudina difosfato (3TC-2P) é formada pela ação das enzimas citidina monofosfato quinase e desoxicitidinamonofosfato quinase. Finalmente pela ação da pirimidina nucleosídeo difosfato quinase, ocorre a formação da lamivudina trifosfato (3TC-3P) (Moore *et al.*, 1999a; Moore *et al.*, 2000). O anabólito ativo é o composto tri-fosforilado (3TC-3P), sendo que o difosfato é o anabólito predominante e limitante da formação da 3TC-3P (Johnson *et al.*, 1999).

Kewn e colaboradores (1997) investigaram o metabolismo intracelular da 3TC para dar origem a forma tri-fosfatada. Eles avaliaram dois tipos de células sanguíneas: mononuclear periféricas e monocíticas. A 3TC-3P se liga ao DNA do HIV competindo com a 2'desoxicitidina 5'trifosfato. Devido à ausência do grupo hidroxila na posição 3' a cadeia de DNA não é alongada e não há replicação do HIV (Perry & Faulds, 1997).

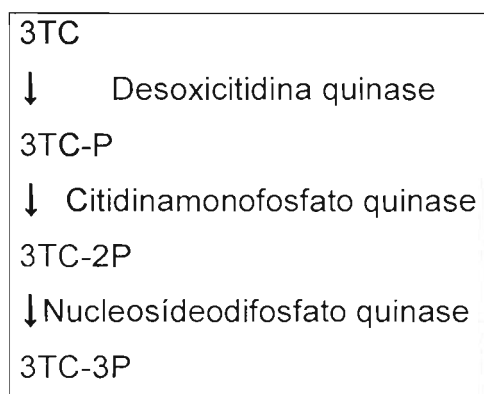


Figura 2.4 - Esquema do caminho de fosforilação intracelular da 3TC (Kewn *et al.*, 1997)

Moore e colaboradores (1999b) realizaram estudos farmacocinéticos da 3TC. Eles avaliaram a administração em pacientes infectados por HIV, em doses de 150 e 300 mg, duas vezes ao dia. Dentre os resultados, os estudos relataram que a 3TC é bem tolerada pelos pacientes. Os efeitos adversos mais descritos são distúrbios gastrointestinais. Efeitos indesejáveis como dores de cabeça, dores abdominais, náusea e fadiga podem ocorrer, porém com frequência e intensidade bem inferiores aos observados com o uso conjunto da ZDV (Perry & Faulds, 1997).

Em pacientes com infecção por HIV em estágio avançado (contagem de CD4+ menor que 100 células por μL), o uso de 3TC pode não ser bem tolerado. Durante um estudo aplicando a terapia anti-HIV constituída pela 3TC em 89 crianças, foram relatados 8% de casos de pancreatites. Porém, este fato não foi comprovadamente atribuído a este fármaco (Perry & Faulds, 1997).

Em geral a 3TC apresenta baixa toxicidade, que aumenta proporcionalmente ao acréscimo da dose. Ela é considerada bastante segura nas doses usuais que variam de 0,5 a 20 mg/kg/dia (Zhou & Sommadossi, 1997). É improvável a indução pela 3TC de efeitos adversos hematológicos e hepáticos, clinicamente importantes, como neuropatias e miopatias (Johnson *et al.*, 1998).

Em estudos clínicos de fase IV realizados com 251 pacientes portadores de HIV-1, utilizando 150mg de 3TC duas vezes ao dia e 200 mg de ZDV de 8 em 8 horas, não foram observados efeitos adversos mais graves que os relacionados ao uso de ZDV isoladamente. Durante os testes foram relatados os seguintes efeitos com sua frequência: dor de cabeça (35%), náusea (33%) e mal estar/fadiga (27%) (Johnson *et al.*, 1999).

2.5. ZIDOVUDINA

A zidovudina (ZDV) é semelhante a timidina endógena, diferenciando apenas pela presença de uma hidroxila na posição 3'e de um grupo azido (N_3) no anel ribose, conforme apresentado na Figura 2.5 (Veal & Back, 1995; Aoki; 1999). Ela possui pKa igual a 9,8, apresentando-se não ionizada na faixa de pH que varia de 3,5 a 5,5 (Mesplet *et al.*, 2001, Souza & Storpirtis, 2004).

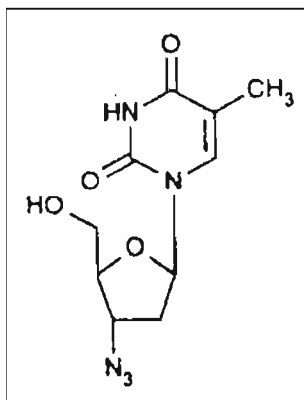


Figura 2.5 - Fórmula estrutural da zidovudina (ZDV) (Veal & Back, 1995).

A ZDV é indicada para o tratamento inicial de adultos infectados pelo HIV, apresentando contagem de células CD4+ inferior a 500 células/mL. Seu uso é indicado também para crianças com mais de três meses de idade e mulheres grávidas infectadas pelo HIV e seus recém-nascidos (Aoki, 1999). A ZDV é rápida e quase completamente absorvida, por difusão passiva. O processo segue cinética de primeira ordem e varia de 5 a mais de 40 minutos (Acosta *et al.*, 1996). Sua biodisponibilidade oral é de aproximadamente 66% podendo ocorrer grande variabilidade individual (Balint, 2001).

A terapêutica anti-retroviral utilizando ZDV isoladamente freqüentemente ocasiona a seleção de cepas resistentes. Esquemas posológicos combinados tem se mostrado mais eficazes na supressão da replicação viral. Isto é comprovado por estudos comparando vários tratamentos associando os seguintes inibidores da transcriptase reversa: nevirapina, didanosina, zalcitabina e ZDV. Estes estudos demonstraram que o uso da terapia tripla contendo anti-retrovirais proporcionou decréscimo plasmático de RNA do HIV-1 a níveis abaixo do limite de detecção (Montaner *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 1998).

A ZDV é um pró fármaco, cuja forma ativa é a Zidovudina trifosfato (ZDV-3P). A ZDV-3P é obtida por reações de fosforilação do fármaco nos linfócitos. Estas reações estão apresentadas de forma esquemática na Figura 2.6. Seu mecanismo de ação consiste em inibir competitivamente a incorporação, pela enzima transcriptase reversa, da timidina ao DNA viral (Veal & Back, 1995).

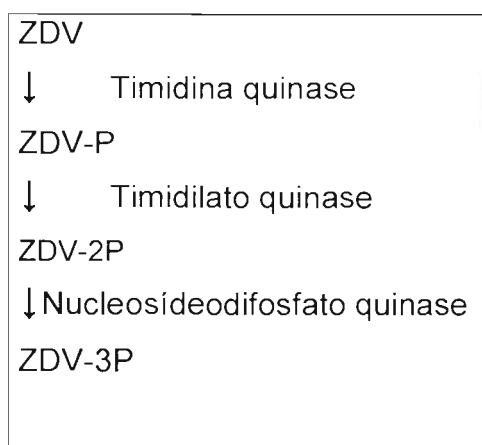


Figura 2.6 - Esquema do caminho de fosforilação intracelular da ZDV (Kewn *et al.*, 1997).

As concentrações de ZDV necessárias ao tratamento anti-HIV são tóxicas para as células mielóides e eritóides progenitoras, o que explica a ocorrência de anemia e granulocitopenia durante a terapia. A incorporação da ZDV ao DNA mitocondrial pode explicar a miopatia observada em alguns pacientes (Aoki; 1999).

Os efeitos adversos da ZDV são mais comuns em portadores do HIV, com doença em estágio avançado. Em pacientes assintomáticos ou quase assintomáticos, especialmente aqueles submetidos a doses diárias reduzidas, os efeitos adversos são pouco comuns, sendo a mielossupressão o principal deles. Anemia macrocítica e neutropenia também podem ocorrer em 4-6 semanas após o início do tratamento dos pacientes com infecção assintomática e avançada, sendo observadas incidências de 2% a 37% com doses de 600mg/dia e 6% a 50% com doses de 1200 mg/dia. A frequência de casos de trombocitopenia foi de 12% dos pacientes tratados com ZDV, sendo o efeito reversível com a interrupção da terapia. Outras reações adversas menos graves como cefaléia intensa, mialgia, náusea e insônia podem ser observadas com relativa frequência. Alguns efeitos raros, porém importantes incluem miopatia e miosite, hepatomegalia com esteatose e acidose láctica, além de anafilaxia (Aoki; 1999).

Estudos recentes tem avaliado as características carcinogênicas de diferentes anti-retrovirais. Embora ainda não sejam estudos validados pelas agências governamentais eles possuem sensibilidade entre 60 e 80%. Em sete testes realizados *in vitro*, com a

ZDV apenas um apresentou resultado negativo, sendo portanto considerada carcinogênica em altas doses (Wutzler & Thust, 2001).

2.6 TERAPÊUTICA COMBINADA UTILIZANDO LAMIVUDINA + ZIDOVUDINA

O tratamento anti-retroviral é avaliado em função da contagem de células linfócito CD4+ e da viremia plasmática. Esses dados fornecem informações sobre a possibilidade de progressão da doença, o grau de imunodeficiência e a velocidade de destruição do sistema imunológico. As condutas terapêuticas são baseadas nos resultados destes exames, principalmente em portadores do HIV assintomáticos. A realização dos exames de contagem de CD4+ e carga viral devem ocorrer antes do início, após o primeiro e terceiro meses do tratamento. O monitoramento deve continuar a cada 4 meses enquanto houver sucesso terapêutico (Robbins *et al.*, 1998; Sprinz, 1999; Rodriguez *et al.*, 2000).

A terapia anti-retroviral combinada pode aumentar a supressão viral, prevenir a resistência aos fármacos e simplificar a posologia (Eron *et al.*, 2000). Porém, alguns antagonismos farmacológicos podem ser observados, ocasionando concentrações plasmáticas sub-terapêuticas ou toxicidade inesperada. Profunda e sustentável supressão da doença ocasionada pelo HIV, é observada quando são associados os seguintes anti-retrovirais: indinavir, ZDV e 3TC (Eron *et al.*, 1995; Veal *et al.*, 1996; Havlir & Lange, 1998).

Estudos realizados por Horneff e colaboradores (1998) avaliaram a tolerância e a eficácia da associação de ZDV e 3TC em crianças infectadas pelo HIV. Elas não haviam sido expostas a nenhum tratamento anteriormente. O estudo foi realizado em treze crianças de 4 meses a 10 anos. Dentre os pacientes apenas um teve que descontinuar o tratamento devido ao desenvolvimento de neutropenia e observação de que após 6 meses não havia significativa redução da carga viral. A terapia combinada de ZDV/3TC é promissora pois vírus resistentes a ZDV são fenotipicamente sensíveis a lamivudina pela mutação do resíduo 184. Além disso é pequena ou inexistente a co-resistência entre ambos (Horneff *et al.*, 1998).

A eficácia da utilização terapêutica da associação de ZDV/3TC vem sendo comparada entre adultos e crianças, demonstrando-se similar. Esta associação foi bem tolerada por crianças, ocasionando decréscimo acentuado e sustentável da carga viral. Porém estudos comparativos entre ZDV/3TC e ZDV/didanosina, não possibilitaram a conclusão de que a eficácia do tratamento utilizando ZDV/3TC seja significativamente superior a encontrada com a associação de ZDV/didanosina. Estes resultados foram atribuídos a variabilidade imunológica dos pacientes (Solder *et al.*, 1997).

Recentes estudos visaram avaliar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da 3TC e ZDV. Estes trabalhos empregaram modelos matemáticos visando correlacionar a dose terapêutica e o efeito em diminuir a carga viral. Embora os modelos não tenham sido totalmente adequados para a quantificação do efeito máximo dos fármacos, eles possibilitaram prever o sinergismo entre eles, bem como, forneceram indícios sobre o surgimento de menor resistência viral quando os fármacos são associados (Legrand *et al.*, 2003).

O uso da ZDV isoladamente para o tratamento de portadores do HIV, freqüentemente ocasiona a seleção de cepas resistentes. A terapêutica combinada empregando zidovudina e lamivudina tem se mostrado eficaz na supressão da replicação viral sendo o surgimento de resistência viral em número igual ou inferior ao uso de ZDV isoladamente (Montaner *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 1998; Horneff *et al.*, 1998). É importante ressaltar que formulações contendo associações de agentes anti-retrovirais ocasionam simplificação da posologia e maior adesão dos portadores do HIV ao tratamento (Moore *et al.*, 1999b).

Na 11^o Conferência Internacional sobre a AIDS, que ocorreu em 1996, em Vancouver, foi apresentada uma teoria de erradicação da doença pelo agressivo tratamento usando a combinação de agentes anti-retrovirais (Cohn, 1997). A difusão das terapias antiretrovirais altamente potentes (*Highly active antiretroviral therapy* – HAART) vem ocasionando a supressão da replicação do HIV de maneira eficaz e sustentável (Moatti & Souteyrand, 2000; Beck *et al.*, 2004). O início da terapia anti-retroviral é indicado para indivíduos sintomáticos, infectados pelo HIV com contagem de células CD4+ menores

que 500 células/mL de plasma e com concentrações de RNA-HIV entre 5.000 e 10.000 cópias/mL (Carpenter *et al.*, 1997).

A terapia anti-retroviral combinada pode aumentar a supressão viral, prevenir a resistência aos fármacos e simplificar a posologia. Porém podem ser observados alguns antagonismos farmacológicos, ocasionando concentrações plasmáticas sub-terapêuticas ou toxicidade inesperada (Havlir & Lange, 1998).

A lamivudina apresenta um sinergismo *in vitro* com a zidovudina no combate ao HIV humano. Essa associação medicamentosa mostrou-se segura e eficaz, sendo a maioria dos efeitos indesejáveis relatados inerentes a infecção ou decorrentes do tratamento com zidovudina isoladamente (Eron *et al.*, 1995; Staszewski *et al.*, 1996;)

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E.P.; PAGE, L.M.; FLETCHER, C.V. Clinical pharmacokinetics of zidovudine. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v. 30, n. 4, p. 251-262, 1996.

AMATO NETO, V.; 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. 153p.

AOKI, F.Y. Infecções virais. In: PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFAMAN, B.B. *Farmacologia Integrada*. São Paulo: Manole, 1999. P. 445-460.

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.

BALINT, G.A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol. Ther.*, Amsterdam, v. 89, p. 17-27, 2001.

BARTLETT, JOHN G. *Título*. Tratamento clínico da infecção pelo HIV / John G Bartlett ; [Trad]drauzio Varella ; [Adapt]conceição Lemes. *Imprenta*. São Paulo : Três Editorial, 1996. *Descr Fis*. 381 p

BECK, E.J.; MANDALIA, S.; GAUDREAU, M.; BREWER, C.; ZOWALL, H.; GILMORE, N.; KEIN, M.B.; LALONDE, R.; PICHE, A.; HANKINS, C.A. The cost-effectiveness of highly active antiretroviral therapy, Canada 1991-2001. *AIDS*, New York, v. 18, p. 2411-2418, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Dados e Pesquisas. Documentos e Publicações. Boletim epidemiológico Aids DST. Editorial. Disponível em <http://www.aids.gov.br/sitebol/inferior.htm>. Acesso em: 01 jul. 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Documentos, recomendações e relatórios técnicos. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/documentos.htm>. Acesso em: 01 jul. 2002b.

BURGER, D.M.; DE GRAFF, M.; WUIS, E.W.; KOOPMANS, P.P.; HEKSTER, Y.A. Determination of indinavir, an HIV-protease inhibitor, in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 703, n. 1/2, p.235-241, 1997.

CARPENTER, C.C.J.; FISCHL, M.A.; HAMMER, S.M.; HIRSCH, M.S.; JACOBSEN, D.M.; KATZENSTEIN, D.A.; MONTANER, J.S.G.; RICHMAN, D.D.; SAAG, M.S.; SCHOOLEY, R.T.; THOMPSON, M.A.; VELLA, S.; YENI, P.G.; VOLBERDING, P.A. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 277, n. 24, p. 1962-1969, 1997.

COHN, J.A. Recent advances HIV infection – I. *BMJ [Br. Med. J.]*, London, v. 314, n. 7079, p. 487-491, 1997. [Review].

ERON, J.J.; BENOIT, S.L.; JEMSEK, J.; MacARTHUR, R.D.; SANTANA, J.; QUINN, J.B.; KURITZKES, D.R.; FALLON, M.A.; RUBIN, M. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v. 333, n. 25, p. 1662-1669, 1995.

ERON, J.J.; YETZER, E.S.; RUANE, P.J.; BECKER, S.; SAWYERR, G.A.; FISHER, R.L.; TOLSON, J.M.; SHAEFER, M.S. Efficacy, safety and adherence with a twice-daily combination lamivudine/zidovudine tablet formulation, plus a protease inhibitor, in HIV infection. *AIDS*, New York, v. 14, n. 6, p. 671-681, 2000.

FAUCI, A.S. The human Immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, Washington, v. 239, p. 617-622, 1988.

FERNANDES, C. Estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg. Belo Horizonte, 2001. 189p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

HAVLIR, D.V.; LANGE, J.M.A. New antivirals and new combinations. *AIDS*, New York, v. 12, suppl.A, p.S165-S174, 1998.

HENRY, K.; ERICE, A.; TIERNEY, C.; BALFOUR Jr., H.H.; FISCHL, M.A.; KMACK, A.; LIOU, S.H.; KENTON, A.; HIRSCH, M.S.; PHAIR, J.; MARTINEZ, A.; KAHN, J.O. A randomized, controlled, double-blind study comparing the survival benefit of four

different reverse transcriptase inhibitor therapies (three-drug, two-drug, and alternating drug) for the treatment of advanced AIDS. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, New York, v. 19, n. 4, p. 339-349, 1998.

HORNEFF, G.; ADANS, O.; WAHN, V. Pilot study of zidovudine-lamivudine combination therapy in vertical HIV-infected antiretroviral-naive children. *AIDS*, New York, v. 12, n. 5, p. 489-494, 1998.

JAYEWARDENE, A.L.; ZHU, F.; AWEEKKA, F.T.; GAMBERTOGLIO, J.G. Simple high-performance liquid chromatographic determination of the protease inhibitor indinavir in human plasma. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 707, n. 1/2, p. 203-211, 1998.

JOHNSON, M.A.; MOORE, K.H.P.; YUEN, G.J.; BYE, A.; PAKES, G.E. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v. 36, n. 1, p. 41-66, 1998.

JOHNSON, M.A.; VERPOOTEN, G.A.; DANIEL, M.J. Single-dose pharmacokinetics of lamivudine in subjects with impaired renal function and effect of haemodialysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Oxford, v. 46, p. 21-27, 1999.

JOZWIAKOWSKI, M.J.; NGUYEN, N.A.T.; SISCO, J.M.; SPANCAKE, C.W. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v. 85, n. 2, p. 193-199, 1996.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Editorial. Disponível em <http://www.unaids.org/en/default.asp>. Acesso em: 11 jul. 2004.

KEWN, S.; VEAL, G.J.; HOGGARD, P.G.; BARRY, M.G.; BACK, D.J. Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 54, p. 589-595, 1997.

KING, R.J.; KIMBERLIN, D.W.; ALDROVANDI, G.M.; ACOSTA, E.P. Antiretroviral pharmacokinetics in the paediatric population. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v. 44, n. 14, p. 1115-1133, 2002.

KYOKO, H.; ETSUKO, U.; MASUMITSU, T. Physicochemical properties and stability of Eпивir tablets. *Kagaku Ryoho no Ryoiki*, Osaka, v. 13, p. 1170-1172, 1997.

KOOP, E.B.; MIGLIETTA, J.J.; SHRUTKOWSKI, A.G.; SHIH, C.K.; GROB, P.M.; SKOOG, M.T. Steady state kinetics and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a non-nucleoside dipyridodiazepinona, BI-RG-587, using a heteropolymeric template. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 19, n. 11, p. 3035-3039, 1991.

LAZZARIN A. Enfuvirtide: the first HIV fusion inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*, Milano, v. 6, n 3, p. 453-64, 2005.

- LEGRAND, M.; COMETS, E.; AYMARD, G.; TUBIANA, R.; KATLAMA, C.; DIQUET, B. An *in vivo* pharmacokinetic/pharmacodynamic model for antiretroviral combination. *HIV Clin. Trials*, Saint Louis, v. 4, n. 3, p. 170-83, 2003.
- MARTIN, C.; SONNERBORG, A.; SVENSSON, J.O.; STAHLE, L. Indinavir-based treatment of HIV-1 infected patients: efficacy in the central nervous system. *AIDS*, New York, v. 13, n. 10, p. 1227-1232, 1999.
- MESPLET, N.; MORIN, P.; FRANÇOIS, C. AGROFOGLIO, L.A. Simultaneous quantification of nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary electrochromatography on a β -cyclodextrin-blended silica stationary phase. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v. 927, p. 161-168, 2001.
- MOATTI, J.P.; SOUTEYRAND, Y. Editorial: HIV/AIDS social and behavioural research: past advances and thoughts about the future. *Soc. Sci. Med.*, Oxford, v. 50, p. 1519-1532, 2000.
- MONTANER, J.S.G.; REISS, P.; COOPER, D.; VELLA, S.; HARRIS, M.; CONWAY, B.; WAINBERG, M.A.; SMITH, D.; ROBINSON, P.; HALL, D.; MYERS, M.; LANGE, J.M.A. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine and zidovudine for HIV-infected patients. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 279, n. 12, p. 930-937, 1998.
- MOORE, K.H.P.; BARRETT, J.E.; SHAW, S.; PAKES, G.E.; CHURCHUS, R.; KAPPOR, A.; LLOYD, J.; BARRY, M.G.; BACK, D. The pharmacokinetics of lamivudine phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells from patients infected HIV-1. *AIDS*, New York, v. 13, n. 16, p. 2239-2250, 1999a.
- MOORE, K.H.P.; SHAW, S.; LAURENT, A.L.; LLOYD, P.; DUNCAN, B.; MORRIS, D.M.; O'MARA, M.J.; PAKES, G.E. Lamivudine/zidovudine as a combined formulation tablet: bioequivalence compared with lamivudine and zidovudine administered concurrently and the effect of food on absorption. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v. 39, p. 593-605, 1999b.
- MOORE, J.D.; VALETTE, G.; DARQUE, A.; ZHOU, X.J.; SOMMADOSSI, J.P. 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.*, Orlando, v. 11, p. 1134-1143, 2000.
- MURPHY, R.L.; MONTANER, J. Nevirapine: a review of its development, pharmacological profile and potential for clinical use. *Expert Opin. Invest. Drugs*, London, v. 5, n. 9, p. 1183-1199, 1996.
- PALLADINO, D.E.H.; HOPKINS, J.L.; INGRAHAM, R.H.; WARREN, T.C.; KAPADIA, S.R.; VAN MOFFAERT, G.J.; GROB, P.M.; STEVENSON, J.M.; COHEN, K.A. High-performance liquid chromatography and photoaffinity crosslinking to explore the binding environment of nevirapine to reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-1. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v. 676, p. 99-112, 1994.

PEREIRA, C.F.; PARIDAEN, J.T. Anti-HIV drug development-an overview. *Curr. Pharm. Des.*, Sharjah, v. 10, n. 32, p. 4005-4037, 2004.

PERRY, C.M.; FAULDS, D. Lamivudine: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*, Auckland, v. 53, n. 4, p. 657-680, 1997.

ROBBINS, B.L.; TRAN, T.T.; PINKERTON Jr, F.H.; AKEB, F.; GUEDI, R.; GRASSI, J.; LANCASTER, DANNY; FRIDLAND, A. Development of a new cartridge radioimmunoassay for determination of intracellular levels of lamivudine triphosphate in the peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 42, n. 10, p. 2656-2660, 1998.

RODRIGUEZ, J.F.; RODRIGUEZ, J.L.; SANTANA, J.; GARCIA, H.; ROSARIO. Simultaneous quantitation of intracellular zidovudine and lamivudine triphosphates in human Immunodeficiency virus-infected individuals. *Antimicrob Agents Chemother.*, Washington, v. 44, n. 11, p. 3097-3100, 2000.

SOLDER, B.; WINTERGERST, U.; NOTHEIS, G.; EBERLE, J.; GURTNER, L.; BELOHRADSKY, B.H. Effect of antiretroviral combination therapy (zidovudine/didanosine or zidovudine/lamivudine) on quantitative plasma human immunodeficiency virus ribonucleic acid in children and adolescents infected with human immunodeficiency virus. *J. Pediatr.*, Orlando, v. 130, n. 2, p. 293-299, 1997.

SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 9-19, 2004.

SPRINZ, E.; FINKELSZTEJN, A. *Rotinas em HIV e AIDS*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 256p.

STASZEWSKI, S.; LOVEDAY, C.; PICAZO, J.J.; DELLAMONICA, P.; SKINHOJ, P.; JOHNSON, M.A.; DANNER, S.A.; HARRIGAN, R.; HILL, A.M.; VERITY, L.; McDADE, H. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in zidovudine-experienced patients. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 276, n. 2, p. 111-117, 1996.

STYRT, B.A.; PIAZZA-HEPP, T.D.; CHIKAMI, G.K. Clinical toxicity of antiretroviral nucleoside analogs. *Antiviral Res.*, Amsterdam, v. 31, p. 121-135, 1996.

VEAL, G.J.; HOGGARD, P.G.; BARRY, M.G.; KHOO, S.; BACL, D.J. Interaction between lamivudine (3TC) and other nucleoside analogues for intracellular phosphorylation. *AIDS*, New York, v. 10, n. 5, p. 546-548, 1996.

VEAL, G.J.; BACK, J.D. Metabolism of zidovudine. *Gen. Pharmacol.*, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1469-1475, 1995.

ZHOU, X.L.; SOMMADOSSI, J.P. Rapid quantitation of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 691, n. 2, p. 417-424, 1997.

WITVRIUW, M.; ARRANZ, M.E.; PANNECOUQUE, C.; DECLERQ, R.; JONCKHEERE, H.; SCHMIT, J.C.; VANDAMME, A.M.; DIAZ, J.A.; INGATE, S.T.; DESMYTER, J.; ESNOUF, R.; VAN MEERVELT, L.; VEJA, S.; BALZARINI, J.; DE CLERQ, E. 1,1,3-trioxo-2H,4H-thieno[3,4e][1,2,4]thiadiazine (TTD) derivatives: a new class of nonnucleoside human immunodeficiency virus with anti-HIV-1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 42, n. 3, p. 618-623, 1998.

WOOLF, E.; HADDIX, H.M.; MATUSZEWSKI, B. Determination of an *in vivo* metabolite of a human immunodeficiency virus protease inhibitor in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v. 762, p. 311-319, 1997.

WU, J.C.; WARREN, T.C.; ADAMS, J.; PROUDFOOT, J.; SKILES, J.; RAGHAVAN, P.; PERRY, C.; POTOCKI, I.; FARINA, P.R.; GROB, P.M. A novel dipyrindiazepinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site. *Biochemistry*, Columbus, v. 30, p. 2022-2026, 1991.

WUTZLER, P.; THUST, R. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues: a survey. *Antiviral Res.*, Amsterdam, v. 49, p. 55-74, 2001.

CAPÍTULO III

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ADEQUADO À
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA CONTIDAS EM COMPRIMIDOS
REVESTIDOS**

3.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos envolve a avaliação e a otimização de diferentes condições ou estágios. Estes iniciam-se com a extração e o preparo das amostras, passando pelas etapas de separação cromatográfica e detecção, culminando com a quantificação do analito. Todos os estudos inovadores necessitam desta etapa, considerada prévia e que tem possibilitado a publicação de várias metodologias. Em artigos recentes, os autores estão sendo encorajados a detalhar e discutir o caminho racional que levou ao desenvolvimento do método (Causon, 1997; Bressolle *et al.*, 1996).

A validação é o monitoramento analítico de um produto farmacêutico ou de um ingrediente específico que o componha. Ela é considerada necessária para que seja garantida a segurança e eficácia do produto em todas as fases de seu prazo de validade, incluindo o armazenamento, a distribuição e o uso. Validar um processo é o estabelecimento de evidências documentadas pelas quais é possível provar, com alto grau de confiança que o mesmo, produzirá consistentemente, produtos de acordo com as especificações pré-determinadas e a qualidade característica (Swartz & Krull, 1998; Brendolan, 1997).

Para os métodos analíticos, a validação representa uma etapa prévia pela qual o laboratório, por meio de estudos adequados, comprova que as características de execução do método atendem às exigências das aplicações analíticas propostas, assegurando que determinado procedimento analítico selecionado dê resultados reprodutíveis, confiáveis e adequados aos fins para os quais são destinados. As normas de boas práticas de fabricação vigentes exigem que os métodos para testes, utilizados para assegurar a conformidade dos produtos farmacêuticos em relação às especificações estabelecidas, atendam a padrões adequados de exatidão e reprodutibilidade (Swartz & Krull, 1998; Brendolan, 1997).

O protocolo de validação envolve um programa de testes pré estabelecidos, descrevendo o que deve ser validado, como os testes devem ser realizados, de que forma serão registrados e qual o critério de aprovação. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados a análise (Brasil, 2003).

Os métodos cromatográficos tem contribuído significativamente para a quantificação de fármacos contidos em associações medicamentosas, com precisão, exatidão e sem a interferência dos adjuvantes farmacêuticos (Causon, 1997). A seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos (Manadas *et al.*, 2002).

Devido a ausência na literatura e nos códigos oficiais, de método analítico que possibilite quantificar conjuntamente os fármacos lamivudina e zidovudina contidos em comprimidos, durante esta etapa experimental, objetivou-se o seu desenvolvimento e validação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL

3.2.1.1 Medicamento Teste

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela Fundação para o Remédio Popular (FURP).

Nome comercial: Furp – Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg;

Lote 9009

Data de fabricação: outubro de 2002

Data de validade: outubro de 2004

3.2.1.2 Medicamento Referência

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela GlaxoSmithKline.

Nome comercial: Biovir®,

Lote B067171

Data de fabricação: fevereiro de 2002

Data de validade: fevereiro de 2004

3.2.1.3 Substâncias químicas de referência

Lamivudina (Teor: 99,76 % e Validade: 03/2004);

Zidovudina (Teor: 99,56% e Validade: 03/2004);

Fornecidos pela Fundação para o Remédio Popular - FURP.

3.2.1.4 Soluções padrão

Durante a execução da parte experimental utilizaram-se soluções padrões preparadas pela dissolução dos padrões secundários em metanol. Essas soluções foram armazenadas em freezer a -20°C e sua estabilidade testada por quatro meses.

Foram preparadas soluções metanólicas estoque nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 10,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$ de lamivudina e zidovudina.

3.2.1.5 Placebos

Os placebos foram elaborados a partir da mistura dos adjuvantes farmacotécnicos em quantidades equivalentes às contidas no produto teste, excetuando-se os fármacos, e utilizados para avaliar a especificidade do método. Foram gentilmente cedidos pela FURP dois placebos, sob a forma de pó, sendo um contendo todos os adjuvantes mais o revestimento e o outro sem o revestimento.

3.2.1.6 Reagentes e Vidraria

Ácido clorídrico p.a., Merck;

Água desgasificada;

Água ultra pura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;

Acetonitrila grau cromatográfico EM Science;

Coluna C8 Shim-pack® modelo 228-17873-92 (150 x 4,6 mm, 5 μ m);

Metanol grau cromatográfico EM Science;

Pré-coluna C18 Phenomenex® modelo AJO4287(50 x 4,6 mm 5 μ m) ;

Pipetas automáticas de volume variável (100, 250, 500 e 1000 μ L), Eppendorf;

Seringas de plástico descartáveis de 10 mL;

Seringas de vidro de 10 mL;

Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μ m.

Foram utilizadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

3.2.1.7 Equipamentos

Agitador tipo vórtex;

Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204-s;

Banho termostático Fisaton, modelo 577;

Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;

Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Merck (Merck 1), composto por uma bomba quaternária L 7100. Desgaseificador L 7612. Injetor automático de amostras L 7200. Detector UV-Visível L 7400. Forno de coluna L 7300;

3.2.2 MÉTODOS

3.2.2.1 Método analítico para quantificação conjunta de lamivudina e zidovudina

Nos compêndios oficiais não há monografias para avaliação físico-química da associação contendo lamivudina e zidovudina. Apenas a partir da 24^o edição, a Farmacopéia Americana (United, 1999) passou a conter metodologias para avaliação da qualidade de preparações contendo zidovudina e a partir da USP 27 (United, 2003), passou a apresentar monografia para a matéria prima lamivudina. Devido ao exposto tornou-se necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia adequada a quantificação de ambos os fármacos, contidos em uma mesma formulação.

3.2.2.2 Desenvolvimento

Durante o desenvolvimento de um método analítico devem ser levados em consideração fatores que a tornem viável de maneira econômica, técnica e que atendam aos requisitos de qualidade contidos nas etapas de validação analítica (Snyder, 1997; United, 1999).

A monografia farmacopeica existente para zidovudina matéria prima serviu como base para o desenvolvimento de um método para análise conjunta de lamivudina e zidovudina (United, 1999). Os primeiros testes empregaram proporções diferentes de metanol e água. A melhor resolução entre os sinais cromatográficos referentes a lamivudina e zidovudina, foi obtida com a proporção 60:40 (v:v) de água e metanol. A extração dos fármacos contidos na forma farmacêutica, iniciou-se com a trituração dos comprimidos,

pesagem de quantidade adequada de pó e transferência para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de cerca de 15 mL de fase móvel. Posteriormente a suspensão foi sonicada por 15 minutos, o volume foi completado e procedeu-se a filtração. A amostra foi diluída adequadamente em fase móvel, e 50 µL foram analisados pelo método cromatográfico.

O presente método cromatográfico objetivou a quantificação de 3TC e ZDV contidos em comprimidos revestidos, de maneira precisa, exata e isenta de interferentes. As condições cromatográficas consistiram na dissolução do resíduo remanescente da extração com 1000 µL de fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), e posterior análise de 50 µL de amostra através de Coluna C8 Shim-pack® (150 x 4,6 mm, 5 µm). A temperatura de análise foi de 40 °C. A detecção dos fármacos foi realizada na região do ultravioleta a 266 nm.

3.2.2.3 Validação

A validação do método analítico objetiva demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (Brasil, 2003).

A validação do método a seguir foi realizada conforme critérios estabelecidos na Resolução 899, de maio de 2003 (Brasil, 2003) e Farmacopéia Americana 24^o edição (United, 1999). Foram averiguados os parâmetros: especificidade, limite de quantificação, linearidade, exatidão e precisão.

3.2.2.3.1 Especificidade/ Seletividade

Segundo a USP 24, a especificidade de um método representa sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação numa mistura complexa (United, 1999).

A especificidade pode ainda ser definida como o grau de interferência nos resultados de análise de amostras contendo impurezas, produtos de degradação ou componentes químicos relacionados, quando comparados aos obtidos com a substância isolada.

A especificidade do método foi verificada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos com as substâncias químicas de referência de lamivudina e zidovudina e de placebos contendo todos os constituintes da formulação com e sem o revestimento.

3.2.2.3.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (Brasil, 2003; United, 1999).

Pode-se utilizar a relação sinal/ruído de 10:1 para determinar o LQ. Isto consiste em dizer que a área do sinal cromatográfico referente aos fármacos deve ser dez vezes maior que a área de picos adjacentes (oriundos de ruídos da linha de base). No entanto, não deve ser esquecido que há um compromisso entre a concentração do LQ, a precisão e a exatidão exigidas, ou seja, à medida que o nível de concentração do LQ aumenta, a precisão também deve aumentar (Snyder, 1997; United, 1999).

Para determinar o LQ avaliou-se a precisão e a exatidão dos resultados obtidos após quantificar, em replicata de 5 determinações, concentrações decrescentes de ambos os fármacos.

3.2.2.3.3 Linearidade

A linearidade é demonstrada quando existe uma proporcionalidade entre os resultados obtidos pelo método em questão e a concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado. A linearidade do método pode ser obtida pela avaliação direta do padrão com concentrações variando de 50% a 150% da concentração de trabalho (Brasil, 2003).

Durante o desenvolvimento do processo analítico, avaliou-se a linearidade do método determinando-se as concentrações padrão de lamivudina e zidovudina contidos em uma mesma curva de calibração. As concentrações para ambos os fármacos variaram de 45 a 5000 ng/mL e os dados necessários ao preparo das soluções estão descritos na Tabela 3.1. Os resultados obtidos correspondem a média de cinco determinações. A equação da reta foi obtida por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ADEQUADO À QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA CONTIDAS EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

Tabela 3.1 Preparo das soluções padrão para avaliação da linearidade do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de 3TC e ZDV em comprimidos.

Concentração das soluções-padrão de lamivudina e zidovudina	Alíquota de cada solução	Volume de fase móvel	Concentração final de lamivudina	Concentração final de zidovudina
0,5 µg/mL	90 µL	1000 µL	45 ng/mL	45 ng/mL
1,0 µg/mL	100 µL	1000µL	100 ng/mL	100 ng/mL
1,0 µg/mL	200 µL	1000µL	200 ng/mL	200 ng/mL
10,0 µg/mL	40 µL	1000 µL	400 ng/mL	400 ng/mL
10,0 µg/mL	100 µL	1000 µL	1000 ng/mL	1000 ng/mL
10,0 µg/mL	200 µL	1000 µL	2000 ng/mL	2000 ng/mL
10,0 µg/mL	300 µL	1000 µL	3000 ng/mL	3000 ng/mL
10,0 µg/mL	500 µL	1000 µL	5000 ng/mL	5000 ng/mL

3.2.2.3.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Ela é expressa como o percentual de resposta obtido por meio de uma quantidade conhecida da substância em exame, incorporada em um meio de composição definida. A medida da exatidão pode ser obtida pela comparação dos resultados oriundos da análise de concentrações diferentes de uma substância padrão de referência ou por meio da comparação do método proposto com um segundo e bem caracterizado método (Brasil, 2003).

Segundo as diretrizes obtidas pela International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), a

exatidão deve ser determinada após coleta de dados referentes a um mínimo de nove determinações, sendo três diferentes concentrações cobrindo a variação especificada. Os dados obtidos devem ser registrados como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada ou como a diferença entre a média e o valor teórico com intervalos de confiança.

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada pela adição de padrões ao placebo. Foi pesada quantidade de placebo equivalente 1/10 do peso médio dos comprimidos. O pó foi transferido para balão volumétrico de 25,0 mL com auxílio de cerca de 15 mL de fase móvel composta de água e metanol (60:40) v:v e sonicado em banho de ultra som por 15 minutos. Após completar o volume a suspensão foi filtrada em membrana de 0,45 μ desprezando os primeiros mililitros do filtrado. Transferiu-se 1mL do filtrado para balão volumétrico de 25,0 mL, adicionou-se volume adequado de padrão, conforme descrito na Tabela 3.2, completou-se o volume fase móvel e homogeneizou-se. Em um tubo de ensaio adicionou-se 40 μ L da solução e 960 μ L de fase móvel. Agitou-se sob vórtex por 30 segundos e transferiu-se para o vial.

Foram preparadas, em triplicata, soluções contendo 500; 1000 e 1500 ng/mL dos padrões de lamivudina e zidovudina. Estas foram adicionadas às soluções obtidas com os placebos e efetuadas as determinações cromatográficas.

Tabela 3.2 Preparo das soluções padrão que foram adicionadas ao placebo para avaliação da exatidão do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de 3TC e ZDV em comprimidos.

Concentração das soluções-padrão de lamivudina e zidovudina	Aliquota de cada solução	Concentração final de lamivudina	Concentração final de zidovudina
500 μ g/mL	625 μ L	500 ng/mL	500 ng/mL
500 μ g/mL	1250 μ L	1000 ng/mL	1000 ng/mL
500 μ g/mL	1875 μ L	1500 ng/mL	1500 ng/mL

3.2.2.3.5 Precisão

A precisão indica o grau de concordância entre os resultados individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, sob condições idênticas (Brasil, 2003; United, 1999).

A precisão pode ser dividida em três tipos: 1) repetibilidade correspondente aos resultados obtidos a partir de várias análises por um método nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo. 2) precisão Intermediária caracterizada por expressar o efeito das variações que podem ocorrer dentro de um mesmo laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas, equipamentos, etc. 3) Reprodutibilidade que se refere a análise dos teores obtidos de uma determinada amostra, por meio de estudos de colaboração entre diferentes laboratórios (United, 1999; Causon; 1997; Fernandes, 2001).

A precisão da análise é geralmente expressa como o desvio padrão relativo (DPR ou RSD) ou coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos em um número significativo de amostras (Brasil, 2003; United, 1999).

Para avaliação da precisão foram preparadas amostras contendo três concentrações dos padrões de 3TC e ZDV. O preparo das soluções com concentrações de 100, 1000 e 3000 ng/mL está descrito na Tabela 3.3. Para avaliação da precisão intra-ensaio, foram analisadas 5 amostras de cada concentração em um mesmo dia. A Precisão inter-ensaio consistiu na análise em triplicata de cada uma das três concentrações em três dias diferentes.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ADEQUADO À QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA CONTIDAS EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

Tabela 3.3 Preparo das soluções padrão para avaliação da precisão intra e inter-ensaio do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de 3TC e ZDV em comprimidos.

Concentração das soluções-padrão de lamivudina e zidovudina	Aliquota de cada solução	Volume de fase móvel	Concentração final de lamivudina	Concentração final de zidovudina
1 µg/mL	100 µL	1000 µL	100 ng/mL	100 ng/mL
10 µg/mL	100 µL	1000 µL	1000 ng/mL	1000 ng/mL
10 µg/mL	300 µL	1000 µL	3000 ng/mL	3000 ng/mL

3.3 RESULTADOS

3.3.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO CONJUNTA DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Devido a ausência de um método analítico adequado a quantificação conjunta de ambos, foi desenvolvido o método cromatográfico descrito no item 3.2.2.2. O método foi validado conforme detalhado em 3.2.2.3.

3.3.1.1 Especificidade

Este parâmetro objetivou avaliar a capacidade do método em distinguir os fármacos em questão, entre si e de possíveis interferentes. Na figura 3.1 esta apresentado o cromatograma das soluções obtidas a partir das substâncias químicas de referência de lamivudina e zidovudina preparados conforme o método descrito no item 3.2.2.2. Os tempos de retenção (em escala centesimal) foram 2 min 61 para 3TC e 3 min 97, para ZDV. No cromatograma da figura 3.2 estão representadas as áreas das substâncias

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ADEQUADO À QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA CONTIDAS EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

químicas de referência e dos placebos, demonstrando a ausência de interferência no tempo de retenção referente aos fármacos.

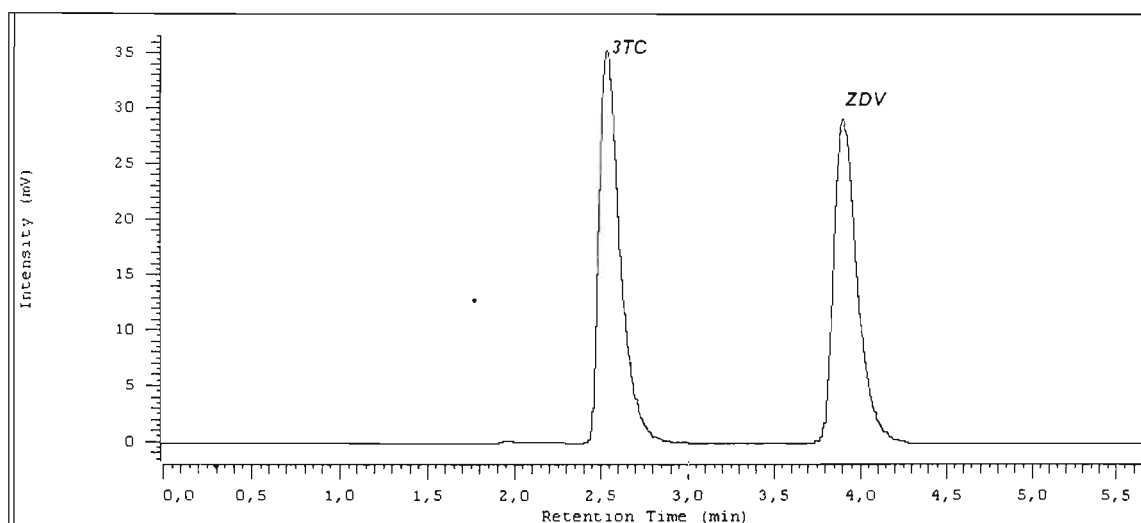


Figura 3.1 Cromatograma referente as substâncias químicas de referência de lamivudina e zidovudina na concentração de 100 ng/mL, obtidos por método cromatográfico com determinação a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40°C.

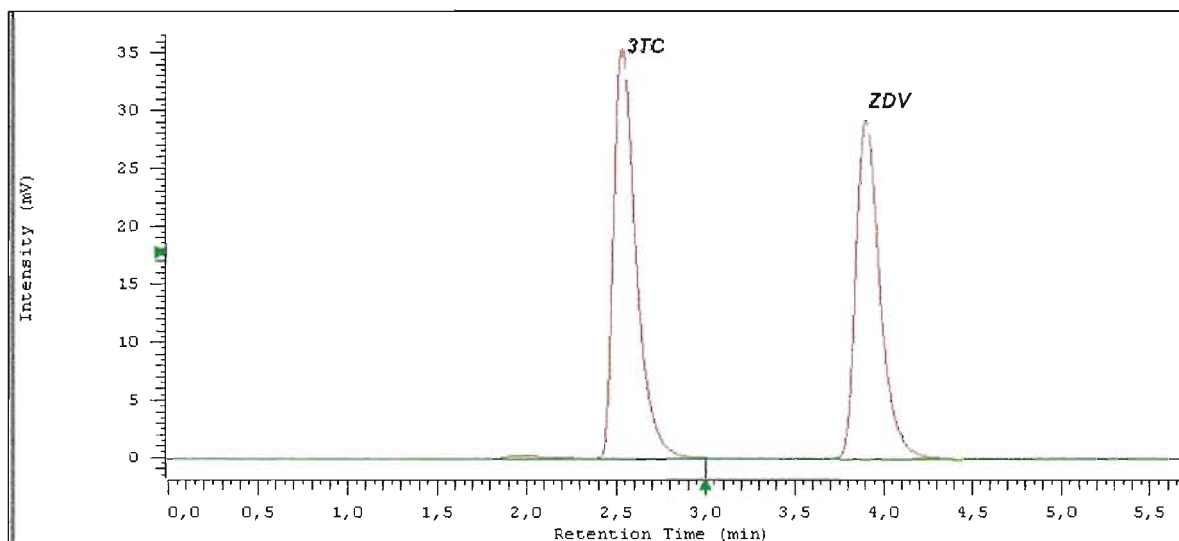


Figura 3.2 Cromatograma referente às substâncias químicas de referência de lamivudina e zidovudina (vermelho) e ao placebo (verde), obtido por método cromatográfico com determinação a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40°C.

3.3.1.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação para o método desenvolvido foi determinado conforme descrito no item 3.2.2.3.2. A menor concentração quantificável foi de 45 ng/mL para ambos os fármacos, com precisão de 3,45% e 3,73% e exatidão de 97,29% e 97,27% para lamivudina e zidovudina respectivamente.

3.3.1.3 Linearidade

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 45 a 5000 ng/mL para ambos os fármacos. As Figuras 3.3 e 3.4 representam as retas de calibração para lamivudina e

zidovudina respectivamente. Na Tabela 3.4 estão apresentados os resultados obtidos após empregar a regressão linear às retas de calibração.

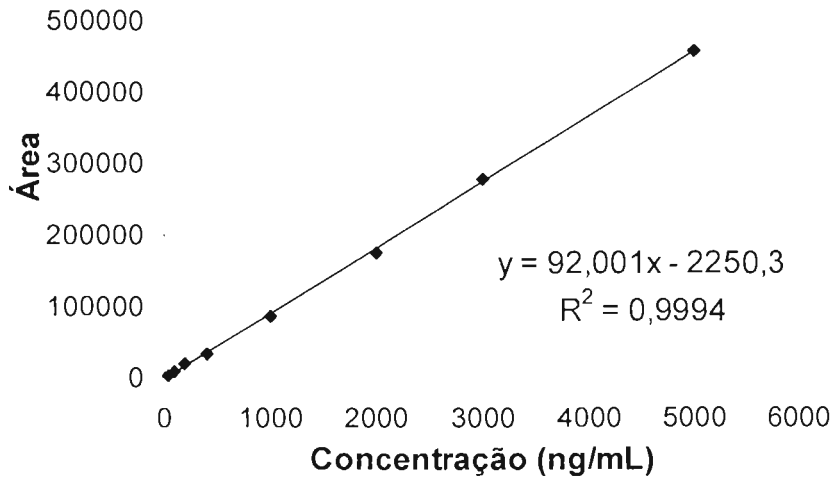


Figura 3.3 Reta de calibração do método cromatográfico para quantificação de lamivudina a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C.

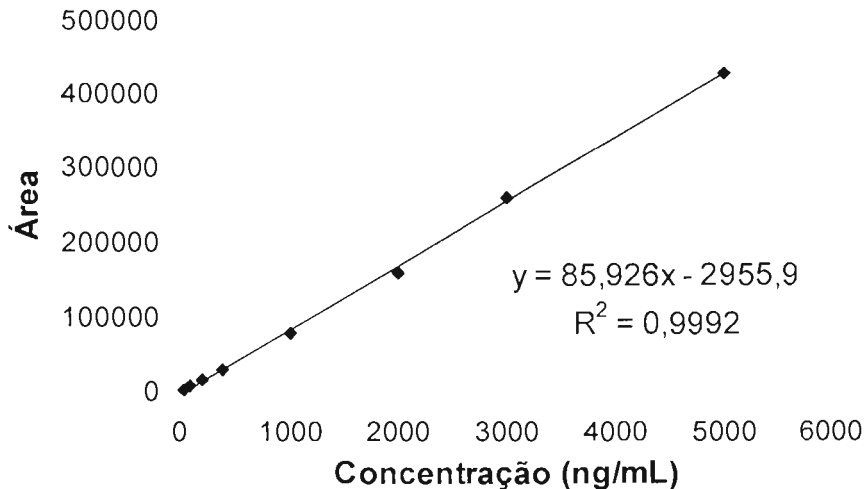


Figura 3.4 Reta de calibração do método cromatográfico para quantificação de zidovudina a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C.

Tabela 3.4 Resultados estatísticos relativos aos parâmetros utilizados para avaliação da linearidade do método cromatográfico desenvolvido para a quantificação de lamivudina e zidovudina a 266nm, utilizando fase móvel composta de água e metanol na proporção de 60:40 (v:v), sob fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C.

Parâmetro	Lamivudina	Zidovudina
Coeficiente angular (a)	92,001	85,926
Coeficiente linear (b)	2250,3	2955,9
Coeficiente de explicação (r^2)	0,9994	0,9992

3.3.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da concordância entre os valores teóricos de concentração dos fármacos e os valores experimentais, obtidos após adição de quantidades conhecidas de padrão ao placebo. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 3.5 e 3.6 para lamivudina e zidovudina respectivamente.

Tabela 3.5 Resultados de concentração de lamivudina padrão recuperada, após adição de três concentrações do fármaco a uma amostra placebo, obtidos após quantificação pelo método cromatográfico desenvolvido.

Determinações	Quantidade recuperada (%)		
	500 ng/mL	1000 ng/mL	1500 ng/mL
1	99,34	97,23	97,46
2	99,26	98,24	97,51
3	97,97	96,70	99,23
Média	98,86	97,39	98,07
CV(%)	0,78	0,80	1,03

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ADEQUADO À QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA CONTIDAS EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

Tabela 3.6 Resultados de concentração de zidovudina padrão recuperada, após adição de três concentrações do fármaco a uma amostra placebo, obtidos após quantificação pelo método cromatográfico desenvolvido.

Determinações	Quantidade recuperada (%)		
	500 ng/mL	1000 ng/mL	1500 ng/mL
1	97,93	99,69	99,32
2	97,08	99,15	98,88
3	96,04	98,14	100,57
Média	97,02	97,99	99,59
CV(%)	0,97	1,26	0,88

3.3.1.5 Precisão

A precisão do método cromatográfico desenvolvido para quantificação simultânea de lamivudina e zidovudina foi avaliada em seis determinações efetuadas em um único dia (intra-ensaio) e em três dias diferentes (inter-ensaios), conforme descrito em 3.2.2.3.5. Na tabela 3.7 estão os resultados de coeficiente de variação referentes às determinações de lamivudina e zidovudina.

Tabela 3.7. Resultados de coeficiente de variação obtidos após quantificação de amostras de lamivudina e zidovudina, em três concentrações diferentes, pelo método cromatográfico desenvolvido.

Concentração (ng/mL)	Lamivudina		Zidovudina	
	CV (%) (n=6)	CV (%) (n=18)	CV (%) (n=6)	CV (%) (n=18)
	Intra-ensaio	Inter-ensaios	Intra-ensaio	Inter-ensaios
100	1,48	1,31	1,83	1,87
1000	1,45	1,75	1,53	1,84
3000	1,20	1,65	1,26	1,21

3.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A revisão bibliográfica demonstrou a ausência de monografia farmacopéica contendo métodos para análise de ambos os fármacos em conjunto (Farmacopeia, 1988; Farmacopéia, 1996; United, 1999; United, 2003), tornando-se necessário seu desenvolvimento. A semelhança estrutural das moléculas impossibilitou o emprego de um método espectrofotométrico. Ambos os fármacos apresentam absorção na mesma região do ultravioleta. O método analítico desenvolvido possibilitou adequada resolução dos sinais cromatográficos referentes a lamivudina e zidovudina, conforme foi observado na Figura 3.1. A especificidade do método em quantificar lamivudina e zidovudina simultaneamente foi satisfatória, sendo que os constituintes da formulação não apresentaram interferências conforme pode ser verificado na Figura 3.2.

O limite de quantificação para o método desenvolvido foi de 45 ng/mL, tanto para lamivudina como para zidovudina. Nesta concentração é possível quantificar os fármacos com precisão e exatidão. A análise da regressão da curva de calibração demonstrou que o método é linear no intervalo de concentração de 45 a 5000ng/mL para ambos os fármacos. As retas de calibração apresentaram alto índice de correlação ($r^2 = 0,999$).

A exatidão do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de lamivudina e zidovudina contidos na forma farmacêutica comprimidos, foi adequadamente avaliada por meio da adição de padrões. As porcentagens médias de recuperação foram de 98,86 a 97,39% para lamivudina e de 97,02 a 99,59% para zidovudina. O método mostrou-se preciso com coeficientes de variação inferiores a 2,0%. A precisão intra-ensaio variou de 1,20 a 1,48% para lamivudina e de 1,26 a 1,83% para zidovudina. A precisão avaliada em três dias diferentes, denominada inter-ensaios apresentou resultados de coeficiente de variação entre 1,31 e 1,75% para lamivudina e entre 1,21 e 1,87% para zidovudina. O coeficiente de variação foi menor nas determinações de precisão intra-ensaio das concentrações maiores, indicando diminuição da precisão proporcionalmente a diminuição das concentrações de ambos os fármacos.

3.5 CONCLUSÃO

O método cromatográfico desenvolvido é simples, de fácil execução e permite a quantificação simultânea de lamivudina e zidovudina contidos em comprimidos revestidos. O procedimento de extração dos fármacos possibilita a recuperação adequada de ambos, sem a utilização de solventes diferentes dos utilizados para a separação cromatográfica, o que simplifica o procedimento, minimizando erros e diminuindo os custos. A validação demonstrou que o método é preciso, exato e linear em uma faixa de concentração que permite empregá-lo para quantificação dos fármacos nos testes de uniformidade de conteúdo, teor, dissolução e perfil de dissolução, com a diluição prévia das amostras em alguns casos.

O método cumpre os requisitos necessários à sua aplicação nos estudos de equivalência farmacêutica, conforme descrito na legislação vigente (Brasil, 2003).

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003.

BRENDOLAN, G.A. Validação de metodologia analítica (apostila). São Paulo: USP 1997, 16p.

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.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.689, n.1, p.175-180, 1997.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1988. pt.1.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1996. pt.2.

FERNANDES, C. Estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg. Belo Horizonte, 2001. 189p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.38, n.4, p.375-400, 2002.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2.ed. New York: Wiley Interscience, 1997. p.685-713.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm Tech.*, São Paulo, v.2, n.3, p. 4-16, 1998.

UNITED States Pharmacopeia: USP 24; The National Formulary: NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.2000.

UNITED States Pharmacopeia: USP 27; The National Formulary: NF 22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.1064-1065, 1961-1963.

CAPÍTULO IV

**EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO
TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA**

4.1 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: HISTÓRICO E PARÂMETROS TÉCNICOS

A utilização correta de medicamentos, além de promover a saúde, pode estar diretamente correlacionada a fatores econômicos. A indústria farmacêutica que desenvolve um produto inovador pode denominá-lo por um nome comercial e em alguns países, deter a sua patente, com exclusividade de comercialização por um longo período. Visando fazer frente ao monopólio das grandes indústrias farmacêuticas transnacionais, surgiu em diversos países, no final da década de 60, a idéia de produzir medicamentos nacionais utilizando denominação genérica. Esta lei foi primeiro implementada nos Estados Unidos, que em 1984 promulgou o *Drug Price and Patent Term Restoration Act Public Law 98-117*. Esta legislação possibilitou o surgimento da indústria farmacêutica que comercializava não mais pelo nome de marca, mas pelo nome genérico (Gerez, 1993; Fernandes, 2001).

A política de medicamentos genéricos foi adotada, com bons resultados, no final da década de 80 por outros países, como Canadá, Dinamarca, Inglaterra e Alemanha (Gerez, 1993; Fernandes, 2001).

No Brasil, a lei nº 9787 de 10 de fevereiro de 1999, estabeleceu o medicamento genérico e regulamentou a sua aquisição no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo esta lei, medicamento genérico é um similar ao medicamento referência ou inovador, desenvolvido após a expiração ou renúncia patentária, que pretende ser com este intercambiável, após comprovada sua eficácia, segurança e qualidade. O medicamento genérico utiliza a Denominação Comum Brasileira (DCB) e na ausência desta a Denominação Comum Internacional (DCI) (Brasil, 1999a.).

Para aplicação da lei, tornou-se necessária a descrição das provas de bioequivalência, a aferição da equivalência farmacêutica, os procedimentos de registro, intercambialidade e dispensação farmacêutica que somente ocorreram após a aprovação da Resolução nº 391 de 9 de agosto de 1999 (Brasil, 1999b). A etapa de equivalência farmacêutica

apresenta grande importância na avaliação da qualidade de um medicamento e recebeu mais detalhamento na Resolução – RDC nº 10 de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), devendo ser realizada em laboratório devidamente qualificado e habilitado (Brasil, 2000).

O estudo de equivalência farmacêutica possibilita a comparação entre as características químicas e físico-químicas dos produtos teste e referência. Este pode ser empregado em três circunstâncias: para medicamentos isentos do estudo de bioequivalência, para medicamentos em que a própria equivalência é indicativo de bioequivalência e como um requisito prévio a submissão ao teste de bioequivalência (Brasil, 2001; Storpirtis *et al.*, 2004).

A descrição mais recente dos requisitos para o teste de equivalência farmacêutica está contida na Resolução nº 900 de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003e). Segundo esta, os estudos devem ser realizados entre o medicamento teste e o referência comercializado no País, sendo as amostras preferencialmente analisadas até seis meses após a data de fabricação. Para ser considerado equivalente farmacêutico, o medicamento deve cumprir com os requisitos farmacopéicos da monografia individual, inscrita na Farmacopéia Brasileira ou outro código autorizado. Na ausência de monografia farmacopéica oficial, o estudo deve ser realizado utilizando-se método fornecido pela empresa solicitante, validado pelo laboratório executor do estudo, complementando-se com ensaios descritos nos métodos gerais da Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2003b).

O medicamento teste deve cumprir com os requisitos dos testes de identificação, impurezas, doseamento e perfil de dissolução. Para que o produto teste seja hábil a ser submetido ao estudo de bioequivalência a diferença entre os teores dos medicamentos teste e referência não deve ser superior a 5%, não devendo nenhum dos produtos ultrapassar os limites farmacopéicos (Brasil, 2003b; Brasil, 2003c; Brasil 2003e).

4.1.1 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

A ineficácia clínica observada com o uso de alguns medicamentos, além de episódios de intoxicação, deram origem às investigações relacionadas a biodisponibilidade de produtos farmacêuticos (Storpiertis & Consiglieri, 1995). Estudos mostraram que variações na formulação ou mesmo na técnica de fabricação, podem gerar diferenças substanciais na absorção e conseqüentemente na resposta terapêutica dos fármacos (Rouge *et al.*, 1996; Storpiertis *et al.*, 1999; Consiglieri & Storpiertis . 2000). Essas modificações podem ser monitoradas *in vitro* pelo perfil de dissolução, por meio da quantificação da fração dissolvida do fármaco e *in vivo* pela sua concentração plasmática ambas em função do tempo. Os dados *in vivo* permitem obter a biodisponibilidade do fármaco (Banakar, 1992; Ginski & Poli, 1999).

Os estudos de dissolução representam uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento farmacotécnico, identificação de variáveis críticas na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares. Atualmente é crescente a modernização dos processos de produção farmacêutica, assim como as pesquisas sobre diferentes formas de liberação de fármacos. Isto tem ocasionado maior ênfase na previsão *in vitro* dos efeitos da terapêutica *in vivo* (Khan, 1996; Manadas *et al.*, 2002).

O teste de dissolução, que era inicialmente indicado para fármacos com baixa solubilidade, vem sendo mais amplamente utilizado. Para realização do teste é necessário estabelecer condições, como: tipo de agitação, volume e características do meio de dissolução e valor de cedência adequada ao fármaco. Para isto são consideradas as características físico-químicas da molécula e o poder discriminatório desejável para o teste. Os resultados obtidos devem possibilitar comparar a influência do processo produtivo e das variáveis da formulação com a adequada e completa liberação do fármaco em determinado tempo (Sathe *et al.*, 1996; Manadas *et al.*, 2002).

A avaliação da influência da dissolução de fármacos pouco solúveis como fator limitante da absorção vem recebendo bastante atenção. Alguns métodos de dissolução em duas fases estão sendo avaliados. Eles objetivam verificar a dissolução *in vitro* da formulação em uma fase aquosa composta de líquido intestinal simulado. A segunda etapa consiste na partição do fármaco dissolvido em uma fase orgânica. Grundy e colaboradores (1997) utilizaram o n-octanol nesta segunda fase. Eles testaram um sistema terapêutico gastrointestinal (GITS) para veicular o nifedipino. O GITS consiste em uma bomba osmótica contendo uma suspensão finamente dividida de nifedipino. O fármaco é liberado seguindo uma cinética de ordem zero e é dissolvido antes de ser absorvido no trato gastrointestinal (TGI). Eles concluíram que o método de dissolução em duas fases produz valores semelhantes aos encontrados *in vivo*, com relação a razão e extensão da absorção do nifedipino no TGI. Este método pode ser utilizado para avaliar outras formulações de fármacos pouco solúveis em água (Grundy *et al.*, 1997).

4.1.2 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

A velocidade e a extensão com as quais um fármaco é absorvido podem variar devido às suas características físico-químicas e aos fatores relacionados à desintegração e dissolução de formas farmacêuticas sólidas. Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a dissolução e a permeação intestinal do fármaco representam dois fenômenos limitantes da absorção e, conseqüentemente, de sua ação terapêutica e podem ser utilizados como parâmetros para o delineamento do estudo de bioequivalência (Balimane, 2000; Brasil, 2003c).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) pode ser considerado conservador por alguns autores, pois relaciona a solubilidade e a permeabilidade de fármacos com os critérios de dissolução. Porém, a possibilidade de estender os critérios de isenção para os estudos de bioequivalência *in vivo*, contemplando as características físico-químicas dos fármacos tem sido amplamente estudada (Ginski & Polli, 1999; Balimane, 2000). São considerados produtos de liberação imediata aqueles que cedem ao menos

85% de fármaco em 30 minutos de teste de dissolução nas seguintes condições: aparato I (cesto) 100 rpm ou aparato II (pá) velocidade de 50 rpm; com 900 mL ou menos dos meios de dissolução água desgasificada, ácido clorídrico 0,1M e Tampão pH 4,5 e 6,8 (Murthy & Ghebre-Sellassie, 1993). A permeabilidade é determinada pela extensão da absorção intestinal em humanos ou indiretamente pela medida da transferência de massas através da membrana intestinal humana. Para extensão da bioisenção a outros produtos que estejam na classe I do SCB a formulação deve exibir rápida dissolução *in vitro* e atender a 4 condições: 1. O fármaco deve ser estável no TGI; 2. Os excipientes usados não devem ter efeito significativo na velocidade e extensão da absorção oral de fármacos; 3. O fármaco não deve apresentar estreita faixa terapêutica; 4. O produto não deve ser absorvido na cavidade oral (Lipka & Amidon, 1999; Yu *et al.*, 2002).

4.1.3 BIOISENÇÃO

A bioisenção consiste na dispensa da realização dos estudos de bioequivalência para determinados tipos de medicamentos ou na sua substituição pela equivalência farmacêutica, em alguns casos, medicamentos administrados por via parenteral, como soluções aquosas, e soluções orais que contém o mesmo fármaco, na mesma concentração que o produto referência, são isentos do teste de bioequivalência. O mesmo pode ocorrer com gases, soluções aquosas otológicas, oftálmicas, inalatórios ou sprays nasais e medicamentos tópicos. Medicamentos de uso oral cujos fármacos não sejam absorvidos no trato gastrointestinal também são isentos da realização do estudo de bioequivalência (Brasil, 2003a).

A equivalência farmacêutica pode se tornar um substituto do teste de bioequivalência para as menores dosagens, quando existirem dosagens de um medicamento genérico de liberação imediata e a maior dosagem for submetida e cumprir os requisitos do teste de bioequivalência. Neste caso é necessário manter as mesmas condições e locais de fabricação. Para comprimidos de liberação modificada com várias dosagens, apenas a maior concentração pode ser submetida ao teste de bioequivalência. desde que os

perfis de dissolução dos fármacos, entre todas as formas de dosagem, sejam comparáveis conforme o Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (Brasil, 2003a; Brasil, 2003d).

4.1.4 CORRELAÇÃO *IN VITRO/IN VIVO*

Atualmente são realizados estudos visando prever o comportamento *in vivo* de fármacos, por meio de gráficos de fração dissolvida em função do tempo. Estes gráficos ou perfis de dissolução auxiliam na previsão da absorção *in vivo*. Alguns dos fatores que podem retardar ou diminuir estes processos são: retenção do fármaco na forma farmacêutica; decomposição do mesmo pelos líquidos do trato gastrintestinal ou formação de complexos não absorvíveis; ineficácia do transporte do fármaco através das membranas biológicas e metabolismo ou eliminação do mesmo antes de atingir a corrente sanguínea. Os dois primeiros fatores citados podem ser facilmente previstos por testes *in vitro* (Dressman *et al.*, 1998).

Estudos objetivando estabelecer uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas e as características físico-químicas de determinada forma farmacêutica vem sendo realizados com frequência. Para tal podem ser estabelecidos três níveis de correlação: **C** que avalia um único ponto entre um parâmetro da dissolução e um parâmetro farmacocinético; **B** que se baseia no tempo médio de dissolução (TMD) *in vitro* comparada ao tempo médio de residência (TMR) ou ao TMD *in vivo* e **A** que é obtida pela sobreposição do perfil de dissolução *in vitro* com a curva de concentração plasmática x tempo *in vivo* (Khan, 1996; Manadas *et al.*, 2002).

O estabelecimento de uma correlação entre parâmetros inerentes ao fármaco, determinados *in vitro* e as conseqüências de sua absorção determinadas *in vivo* poderia minimizar custos no desenvolvimento e pesquisa de novas opções terapêuticas. Além dos modelos desenvolvidos para avaliar a dissolução, são crescentes as pesquisas visando estimar a permeação dos fármacos por membranas biológicas. Modelos

associando dissolução/permeação têm-se mostrado mais adequados à previsão da absorção *in vivo* (Ginski & Polli, 1999).

Atualmente, para formas farmacêuticas de uso oral, há um consenso de que a dissolução do fármaco e a permeação intestinal representem dois fenômenos limitantes do processo de absorção (Polli *et al.*, 1996). Existem vários estudos objetivando o desenvolvimento de modelos de correlação entre dados obtidos *in vitro* e o comportamento *in vivo* de fármacos (CIVIV) (Katori *et al.*, 1995; Eddington *et al.*, 1998; Balan *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2001). Estes estudos visam estabelecer correlações estatisticamente aceitáveis entre o processo de absorção do fármaco e a sua liberação da forma farmacêutica determinada *in vitro* (Skelly *et al.*, 1990; Cutler *et al.*, 1997). O grau de CIVIV depende da dissolução do fármaco, sua permeação intestinal e da fração da dose absorvida (Polli *et al.*, 1996). A CIVIV apresenta grande relevância ética, pois minimiza os testes em voluntários sadios humanos. É possível também o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada e a previsão de seu comportamento *in vivo* (GUIDANCE, 2000; Brasil, 2002). Alguns métodos *in vitro* apresentam alta fidelidade em mimetizar as características *in vivo* do epitélio intestinal. Eles são vastamente empregados no estudo de novos fármacos e permitem desvendar o mecanismo de absorção de moléculas em condições controladas. São usados também para avaliar a absorção de pró fármacos e de aditivos farmacêuticos a uma formulação (Baliname *et al.*, 2000).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL

4.2.1.1 Medicamento Teste

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela Fundação para o Remédio Popular (FURP).

Nome comercial: Furp – Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg;

Lote 9009

Data de fabricação: outubro de 2002

Data de validade: outubro de 2004

4.2.1.2 Medicamento Referência

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela GlaxoSmithKline.

Nome comercial: Biovir®,

Lote B067171

Data de fabricação: fevereiro de 2002

Data de validade: fevereiro de 2004

4.2.1.3 Substâncias Químicas de Referência

Lamivudina (Labogem Ind. E Com.) (Teor: 99,76 % e Validade: 03/2004);

Zidovudina (Labogem Ind. E Com.) (Teor: 99,56% e Validade: 03/2004);

Fornecidos pela Fundação para o Remédio Popular - FURP.

4.2.1.4 Soluções padrão

Durante a execução da parte experimental utilizaram-se soluções padrões preparadas pela dissolução das substâncias químicas de referência em metanol. Essas soluções foram armazenadas em freezer a -20°C e sua estabilidade testada por quatro meses.

Foram preparadas soluções metanólicas estoque nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 100,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$ de lamivudina e zidovudina e solução estoque contendo 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de estavudina (PI) em metanol.

4.2.1.5 Reagentes e Vidraria

Ácido clorídrico p.a., Merck;

Água desgaseificada;

Água ultra pura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;

Coluna C8 Shim-pack® modelo 228-17873-92 (150 x 4,6 mm, 5µm);

Fosfato de potássio monobásico p.a., Merck;

Hidróxido de sódio p.a., Merck;

Metanol grau cromatográfico EM Science;

Pipetas automáticas de volume variável (100, 250, 500 e 1000µL), Eppendorf;

Pré-coluna C18 Phenomenex® modelo AJO4287(50 x 4,6mm 5µm) ;

Seringas de plástico descartáveis de 10 mL;

Seringas de vidro de 10 mL;

Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm.

Foram utilizadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

4.2.1.6 Equipamentos

Agitador tipo vórtex;

Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204-s;

Banho termostático Fisaton, modelo 577;

Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;

Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Merck (Merck 1), composto por uma bomba quaternária L 7100. Desgaseificador L 7612. Injetor automático de amostras L 7200. Detector UV-Visível L 7400. Forno de coluna L 7300;

4.2.1.7 Infra-estrutura

Etapa analítica referente a equivalência farmacêutica: Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários e Produtos afins e as Respectivas matérias-primas - da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – CONFAR.

4.2.2 MÉTODOS

4.2.2.1 Avaliação físico-química

Nos compêndios oficiais não há monografias para avaliação físico-química da associação contendo lamivudina e zidovudina. Apenas a partir da 24^o edição, a Farmacopéia Americana (United, 1999) passou a conter metodologias para avaliação da qualidade de preparações contendo zidovudina e a partir da edição de 2003 a USP 27 (United, 2003) passou a apresentar monografia para a matéria prima lamivudina. A Farmacopéia Brasileira possui monografias para zidovudina matéria prima desde 2001 e lamivudina matéria-prima e comprimidos desde 2002 (Farmacopéia, 2002). Devido ao exposto tornou-se necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia adequada a quantificação de ambos os fármacos, contidos em uma mesma formulação.

4.2.2.1.1 Variação de peso e peso médio

A determinação da variação de peso e do peso médio dos comprimidos foi realizada conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4^o edição (Farmacopéia, 1988).

Pesaram-se individualmente 20 unidades de cada lote e determinou-se a variação em relação à média. Segundo a Farmacopéia Brasileira 4^o edição, para comprimidos revestidos ou drágeas com peso médio superior a 300,0 mg, o limite de variação é $\pm 5\%$. O produto cumpre as especificações quando apenas duas unidades apresentam-se em

desacordo com o limite especificado, porém nenhuma unidade poderá estar acima ou abaixo do dobro da porcentagem indicada.

4.2.2.1.2 Uniformidade de conteúdo

O teste de uniformidade de conteúdo foi citado inicialmente na Farmacopéia Americana XXII edição (United, 1990) e descrito de forma semelhante na parte 2 da Farmacopéia Brasileira 4^o Edição (Farmacopéia, 1996). O teste consiste em separar aleatoriamente 30 comprimidos e pesar individualmente 10 unidades. O cálculo do teor de fármaco é efetuado quantificando-se individualmente cada unidade. Posteriormente é calculado o desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados. Para medicamentos com média dos limites especificados na monografia igual ou superior a 100% do valor rotulado, aceita-se uma variação de 85 a 115% do valor rotulado e o DPR deve ser igual ou menor que 6%. Caso as 10 unidades testadas não atendam aos requisitos, são utilizadas as 20 unidades restantes. Dentre as 30 unidades testadas apenas uma pode apresentar variação fora dos limites de 85 a 115% do valor rotulado e nenhuma ultrapassar 75 a 125%. O DPR das 30 unidades deve ser igual ou inferior a 7,8%.

Em decorrência da inexistência de monografia para ambos os fármacos em uma mesma formulação, foi utilizada como referência o limite de 90 a 110% em relação ao valor rotulado que é descrito na Farmacopéia Americana (United, 2003) para comprimidos de zidovudina e na Farmacopéia Brasileira para comprimidos de lamivudina (Farmacopéia, 2002).

4.2.2.1.3 Teor

O teor de 3TC e ZDV nos medicamentos teste e referência foi obtido após análise de 4 soluções amostra de cada produto. As soluções foram preparadas pesando-se exatamente 1/10 do peso médio e transferindo-se para balão volumétrico de 25,0 mL

com auxílio de cerca de 15 mL de água ultra pura. A suspensão foi sonicada em banho de ultra som por 15 minutos, posteriormente completou-se o volume e homogeneizou-se. A suspensão foi filtrada em membrana 0,45 μm desprezando-se os primeiros mililitros. Foi pipetado 1mL do filtrado transferido para balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com água ultra pura e homogeneizado. Finalmente foram transferidos 40 μL da solução para um tubo de ensaio, foram adicionados 960 μL de fase móvel e agitados sob vórtex por 30 segundos. Um volume de 50 μL de amostra foi analisado segundo o método descrito a seguir (4.2.2.1.4).

4.2.2.1.4 Método cromatográfico

O presente método cromatográfico visa a quantificação de 3TC e ZDV contidos em comprimidos revestidos, de maneira precisa, exata e isenta de interferentes. As condições cromatográficas consistiram na análise de 50 μL de amostra através de Coluna C8 Shim-pack® (150x4,6 mm, 5 μm), após a reconstituição para 1000 μL de fase móvel, sob fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura de análise foi de 40 °C. A detecção dos fármacos foi realizada na região do ultravioleta a 266 nm.

4.2.2.1.5 Teste de Dissolução de comprimidos contendo 3TC e ZDV

Devido a ausência de monografia contendo um teste de dissolução adequado a ambos os fármacos quando contidos em um mesmo comprimido, realizou-se uma avaliação de diversas condições para execução do teste dissolução.

Durante a execução dos testes de dissolução foi utilizado o aparato número 2 (pá). Devido a rápida desintegração dos comprimidos, elegeu-se como velocidade a ser testada 50 rpm. A temperatura utilizada durante o teste foi de 37°C, seguindo-se os critérios gerais para o teste de dissolução.

O volume dos meios de dissolução testados foi de 900 mL. Foram utilizados os seguintes meios: água degaseificada, obtida por aquecimento a 42 °C e filtrada através de membrana com 47mm de diâmetro e poro de 0,45 µm; ácido clorídrico 0,01mol/L (pH 2,2) preparado por meio de diluição de ácido clorídrico concentrado em água degaseificada e tampão fosfato pH 6,8, obtido pela solubilização de 6,12 g de fosfato de potássio monobásico e 0,808 g de hidróxido de sódio em 900 mL de água (quando necessário, o pH foi ajustado para 6,8, com solução de NaOH 0,2 M ou HCl 0,2 M).

Foram avaliadas também as condições descritas na monografia referente a zidovudina comprimidos, contida na Farmacopéia Americana (United, 1999), que preconiza a utilização do aparato 2 (pá) para o teste, com 900 mL água degaseificada como meio de dissolução, a uma velocidade de 50 rpm por um tempo de 30 minutos. A porcentagem de cedência preconizada é de 80% de fármaco.

Foram retiradas alíquotas de 10 mL de cada cuba de dissolução, 30 minutos após o início do teste. Estas passaram por unidades filtrantes Full Flow™, com poro de 35 µm. As amostras obtidas após 3 minutos de teste, foram diluídas 4000 vezes em água ultra pura e filtradas em membrana 0,45 µ. As amostras obtidas foram analisadas segundo o método descrito em 4.2.2.1.4.

4.2.2.1.6 Perfil de Dissolução de comprimidos contendo 3TC e ZDV

Para avaliar a cinética de dissolução dos fármacos 3TC e ZDV contidos em um único comprimido, foi determinado o perfil de dissolução de ambos em três meios de dissolução distintos: água degaseificada, ácido clorídrico 0,01mol/L e tampão fosfato pH 6,8. Foram avaliadas seis unidades tanto do produto teste quanto do produto referência, para cada uma das condições descritas no item 4.2.1.5. Foram coletadas amostras de 10 mL de meio 1; 3; 5; 7; 10; 15; 20 e 30 minutos após o início do teste. As alíquotas passaram por unidades filtrantes Full Flow™, com poro de 35 µm, foram diluídas 4000

vezes em água ultra pura e novamente filtradas em membrana 0,45 μ . As amostras obtidas foram analisadas segundo o método descrito em 4.2.2.1.4.

4.2.2.1.7 Cinética de Dissolução de comprimidos contendo 3TC e ZDV

A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução pode ser facilitada pela utilização de uma equação geral, que traduz matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. Para o estudo da cinética de dissolução dos produtos teste e referência contendo a associação dos fármacos lamivudina e zidovudina, foram avaliados os modelos cinéticos de zero e primeira ordem, conforme descrito a seguir (Manadas *et al.*, 2002, Kano, 2002):

Zero ordem: foram traçados, para cada produto, gráficos de quantidade total (Qt) dos fármacos lamivudina e zidovudina menos a quantidade dissolvida (Qdis.) de cada um deles em função do tempo (t).

Primeira ordem: foram traçados, para cada produto, gráficos de logaritmo neperiano (ln) da porcentagem de lamivudina e de zidovudina não dissolvidas em função do tempo (t).

Um método gráfico simples para análise de desintegração e dissolução de cápsulas e comprimidos foi citado por Kano (2002). O método permite estimar a quantidade de fármaco dissolvida (%) em função do tempo, por meio da seguinte equação:

$$\text{Eq. 4.1} \quad 100-fs = \frac{100Kd}{Kd - Ks} e^{-Kst} - \frac{100Ks}{Kd - Ks} e^{-Kst}$$

Em que:

fs = quantidade em porcentagem acumulada de fármaco dissolvido no tempo t;

Kd = constante de velocidade de desintegração;

Ks = Constante de velocidade de dissolução.

Durante os testes a desintegração dos produtos foi bastante rápida, permitindo considerar que a constante de desintegração tende ao infinito ($Kd \rightarrow \infty$). Isto possibilitou a simplificação do método proposto, de acordo com a Equação 4.2.

$$\text{Eq. 4.2} \quad 100 - fs = 100e^{-Kst}$$

Uma reta com inclinação equivalente a $-Ks$ pode ser obtida com a construção do gráfico de logaritmo neperiano da quantidade de fármaco não dissolvido (%) em função do tempo.

Visando obter mais dados relativos à cinética de dissolução dos fármacos contidos nos produtos referência e teste, foram calculados os seguintes parâmetros: meia-vida de dissolução ($t_{50\%}$), e tempo médio para dissolução de 85% dos fármacos ($t_{85\%}$) nos produtos.

Para o cálculo da meia-vida de dissolução foram utilizadas as Equações 4.3 para ordem zero e 4.4 para primeira ordem.

$$\text{Eq. 4.3 (ordem zero)} \quad t_{50\%} = \frac{Q_{\infty}}{2K_0}$$

$$\text{Eq. 4.4 (primeira ordem) } t_{50\%} = \frac{0,693}{K}$$

Em que:

Q_{∞} = Quantidade total dissolvida;

K = constante de velocidade de dissolução de primeira ordem;

K_0 = constante de velocidade de dissolução de ordem zero.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 VARIAÇÃO DE PESO E PESO MÉDIO

A determinação da variação de peso e do peso médio dos comprimidos denominados teste e referência foi realizada conforme descrito em 4.2.2.1.1. Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados de pesos referentes a 20 unidades, bem como, os valores de desvios percentuais em relação à média (DPM) obtidos.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.1 Resultados dos testes de variação de peso e peso médio realizados com 20 unidades dos produtos teste e referência, conforme procedimento descrito em 4.2.2.1.1.

Unidades	Teste		Referência	
	Peso (mg)	Desvio (%)	Peso (mg)	Desvio (%)
1	687,3	0,10	768,5	-0,22
2	684,1	-0,36	771,5	0,17
3	684,2	-0,35	755,4	-1,92
4	684,8	-0,26	784,7	1,89
5	672,3	-2,08	767,8	-0,31
6	694,3	1,12	770,9	0,09
7	683,3	-0,04	766,0	-0,54
8	693,6	1,02	770,8	0,08
9	693,6	1,02	777,4	-,94
10	652,3	-4,99	767,3	-0,37
11	712,3	3,74	770,2	0,00
12	687,8	0,17	764,7	-0,71
13	688,4	0,26	764,5	-0,74
14	689,7	0,45	773,9	0,48
15	707,4	3,03	778,9	1,13
16	688,8	0,32	770,4	0,03
17	679,4	-1,05	773,8	0,47
18	685,6	-0,15	771,2	0,13
19	674,8	-1,72	768,3	-0,24
20	688,4	0,26	767,4	-0,36
Média	686,6		770,2	

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

4.3.2 UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO

A uniformidade de conteúdo das unidades farmacêuticas, dos produtos teste e referência, foi avaliada conforme descrito em 4.2.2.1.1. Para o teste foram suficientes dez unidades de cada produto. Os fármacos foram quantificados pelo método cromatográfico descrito no item 4.2.2.1.4. Os resultados referentes a lamivudina e zidovudina estão apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente.

Tabela 4.2 Resultados do teste de uniformidade de conteúdo de lamivudina em dez unidades dos produtos teste e referência.

Unidades	Produto teste		Produto referência	
	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)
1	150,94	100,62	148,01	98,67
2	156,49	104,33	154,04	102,69
3	150,38	100,26	160,19	106,79
4	144,97	96,65	158,18	105,45
5	143,36	95,57	140,07	93,38
6	145,86	97,24	154,13	102,75
7	146,09	97,39	144,12	96,08
8	141,94	94,63	147,81	98,54
9	143,38	95,59	156,37	104,25
10	146,10	97,40	142,68	95,12
Média		97,97		100,37
DP		2,95		4,65
DPR (%)		3,01		4,63

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.3 Resultados do teste de uniformidade de conteúdo de zidovudina em dez unidades dos produtos teste e referência.

Unidades	Produto teste		Produto referência	
	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)
1	310,05	103,35	281,43	93,81
2	318,15	106,05	312,32	104,11
3	301,23	100,41	321,64	107,21
4	296,99	99,00	320,35	106,78
5	299,67	99,89	279,34	93,11
6	299,12	99,71	320,93	106,98
7	301,99	100,66	289,49	96,50
8	282,67	94,22	292,26	97,42
9	278,37	92,79	319,52	106,51
10	297,07	99,02	307,24	102,41
Média		99,51		101,48
DP		3,85		5,72
DPR (%)		3,87		5,64

4.3.3 TEOR

Os resultados do teor de lamivudina e zidovudina foram obtidos conforme descrito no item 4.2.2.1.3, após quantificação de quatro amostras dos produtos teste e referência pelo método cromatográfico descrito no item 4.2.2.1.4. Nas Tabelas 4.4 e 4.5 estão os resultados referentes a lamivudina e zidovudina, respectivamente.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.4 Resultados da quantificação de quatro amostras de lamivudina, contida nos produtos teste e referência e quantificada por cromatografia líquida, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Unidades	Produto teste		Produto referência	
	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)
1	149,73	99,817	150,81	100,54
2	146,45	97,635	144,47	96,31
3	147,64	98,428	146,34	97,56
4	150,49	100,33	149,36	99,58
Média		99,05		98,50
DP		1,24		1,91
CV (%)		1,25		1,94

Tabela 4.5 Resultados da quantificação de quatro amostras de zidovudina, contida nos produtos teste e referência e quantificada por cromatografia líquida, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Unidades	Produto teste		Produto referência	
	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)	Concentração (mg/comp.)	Teor (%)
1	307,38	103,46	296,29	98,763
2	303,30	101,10	302,72	100,91
3	299,46	99,82	303,28	101,09
4	295,88	98,63	308,75	102,92
Média		100,48		100,92
DP		1,65		1,70
CV (%)		1,64		1,68

4.3.4 TESTE DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO 3TC E ZDV

Os resultados de porcentagem de cedência de lamivudina e zidovudina, obtidos após dissolução dos comprimidos e posterior quantificação, estão apresentados na Tabela 4.6. Conforme descrito no item 4.2.2.1.5. foram avaliadas outras condições para o teste de dissolução, cujos resultados médios de porcentagem de fármaco dissolvido em cada uma das condições avaliadas, estão apresentados na tabela 4.7. Em todas as condições testadas houve cedência superior a 85% no tempo de trinta minutos.

Tabela 4.6 Resultados de porcentagem de dissolução de lamivudina e zidovudina, contidas nos produtos teste e referência, submetidas a teste de dissolução utilizando 900 mL de água como meio, rotação igual a 50rpm e tempo de 30 minutos, sendo a quantificação por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultravioleta a 266 nm.

Comprimidos	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	lamivudina	Zidovudina	Lamivudina	Zidovudina
1	97,71	91,05	85,89	85,56
2	98,27	92,35	85,75	90,35
3	87,56	85,30	86,38	87,48
4	99,85	98,49	105,29	85,73
5	92,20	99,00	90,15	85,95
6	91,23	87,70	85,69	85,49
Média	94,47	92,32	89,86	86,76
CV (%)	4,18	4,69	6,36	1,51

Tabela 4.7 Resultados médios de porcentagem de dissolução de lamivudina e zidovudina, contidas nos produtos teste e referência, submetidas a três condições distintas e quantificadas após trinta minutos de teste, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Meios	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	lamivudina	Zidovudina	Lamivudina	Zidovudina
Água	94,47	92,32	89,86	86,76
Ácido Clorídrico 0,01M	107,83	104,28	86,67	85,63
Tampão fosfato pH 6,8	106,19	105,03	95,01	102,35

4.3.5 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO 3TC E ZDV

Objetivando avaliar a cinética de dissolução dos fármacos lamivudina e zidovudina contidos nos medicamentos em questão, efetuou-se o procedimento descrito no item 4.2.2.1.5. Nas tabelas 4.8, 4.9 e 4.10 estão contidos os resultados médios de dissolução de lamivudina contida nos produtos teste e referência, utilizando como meios de dissolução água, ácido clorídrico 0,01 M e tampão fosfato pH 6,8, respectivamente. Os perfis médios de dissolução relativos aos dados obtidos com a lamivudina estão apresentados nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3.

Os Valores médios obtidos após determinar o perfil de dissolução da zidovudina, utilizando água, ácido clorídrico 0,01M e tampão fosfato pH 6,8, como meios de dissolução estão apresentados nas Tabelas 4.11, 4.12 e 4.13, respectivamente. Os perfis médios de dissolução relativos aos dados obtidos com a zidovudina estão apresentados nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.8 Resultados médios do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio água degaseificada, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Tempo (minutos)	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	Média	DPR	Média	DPR
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	4,59	2,36	3,22	2,55
3	50,36	15,47	40,82	14,36
5	75,03	18,99	63,45	18,21
7	84,89	19,76	70,99	17,59
10	88,74	19,44	74,20	15,68
15	91,17	16,71	78,29	14,78
20	94,49	16,29	82,98	13,99
30	94,45	14,10	89,86	13,09

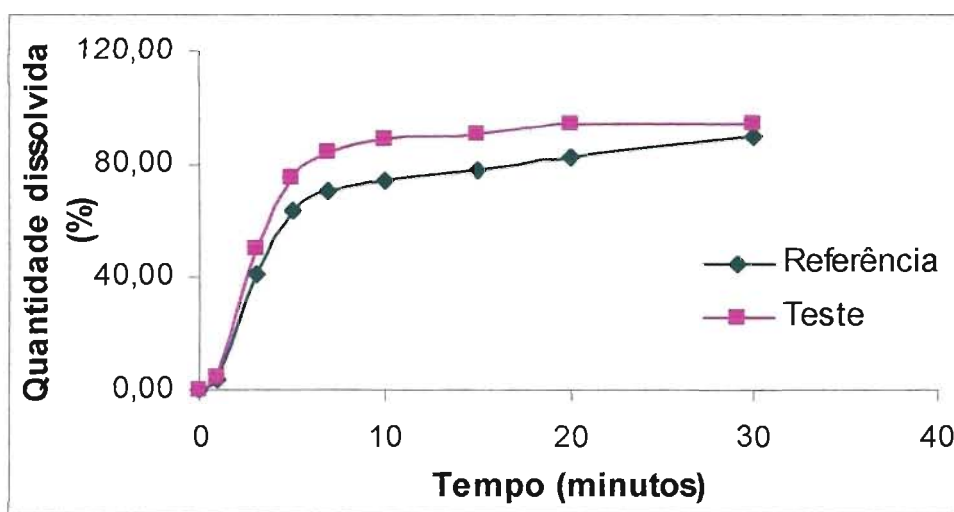


Figura 4.1 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de lamivudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução água degaseificada.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
 COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.9 Resultados médios do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Ácido clorídrico 0,01M, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Tempo (minutos)	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	Média	DPR	Média	DPR
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	8,47	4,37	4,94	3,64
3	59,54	14,81	56,99	19,10
5	78,89	20,08	66,95	21,59
7	93,00	21,06	75,54	19,70
10	96,57	21,20	82,88	18,20
15	99,11	20,60	84,72	18,07
20	102,64	20,24	85,01	15,92
30	104,28	18,19	85,63	14,63

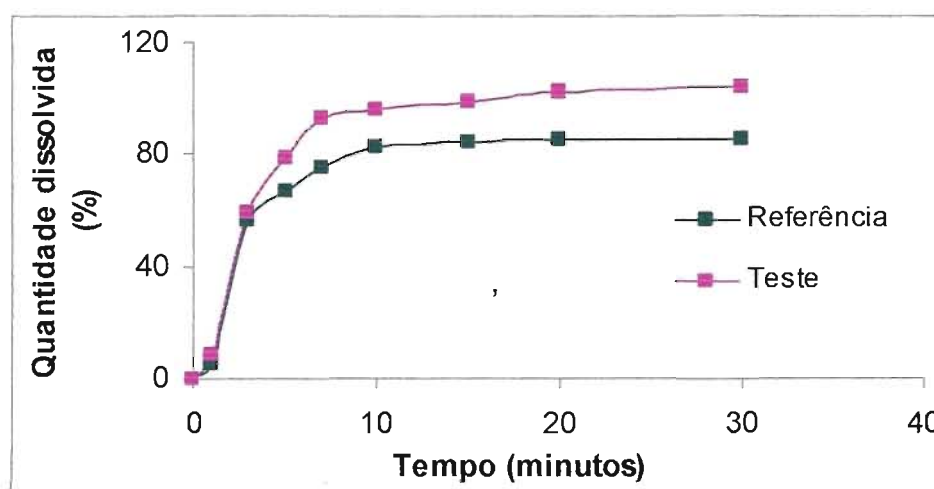


Figura 4.2 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de lamivudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução Ácido clorídrico 0,01M.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
 COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.10 Resultados médios do perfil de dissolução de lamivudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio Tampão fosfato pH 6,8, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Tempo (minutos)	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	Média	DPR	Média	DPR
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	4,57	1,86	3,06	2,22
3	51,07	12,01	52,62	12,38
5	86,52	18,48	80,54	19,42
7	94,96	19,24	92,88	20,29
10	98,62	19,38	94,22	19,54
15	103,30	19,32	97,22	17,98
20	103,49	18,26	100,88	17,69
30	105,03	16,41	102,35	15,83

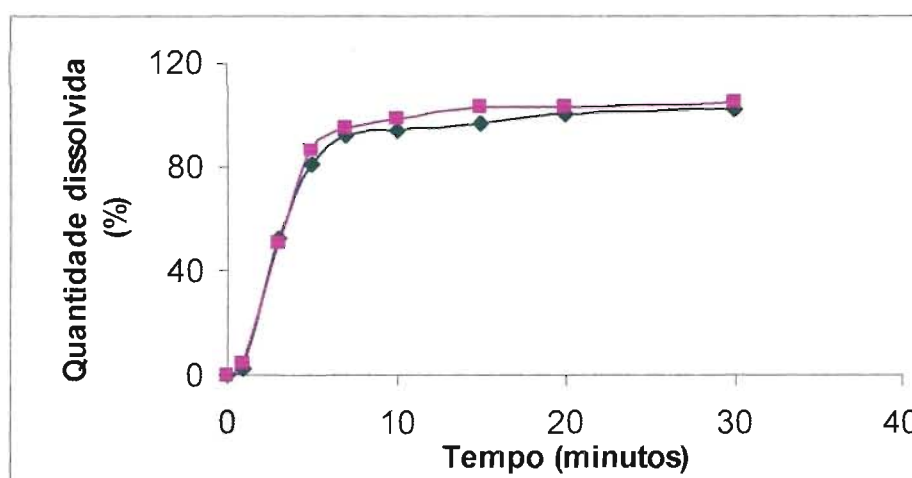


Figura 4.3 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de lamivudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.11 Resultados médios do perfil de dissolução de zidovudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio água degaseificada, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Tempo (minutos)	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	Média	DPR	Média	DPR
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	6,49	3,50	2,72	2,16
3	58,90	16,85	34,59	11,89
5	80,28	18,64	63,99	17,14
7	87,38	18,75	72,51	16,37
10	89,63	18,32	74,59	14,13
15	91,14	16,66	80,18	14,26
20	91,33	15,60	83,48	13,89
30	92,32	13,63	86,76	12,42

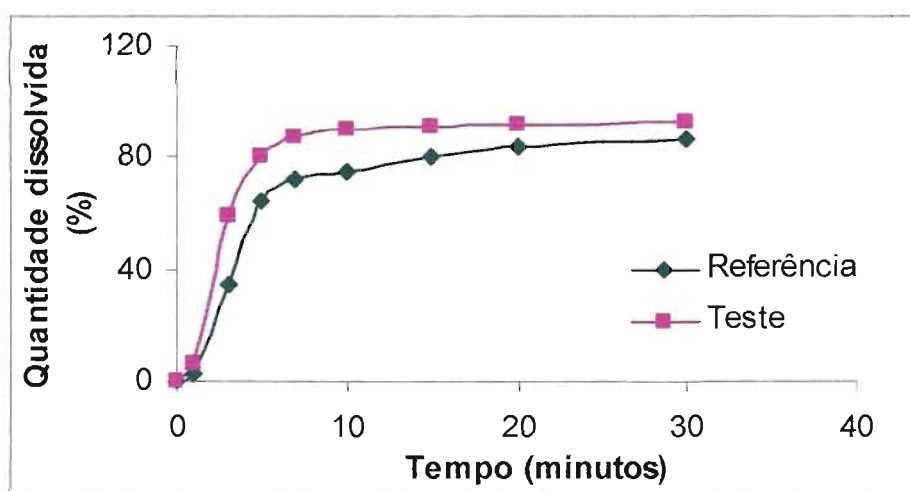


Figura 4.4 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de zidovudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução água degaseificada.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
 COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.12 Resultados médios do perfil de dissolução de zidovudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio ácido clorídrico 0,01M, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Tempo (minutos)	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	Média	DPR	Média	DPR
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	11,35	5,83	4,62	3,53
3	71,48	16,77	54,21	17,62
5	86,04	20,20	65,04	20,10
7	97,16	22,08	74,06	17,79
10	101,26	22,35	82,24	17,69
15	103,66	21,71	84,12	16,93
20	106,99	21,30	84,56	15,81
30	107,83	19,06	86,67	13,88

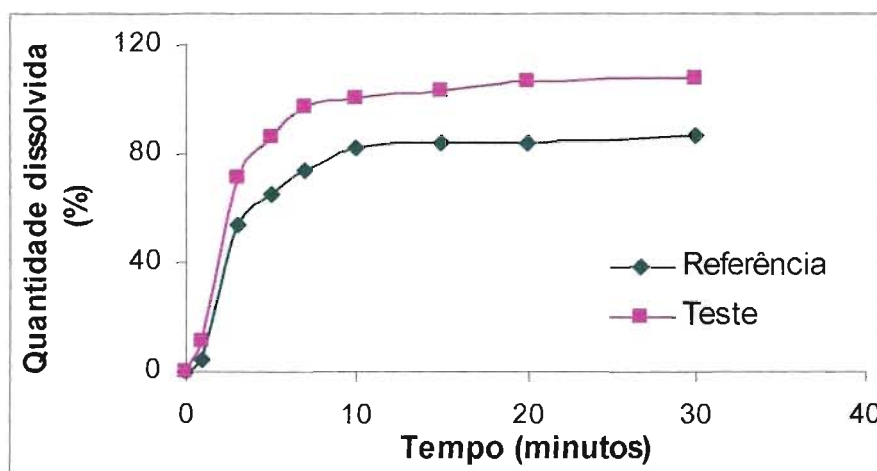


Figura 4.5 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de zidovudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução ácido clorídrico 0,01M.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.13 Resultados médios do perfil de dissolução de zidovudina, contida nos produtos teste e referência, utilizando como meio tampão fosfato pH 6,8, obtidos após quantificação, por método cromatográfico, utilizando detecção na região do ultra violeta a 266nm.

Tempo (minutos)	Quantidade dissolvida (%)			
	Produto teste		Produto referência	
	Média	DPR	Média	DPR
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	6,96	2,49	3,45	1,91
3	60,48	12,57	45,62	10,41
5	89,03	18,38	70,03	14,91
7	96,63	19,61	81,07	18,14
10	100,22	19,73	85,90	16,60
15	104,77	19,64	90,05	16,42
20	105,43	18,69	93,53	16,08
30	106,19	16,67	95,01	14,22

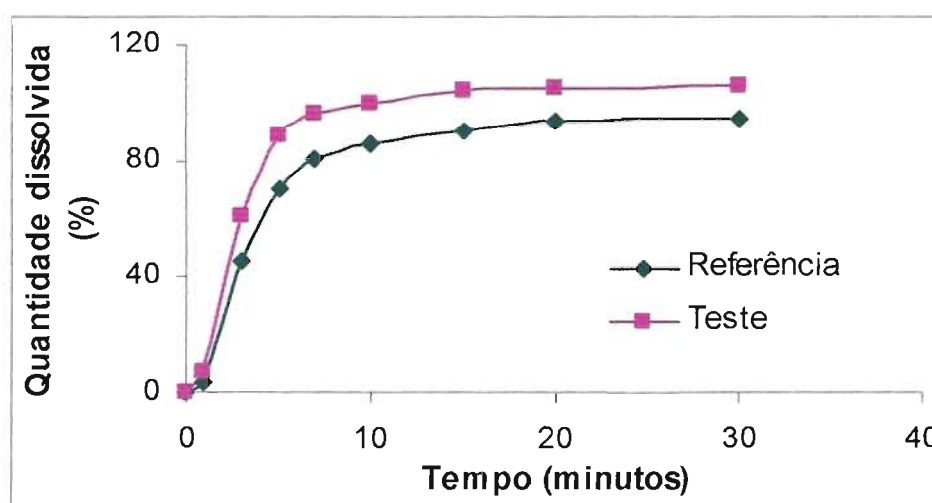


Figura 4.6 Perfis médios de dissolução, referentes a seis determinações, obtidos após quantificação, por método cromatográfico desenvolvido e validado, de zidovudina contida em produtos teste e referência, utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8.

4.3.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

A avaliação da cinética de dissolução foi realizada por meio da aplicação dos modelos de zero e primeira ordem. Os resultados referentes a análise estatística da reta de regressão para ambos os fármacos contidos nos produtos referência e teste estão apresentados nas Tabelas 4.14. Os valores obtidos para os parâmetros índice de correlação (r) e a variância (F) foram maiores quando aplicado o modelo de primeira ordem. Estes estudos demonstraram que para ambos os fármacos o modelo cinético que melhor representou a dissolução foi o de primeira ordem.

Tabela 4.14 Resultados estatísticos dos estudos de regressão, aplicando os modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, derivados dos perfis de dissolução obtidos utilizando aparato 1, meio água e velocidade de rotação de 50 rpm, relativos aos produtos referência e teste para os fármacos lamivudina e zidovudina.

	Ordem zero		Primeira ordem	
	r	F	r	F
Lamivudina Referência	0,79	40,67	0,93	58,18
Teste	0,73	55,80	0,88	60,39
Zidovudina Referência	0,78	42,79	0,89	58,10
Teste	0,68	45,70	0,80	60,25

r = índice de correlação; F = relação de variância maior e menor.

O modelo cinético de primeira ordem que melhor representou a dissolução dos produtos, foi utilizado para o cálculo da constante de velocidade de dissolução (k); da meia vida de dissolução ($t_{50\%}$); do tempo necessário a dissolução de 85% dos fármacos ($t_{85\%}$) e da quantidade de cada um dos fármacos dissolvidos em 30 minutos (Q30). Os parâmetros cinéticos obtidos a partir das equações da reta determinada pelo modelo de primeira ordem para os produtos referência e teste estão apresentados nas Tabelas 4.15 e 4.16, respectivamente.

CAPÍTULO IV - EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA: PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A
COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 4.15 Parâmetros da constante de velocidade de dissolução (k); da meia vida de dissolução ($t_{50\%}$); do tempo necessário a dissolução de 85% dos fármacos ($t_{85\%}$) e da quantidade de cada um dos fármacos dissolvidos em 30 minutos (Q30), presentes no produto referência após dissolução utilizando aparato 1, meio de dissolução água e velocidade de rotação de 50rpm.

Parâmetro cinético	Produto referência	
	Lamivudina	Zidovudina
k (min.^{-1})	-0,073	-0,068
Q30 (min.)	99,27	99,21
$t_{50\%}$ (min.)	9,53	10,26
$t_{85\%}$ (min.)	21,32	22,45

Tabela 4.16 Parâmetros da constante de velocidade de dissolução (k); da meia vida de dissolução ($t_{50\%}$); do tempo necessário a dissolução de 85% dos fármacos ($t_{85\%}$) e da quantidade de cada um dos fármacos dissolvidos em 30 minutos (Q30), presentes no produto teste após dissolução utilizando aparato 1, meio de dissolução água e velocidade de rotação de 50rpm.

Parâmetro cinético	Produto teste	
	Lamivudina	Zidovudina
k (min.^{-1})	-0,101	-0,083
Q30 (min.)	99,99	99,56
$t_{50\%}$ (min.)	6,88	8,39
$t_{85\%}$ (min.)	13,03	13,77

4.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O estudo das características biofarmacotécnicas de dois produtos contendo os agentes anti-retrovirais lamivudina e zidovudina iniciou-se pela avaliação de suas características físico-químicas. Essas análises possibilitam a obtenção de importantes informações a respeito do comportamento dos produtos. Por meio desses estudos, pode-se comparar formulações em desenvolvimento, ou mesmo especialidades farmacêuticas já comercializadas. Os resultados possibilitam selecionar e destacar aquelas que não correspondem aos critérios estabelecidos pelos compêndios oficiais e, portanto, que podem apresentar comprometimento de sua eficácia e segurança (Dressman *et al.*, 1998).

A avaliação das características físico-químicas dos produtos teste e referência foi realizada de acordo com os critérios descritos nos capítulos gerais das farmacopéias Brasileira e Americana, devido a ausência de monografia específica para os produtos contendo associação de lamivudina e zidovudina (Farmacopéia, 1988; Farmacopéia, 1996; United, 1999; United, 2003). O teste de variação de peso e peso médio foi realizado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 4^o edição. Dentre as vinte unidades testadas nenhuma apresentou desvio superior a 5% em relação a média conforme pode ser observado na Tabela 4.1. Ambos os produtos possuem variação de peso dentro do preconizado pelos códigos oficiais (Farmacopéia, 1988).

O teste de uniformidade de conteúdo foi realizado inicialmente com dez unidades, os resultados obtidos tornaram desnecessário o teste com os demais comprimidos. Os mínimos e máximos de concentração referentes a lamivudina foram de 94,63% e 104,33% para o produto teste e 93,38% e 106,79% para o produto referência, DPR de variação de 3,01% e 4,63%, respectivamente (Tabela 4.2). Os mínimos e máximos de concentração referentes a zidovudina foram de 92,79% e 106,05 % para o produto teste e 93,11 % e 107,21% para o produto referência, com DPR de 3,87% e 5,64%, respectivamente (Tabela 4.3). Ambos os produtos apresentaram resultados de acordo

com o preconizado pela farmacopéia americana. Para medicamentos com média dos limites especificados na monografia igual ou superior a 100% do valor rotulado, aceita-se uma variação de 85 a 115% do valor rotulado e DPR igual ou menor que 6% (Farmacopeia, 1996; United, 2003).

O teor dos fármacos contidos nos produtos teste e referência foi determinado por meio do método cromatográfico desenvolvido e validado. Os resultados médios referentes a quatro determinações quantitativas de lamivudina foram 99,05% para o produto teste e 98,50% para o produto referência com coeficientes de variação de 1,3 e 1,9%, respectivamente. Os resultados médios referentes a quatro determinações quantitativas de zidovudina foram 100,48% para o produto teste e 100,92% para o produto referência com coeficientes de variação de 1,6 e 1,7%, respectivamente. Os produtos Biovir[®] lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline (referência) e Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg - Lote 9009, produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP (teste) levados ao ensaio de biodisponibilidade relativa apresentaram diferença de teores inferior a 5%, cumprindo o requisito preconizado pela resolução nº 899 (Brasil, 2003b).

O teste de dissolução, descrito nas Farmacopéias Americana e Brasileira, é composto de três etapas. Na primeira são testadas 6 unidades, que cumprem o teste quando a porcentagem de fármaco dissolvida é igual ou maior que a porcentagem de cedência descrita na monografia adicionada de 5%. Como referência foi utilizada a monografia descrita para zidovudina comprimidos, onde o limite para cedência é 80% do valor rotulado em um período de 30 minutos de teste. No caso de uma ou mais unidades apresentarem porcentagem de fármaco dissolvida inferior a 85%, realiza-se a segunda etapa, onde são testadas mais 6 unidades. Nesta etapa o produto cumpre o teste quando a média das porcentagens de dissolução referentes às 12 unidades for maior que 80% e nenhuma unidade apresentar porcentagem de cedência inferior a 65%. A terceira etapa somente será realizada quando o produto não cumprir os requisitos das etapas anteriores. Nesta última são avaliadas 12 unidades e a porcentagem de cedência obtida pela média das 24 determinações deve ser igual ou maior a 80%, aceitando-se

não mais que duas unidades com cedência inferior a 65%, e nenhuma unidade com cedência inferior a 55%.

Durante os ensaios de dissolução utilizou-se o aparato 2 descrito nas farmacopéias (Farmacopeia, 1988; United, 2003). Este foi escolhido devido às características dos comprimidos, que não flutuaram durante os testes preliminares. Empregou-se como velocidade de rotação 50 rpm, visando evitar que a película de revestimento contida nos produtos teste e referência pudesse formar uma massa amorfa, reduzindo assim a área superficial efetiva e ocasionando diminuição da velocidade de dissolução (Murthy & Ghebre-Sellassie, 1993). Dentre os meios de dissolução avaliados seguiram-se os critérios descritos na farmacopéia americana, que preconiza a utilização preferencial de água, seguida de ácido clorídrico e soluções tampão com pH variando de 4 a 8 (United, 2003).

Os testes de dissolução tanto para o produto teste como para o produto referência apresentaram valores médios de porcentagem de cedência para os fármacos lamivudina e zidovudina superiores a 85% em tempo de dissolução de 30 minutos. Utilizando como meio de dissolução a água, os fármacos se dissolveram rapidamente. A velocidade e a extensão da solubilidade dos fármacos no organismo são fatores que influenciam diretamente a absorção dos mesmos. De acordo com os resultados apresentados, a lamivudina e a zidovudina podem ser considerados fármacos altamente solúveis conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Lipka & Amidon, 1999). Estudos recentes propõem que a biodisponibilidade relativa entre dois produtos pode ser evidenciada se 85% do fármaco se dissolvesse em menos de 30 minutos (Blume & Schug, 1999; Lipka & amidon, 1999). Esta porcentagem de cedência pôde ser constatada tanto para lamivudina quanto para zidovudina em ambos os produtos. Os estudos *in vitro* são considerados importantes ferramentas para a detecção de diferenças entre produtos similares e mesmo entre lotes diferentes de determinado produto, bem como, para proporcionarem indicações sobre o provável comportamento *in vivo* dos mesmos. Embora os testes *in vitro* sejam bastante úteis,

conclusões definitivas sobre biodisponibilidade relativa somente são possíveis após a realização de estudos *in vivo* (Manadas, 2002; Kano, 2002).

A lamivudina e a zidovudina apresentaram perfis de dissolução semelhantes em cada um dos meios avaliados. Os perfis de dissolução realizados em água, apresentaram maior diferenciação entre os produtos teste e referência nos primeiros minutos, tornando-se mais semelhantes após 20 minutos (Figuras 4.1 e 4.4). Os perfis obtidos utilizando ácido clorídrico como meio de dissolução demonstraram maior diferença de solubilidade entre os produtos teste e referência, para ambos os fármacos (Figuras 4.2 e 4.5). Os perfis de dissolução traçados após o teste com tampão fosfato pH 6,8, apresentaram maior semelhança entre os produtos testados tanto para lamivudina quanto para zidovudina (Figuras 4.3 e 4.6). A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução é facilitada pela utilização de uma equação geral, que traduz matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. Conforme os resultados apresentados na Tabela 4.14, a cinética de dissolução de ambos os fármacos é melhor representada por uma equação de primeira ordem. As formas farmacêuticas que seguem este perfil de dissolução, tais como as que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior, de tal modo que a quantidade liberada por unidade de tempo diminui (Manadas, 2002).

A aplicação do modelo independente e cálculo dos fatores de diferença (f_1) e semelhança (f_2) necessita inicialmente do cumprimento dos seguintes requisitos: emprego de, no mínimo cinco pontos de coleta durante a elaboração do perfil de dissolução e inclusão de apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos. Para permitir o uso de médias os coeficientes de variação dos primeiros tempos de coleta não devem exceder a 20% e para os demais pontos preconiza-se um coeficiente de variação máximo de 10% (Brasil, 2003d). Nas três condições de dissolução avaliadas não foi possível empregar os fatores f_1 e f_2 pois ambos os produtos não cumpriram todos requisitos necessários a aplicação do método modelo independente (Murthy & Ghebre-Sellassie, 1993; Brasil, 2003d).

Após cumprirem os requisitos necessários aos testes de equivalência farmacêutica, os produtos Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline (referência) e Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg - Lote 9009, produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP (teste) foram avaliados no estudo de biodisponibilidade relativa. Ambos os produtos são classificados como equivalentes farmacêuticos, por conterem os mesmos fármacos, na mesma dosagem e na mesma forma farmacêutica. Como os equivalentes farmacêuticos são fabricados por indústrias farmacêuticas distintas, os demais componentes da formulação e a técnica de fabricação geralmente, não são os mesmos. Estes produtos devem cumprir as especificações farmacopéicas, entretanto, isto não assegura a intercambialidade entre ambos. A realização do estudo *in vivo* mostra-se necessária para conclusões definitivas sobre a biodisponibilidade relativa ou bioequivalência dos produtos em estudo.

4.5 CONCLUSÃO

Os perfis de dissolução traçados, tanto para lamivudina quanto para zidovudina, apresentaram-se mais semelhantes para ambos os produtos, quando foi utilizado como meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8. A maior capacidade de diferenciação entre os produtos foi obtida utilizando ácido clorídrico 0,01M.

Os produtos teste e referência avaliados apresentaram resultados das análises físico-químicas como variação de peso, peso médio, uniformidade de conteúdo e dissolução de acordo com as especificações gerais descritas pelas farmacopéias. Os resultados referentes aos testes de teor também apresentaram desvios considerados pequenos, inferiores a 5%, entre ambos os produtos, cumprindo assim os requisitos necessários ao teste de equivalência farmacêutica.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALAN, G.; TIMMINS, P.; GREENE, D.S.; MARATHE, P.H. *In vitro-in vivo* correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v. 90, n. 8, p. 1176-1185, 2001.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, Amsterdam, v. 44, p. 301-312, 2000.

BANAKAR, U.V. *Pharmaceutical dissolution testing*. New York, Marcel Dekker, 1992. 437p.

BLUME, H.H.; SCHUG, B.S. The biopharmaceutics classification system (BCS): class III drugs-better candidates for BA/BE waiver? *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 9, p. 117-121, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei n. 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Estabelece o medicamento genérico. *Diário Oficial da União*, Brasília, n 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n. 391, de 9 de agosto de 1999. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 15 ago. 1999b, Seção 1, p. 62-69.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n.41, de 28 de abril de 2000. Determina que as entidades ou empresas que porventura pretendam cadastrar-se junto à ANVS/MS para se habilitarem à realização dos ensaios de equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e/ou bioequivalência deverão proceder ao preenchimento de formulário específico disponível, via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 06 abril 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC n. 10, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília 15 jan. 2001. Seção 1, p. 30-39.

BRASIL. Ministério da Saúde. Documentos, recomendações e relatórios técnicos. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/documentos.htm>. Acesso em: 01 jul. 2002.

BRASIL. Resolução RDC n.894, de 29 de maio de 2003. "Guia para protocolo e relatório técnico de estudos de bioequivalência".[A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003a.

BRASIL. Resolução RDC n.896, de 29 de maio de 2003. "Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003b.

BRASIL. Resolução RDC n.898, de 29 de maio de 2003. "Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003c.

BRASIL. Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003d.

BRASIL. Resolução RDC n.900, de 29 de maio de 2003. "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003e.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2000.

CUTLER, D.J.; BEYSSAC, E.; AIACHE, J.M. Level B and C in vivo/in vitro correlations: statistical considerations. *Intern. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 158, p. 185-193, 1997.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorpt: immediate release dosage forms. *Pharm. Res.*, Norwell, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

EDDINGTON, N.D.; MARROUM, P.; UPPOOR, R.; HUSSAIN, A.; AUGSBURGER, L. Development and internal validation of an in vitro-in vivo correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. *Pharm Res.*, Norwell, v. 15, n. 3, p. 466-473, 1998.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1988. pt.1.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1996. pt.2.

FERNANDES, C. Estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg. Belo Horizonte, 2001. 189p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

GEREZ, J.C. Indústria farmacêutica: histórico, mercado e competição. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 21-30, 1993.

GINSKI, J.M.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution-absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 177, p. 117-125, 1999.

GRUNDY, J.S.; ANDERSON, K.E.; ROGERS, J.A.; FOSTER, R.T. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. description of a two phase in vitro dissolution test. *J Controlled Release*. Amsterdam, v. 48, p. 1-8, 1997.

GUIDANCE for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. Rockville: FDA. 2000. 13p.

KANO, E.K. *Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: estudos in vitro e in vivo* (bioequivalência). São Paulo, 2002. 233p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KATORI, N.; AOYAGI, N.; TERAO, T. Estimation of agitation intensity in the GI tract in humans and dogs based on *in vitro/in vivo* correlation. *Pharm. Res.*, Norwell, v. 12, n. 2, p. 237-243, 1995.

KHAN, M.Z.I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with *in vivo* data: challenges and opportunities. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 140, p. 131-143, 1996.

LIPKA, E.; AMIDON, G. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v. 62, p. 41-49, 1999.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-400, 2002.

MURTHY, K.S.; GHEBRE-SELLASSIE, I. Current perspectives on the dissolution stability of solid oral dosage forms. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v. 82, n. 2, p. 113-126, 1993.

POLLI, J.E.; CRISON, J.R.; AMIDON, G.L. Novel approach to the analysis of in vitro-in vivo relationships. *J. Pharm. Sc.*, Hoboken, v. 85, n. 7, p. 753-761, 1996.

RAO, B.S.; SESHASAYANA, A., SARADHI, S.V.P.; KUMAR, N.R.; NARAYAN, C.P.S.; MURTHY, K.V.R. Correlation of "in vitro" release and "in vivo" absorption characteristics of rifampicin from ethylcellulose coated nonpareil beads. *Intern. J Pharm.* Amsterdam, v. 230, p. 1-9, 2001.

ROUGE, N.; BURI, P.; DOELKER, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Intern J Pharm.*, Amsterdam, v. 136, p. 117-139, 1996.

SATHE, P.M.; TSONG, Y.; SHAH, V.P. *In-vitro* dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach. *Pharm. Res.*, Norwell, v. 13, n. 12, p. 1799-1803, 1996.

SKELLY, J.P., AMIDON, G.L., BARR, W.H., BENET, L.Z., CARTER, J.E., ROBINSON, J.R., SHAH, V.P., YACOBI, A. *In vitro* and *in vivo* testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms. *Pharm Res. Norwell*, v. 7, n. 9, p. 975-982, 1990

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Infarma*, Brasília, v. 16, n. 9/10, p. 51-55, 2004.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1999.

UNITED States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990.

UNITED States Pharmacopeia: USP 24; The National Formulary: NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.2000.

UNITED States Pharmacopeia: USP 27; The National Formulary: NF 22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p. 1064-1065, 1961-1963.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEDHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.L.; LEE, V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm. Res.*, Norwell, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

CAPÍTULO V

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

5.1 INTRODUÇÃO

A análise de compostos encontrados em líquidos biológicos é um procedimento de interesse para diversas áreas, como: análises clínicas, medicina legal, ambiental, farmacêutica, entre outras (Queiroz *et al.*, 2001). Os métodos analíticos para quantificação de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas são de fundamental importância para a avaliação, confiabilidade e interpretação dos dados oriundos dos testes de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética (Bressolle *et al.*, 1996). O desenvolvimento de métodos bioanalíticos é um trabalho que exige várias tentativas, além de muitas etapas que iniciam-se com testes, passando pelos procedimentos de extração, até a validação. Os procedimentos de validação englobam desde o método analítico, onde são avaliados seletividade, precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação, limite de detecção e estabilidade, até a validação da estabilidade da matriz biológica (Bressolle *et al.*, 1996).

Atualmente vem sendo observado por um lado o crescente número de publicações descrevendo métodos bioanalíticos e por outro, significativas dificuldades de outros laboratórios em reproduzir procedimentos e resultados. Devido a isto, vem sendo incentivada a descrição das etapas necessárias ao desenvolvimento de métodos, bem como a normatização dos requisitos necessários a validação (Bressolle *et al.*, 1996; Causon, 1997; Brasil, 2003a).

5.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BIONALÍTICOS

O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de várias etapas que vão desde o preparo e extração da amostra, até a separação, detecção e quantificação cromatográfica. O detalhamento e discussão destas etapas permite conhecer claramente como foram estabelecidas as condições que possibilitaram

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

obter o método que será submetido a etapa de validação (Shah & Skelly, 1993; Causon, 1997).

Durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos, uma importante consideração é a escolha da utilização de padrão interno ou externo. A utilização do padrão externo implica na comparação da resposta do analito com uma reta de calibração gerada a partir da resposta do padrão externo. O padrão interno é a opção de escolha sempre que é possível obter um padrão isotópica ou estruturalmente semelhante ao analito. Este é adicionado inicialmente as amostras passando por todas as etapas de pré-tratamento. Para determinar a concentração do analito é utilizada uma razão entre as repostas do analito e do padrão interno. Isto possibilita minimizar os erros durante as etapas de preparo das amostras (Causon, 1997).

A utilização de matrizes biológicas, como soro, plasma e urina, geralmente dificulta a análise cromatográfica direta de fármacos. Um tratamento prévio pode ser requerido devido a complexidade das matrizes que geralmente possuem proteínas incompatíveis com as colunas cromatográficas além da concentração dos analitos que pode ser a nível de traço. A utilização de técnicas de extração e/ou pré-concentração deve ser avaliada visando adequada recuperação do analito, de forma prática e economicamente viável. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas (Queiroz *et al.*, 2001).

A extração líquido-líquido ocorre com a partição da amostra entre duas fases imiscíveis, sendo uma aquosa e outra orgânica. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Esta técnica é considerada simples, podendo empregar diferentes solventes, o que fornece uma ampla faixa de solubilidade e seletividade, além de possibilitar a desnaturação das proteínas presentes na amostra, o que evita

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

contaminação da coluna cromatográfica. Algumas desvantagens deste tipo de extração são: afinidade do analito pela água, o que pode ocasionar extração parcial ou perdas do analito; formação de emulsões, resultando em grande consumo de tempo; necessidade de grandes volumes de solvente; decomposição de compostos termicamente instáveis durante a etapa de pré-concentração; suscetibilidade a erros e dificuldade de automação. Apesar de algumas desvantagens a extração líquido-líquido é considerada uma técnica de preparação de amostras e possibilita a obtenção de extratos com elevado grau de pureza e seletividade para determinados analitos (Queiroz *et al.*, 2001).

5.3 VALIDAÇÃO

A validação de um método bioanalítico consiste em utilizar parâmetros de performance analítica que permitam determinar se o método está adequado ao uso pretendido (Causon 1997). Para que um método seja adequado aos estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência ele deve ser validado segundo os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade ou limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e em alguns casos robustez. Para a validação de métodos bioanalíticos são necessários também estudos de estabilidade dos fármacos em líquidos biológicos. A descrição detalhada de como executar cada um destes testes pode ser encontrada na resolução 899 de 29 de maio de 2003, contida no anexo 3.1 (Brasil, 2003a).

A especificidade consiste na habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz (Brasil, 2003a).

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

A linearidade consiste na capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame. Esta faixa ou intervalo de concentração onde as amostras podem ser quantificadas de maneira confiável, reprodutível e com precisão e exatidão adequadas, compreende o limite inferior de quantificação (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) (Brasil, 2003a).

A menor quantidade de um analito que o procedimento analítico consegue diferenciar, de forma confiável, do ruído ocasionado na linha de base do detector caracteriza o limite de detecção. A menor quantidade de analito numa amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão é denominada limite de quantificação inferior e a maior quantidade de analito determinada quantitativamente com precisão e exatidão é o limite de quantificação superior (Brasil, 2003a).

O grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em condições idênticas de ensaio é denominado precisão. A precisão entre dois laboratórios ou sob as mesmas condições experimentais em um curto período de tempo é denominada reprodutibilidade. O grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência caracteriza a exatidão do método (Brasil, 2003a).

Durante a validação de um método bioanalítico são incluídos testes de estabilidade das amostras. Estes consistem em avaliar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa matriz sob condições específicas tais como: após três ciclos de congelamento e descongelamento; a temperatura ambiente por um curto período de tempo; por um longo período de tempo na temperatura de armazenamento (geralmente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e na temperatura de análise por tempo igual ou superior ao tempo em que as amostras permanecerão no equipamento (Brasil, 2003a).

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 MATERIAL

5.4.1.1 Medicamento Teste

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela Fundação para o Remédio Popular (FURP).

Nome comercial: Furp – Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg;

Lote 9009

Data de fabricação: outubro de 2002

Data de validade: outubro de 2004

5.4.1.2 Medicamento Referência

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela GlaxoSmithKline.

Nome comercial: Biovir®,

Lote B067171

Data de fabricação: fevereiro de 2002

Data de validade: fevereiro de 2004

5.4.1.3 Substância Química de Referência

Lamivudina (Teor: 99,76 % e Validade: 03/2004);

Zidovudina (Teor: 99,56% e Validade: 03/2004);

Fornecidos pela Fundação para o Remédio Popular - FURP.

Estavudina (Teor: 100,67 % e Validade: 03/2005) utilizada como padrão interno (PI) durante as análises cromatográficas. Fornecido pela LABOGEM.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.4.1.4 Soluções padrão

Durante a execução da parte experimental utilizaram-se soluções padrões preparadas pela dissolução dos padrões secundários em metanol. Essas soluções foram armazenadas em freezer a -20°C e sua estabilidade testada por quatro meses.

Foram preparadas soluções metanólicas estoque nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 100,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$ de lamivudina e zidovudina e solução estoque contendo 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de estavudina (PI) em metanol.

5.4.1.5 Reagentes e Vidraria

Água ultra pura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
Acetonitrila grau cromatográfico EM Science;
Acetato de etila grau cromatográfico EM Science;
Acetato de amônio p.a., Merck (Solução 0,2 mol/L);
Coluna C8 Shim-pack® modelo 228-17873-92 (150x4,6 mm, 5 μm);
Fosfato de potássio Monobásico p.a., Merck;
Metanol grau cromatográfico EM Science;
Pré-coluna C18 Phenomenex® modelo AJO4287(50x4,6mm 5 μm) ;
Pipetas automáticas de volume variável (100, 250, 500 e 1000 μL), Eppendorf;
Seringas de plástico descartáveis de 10 mL;
Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm .

Foram utilizadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.4.1.6 Equipamentos

Agitador tipo vórtex;

Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204-s;

Banho termostático Fisaton, modelo 577;

Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;

Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Merck (Merck 1), composto por uma bomba quaternária L 7100. Desgaseificador L 7612. Injetor automático de amostras L 7200. Detector UV-Visível L 7400. Forno de coluna L 7300;

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Merck (Sys 2), composto por uma bomba quaternária L 7100. Desgaseificador L 7612. Injetor automático de amostras L 7200. Detector UV-Visível L 7400. Detector de Fluorescência; Forno de coluna L 7300;

5.4.1.7 Infra-estrutura

Etapas analítica e estatística do estudo de biodisponibilidade relativa: Laboratório de Biofarmacotécnica do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP– BIOFAR.

5.4.2 MÉTODOS

5.4.2.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma

Na literatura existem vários métodos para quantificação plasmática de lamivudina (Zhou & Sommadossi, 1997; Hoetelmans *et al.*, 1998) ou zidovudina (Frijus-Plessen *et al.*, 1990) isoladamente, bem como em conjunto. Dentre os métodos mais freqüentemente utilizados, podem ser citados os cromatográficos empregando CLAE

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

com detecção na região do ultra-violeta (Aymard *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2001; Fan & Stewart, 2002; Rezk *et al.*, 2003); Cromatógrafo acoplado ao detector de massas (Pereira *et al.*, 2000) e Eletrocromatografia capilar (Mesplet *et al.*, 2001).

Nos trabalhos citados anteriormente, empregou-se como procedimento para retirada dos fármacos contidos na matriz biológica, a extração em fase sólida. Para o desenvolvimento de uma metodologia bionalítica com adequada resolução dos sinais cromatográficos, recuperação dos fármacos e de fácil execução foram avaliadas diferentes condições. Foram testadas diferentes fases móveis isoladamente e em associações, compostas por água, metanol, acetonitrila, acetato de amônio 0.01M, tampão fosfato 0,04 M e 0,01 M com pH variando de 4 a 8. Visando melhor resolução e visualização dos sinais cromatográficos, variou-se o fluxo de fase móvel de 0,8 a 1,2 mL/min., a temperatura de análise de 30 a 60 °C, e o comprimento de onda, onde foram testados 266, 270 e 280 nm. A recuperação durante a extração dos fármacos foi avaliada utilizando-se diferentes solventes como acetato de etila, éter e precipitação com acetonitrila em diferentes volumes e condições.

No presente trabalho desenvolveu-se um método cromatográfico que possibilitou a quantificação simultânea de ambos os fármacos, após extração líquido-líquido e detecção na região do ultravioleta. O método que se mostrou preciso e exato para a quantificação de lamivudina e zidovudina, utilizando estavudina como padrão interno, será descrito a seguir.

5.4.2.2 Procedimento de purificação das amostras

Durante a etapa analítica foram utilizadas amostras plasmáticas contendo 3TC e ZDV para elaboração da curva de calibração, para o preparo dos controles de qualidade e análise de amostras de líquidos biológicos oriundas dos voluntários. Foram necessárias também amostras plasmáticas, isentas dos fármacos em questão, para

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

serem empregadas como “branco”. Anteriormente à sua utilização, essas amostras passaram por uma etapa de purificação, que consistiu na extração líquido-líquido utilizando duas alíquotas de 4 mL de acetato de etila. Ao volume de 250 µL de plasma foram adicionados 25 µL de solução de acetato de amônio 0,2 mol/L, seguido de agitação sob vórtex por 20 segundos e 4 mL do solvente seguido de agitação sob vórtex por um minuto. A porção aquosa foi congelada e a parte orgânica filtrada em unidade HV millex com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. O procedimento foi repetido com nova adição de 4 mL de acetato de etila sendo as porções do filtrado coletadas juntamente. O solvente foi evaporado a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio. Ao resíduo foram adicionados 250 µL de fase móvel, preparada conforme descrito a seguir no item 5.4.2.3, sendo posteriormente agitada sob vórtex por 30 segundos.

5.4.2.3 Condições cromatográficas para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma

As condições cromatográficas para quantificação de 3TC e ZDV em plasma, consistiram no emprego de coluna da marca Shim-pack®, modelo CLC-C8 (M), de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm, para separação. Visando aumentar a vida útil da coluna analítica e purificar ainda mais as amostras, utilizou-se pré-coluna C18 Phenomenex® (50 x 4,6 mm 5 µm).

A eluição das amostras foi realizada por uma fase móvel ternária, utilizando um sistema gradiente de mistura entre as fases seguido da adição de elevada proporção de acetonitrila constituindo uma etapa de limpeza da coluna entre cada uma das injeções de amostra. A primeira fase foi constituída por uma mistura de tampão fosfato 0,01 M (diluição de 1,3609 g de fosfato de potássio monobásico em 1L de água, sem ajuste de pH):acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A), sendo a segunda fase composta apenas por metanol (Eluente B). O sistema gradiente combinou os Eluentes A e B conforme descrito a seguir: 0 - 7 min 98:2 (v/v Eluente A/ Eluente B), 7 - 10 min

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

aumento gradativo do eluente B e diminuição de A atingindo a proporção de 72:28 (v/v Eluente A/ Eluente B) , 10 min 2 - 15 min manutenção da proporção 72:28 (v/v Eluente A/ Eluente B) de forma constante, 15 min 1 - 17 min sistema de limpeza da coluna constituído pela proporção 5:95 (v/v Eluente A/acetonitrila) e 17 min 1 - 21 min 98:2 (v/v Eluente A/ Eluente B). A fase móvel seguiu um fluxo de 1,0 mL/min e a temperatura utilizada na coluna foi de 40 °C. O comprimento de onda empregado no detector ultravioleta foi de 270 nm. Para análise dos extratos reconstituídos, foram injetados 25 µL no sistema cromatográfico e o tempo de análise foi de 21 minutos. Durante o preparo das amostras utilizou-se como padrão interno 50 µL de solução contendo 10 µg/mL de estavudina em metanol.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.4.2.4 Fluxograma

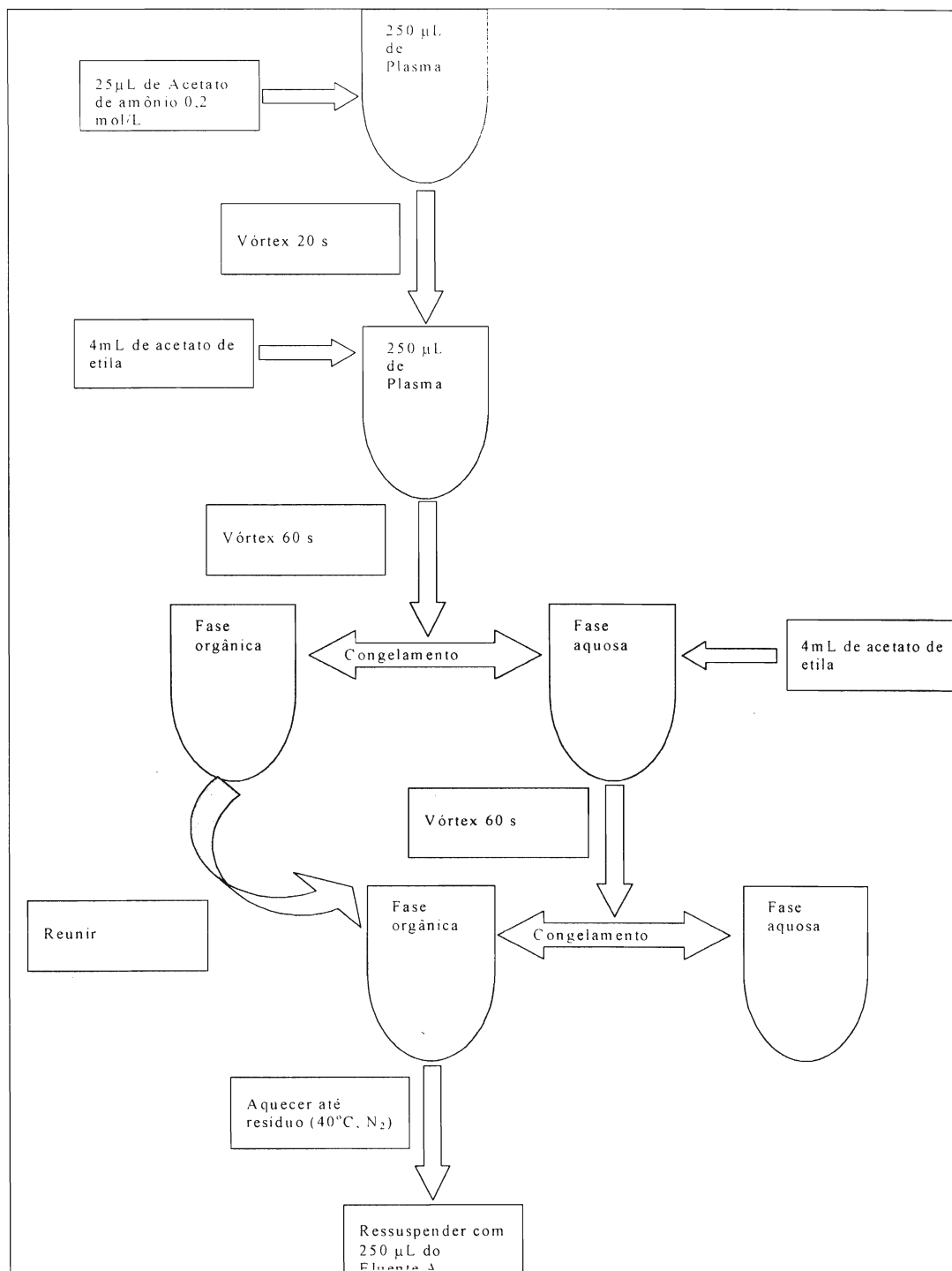


Figura 5.1 Fluxograma referente ao método de purificação e preparo de amostras plasmáticas destinadas a análise cromatográfica.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.4.2.5 Validação do método bioanalítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma

A validação foi realizada por meio da avaliação da especificidade, recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade conforme estabelecido pela Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003a).

5.4.2.5.1 Especificidade

O parâmetro especificidade foi investigado pela análise de, no mínimo, seis amostras de plasma branco para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos. Dentre as seis amostras de plasma testadas uma era composta por plasma lipêmico, outra por plasma hemolisado e quatro por plasmas normais, obtidos de voluntários sadios e isentos de fármaco e padrão interno. A presença de interferentes que apresentassem tempo de retenção igual ao de algum dos fármacos quantificados poderia ser aceita, de acordo com os seguintes critérios: 1) A área do pico interferente inferior ou igual a no máximo 20% da área do pico correspondente ao limite de quantificação inferior para o padrão; 2) A área do pico interferente igual a no máximo 5% da área do pico do padrão-interno (Brasil, 2003a).

5.4.2.5.2 Recuperação

A recuperação corresponde ao resultado, expresso como porcentagem, obtido após análise de amostras de plasma "branco" acrescidas de quantidade conhecida das substâncias químicas de referência, submetidas a pré-tratamento, comparado ao resultado obtido após análise de padrão puro, não submetido a pré-tratamento (Causon, 1997).

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

Este parâmetro foi determinado avaliando-se em replicata (n=6) as amostras de plasma de controle de qualidade, contendo 200 ng/mL (CQB), 1000 ng/mL de lamivudina e 2000 ng/mL de zidovudina (CQM) e 2000 ng/mL de lamivudina e 4000 ng/mL de zidovudina (CQA). O teste consistiu na comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de extração, e resultados de análises de amostras de lamivudina, zidovudina e padrão interno em metanol, não submetidas a esse processo. Porcentagens próximas a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores (50-60%), desde que a recuperação seja precisa e exata, ou seja, admite-se uma variação menor ou igual a 15% (Snyder, 1997; United, 1999; Brasil, 2003a).

5.4.2.5.3 Limite de quantificação (LQ)

A determinação do LQ foi efetuada quantificando-se concentrações decrescentes de ambos os fármacos, utilizando-se no mínimo, cinco amostras. Foi estabelecido como limite inferior de quantificação (LIQ), a menor concentração cujos resultados de exatidão e precisão mostraram-se aceitáveis. Segundo Bressolle e colaboradores, estes valores devem estar compreendidos entre $\pm 20\%$ do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação igual ou inferior a 20% (Bressolle *et al.*, 1996; Brasil, 2003a).

5.4.2.5.4 Reta de calibração e Linearidade

A reta de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento, representada neste trabalho pela área do sinal cromatográfico e a concentração conhecida do analito (Brasil, 2003a).

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

No presente estudo foram geradas duas retas de calibração, sendo uma para 3TC e outra para ZDV, ambas contendo sete concentrações diferentes de cada fármaco. Estas foram preparadas em plasma e adicionadas de 50 μL de solução contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estavudina (PI) em metanol. As retas de calibração foram elaboradas contendo as seguintes concentrações: 80, 120, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ng/mL para a lamivudina e 80, 120, 500, 1000, 1500, 3000, 5000 ng/mL para a zidovudina. Na Tabela 5.1 estão apresentados os dados necessários ao preparo de cada ponto das retas de calibração.

Tabela 5.1 Obtenção de amostras plasmáticas contendo quantidade conhecida de padrão de lamivudina e zidovudina utilizadas na elaboração da reta de calibração

Concentração da solução-padrão de lamivudina	Alíquota	Concentração da solução-padrão de zidovudina	Alíquota	Volume de plasma branco	Concentração final de lamivudina	Concentração final de zidovudina
0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	40 μL	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	40 μL	250 μL	80 ng/mL	80 ng/mL
0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 μL	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 μL	250 μL	120 ng/mL	120 ng/mL
1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 μL	1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 μL	250 μL	500 ng/mL	500 ng/mL
10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 μL	10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 μL	250 μL	1000 ng/mL	1000 ng/mL
10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	37,5 μL	10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	37,5 μL	250 μL	1500 ng/mL	1500 ng/mL
10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 μL	10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	75 μL	250 μL	2000 ng/mL	3000 ng/mL
10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 μL	10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 μL	250 μL	2500 ng/mL	5000 ng/mL

Para avaliar a linearidade prepararam-se as retas de calibração em seis repetições. Estabeleceu-se a correlação linear entre a concentração, considerada variável independente (x) e a área do pico, considerada variável dependente (y). Os parâmetros da correlação foram estimados através do método dos mínimos

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

quadrados. A linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação linear (R), que deve ser, no mínimo, 0,98 (Brasil, 2003a).

5.4.2.5.5 Precisão

A precisão de um método pode ser determinada por meio do grau de concordância entre os resultados obtidos de repetidas análises da mesma amostra. Este parâmetro possibilita medir o erro aleatório e expressá-lo em porcentagem como Desvio Padrão Relativo (DPR %) ou coeficiente de variação (CV%), conforme equação apresentada a seguir (Eq. 5.1) (Causon, 1997; United, 1999; Brasil, 2003a).

$$\text{Eq. 5.1} \quad \text{DPR(\%)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

Para avaliar a precisão do método foi determinada a repetibilidade dos resultados obtidos por meio dele. Para tal foram quantificadas em réplica de cinco amostras de plasma contendo quantidades definidas de padrão em três concentrações: 200 ng/mL para ambos os fármacos (denominada CQB): 1000 ng/mL para lamivudina e 2000 ng/mL para zidovudina (denominada CQM) e 2000 ng/mL para lamivudina e 4000 ng/mL para zidovudina (denominada CQA).

Para o preparo das amostras de plasma de controle de qualidade empregaram-se alíquotas de soluções padrão de lamivudina e zidovudina em metanol, nas concentrações de 100 ou 500 µg/mL. Em balões volumétricos de 25,0 mL, contendo cerca de 8 mL de plasma branco, foram adicionados os volumes adequados das soluções padrão. A seguir, completou-se o volume adicionando lentamente o plasma para evitar a formação de espuma. Após ajuste do menisco, agitou-se vigorosamente para garantir a homogeneização (Tabela 5.2).

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

Tabela 5.2 Obtenção de amostras plasmáticas de controle de qualidade contendo lamivudina e zidovudina

Controle de qualidade	CQB		CQM		CQA	
	3TC	ZDV	3TC	ZDV	3TC	ZDV
Concentração das soluções-padrão	100µg/mL	100µg/mL	500µg/mL	500µg/mL	500µg/mL	500µg/mL
Alíquota	50 µL	50 µL	50 µL	100 µL	100 µL	200 µL
Volume de plasma branco	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
Concentração final	200 ng/mL	200 ng/mL	1000 ng/mL	2000 ng/mL	2000ng/mL	4000ng/mL

A precisão foi determinada pela quantificação em triplicata das amostras de CQB, CQM e CQA em uma mesma corrida analítica (precisão intra-corrída) e em três dias diferentes (precisão inter-corrídas).

O método apresenta adequada precisão quando os valores do coeficiente de variação (CV%), obtidos tanto no parâmetro repetibilidade, quanto precisão intra-corrída e inter-corrídas forem iguais ou inferiores a 15%. Admite-se valores de CV% maiores que 15% porém iguais ou inferiores a 20% para a concentração correspondente ao limite de quantificação (Brasil, 2003a).

5.4.2.5.6 Exatidão

O avaliação do parâmetro exatidão é importante durante a validação do método, pois métodos exatos possibilitam obter resultados analíticos próximos aos valores reais ou verdadeiros. O cálculo da exatidão pode ser efetuado pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme representado na Equação 5.2 (Brasil, 2003a).

$$\text{Eq. 5.2} \quad \text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras plasmáticas de controle de qualidade em três diferentes concentrações, CQB, CQM e CQA, preparadas conforme descrito na Tabela 5.2 do item 5.4.2.5.5. A exatidão deve estar entre $\pm 15\%$ do valor nominal da concentração. Foram avaliadas a exatidão intra-dia (análise realizada no mesmo dia em réplicas de seis) e inter-dias (análises realizadas em três dias diferentes) (Brasil, 2003a).

5.4.2.5.7 Estabilidade

A avaliação da estabilidade das amostras utilizadas durante as diferentes etapas do estudo visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (United, 1999; Brasil, 2003a).

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

Para avaliar se as amostras plasmáticas contendo os fármacos lamivudina e zidovudina se manteriam estáveis em condições pré-determinadas, possibilitando assim a aplicação do método bioanalítico ao estudo de biodisponibilidade relativa, foram realizados os testes conforme recomendado pela Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003. As amostras são consideradas estáveis quando os desvios nominais obtidos comparando-se sua concentração com amostras recém-preparadas, forem inferiores a 15% exceto para o LIQ onde aceita-se um desvio de até 20%. Os parâmetros validados foram:

Estabilidade de curta duração: quantificação dos fármacos em amostras de plasma contendo-os nas concentrações de 200 (CQB), 1000 (CQM) e 2000 (CQA) ng/mL para lamivudina e 200 (CQB), 2000 (CQM) e 4000 (CQA) ng/mL para zidovudina, mantidas a temperatura ambiente por 24 e 48 horas.

Estabilidade de longa duração: As amostras de controle de qualidade armazenadas a -20°C foram analisadas após um período de tempo igual ao de armazenamento das amostras de plasma dos voluntários que receberam a associação medicamentosa contendo lamivudina e zidovudina. Durante o estudo foi avaliada a estabilidade das amostras de controle de qualidade descritas anteriormente após 30 dias, dois e seis meses de preparo.

Estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento das amostras de CQB, CQM e CQA.

Estabilidade das soluções-padrão utilizadas para preparação diária da curva de calibração. Estas soluções foram avaliadas até seis meses após seu preparo.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.4.2.5.8 Robustez

A robustez de um método consiste na avaliação da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Isto possibilita maior confiabilidade dos resultados obtidos durante sua utilização. No decorrer da validação do método avaliou-se a robustez, nos resultados obtidos utilizando-se outro cromatógrafo Merck e outra coluna C8 de mesmo lote, conforme descrição nos itens Equipamentos 5.4.1.6. e Reagentes e vidrarias 5.4.1.5. Foram avaliados os parâmetros linearidade (item 5.4.2.5.4), precisão (item 5.4.2.5.5) e exatidão (item 5.4.2.5.6).

5.5 RESULTADOS

5.5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

O método cromatográfico desenvolvido, mostrou-se adequado para quantificação simultânea de lamivudina e zidovudina, em amostras de plasma provenientes do ensaio de biodisponibilidade relativa. Esta adequação é comprovada a seguir, pelos resultados obtidos nos parâmetros avaliados durante a validação do método.

5.5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.5.2.1 Especificidade

O método desenvolvido mostrou-se específico para a quantificação dos fármacos lamivudina e zidovudina, bem como do padrão interno estavudina, sem significativas

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

interferências. Os três sinais cromatográficos referentes aos fármacos, apresentaram adequada resolução entre si, apresentando tempos de retenção iguais a 7 min 2; 12 min e 15 min 9 para lamivudina, PI e zidovudina respectivamente. Visando avaliar a adequação do método ao estudo de biodisponibilidade relativa foram analisadas amostras de plasma padrão “branco” (sem adição de fármacos e mantido nas condições padrão), hemolisado e lipêmico, as quais não apresentaram sinais cromatográficos interferentes nos tempos de retenção correspondentes aos fármacos lamivudina, zidovudina e ao PI, como pode ser observado na Figura 5.2.

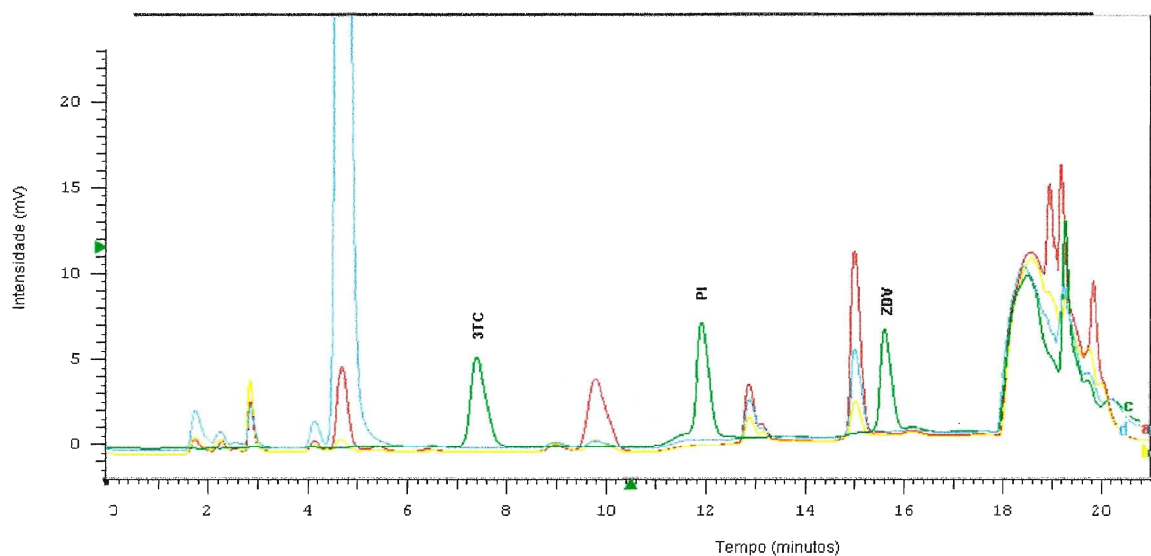


Figura 5.2 - Cromatogramas de análises cromatográficas nas condições preconizadas pelo método, de amostras de Padrão (c - verde) e plasmas branco (b - amarelo), lipêmico (d - azul) e hemolisado (a - vermelho).

5.5.2.2 Recuperação

O procedimento de extração, descrito para o método analítico desenvolvido, apresentou adequada eficiência que pode ser comprovada pelos resultados do teste de recuperação. Embora sejam desejáveis resultados de porcentagem de analito recuperado próximos a 100%, valores menores são aceitáveis, desde que a recuperação seja precisa e exata (Brasil, 2003a). Os resultados médios do teste de

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

recuperação descrito no item 5.4.2.5.2, foram 66,30%; 103,5% e 93,95% para lamivudina, zidovudina e o PI respectivamente, conforme apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Valores médios referentes a cinco determinações experimentais do teste de recuperação de lamivudina, zidovudina e padrão interno adicionados às amostras de plasma, empregando-se o procedimento de dupla extração com porções de 4mL de acetato de etila.

Concentração	Recuperação (%)		
	lamivudina	zidovudina	Padrão interno
CQB	66,68	100,84	83,74
CQM	65,15	110,07	98,86
CQA	67,08	99,61	99,26
Média	66,30	103,51	93,95
D.P.	1,54	5,53	9,42
CV(%)	1,02	5,72	8,85

5.5.2.3 Limite de quantificação

A determinação do limite de quantificação foi efetuada conforme descrito no item 5.4.2.5.3. O limite de quantificação tanto para lamivudina, quanto para zidovudina foi de 80 ng/mL. A exatidão e a precisão dos resultados foram de 108,58% e 6,55% para lamivudina e 99,73% e 6,78% para zidovudina, respectivamente.

5.5.2.4. Reta de calibração

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 80 a 2500 ng/mL para lamivudina e de 80 a 5000 ng/mL para zidovudina. As retas de calibração referentes a lamivudina e zidovudina estão apresentadas nas Figuras 5.3 e 5.4 respectivamente e

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

os parâmetros estatísticos determinados em relação a linearidade estão contidos na Tabela 5.4.

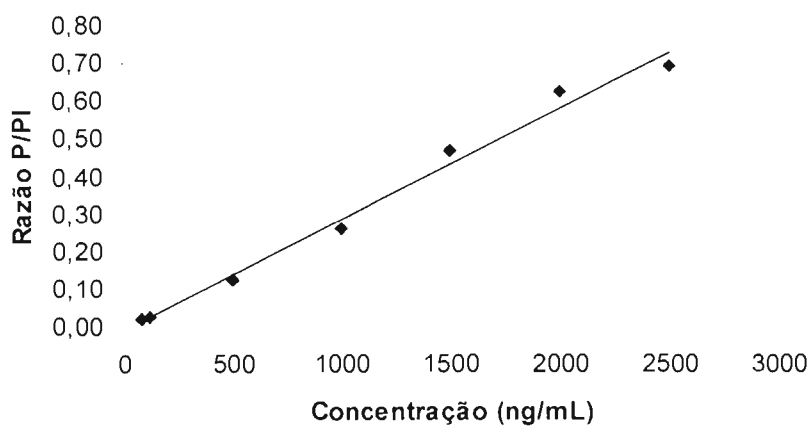


Figura 5.3. Retra de calibração referente a quantificação de lamivudina em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta de uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

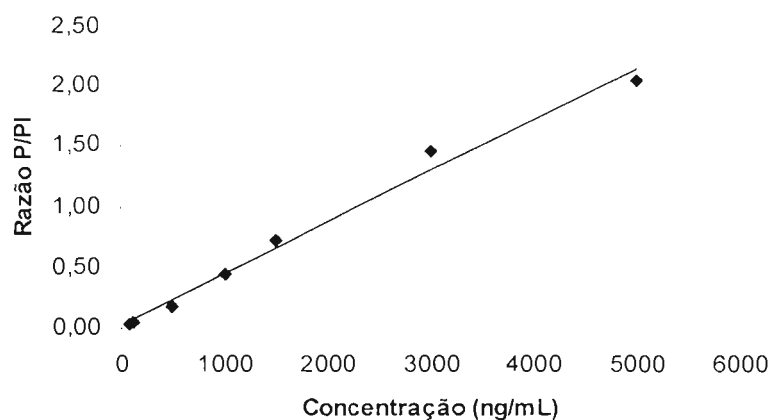


Figura 5.4. Reta de calibração referente a quantificação de zidovudina em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta de uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Tabela 5.4 Resultados estatísticos relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Parâmetro	lamivudina	Zidovudina
Coeficiente angular (a)	0,0003	0,0040
Coeficiente linear (b)	-0,0083	0,0261
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9887	0,9888

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

5.5.2.5 Precisão e Exatidão

O método apresentou precisão adequada para quantificação de ambos os fármacos, com coeficiente de variação calculado inferior a 15% e satisfatória exatidão, cujos resultados estão compreendidos entre 85 e 115%.

Os valores de precisão obtidos para amostras de lamivudina analisadas no mesmo dia (intra-corridas) variaram de 3,1 a 4,8% e em dias diferentes (inter-corridas) variaram de 3,7 a 6,5%. Os resultados da avaliação da precisão e exatidão referentes a lamivudina estão apresentados na Tabela 5.5.

Os resultados relativos a precisão das amostras de zidovudina analisadas no mesmo dia (intra-corridas) variaram de 2,8 a 3,6% e os coeficientes de variação para amostras analisadas em dias diferentes (inter-corridas) variaram de 2,0 a 2,4%. Os resultados da avaliação da precisão e exatidão referentes a zidovudina estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.5 Precisão e exatidão intra-corrída e inter-corridas referentes a método analítico para quantificação de lamivudina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis ou três determinações, para análise intra e inter-dias, respectivamente

Concentração (ng/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
200 (CQB)	4,8	8,2	112,8	107,1
1000 (CQM)	3,1	4,8	92,4	90,0
2000 (CQA)	3,2	6,4	100,5	95,6

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

Tabela 5.6 Precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrídas referentes a método analítico para quantificação de zidovudina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis ou três determinações, para análise intra e inter-dias, respectivamente

Concentração (ng/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
200 (CQB)	3,4	9,4	85,2	100,0
2000 (CQM)	2,8	3,5	96,1	96,8
4000 (CQA)	3,6	4,8	101,0	100,3

5.5.2.6 Estabilidade

A avaliação da estabilidade dos fármacos contidos em amostras plasmáticas e após extração durante o tempo necessário a conclusão das análises, visa subsidiar a confiabilidade dos resultados. Os procedimentos utilizados durante a avaliação da estabilidade das amostras foram descritos no item 5.4.2.5.7.

5.5.2.6.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Os resultados referentes a estabilidade das amostras de controle de qualidade avaliadas por três ciclos de congelamento e descongelamento mostram que estas mantiveram-se estáveis, apresentando precisão e exatidão aceitáveis, conforme pode ser observado na Tabelas 5.7 (lamivudina) e 5.8 (zidovudina).

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

Tabela 5.7 Resultados médios de precisão e exatidão de amostras de controle de qualidade, contendo lamivudina, submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Concentração (ng/mL)	Exatidão (%) (n=3)			Precisão (%) (n=3)		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
200	110,98	108,57	105,07	1,14	2,66	10,74
1000	90,57	94,60	90,71	4,93	5,72	4,92
2000	96,22	105,74	87,24	1,87	3,66	5,36

Tabela 5.8 Resultados médios de precisão e exatidão de amostras de controle de qualidade, contendo zidovudina, submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01 M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270 nm.

Concentração (ng/mL)	Exatidão (%) (n=3)			Precisão (%) (n=3)		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
200	90,47	103,29	106,26	2,04	4,84	1,06
2000	102,88	91,78	87,00	3,06	2,07	6,54
4000	103,79	97,14	87,53	2,96	1,39	0,70

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

5.5.2.6.2 Estabilidade de longa duração

As amostras plasmáticas contendo lamivudina e zidovudina armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mantiveram-se estáveis por 6 meses. Os resultados da precisão e exatidão do estudo de estabilidade de longa duração dos fármacos lamivudina e zidovudina, estão apresentados nas Tabelas 5.9 e 5.10, respectivamente.

Tabela 5.9 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade de longa duração da lamivudina em amostras de plasma mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Tempo (meses)	Exatidão (%) (n=3)			Precisão (%) (n=3)		
	200 ng/mL	1000 ng/mL	2000 ng/mL	200 ng/mL	1000 ng/mL	2000 ng/mL
1	99,8	89,2	97,2	1,26	3,22	3,56
2	97,1	88,3	96,8	2,82	3,89	3,80
6	98,7	86,9	94,9	3,57	4,08	3,71

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

Tabela 5.10 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade de longa duração da zidovudina em amostras de plasma mantidas a -20°C e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Tempo (meses)	Exatidão (%) (n=3)			Precisão (%) (n=3)		
	200 ng/mL	2000 ng/mL	4000 ng/mL	200 ng/mL	2000 ng/mL	4000 ng/mL
1	106,5	93,8	98,8	3,22	2,45	3,60
2	103,7	94,4	99,3	3,61	3,02	3,48
6	104,2	93,9	97,2	4,07	3,92	3,90

5.5.2.6.3 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada utilizando amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao mesmo tratamento, no mesmo tempo e condições de análise que as amostras de plasma de voluntários. As amostras de plasma de controle de qualidade passaram por descongelamento natural à temperatura ambiente e preparação conforme método validado previamente descrito nos itens 5.4.2.2 e 5.4.2.3 Para avaliar a estabilidade das amostras durante o período de espera no injetor automático até a sua introdução no sistema cromatográfico, foram realizados estudos em períodos correspondentes a 24 e 48 horas à temperatura ambiente, cujos resultados médios estão apresentados nas Tabelas 5.11 e 5.12 para lamivudina e zidovudina respectivamente.

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

Tabela 5.11 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade da lamivudina em amostras de plasma mantidas a temperatura ambiente por 24 e 48 horas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Tempo (horas)	Exatidão (%) (n=3)			Precisão (%) (n=3)		
	200 ng/mL	1000 ng/mL	2000 ng/mL	200 ng/mL	1000 ng/mL	2000 ng/mL
24	101,61	98,50	93,80	1,24	6,27	1,96
48	103,23	92,53	85,70	11,83	4,51	2,50

Tabela 5.12 Resultados médios de precisão e exatidão referentes a estabilidade da zidovudina em amostras de plasma mantidas a temperatura ambiente por 24 e 48 horas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Tempo (horas)	Exatidão (%) (n=3)			Precisão (%) (n=3)		
	200 ng/mL	2000 ng/mL	4000 ng/mL	200 ng/mL	2000 ng/mL	4000 ng/mL
24	92,14	98,21	101,95	2,89	4,73	0,44
48	106,36	87,96	88,51	6,76	0,16	3,21

5.5.2.7 Robustez

Os resultados dos parâmetros de validação foram comparados a um segundo sistema cromatográfico, contendo características idênticas as descritas no item 5.4.1.6. Estes

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

parâmetros possibilitaram avaliar a robustez do método desenvolvido. Nas figuras 5.5 e 5.6 estão apresentadas as retas de calibração da lamivudina e zidovudina, respectivamente. Os resultados do teste de regressão linear estão apresentados na Tabela 5.13. Os valores referentes aos parâmetros precisão e exatidão estão apresentados nas Tabelas 5.14 (lamivudina) e 5.15 (zidovudina).

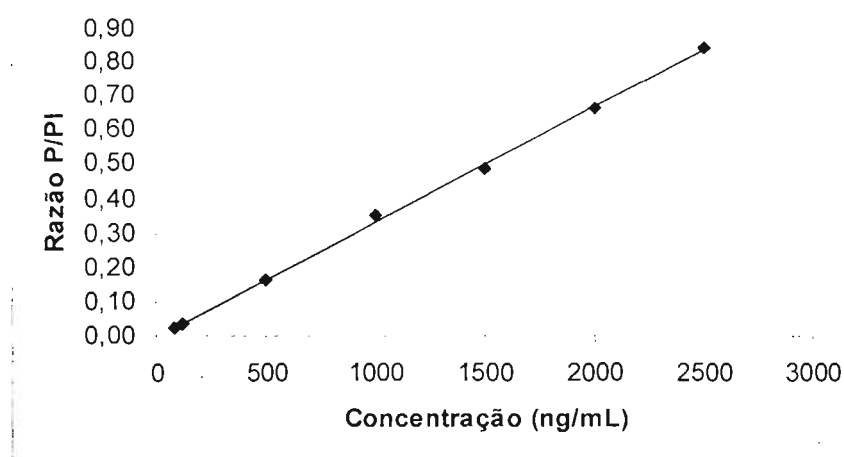


Figura 5.5 Retas de calibração referente a quantificação de lamivudina em plasma utilizando cromatógrafo 2, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultravioleta a 270nm.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

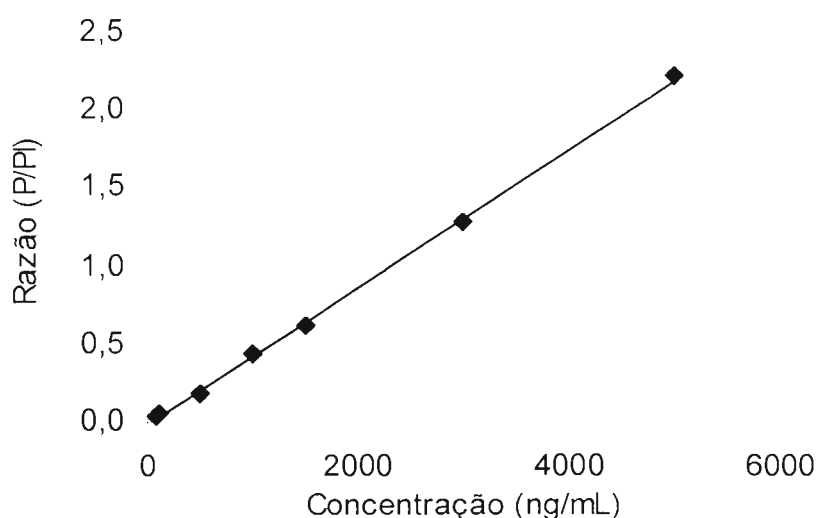


Figura 5.6 Reta de calibração referente a quantificação de zidovudina em plasma utilizando Cromatógrafo 2, com fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultravioleta a 270nm.

Tabela 5.13 Resultados estatísticos relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma utilizando cromatógrafo 2, com fase móvel binária composta por uma mistura de tampão fosfato 0,01M:acetonitrila (97:3 v/v) (Eluente A) e metanol (Eluente B) em sistema gradiente e detecção no ultra violeta a 270nm.

Parâmetro	lamivudina	zidovudina
Coeficiente angular (a)	0,0003	0,0004
Coeficiente linear (b)	-0,002	-0,0052
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9989	0,9993

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

Tabela 5.14 Precisão e exatidão intra-corrída referentes a método analítico para quantificação de lamivudina em plasma utilizando cromatógrafo 2. Cada valor representa a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
	Intra-dia	Intra-dia
200 (CQB)	3,8	104,8
1000 (CQM)	3,4	98,8
2000 (CQA)	4,5	100,9

Tabela 5.15 Precisão e exatidão intra-corrída referentes a método analítico para quantificação de zidovudina em plasma utilizando cromatógrafo 2. Cada valor representa a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
	Intra-dia	Intra-dia
200 (CQB)	1,7	111,7
2000 (CQM)	1,1	98,9
4000 (CQA)	1,0	100,5

5.10 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A análise conjunta e simultânea dos fármacos lamivudina e zidovudina em amostras biológicas é um requisito necessário à realização do estudo de bioequivalência

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

envolvendo produtos contendo estes fármacos. No presente capítulo, foi abordado o desenvolvimento de método bioanalítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultra violeta e extração líquido-líquido dos referidos fármacos.

A metodologia empregando CLAE-UV foi selecionada por possibilitar a quantificação simultânea dos fármacos contidos nas amostras plasmáticas com precisão e exatidão. O método demonstrou adequada especificidade para ambos os fármacos em detrimento de possíveis interferentes. Durante o emprego da metodologia comprovou-se sensibilidade adequada à sua aplicação em estudos de farmacocinética, biodisponibilidade, biodisponibilidade relativa e bioequivalência, nos quais a determinação de pequenas concentrações plasmáticas dos analitos é de suma importância.

Nos últimos anos, muitos estudos sobre a eficácia e o monitoramento terapêutico de agentes anti-retrovirais tem ocasionado o desenvolvimento de métodos para quantificação de fármacos dessa classe terapêutica (Noormohamed *et al.*, 1995; Katlama *et al.*, 1996; Robbins *et al.*, 1998; Sasomsin *et al.*, 2002). Métodos empregando radioimunoensaio, embora tenham sido descritos como bem sucedidos para quantificação de compostos resultantes da fosforilação de zidovudina e lamivudina, não possibilitaram a quantificação de ambos os fármacos livres. Estas metodologias apresentam o inconveniente de serem menos difundidas e preconizadas para os estudos de biodisponibilidade relativa (Robbins *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2000). Na literatura encontra-se também a descrição de método cromatográfico acoplado à espectroscopia de massas para detecção de lamivudina e zidovudina. O método exige maior destreza no domínio da técnica, uma vez que para detectar a lamivudina é necessário o uso do modo íon positivo e para quantificação da zidovudina o modo íon negativo (Pereira *et al.*, 2000). Além disso, esse método é mais oneroso, uma vez que o equipamento é de alto custo para aquisição e validação. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta tem sido amplamente utilizada, por ser uma técnica rápida, específica

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

e que permite a quantificação simultânea de diferentes fármacos e seus metabólitos (Zhou & Somadossi, 1997; Moyer *et al.*, 1999; Aymard *et al.*, 2000).

As amostras biológicas contendo os fármacos, obtidas dos voluntários e destinadas aos estudos de biodisponibilidade relativa, devem passar por um tratamento prévio à sua análise no cromatógrafo. As razões para isto são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas. O pré-tratamento objetiva uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Queiroz *et al.*, 2001).

Os fármacos lamivudina e zidovudina possuem características estruturais e físico-químicas distintas. A zidovudina se comporta como ácido fraco, possui pKa igual a 9,8 e apresenta-se não ionizada em pH de 3,5 a 5,5. A lamivudina se comporta como base fraca, apresenta pKa igual a 4,3. Estas pequenas diferenças ocasionam grandes alterações nos procedimentos de extração. Alguns autores utilizaram a precipitação com ácido tricloroacético como pré-tratamento na análise de lamivudina (Zhou & Somadossi, 1997). A precipitação utilizando acetato de amônio 25 mM também foi empregada na extração de ambos os fármacos (Pereira *et al.*, 2000). Porém, a grande maioria dos trabalhos que quantificaram lamivudina e zidovudina conjuntamente empregaram a extração em fase sólida utilizando como solvente o metanol (Harker *et al.*, 1994; Hoetelmans *et al.*, 1998; Moyer *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2000; Aymard *et al.*, 2000). Durante a execução deste trabalho diferentes procedimentos de extração foram testados. A adição de acetato de amônio às amostras, seguida de duas extrações líquido-líquido com acetato de etila, foi o procedimento que possibilitou melhor recuperação dos fármacos, bem como do padrão interno utilizado. Embora o procedimento de extrair duas vezes seja um pouco mais trabalhoso que uma extração simples, ele possibilitou maior recuperação dos fármacos mostrando-se bastante eficiente e bem menos oneroso que a extração em fase sólida.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

As amostras purificadas foram analisadas pelo método cromatográfico desenvolvido, visando avaliar a sua especificidade. O cromatograma apresentado na Figura 5.1 contém os sinais cromatográficos referentes aos padrões de 3TC, ZDV e do PI. Os três fármacos apresentaram adequada resolução entre si. Nos tempos de retenção referentes aos fármacos de interesse não foi observado qualquer sinal devido a interferentes extraídos de amostras plasmáticas lipêmicas, hemolisadas e sem alteração (denominadas plasma branco). O método está de acordo com os critérios de especificidade, aceitando-se uma porcentagem de interferência de até 20% para o sinal cromatográfico do fármaco e 5% para o PI (Brasil, 2003a).

Durante o desenvolvimento e validação do método foram avaliados parâmetros como limite de quantificação (LQ) e recuperação, uma vez que no estudo de biodisponibilidade relativa executado foi administrado apenas um comprimido a cada voluntário em cada uma das fases. Esta dose única ocasiona baixas concentrações plasmáticas dos fármacos em alguns tempos de coleta. Valores de concentração inferiores ao LQ não foram utilizados no cálculo de ASC. É importante lembrar que um dos requisitos preconizados para o teste é que o valor de ASC_{0-t} seja no mínimo igual a 85% do valor de $ASC_{0-\infty}$. Por isso é importante quantificar baixas concentrações dos fármacos com precisão e exatidão (Brasil 2003a). O limite de quantificação para ambos os fármacos foi de 80 ng/mL com exatidão e precisão dos resultados de 108,58% e 6,55% para lamivudina e 99,73% e 6,78% para zidovudina, respectivamente.

Durante a construção das retas de calibração utilizadas na validação do método analítico foram utilizados valores de concentração diferentes para ambos os fármacos. Estes valores foram baseados em dados já publicados (Moodley *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1999; Aymard *et al.*, 2000) e em um estudo piloto realizado anteriormente ao estudo de biodisponibilidade relativa. Foram levadas em consideração também as quantidades dos fármacos nos comprimidos, sendo que a concentração de ZDV é o dobro da concentração de 3TC. Outro fator importante foi

**CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA**

a grande variabilidade na absorção oral de ZDV e sua biodisponibilidade de aproximadamente 66% (Balint, 2001) e da 3TC que é superior a 80% em adultos (Perry & Faulds, 1997).

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 80 a 2500 ng/mL para lamivudina e de 80 a 5000 ng/mL para a zidovudina. Esta faixa de linearidade foi adequada à aplicação do método aos estudos de biodisponibilidade relativa. O método mostrou-se preciso e exato para quantificação de ambos os fármacos nas concentrações citadas anteriormente. Os valores obtidos para análise de amostras de lamivudina no mesmo dia (intra-corridas) variaram de 3,1 a 4,8% para precisão e 92,4 a 112,8% para exatidão e em dias diferentes (inter-corridas) variaram de 3,7 a 6,5% para precisão e 90,0-107,1% para exatidão. Os resultados obtidos para análise de amostras de zidovudina no mesmo dia (intra-corridas) variaram de 2,8 a 3,6% para precisão e de 85,2 a 101,0% para exatidão e em dias diferentes (inter-corridas) variaram de 2,0 a 2,4% para precisão e 96,8 a 100,3% para exatidão, estando de acordo com a legislação vigente para este tipo de estudo (Brasil, 2003a).

O método foi validado também quanto a robustez, comparando-se os resultados obtidos utilizando dois cromatógrafos de mesma marca e características semelhantes. A adequada robustez possibilita a utilização de dois equipamentos e a comparação dos resultados oriundos de ambos sem desvios significativos. Os resultados apresentados na Tabela 5.4 demonstram a adequada linearidade e os valores de precisão e exatidão para ambos os fármacos estão contidos nas Tabelas 5.5 e 5.6 e encontram-se dentro dos limites permitidos.

Quanto a estabilidade, as amostras de ambos os fármacos mostraram-se estáveis a pelo menos três ciclos de congelamento e descongelamento como pode ser observado pelos dados apresentados nas Tabelas 5.7 (3TC) e 5.8 (ZDV). A estabilidade de longa duração foi determinada com a finalidade de se estudar o tempo em que amostras provenientes de estudos clínicos podem permanecer armazenadas sem prejuízo da qualidade das mesmas. O presente trabalho

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

demonstrou que os fármacos 3TC e ZDV mantêm-se estáveis em amostras plasmáticas armazenadas a -20°C , por até 6 meses (Tabelas 5.9 e 5.10). A avaliação da estabilidade das amostras reconstituídas em fase móvel é importante no que se refere a problemas operacionais que podem ocorrer durante o procedimento de rotina, já que uma vez garantida a estabilidade destas amostras será possível seu armazenamento para posterior análise no cromatógrafo. As amostras plasmáticas descongeladas, purificadas e reconstituídas com fase móvel se mantiveram estáveis por 48 horas à temperatura ambiente, conforme pode ser observado pelos resultados apresentados nas Tabelas 5.11 e 5.12.

Os resultados obtidos após avaliação dos parâmetros de validação demonstraram que o método cromatográfico apresentou adequada especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. De acordo com estes resultados é possível a aplicação do método ao estudo de biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo lamivudina e zidovudina.

5.11 CONCLUSÃO

O método bioanalítico desenvolvido mostrou-se adequado à quantificação conjunta de lamivudina e zidovudina em amostras plasmáticas. Ele é simples e facilmente aplicável ao grande número de análises necessárias aos estudos de biodisponibilidade. O procedimento de extração líquido-líquido dos fármacos não necessita de equipamentos sofisticados, sendo menos oneroso que os procedimentos de extração em fase sólida. O método mostrou-se preciso e exato, cumprindo todos os requisitos de validação e estabilidade descritos na legislação vigente para seu emprego nos estudos de biodisponibilidade.

5.12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BALINT, G.A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol. Ther.*, Amsterdam, v.89, p.17-27, 2001.

BRASIL. Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003a.

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.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.689, n.1, p.175-180, 1997.

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.

FRIJUS-PLESSEN, N.; MICHAELIS, H.C.; FOTH, H.; KAHL, 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., Biomed. Appl.*, Amsterdam, v.534, p.101-107, 1990.

HARKER, A.J.; EVANS, G.L.; HAWLEY, A.E.; MORRIS, D.M. High-performance liquid chromatographic assay for 2'-deoxy-3'-thiacytidine in human serum. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, v.657, n.1, p.227-232, 1994.

HOETELMANS, R.M.W.; PROFIJT, M.; MENNHORST, P.L.; MULDER, J.W.; BEIJNEN, J.H. Quantitative determination of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (lamivudine) in human plasma, saliva and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.713, n.2, p.387-394, 1998.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

JOHNSON, M.A.; MOORE, K.H.P.; YUEN, G.J.; BYE, A.; PAKES, G.E. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.36, n.1, p.41-66, 1998.

KATLAMA, C.; INGRAND, D.; LOVEDAY, C.; CLUMECK, N.; MALLOLAS, J.; STASZEWSKI, S.; JOHNSON, M.; HILL, A.M.; PEARCE, G.; MCDADE, H. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in antiretroviral-naïve patients. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.276, n.2, p.118-125, 1996.

MESPLET, N.; MORIN, P.; FRANÇOIS, C. AGROFOGLIO, L.A. Simultaneous quantification of nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary electrochromatography on a β -cyclodextrin-blended silica stationary phase. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.927, p.161-168, 2001.

MOODLEY, J.; MOODLEY, D.; PILLAY, K.; COOVADIA, H.; SABA, J.; VAN LEEUWEN, R.; GOODWIN, C.; HARRIGAN, P.R.; MOORE, K.H.; STONE, C.; PLUMB, R.; JOHNSON, M.A. Pharmacokinetics and antiretroviral activity of lamivudine alone or when co-administered with zidovudine in HIV-infected pregnant women and their offspring. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.178, p.1327-1333, 1998.

MOORE, J.D.; VALETTE, G.; DARQUE, A.; ZHOU, X.J.; SOMMADOSSI, J.P. 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.*, Orlando, v.11, p.1134-1143, 2000.

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.*, Baltimore, v.45, n.9, p.1465-1476, 1999.

NOORMOHAMED, S.E.; HENRY, W.K.; RHAME, F.S.; BALFOUR Jr., H.H.; FLETCHER, C.V. Strategies for control of zidovudine concentration in serum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.39, p.2792-2797, 1995.

PEREIRA, A.S.; KENNEY, K.B.; COHEN, M.S.; HALL, J.E.; ERON, J.J.; TIDWELL, R.R.; DUNN, J.A. Simultaneous determination of lamivudine and zidovudine concentrations in human seminal plasma using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.742, n.1, p.173-183, 2000.

PERRY, C.M.; FAULDS, D. Lamivudine: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*, Auckland, v.53, n.4, p.657-680, 1997.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA EM PLASMA

- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.
- REZK, N.L.; TIDWELL, R.R.; KASHUBA, A.D.M. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.791, n.1/2, p.137-147, 2003.
- ROBBINS, B.L.; TRAN, T.T.; PINKERTON Jr, F.H.; AKEB, F.; GUEDI, R.; GRASSI, J.; LANCASTER, DANNY; FRIDLAND, A. Development of a new cartridge radioimmunoassay for determination of intracellular levels of lamivudine triphosphate in the peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.42, n.10, p.2656-2660, 1998.
- RODRIGUES, J.F.; RODRIGUEZ, J.L.; SANTANA, J.; GARCIA, H.; ROSÁRIO, O. Simultaneous quantitation of intracellular zidovudine and lamivudine triphosphates in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, Washington, v.44, n.11, p.3097-3100, 2000.
- SASOMSIN, P.; MENTRÉ, F.; DIQUET, B.; SIMON, F.; BRUN-VEZINET, F. Relationship between exposure to zidovudine and decrease of P24 antigenemia in HIV-infected patients in monotherapy. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, Oxford, v.16, n.5, p.347-352, 2002.
- SHAH, V.P.; SKELLY, J.P. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. In: ARANCIA, A.; GAL, M.N.; MELLA, E., eds. *Biodisponibilidade de medicamentos*. Santiago: Universitária, 1993. p.145-157.
- 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.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2.ed. New York: Wiley Interscience, 1997. p.685-713.
- UNITED States Pharmacopeia: USP 24; The National Formulary: NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.2569.
- ZHOU, X.L.; SOMMADOSSI, J.P. Rapid quantitation of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.691, n.2, p.417-424, 1997.

CAPÍTULO VI

**BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E
APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO
LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA**

6.1 INTRODUÇÃO

As investigações relacionadas à biodisponibilidade de produtos farmacêuticos originaram-se devido à ineficácia clínica observada com o uso de alguns medicamentos, além de episódios de intoxicação (Storpirtis, Consiglieri, 1995). A biodisponibilidade refere-se à quantidade de fármaco absorvida a partir de uma forma farmacêutica e a velocidade pela qual este processo ocorre (Storpirtis, Consiglieri, 1995; Arancibia, 1991, Consiglieri & Storpirtis, 2000.). A completa biodisponibilidade de um fármaco somente pode ser assegurada quando este for introduzido diretamente na corrente sangüínea. Qualquer outra via de administração extra vascular implica no processo de absorção, que possui barreiras podendo diminuir a concentração do componente ativo na corrente circulatória (Storpirtis, Consiglieri, 1995). Estudos mostraram que variações na formulação ou mesmo na técnica de fabricação, podem gerar diferenças substanciais na absorção dos fármacos (Storpirtis, Consiglieri, 1995; Benet, 1999; Storpirtis *et al.*, 1999).

As variações dos perfis de biodisponibilidade de medicamentos ocorrem principalmente em função das diferenças observadas em relação à eficácia e velocidade de absorção dos fármacos. As alterações nestes dois processos podem ocorrer devido aos fatores fisiológicos inerentes a cada indivíduo, estudados pela farmacocinética e farmacodinâmica, e aos fatores relacionados à forma farmacêutica de dosagem utilizada, avaliados pela biofarmacotécnica.

A farmacocinética consiste no estudo quantitativo dos processos de absorção distribuição, biotransformação e excreção, fenômenos estes que determinam a variação da concentração plasmática do fármaco em função do tempo (Storpirtis, Consiglieri, 1995). Um medicamento administrado por via oral (seja na forma farmacêutica comprimidos, cápsulas, drágeas, suspensão, entre outras) somente alcançará a circulação sistêmica e produzirá efeito farmacológico se for absorvido no trato gastrointestinal. Após esta etapa, o fármaco cai na circulação portal sendo levado até o fígado, onde o metabolismo parcial ou completo pode ser um fator limitante da sua biodisponibilidade (Moraes & Moraes, 2000). A farmacocinética pode ser considerada

como uma ferramenta útil ao estudo do fármaco no organismo em diversas situações, tais como co-administração de medicamentos, presença de patologias associadas, interação fármaco-alimento, entre outras (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

A farmacodinâmica compreende os mecanismos envolvidos na interação das moléculas do fármaco com os receptores na biofase, a qual desencadeia o efeito farmacológico (Storpirtis, Consiglieri, 1995).

A Biofarmacotécnica é o ramo da farmácia que estuda os processos ocasionados no organismo a partir da administração da forma farmacêutica, considerando as fases de liberação e dissolução do fármaco que precedem sua absorção (Storpirtis, Consiglieri, 1995).

A importância da qualidade dos medicamentos produzidos está diretamente relacionada à sua eficácia, porém estas afirmativas não são suficientes para assegurar a intercambialidade entre diferentes produtos (Knoben *et al.*, 1990). Para tal, é necessário o estudo da quantidade de fármaco que é absorvida e a velocidade deste processo. Estes estudos devem ser realizados em produtos que contém o mesmo princípio ativo e que sejam administrados pela mesma via (Pasbt & Jaeger, 1990; Storpirtis & Consiglieri, 1995). Chamados de testes de bioequivalência, eles são realizados em um mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar (Bois, Tozer; *et al.*, 1991).

Os principais fatores que desencadearam a realização de inúmeros estudos de bioequivalência foram os elevados custos envolvidos na triagem clínica completa de novos medicamentos, além das inovações no desenvolvimento de metodologias bioanalíticas adequadas (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

Os ensaios clínicos seguem princípios éticos e científicos de experimentação e são os responsáveis pelas bases da avaliação de eficácia e segurança de fármacos ou medicamentos. Na atualidade, a farmacologia clínica desenvolve principalmente duas

atividades: estudos farmacocinéticos e elaboração, execução e análise de ensaios clínicos para verificar a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos em seres humanos. A confiabilidade dos resultados dos estudos de bioequivalência está na dependência direta dos estudos analíticos (Moraes & Moraes, 2000). Os estudos clínicos devem ser elaborados com bastante clareza e segurança, seguindo os parâmetros de ética estabelecidos na Declaração de Helsinque e no Brasil conforme as diretrizes e normas em pesquisa clínica envolvendo seres humanos contidas na Resolução 196/96 CNS-MS (Moraes & Moraes, 2000).

Em 1977, a FDA (*Food and Drug Administration*) dividiu o programa de ensaios clínicos em quatro fases. Fase I relaciona-se com a primeira administração de fármacos em voluntários sadios ou, no caso de medicamentos previamente caracterizados como tóxicos (por exemplo, fármacos antineoplásicos e antivirais), aplicados a populações especiais portadoras da própria doença (câncer ou AIDS). Fase II refere-se à investigação clínica do efeito do tratamento em pacientes nos quais a farmacocinética, farmacodinâmica e as doses utilizadas são cuidadosamente estudadas em relação à sua eficácia e segurança. A fase III compreende estudos clínicos amplos (multicentros), quando será avaliada a segurança e eficácia comparada do novo fármaco com um medicamento padrão, o que possibilitará a aprovação de seu uso terapêutico e finalmente a fase IV que consiste em estudos pós-comercialização (Moraes & Moraes, 2000).

As fases anteriormente descritas são precedidas de ensaios pré clínicos *in vitro*, em cultura de células e órgãos isolados *in vivo* em modelos animais experimentais, nos quais se estuda o metabolismo, a eficácia e a potencial toxicidade do fármaco. Todos os medicamentos passam por rigorosos testes de segurança antes de serem aprovados para ensaios clínicos (Moraes & Moraes, 2000).

O alto custo destes estudos inviabiliza sua aplicação a todas as novas preparações farmacêuticas. Os estudos de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência possibilitam atestar a qualidade e intercambialidade de um medicamento teste após compará-lo a

um medicamento referência que passou por todas as etapas clínicas descritas anteriormente. Isto permite a diminuição de custos no desenvolvimento de novos produtos.

Os ensaios de bioequivalência se justificam apenas para dois tipos de situações: alterações de uma formulação já existente no mercado ou versões genéricas de um produto inovador (Consiglieri & Storpiritis, 2000). Enquanto os estudos de biodisponibilidade devem ser realizados para qualquer produto farmacêutico original, os ensaios de bioequivalência e biodisponibilidade relativa tem como objetivo demonstrar que um produto apresenta, ou não, diferenças significativas em relação ao desempenho biológico, quando comparado a outro previamente aprovado (Consiglieri & Storpiritis, 2000).

6.2 BIODISPONIBILIDADE

O termo biodisponibilidade é definido pela quantidade intacta do fármaco administrada por via extra vascular que atinge a circulação sangüínea para que ocorra um efeito biológico. Ela é dependente do metabolismo pré-sistêmico e da velocidade pela qual o processo ocorre (Moraes & Moraes, 2000).

A resposta terapêutica de um fármaco depende de sua adequada concentração no sítio de ação. Isto ocorre após se estabelecer um equilíbrio entre a concentração do princípio ativo no plasma e no local onde exercerá sua ação. Esta concentração depende de processos farmacocinéticos denominados: absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. Estes processos são dinâmicos e ocorrem desde a entrada do fármaco no organismo até sua eliminação. A velocidade com que estes processos ocorrem afeta diretamente a concentração do fármaco na circulação sistêmica e portanto sua biodisponibilidade (Gibaldi, 1991).

Um fármaco 100% disponível é aquele que é completamente liberado de sua forma farmacêutica, constituindo uma solução no trato gastrintestinal (TGI). O fármaco liberado

e dissolvido deve ser completamente estável nos líquidos do TGI, atravessando as membranas biológicas e atingindo a circulação mesentérica sem ser inativado. Finalmente todo o fármaco absorvido deve passar para a circulação sistêmica sem ser metabolizado na passagem pelo fígado (Aulton, 1996).

6.2.1 BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA

A biodisponibilidade absoluta consiste na fração da dose administrada que é efetivamente absorvida pelo organismo. Para determinação da biodisponibilidade absoluta calcula-se a área sob a curva da concentração plasmática do fármaco *versus* tempo, a partir de uma injeção intravenosa como referência, pois neste caso a biodisponibilidade é considerada 100%. Pode-se comparar a absorção de um produto teste administrado por via extravascular calculando-se parâmetros farmacocinéticos como: Área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC_{0-t}), concentração plasmática máxima (C_{max}) e tempo necessário para atingir C_{max} (T_{max}) e comparando-os com os resultados obtidos após administração intravenosa do fármaco, nas mesmas condições e, se possível, na mesma dose (Storpiritis, 1999).

6.2.2 BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

A biodisponibilidade relativa, segundo a legislação nacional vigente, consiste no quociente entre a quantidade e a velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um preparado e a quantidade e velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo (Brasil, 2003b). A biodisponibilidade relativa consiste no estudo comparativo entre as biodisponibilidades de dois medicamentos administrados sob condições iguais e padronizadas (Consiglieri & Storpiritis, 2000). Para os estudos de biodisponibilidade relativa o planejamento, a execução e a avaliação dos resultados são realizados de

acordo com o preconizado pela ANVISA de maneira idêntica aos estudos de bioequivalência (Brasil 2003a).

Os estudos de biodisponibilidade relativa passaram a ser requisitos obrigatórios, a partir de 2003, aos produtos similares presentes no mercado brasileiro (Brasil, 2003d).

6.3 BIOEQUIVALÊNCIA

A Bioequivalência consiste no estudo comparativo entre as biodisponibilidades de produtos que contêm o mesmo princípio ativo, administrados pela mesma via. O desenho do estudo é realizado com administração extravascular de um preparado e um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo. Dois produtos são considerados bioequivalentes quando, ao serem administrados nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentarem diferenças significativas em relação à quantidade de fármaco absorvida e à velocidade do processo de absorção (Storpiritis, Consiglieri, 1995; Brasil, 2003b).

A biodisponibilidade comparativa entre duas formulações ou preparações administradas como doses únicas, a partir de dados de concentrações sanguíneas, deve ser determinada com base em valores de concentração plasmática máxima atingida ($C_{máx}$) pela espécie farmacologicamente ativa e a área sob a curva (ASC) traçada pelas variações de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo. A variabilidade individual na resposta a um medicamento é acompanhada de uma variabilidade no comportamento farmacocinético. Por isso a FDA admite uma diferença de até 20% na biodisponibilidade das duas formulações, para que as mesmas sejam consideradas bioequivalentes (Moraes & Moraes, 2000).

A amplitude do intervalo de bioequivalência é um fator ainda muito discutido. Para a razão de tendência central D_1 é geralmente adotado 80% e D_2 igual a 120%. Estes valores são oriundos de relação com limites (por exemplo os de potência) da

Farmacopéia Americana. Para fármacos onde o índice terapêutico é estreito ou que apresentam efeitos tóxicos intensos, são adotados intervalos menores (90 a 110%, por exemplo) (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

Alguns produtos podem ser equivalentes quanto à quantidade absorvida e diferir em relação à velocidade de absorção e mesmo assim serem considerados bioequivalentes caso essa diferença seja intencional ou declarada no rótulo (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

6.4 FATORES QUE INFLUEM NA BIODISPONIBILIDADE

Existem fatores que influem significativamente no ensaio de biodisponibilidade, dentre eles é importante ressaltar a variabilidade farmacocinética, que é responsável pelas diferenças intra-indivíduos. Há também variabilidade farmacodinâmica entre indivíduos, que consiste na diferença de resposta a uma dada concentração de fármaco no sítio de ação (Moraes & Moraes, 2000).

As variações de perfis de biodisponibilidade de medicamentos ocorrem principalmente em função das diferenças observadas em relação à eficácia e velocidade de absorção dos fármacos. Os fatores fisiológicos inerentes a cada indivíduo e os fatores relacionados à forma farmacêutica de dosagem utilizada, são os principais responsáveis por essas alterações. Por esse motivo, formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, apresentam, freqüentemente problemas de biodisponibilidade em relação a outras formas de dosagem (Serra, 1998).

Fatores que influenciam a biodisponibilidade de medicamentos são aqueles que afetam a desintegração, dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade, podendo ser resumidos em fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal, características físico-químicas do fármaco, além da influência da forma farmacêutica e seus excipientes (Aulton, 1996).

6.5 MEDICAMENTOS GENÉRICOS

Nos EUA, para obtenção do registro junto ao órgão federal de controle de medicamentos e alimentos, Food and Drug Administration (FDA), o medicamento genérico deve ser um equivalente farmacêutico do medicamento original, comprovando também ser seu equivalente terapêutico (Consiglieri & Storpiritis, 2000).

No Brasil o não reconhecimento da Lei das Patentes até 1996 e a falta de política adequada para medicamentos genéricos podem ser consideradas as principais causas da existência de inúmeras especialidades contendo o mesmo fármaco, comercializadas por diferentes laboratórios sob apresentação e posologia idênticas. Os medicamentos similares já registrados embora tenham o direito a registro sanitário, não podem ser considerados genéricos (Consiglieri & Storpiritis, 2000).

Os produtos “bioequivalentes”, bem como os equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas, são aqueles, cuja velocidade e grau de absorção não demonstram diferenças significativas, ou seja, apresentam a mesma biodisponibilidade, quando administrados na mesma dose molar sob as mesmas condições experimentais (Meredith, 1996).

Segundo a ANVISA (Brasil, 2003b) dois medicamentos serão considerados bioequivalentes quando o intervalo de confiança 90% para as seguintes razões: ASC_{0-t} teste/ ASC_{0-t} referência e C_{max} , teste / C_{max} , referência, entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos dos produtos teste e referência estiverem compreendidos entre 80 e 125%. O parâmetro ASC_{0-t} refere-se à extensão da absorção, ou seja, à quantidade de fármaco absorvida pelo organismo, enquanto o parâmetro C_{max} está relacionado à velocidade da absorção. Segundo a ANVISA, outros limites de intervalo de confiança de 90% para C_{max} , previamente estabelecidos no protocolo para estudo de bioequivalência, poderão ser aceitos mediante justificativas científicas.

Segundo a FDA, dois produtos podem ser considerados bioequivalentes, desde que os limites para o intervalo de confiança de 90%, obtidos a partir da razão entre as velocidades (C_{max}) e as extensões (ASC) de absorção dos produtos teste e referência, estejam compreendidos entre os limites de -20 a +25%, ou seja, 80 a 125% (United States, 2001).

No caso de medicamentos utilizados de forma crônica, os fatores que determinam sua eficácia e segurança são o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio estacionário e a concentração média do fármaco no estado de equilíbrio estacionário (DiPiro *et al.*, 1996). O tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio estacionário corresponde a cinco vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, a qual não depende da formulação, pois é característica específica de cada fármaco. A concentração média no estado de equilíbrio estacionário é definida pela fórmula (Shargell & Yu, 1993):

$$C_{eee} = ASC/\tau,$$

Em que:

C_{eee} = concentração média no estado de equilíbrio estacionário;

ASC = área sob a curva "concentração sanguínea vs tempo" no intervalo de dose, que equivale à $ASC_{0-\infty}$;

τ = intervalo de dose.

Portanto, medicamentos que apresentem equivalência em relação ao parâmetro $ASC_{0-\infty}$ deverão atingir valores equivalentes de concentração sanguínea média no estado de equilíbrio estacionário, desde que sejam administrados no mesmo esquema terapêutico (doses e intervalos de dose iguais).

A EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2000) agência europeia reguladora para medicamentos, sugere para fármacos de alta variabilidade uma ampliação dos limites do IC 90% para 75 a 133% referentes ao parâmetro farmacocinético C_{max} .

No Canadá, estão sendo realizados estudos e discussões sobre os requisitos necessários aos testes de bioequivalência de fármacos críticos. Estes são caracterizados pelas significativas alterações na sua concentração plasmática quando ocorre pequena alteração na dose administrada. Isto pode acarretar ineficácia terapêutica ou mesmo reações adversas graves, persistentes ou irreversíveis durante o uso. No caso de fármacos considerados críticos o intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t} deve estar compreendido dentro dos limites de 90 a 112% e para C_{max} entre 80 e 125%, sendo que os resultados encontrados devem ser semelhantes quando os medicamentos são administrados na presença e na ausência de alimentos (Health Canada, 2002).

Atualmente é crescente o número de medicamentos genéricos, para um mesmo produto. Isto tem um valor comercial importante, uma vez que quanto maior o número de genéricos de determinado produto, menor é o custo deste para o consumidor (Brasil, 2002a). Uma nova preocupação vem surgindo quanto a intercambialidade dos produtos. Estudos demonstram que é possível substituir um produto referência pelo genérico correspondente, mas não se pode garantir que dois produtos genéricos sejam intercambiáveis entre si (Midha *et al.*, 1998).

6.6 ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA E BIOEQUIVALÊNCIA ENVOLVENDO LAMIVUDINA E/OU ZIDOVUDINA

Estudos de biodisponibilidade contendo lamivudina demonstraram que ela é rapidamente absorvida quando administrada por via oral. Sua concentração plasmática máxima é atingida geralmente entre 0,5 e 1,5 horas após a administração. Ela é amplamente distribuída pelo organismo, com volume aparente de distribuição (Vd) de aproximadamente 1,3L/kg após administração intravenosa. Cerca de 70% da dose oral é eliminada inalterada na urina, sendo o *clearance* sistêmico após administração intravenosa de aproximadamente 0,3L/h/Kg (Johnson *et al.*, 1999). Os valores dos parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração oral de lamivudina a voluntários sadios foram: ASC ($\mu\text{g/L.h}$) 15579 (13412-18096); C_{max} ($\mu\text{g/L}$) 3798 (3038-4747); t_{max} (h) 1,0 (0,5-1,6); $t_{1/2\beta}$ (h) 11,7 (9,3-14,6) (Johnson *et al.*, 1998) e ASC ($\mu\text{g/L.h}$) 6005 (5483-6577); C_{max} ($\mu\text{g/L}$) 1537 (1336-1768); t_{max} (h) 0,75 (0,5-2,0); $t_{1/2\beta}$ (h) 9,7 (8,6-10,8) (Moore *et al.*, 1999) para doses de 300 e 150 mg, respectivamente.

A zidovudina é rápida e completamente absorvida após administração oral. Ela é amplamente distribuída pelos líquidos e tecidos corpóreos, sendo seu volume de distribuição entre 1,4 e 3,9 L/Kg. Sua distribuição sistêmica é diminuída devido a significativo metabolismo de primeira passagem, ocasionando um *clearance* plasmático de aproximadamente 1,3 L/h/Kg e uma biodisponibilidade média de 63%. (Acosta *et al.*, 1996; Hoetelmans *et al.*, 1996).

Estudos relacionando a concentração plasmática de ZDV e a sua toxicidade indicaram a existência de uma relação entre ambos. Os efeitos tóxicos são 4,3 vezes maiores quando a concentração do fármaco no estado de equilíbrio atinge 0,8mg/mL. As porcentagens de portadores do HIV que recebem doses diárias de ZDV de 600, 1000 e 1500 mg, que atingem concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio superiores a 0,8 mg/L, são 6, 15 e 32%, respectivamente. Para indivíduos que recebem doses diárias de ZDV de 600 e 1000 mg cerca de 38% no primeiro caso e 18% no segundo não atingem o nível plasmático efetivo que é de 0,2 mg/L. Estes estudos possibilitaram

caracterizar a alta variabilidade da zidovudina e servem de subsídios para a individualização da terapia (Mentré *et al.*, 1993).

Os parâmetros farmacocinéticos médios obtidos após administração oral de doses de 250 e 750 mg de zidovudina a portadores do HIV foram: ASC (mg/mL.h) 1,45 (C.V. 36%); C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) 0,73 (C.V. 50%); t_{max} (h) 0,5 (C.V. 49%) e ASC (mg/mL.h) 3,33 (C.V. 36%); C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) 2,08 (C.V. 50%); t_{max} (h) 1,5 (C.V. 49%), respectivamente (Blum *et al.*, 1988).

A comparação dos parâmetros farmacocinéticos referentes à administração de lamivudina e zidovudina contidas em comprimidos distintos e associadas foi realizada por Moore e colaboradores (1999). O estudo consistiu na administração a 24 voluntários humanos sadios de comprimidos separados contendo 150 mg de 3TC e 300 mg de ZDV na primeira fase e de um único comprimido contendo os dois fármacos nas concentrações descritas anteriormente na segunda fase. Nas duas primeiras fases os voluntários receberam os tratamentos em jejum, em uma terceira fase foi administrada a associação medicamentosa 5 minutos após uma refeição padronizada. Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos obtidos para cada um dos fármacos nos três tratamentos estão contidos na Tabela 6.1.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
 DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.1 Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos após administração de lamivudina e zidovudina a 24 voluntários sadios, nas seguintes condições: fármacos em comprimidos distintos (1), associação (2) e associação administrada após refeição padronizada (3) (adaptado de Moore *et al.*, 1999)

Condições	Lamivudina			Zidovudina		
	1	2	3	1	2	3
ASC _{0-∞} (ng.h/mL)	6137,6 ± 1234,0	6374,2 ± 1607,4	6035,4 ± 1160,6	2398,2 ± 2299,4	2390,9 ± 553,0	2147,6 ± 664,6
C _{max} (ng/mL)	1620,3 ± 519,6	1742 ± 616,3	1376 ± 403,9	2008,3 ± 809,9	1992,6 ± 636,1	1139,2 ± 587,8
t _{max} (h)	0,91 ± 0,48	0,91 ± 0,37	1,86 ± 0,94	0,57 ± 0,45	0,58 ± 0,34	1,07 ± 0,66
t _{1/2β} (h)	9,98 ± 2,78	9,79 ± 2,42	10,52 ± 5,32	1,50 ± 0,24	1,45 ± 0,24	1,53 ± 0,41

*Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos apresentados são valores médios ± desvio padrão.

6.7 MATERIAL E MÉTODOS

6.7.1 MATERIAL

6.7.1.1 Medicamento Teste

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela Fundação para o Remédio Popular (FURP).

Nome comercial: Furp – Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg;

Lote 9009

Data de fabricação: outubro de 2002

Data de validade: outubro de 2004

6.7.1.2 Medicamento Referência

Foram avaliados comprimidos revestidos contendo 150 mg de Lamivudina e 300 mg de Zidovudina, produzidos pela GlaxoSmithKline.

Nome comercial: Biovir®,

Lote B067171

Data de fabricação: fevereiro de 2002

Data de validade: fevereiro de 2004

6.7.1.3 Substâncias Químicas de Referência:

Lamivudina (Teor: 99,76 % e Validade: 03/2004);

Zidovudina (Teor: 99,56% e Validade: 03/2004);

Fornecidos pela Fundação para o Remédio Popular - FURP.

Estavudina (Teor: 100,67 % e Validade: 03/2005) utilizada como padrão interno (PI) durante as análises cromatográficas. Fornecido pela LABOGEM.

6.7.1.4 Soluções padrão

Durante a execução da parte experimental utilizaram-se soluções padrões preparadas pela dissolução dos padrões secundários em metanol. Essas soluções foram armazenadas em freezer a -20°C e sua estabilidade testada por quatro meses.

Foram preparadas soluções metanólicas estoque nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 100,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$ de lamivudina e zidovudina e solução estoque contendo 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de estavudina (PI) em metanol.

6.7.1.5 Reagentes e Vidraria

Água ultra pura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
Acetonitrila grau cromatográfico EM Science;
Acetato de etila grau cromatográfico EM Science;
Acetato de amônio p.a., Merck (Solução 0,2 mol/L);
Coluna C8 Shim-pack® modelo 228-17873-92 (150x4,6 mm, 5 μm);
Fosfato de potássio Monobásico p.a., Merck;
Metanol grau cromatográfico EM Science;
Pré-coluna C18 Phenomenex® modelo AJO4287(50x4,6mm 5 μm) ;
Pipetas automáticas de volume variável (100, 250, 500 e 1000 μL), Eppendorf;
Seringas de plástico descartáveis de 10 mL;
Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm .

Foram utilizadas vidrarias calibradas, comuns de laboratório.

6.7.1.6 Equipamentos

Agitador tipo vórtex;
Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204-s;
Banho termostático Fisaton, modelo 577;
Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;
Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Merck (Merck 1), composto por uma bomba quaternária L 7100. Desgaseificador L 7612. Injetor automático de amostras L 7200. Detector UV-Visível L 7400. Forno de coluna L 7300;

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Merck (Sys 2), composto por uma bomba quaternária L 7100. Desgaseificador L 7612. Injetor automático de amostras L 7200. Detector UV-Visível L 7400. Detector de Fluorescência; Forno de coluna L 7300;

6.7.1.7 Infra-estrutura

Durante a execução do projeto foram utilizadas as infra-estruturas de diferentes centros laboratoriais, devidamente credenciados pela ANVISA.

Etapas clínicas do estudo de biodisponibilidade relativa: Paris & Paris Medicina do Futuro S/C Ltda.

Laboratório de Análises Clínicas onde foram efetuados os exames pré e pós etapa clínica: Laboratório de Exame Ehrlich Ltda.

Etapas analítica e estatística do estudo de biodisponibilidade relativa: Laboratório de Biofarmacotécnica do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP– BIOFAR.

6.7.2 MÉTODOS

6.7.2.1 Avaliação biofarmacotécnica *in vivo*

A avaliação biofarmacotécnica *in vivo*, consiste em determinar o comportamento do fármaco dentro do organismo humano. O processo se inicia com a administração do medicamento, seguida da liberação do fármaco de sua forma farmacêutica e posterior determinação de alguns parâmetros farmacocinéticos como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Storpiertis, 1999).

Esta etapa consistiu ainda na determinação da biodisponibilidade relativa de ambos os fármacos contidos nos produtos teste e referência e na comparação da quantidade

absorvida e da velocidade de absorção por meio de um estudo comparativo em condições padronizadas (Benet, 1999; Storpirtis, 1999).

6.7.2.1.1. Procedimento de Purificação das amostras

Durante a etapa analítica foram utilizadas amostras plasmáticas contendo 3TC e ZDV para elaboração da curva de calibração, para o preparo dos controles de qualidade e análise de amostras oriundas dos voluntários. A qualidade dos resultados obtidos durante o estudo foi assegurada devido à validação do método bioanalítico e à quantificação diária e conjunta de amostras de curvas de calibração e controle de qualidade preparadas simultaneamente ao preparo das amostras oriundas dos voluntários. Foram necessárias também amostras plasmáticas, isentas dos fármacos em questão, para serem empregadas como "branco". Anteriormente à sua utilização, essas amostras passaram por uma etapa de purificação, que consistiu em dupla extração líquido-líquido utilizando acetato de etila, conforme descrito no capítulo V, item 5.4.2.2.

6.7.2.1.2 Condições cromatográficas para quantificação de lamivudina e zidovudina em plasma

As condições cromatográficas para quantificação de 3TC e ZDV em plasma, consistiram no emprego de coluna da marca Shim-pack®, modelo CLC-C8 (M), de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm, para separação. Visando aumentar a vida útil da coluna analítica e purificar ainda mais as amostras, utilizou-se pré-coluna C18 Phenomenex® (50x4,6mm 5µm).

A eluição das amostras foi realizada por uma fase móvel binária, utilizando um sistema gradiente de mistura entre ambas as fases seguido da adição de elevada proporção de acetonitrila constituindo uma etapa de limpeza da coluna entre cada uma das injeções de amostra. A primeira fase foi constituída por uma mistura de tampão fosfato 0,01 M

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

sem ajuste de pH): acetoneitrila (97:3 v/v) (Eluente A), sendo a segunda fase composta apenas por metanol (Eluente B). O procedimento foi executado conforme fluxograma apresentado em 5.4.2.4.

6.7.2.1.3 Fluxograma

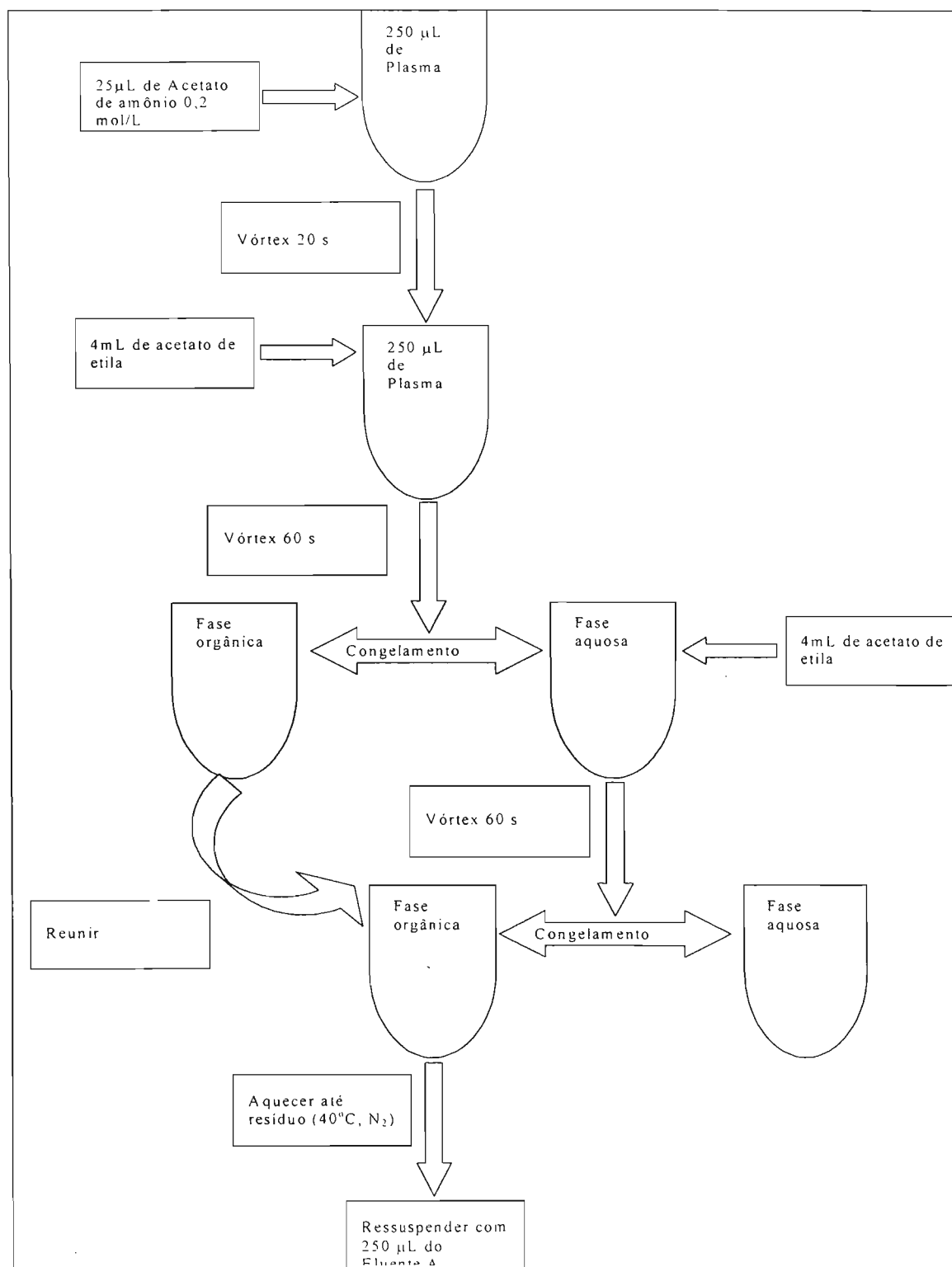


Figura 6.1 Fluxograma referente ao método de purificação e preparo de amostras plasmáticas destinadas a análise cromatográfica.

6.7.2.1.4 Avaliação da bioequivalência entre medicamentos teste e referência contendo lamivudina e zidovudina, apresentados sob a forma farmacêutica de comprimidos

O estudo de biodisponibilidade relativa contou com a colaboração de 24 voluntários sadios humano, devido a isto ele foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme declaração contida no Anexo 6.1.

6.7.2.1.4.1 Casuística

O procedimento consistiu em um estudo quantitativo, com delineamento cruzado e aberto. Durante a etapa clínica foram selecionados 24 voluntários sadios, sendo 12 homens e 12 mulheres. A idade média dos voluntários foi de 33 anos, sendo o peso e altura médios de 62 kg e 166 cm, respectivamente (Tabela 6.2).

O estudo foi elaborado com bastante clareza e segurança, seguindo os parâmetros de ética estabelecidos na Declaração de Helsinque e no Brasil conforme as diretrizes e normas em pesquisa clínica envolvendo seres humanos (Moraes & Moraes, 2000). Os voluntários foram devidamente informados sobre as características da pesquisa, recebendo e assinando um termo de consentimento livre e esclarecido contido no Anexo 6.2. Todos satisfizeram aos seguintes critérios recomendados pela Resolução nº 896 (Brasil, 2003b):

- Não fumantes;
- Apresentação de bom estado de saúde, idade entre 21 e 50 anos e peso dentro do ideal $\pm 15\%$;
- Ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- Sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

- Não estavam tomando medicamentos;
- Voluntários do sexo feminino não estavam em estado de gravidez ou em período de amamentação.

A inclusão dos indivíduos foi baseada também nos resultados de exames clínicos e laboratoriais.

- Hemograma completo;
- Uréia;
- Creatinina;
- Fosfatase alcalina;
- Glicemia;
- Bilirrubina total;
- Proteínas totais e albumina;
- Transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP);
- Ácido úrico;
- Colesterol total;
- Triglicérides;
- Urina tipo I;
- Sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C;
- β -HCG (para mulheres);
- Eletrocardiograma com doze derivações.

Conforme preconizado pela Resolução nº 896 (Brasil, 2003b), todos os exames, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, foram realizados também no período pós-estudo.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.2 Características dos voluntários incluídos no ensaio de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 150 mg de lamivudina e 300 mg de zidovudina. R = produto referência (Biovir[®] lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline), T = produto teste (FURP - Lamivudina lote 9007, produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP)

Voluntário	Sexo	Idade	Altura (cm)	Peso (Kg)
1	F	22	160	51
2	F	35	168	68
3	M	29	173	62
4	F	35	164	59
5	M	34	153	53
6	F	30	162	54
7	F	39	166	66
8	M	29	165	67
9	F	31	173	68
10	M	28	182	67
11	F	33	172	70
12	M	26	170	69
13	M	47	164	58
14	F	26	160	50
15	F	31	165	52
16	F	24	166	58
17	M	36	154	56
18	M	21	167	63
19	M	46	175	79
20	F	46	165	57
21	M	31	174	72
22	F	26	165	58
23	M	21	173	60
24	M	34	159	68
Média		32	167	62
D.P.		8	7	8

6.7.2.1.4.2 Procedimento do Ensaio de Biodisponibilidade Relativa

O estudo objetivou comparar a velocidade e a extensão da absorção de lamivudina e zidovudina presentes em comprimidos de pronta liberação produzidos por duas empresas. Durante a etapa clínica os voluntários foram divididos em dois grupos (A e B) contendo 12 indivíduos, sendo 6 homens e 6 mulheres. Foi empregado tratamento estatístico de aleatorização visando estipular quais voluntários receberiam o medicamento teste na primeira fase e o medicamento referência na segunda fase. O desenho do estudo está apresentado na Tabela 6.3. Entre as duas fases houve um período de "wash out" de 7 dias, visando a total eliminação dos fármacos presentes no organismo.

Os voluntários compareceram à Clínica Paris & Paris na noite anterior ao ensaio, receberam um lanche e permaneceram internados e em jejum até o dia seguinte. Na manhã receberam 1 comprimido contendo 150 mg de lamivudina e 300 mg de zidovudina, administrado com 200 mL de água. Foi mantido jejum até quatro horas após a administração do medicamento. Os voluntários receberam almoço e mais duas refeições padronizadas. Eles não ingeriram bebidas alcoólicas, café ou outras bebidas contendo xantinas no período de 48 horas anteriormente ao ensaio e durante sua realização. Os voluntários foram conscientizados da necessidade de não tomarem nenhum medicamento no período de uma semana antes do estudo, bem como nos dias de sua realização.

Durante a realização do estudo foram efetuadas coletas de amostras sanguíneas nas primeiras 12 horas e os voluntários foram liberados em seguida. Eles retornaram à clínica apenas para serem realizadas as coletas sanguíneas após 24 e 36 horas da administração do medicamento.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.3 Desenho do estudo para ensaio de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 150 mg de lamivudina e 300 mg de zidovudina. R = produto referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline), T = produto teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg - Lote 9009, produzido por Fundação para o Remédio Popular – FURP)

Voluntário	Fase 1	Fase 2
1	R	T
2	T	R
3	R	T
4	T	R
5	R	T
6	T	R
7	T	R
8	R	T
9	R	T
10	T	R
11	T	R
12	R	T
13	R	T
14	T	R
15	R	T
16	T	R
17	R	T
18	T	R
19	R	T
20	T	R
21	R	T
22	T	R
23	T	R
24	R	T

6.7.2.1.4.3 Coleta de Amostras

Foram coletadas amostras de 8 mL de sangue em tubos heparinizados, nos seguintes tempos: 0:00; 0:15; 0:30; 0,45; 1:00; 1:15; 1:30; 1:45; 2:00; 2:30; 3:00; 4:00; 6:00; 8:00; 10:00; 12:00; 24:00; 36:00 horas após administração dos medicamentos.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos, para separação do plasma, que foi congelado a -20°C até o momento da análise. A etapa analítica iniciou-se imediatamente após a segunda fase da etapa clínica e estendeu-se por 22 dias, sendo este o período máximo de tempo em que as amostras permaneceram congeladas.

6.7.2.1.4.4 Quantificação de 3TC e ZDV nas amostras plasmáticas

Em cada dia de análise foram avaliadas todas as amostras de um mesmo voluntário, obtidas nas fases 1 e 2. Cada alíquota de plasma foi descongelada e homogeneizada. Foram pipetados 250 μL de plasma e transferidos para tubos de ensaio contendo quantidade adequada do PI previamente pipetado e seco em atmosfera de nitrogênio. Nas amostras de plasma obtidas no tempo zero, ou seja, antes da administração dos medicamentos, não foi adicionado o PI. Isto possibilita atestar a ausência de interferentes para o método, nas amostras analisadas.

Posteriormente, seguiu-se o procedimento geral para preparo das amostras plasmáticas, conforme fluxograma contido no item 6.7.2.1.3. A quantificação dos fármacos lamivudina e zidovudina, contidos nas amostras plasmáticas dos voluntários foi realizada utilizando dois cromatógrafos de mesma marca, características semelhantes e devidamente validados. As análises compreenderam um período de 22 dias, que foi inferior ao tempo em que as amostras congeladas permaneceram estáveis.

6.7.2.1.4.5 Avaliação da Biodisponibilidade Relativa entre os Medicamentos Teste e Referência

A avaliação da biodisponibilidade relativa entre os medicamentos Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline (referência) e Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP (teste), consistiu no estudo comparativo entre as biodisponibilidades dos dois produtos avaliadas sob condições padronizadas.

Este estudo empregou parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de absorção dos fármacos a partir da forma farmacêutica comprimido, produzida de maneira distinta em cada um dos medicamentos avaliados. A determinação da biodisponibilidade relativa consiste em um estudo de alta complexidade, que foi particularmente aumentada, devido a presença de dois fármacos contidos em uma mesma forma farmacêutica. O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, foi realizado separadamente para cada fármaco, gerando dados de maneira semelhante a dois estudos distintos.

A quantidade de fármaco absorvida foi determinada por meio do cálculo de dois parâmetros: ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$.

A ASC_{0-t} consiste na concentração plasmática do fármaco em função do tempo sendo representada em um gráfico. A área delimitada por este traçado, pode ser calculada pelo método dos trapezóides. O tempo máximo utilizado consiste no último ponto do gráfico onde é possível calcular a concentração, ou seja, valor de concentração igual ou maior ao limite de quantificação.

A $ASC_{0-\infty}$ consiste na extrapolação da ASC_{0-t} ao tempo infinito. Isto é possível somando-se a ASC_{0-t} o valor da razão entre a última concentração determinada experimentalmente (C_t) e a constante de eliminação (K_{el}) obtida pelo cálculo da inclinação descendente da porção final do gráfico (Eq. 6.1).

$$\text{Eq. 6.1} \quad \text{ASC}_{0-\infty} = \text{ASC}_{0-t} + \text{Ct}/K_{el}$$

Durante o estudo de biodisponibilidade relativa o valor de ASC_{0-t} obtido experimentalmente deve ser igual ou maior a 80% do valor de $\text{ASC}_{0-\infty}$ calculado.

A velocidade de absorção do fármaco foi determinada por meio do cálculo de dois parâmetros: C_{\max} e t_{\max} .

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme critérios estabelecidos pelas resoluções nº 896 (Brasil, 2003b) e nº 898 (Brasil, 2003c), que são descritos de maneira semelhante pelo FDA-USA (United States, 2001) e pela Farmacopéia Americana (United, 1999). Os valores dos parâmetros C_{\max} , ASC_{0-t} e $\text{ASC}_{0-\infty}$, obtidos para cada voluntário, foram transformados para escala logarítmica. Posteriormente foi empregada a análise de variância (ANOVA) dos parâmetros farmacocinéticos C_{\max} , ASC_{0-t} e $\text{ASC}_{0-\infty}$, usando modelos lineares generalizados. Verificou-se inicialmente a presença de efeitos de produto, grupo e/ou período ocasionados pelo delineamento do estudo. Essa ausência de efeitos, ou seja, a igualdade entre os tratamentos, não implica em bioequivalência entre as formulações (Brasil, 2003c).

A biodisponibilidade relativa entre dois produtos foi calculada após a construção do intervalo de confiança de 90% (I.C. 90%). Este intervalo é calculado utilizando a diferença das médias de mínimos quadrados dos parâmetros farmacocinéticos C_{\max} e ASC_{0-t} , após transformação logarítmica e o quadrado médio residual obtido pelo cálculo da ANOVA. Os antilogaritmos dos limites de confiança obtidos constituem o intervalo de confiança de 90% para a razão das médias geométricas entre os produtos teste e referência (Brasil, 2003c). Estes podem ser considerados com igual biodisponibilidade relativa, quando os intervalos de confiança 90% para as razões entre os valores de C_{\max} , e ASC_{0-t} de ambos os produtos, calculados após as transformações logarítmicas, estiverem entre 80 e 125%, conforme apresentado nas Equações 6.2 e 6.3.

$$\text{Eq. 6.2} \quad 80 \leq \frac{\text{ASC (teste)}}{\text{ASC (referência)}} \geq 125\%$$

$$\text{Eq. 6.3} \quad 80 \leq \frac{C_{\max} (\text{teste})}{C_{\max} (\text{referência})} \geq 125\%$$

Durante o presente trabalho o cálculo da análise de variância e do Intervalo de Confiança 90% para os parâmetros farmacocinéticos C_{\max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, antes e após transformação logarítmica foi realizado utilizando os programas SAS (versão 612, 1996, Cary, NC, USA Fabricado pelo SAS Institute Inc.) e Excell. A detecção dos dados discrepantes e não paramétricos foi realizada no SPSS versão 8.0, 1997, fabricado por Spss Inc. (Brasil, 2003c).

6.8 RESULTADOS

6.8.1 AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA ENTRE MEDICAMENTOS TESTE E REFERÊNCIA CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA, APRESENTADOS SOB A FORMA FARMACÊUTICA DE COMPRIMIDOS

Durante os estudos de biodisponibilidade relativa foram coletadas 18 amostras plasmáticas de cada voluntário em cada fase. A concentração de lamivudina e zidovudina contida nestas amostras foi determinada e utilizada para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos empregados na avaliação da biodisponibilidade relativa entre os produtos.

Utilizando-se os valores individuais de concentração plasmática de lamivudina e zidovudina, determinou-se a média referente as determinações oriundas dos 24 voluntários. Os resultados médios de concentração referentes aos produtos teste (FURP

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

– Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) e referência (Biovir® lote B067171) estão contidos nas Tabelas 6.4 e 6.5 para lamivudina e zidovudina respectivamente. As curvas médias (n=24) de concentração plasmática de lamivudina e zidovudina em função do tempo, estão apresentadas nas Figuras 6.2 e 6.3 respectivamente. Ambas as figuras se referem aos produtos teste e referência. Os valores individuais de concentração, bem como as curvas de concentração plasmática em função do tempo relativas a cada voluntário estão disponíveis no Anexo 6.3.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.4 Valores médios de concentração plasmática de lamivudina obtidos após administração do produto referência (Biovir® lote B067171) e do produto teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários.

Tempo (horas)	Concentração plasmática (ng/mL)					
	Produto referência			Produto teste		
	Média	D.P	C.V.(%)	Média	D.P	C.V.(%)
0,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
0,25	267,17	322,10	120,56	331,26	287,55	86,80
0,50	921,27	623,24	67,65	1134,30	634,31	55,92
0,75	1207,70	598,79	49,58	1313,05	539,57	41,09
1,00	1214,21	504,60	41,56	1228,27	463,08	37,70
1,25	1258,69	458,42	36,48	1120,00	426,55	38,26
1,50	1155,12	365,92	31,68	1074,17	335,33	31,22
1,75	1012,05	281,09	27,77	1030,65	359,01	34,83
2,00	919,39	233,72	25,42	967,81	280,09	28,94
2,50	819,58	188,44	22,99	859,50	328,71	36,24
3,00	775,79	221,56	28,56	722,79	253,69	35,10
4,00	578,61	180,39	27,72	515,82	186,69	36,56
6,00	308,84	127,17	41,18	271,36	110,03	40,55
8,00	143,23	101,22	70,67	124,98	110,28	88,24
10,00	81,93	85,27	137,68	62,07	94,74	152,64
12,00	16,10	45,52	282,80	16,50	38,51	233,31
24,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
36,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

* NQ = valores de concentração plasmática inferiores ao limite de quantificação

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.5 Valores médios de concentração plasmática de zidovudina obtidos após administração do produto referência (Biovir® lote B067171) e do produto teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários.

Tempo (horas)	Concentração plasmática (ng/mL)					
	Produto referência			Produto teste		
	Média	D.P	C.V.(%)	Média	D.P	C.V.(%)
0,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
0,25	1130,08	1436,16	127,09	1751,55	1819,93	92,49
0,50	1820,96	1056,00	57,99	1816,78	911,98	50,20
0,75	1383,02	643,92	46,56	1184,10	376,89	32,64
1,00	1010,85	474,04	48,89	932,16	472,22	50,66
1,25	747,60	310,13	41,48	784,28	354,95	45,26
1,50	583,72	197,25	33,79	702,34	517,13	73,63
1,75	497,69	218,79	43,96	499,11	310,32	62,17
2,00	405,65	191,46	47,20	484,50	338,51	74,48
2,50	315,97	239,66	75,13	328,61	286,67	87,24
3,00	231,15	150,57	65,14	222,59	140,73	63,22
4,00	113,82	106,61	93,67	119,03	114,50	96,20
6,00	44,25	76,10	171,96	37,96	71,05	187,15
8,00	18,92	45,18	238,85	12,98	38,01	277,37
10,00	3,97	19,48	489,90	7,57	25,65	338,82
12,00	NQ	NQ	NQ	3,61	17,70	489,90
24,00	NQ	NQ	NQ	4,37	21,42	439,90
36,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

* NQ = valores de concentração plasmática inferiores ao limite de quantificação

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

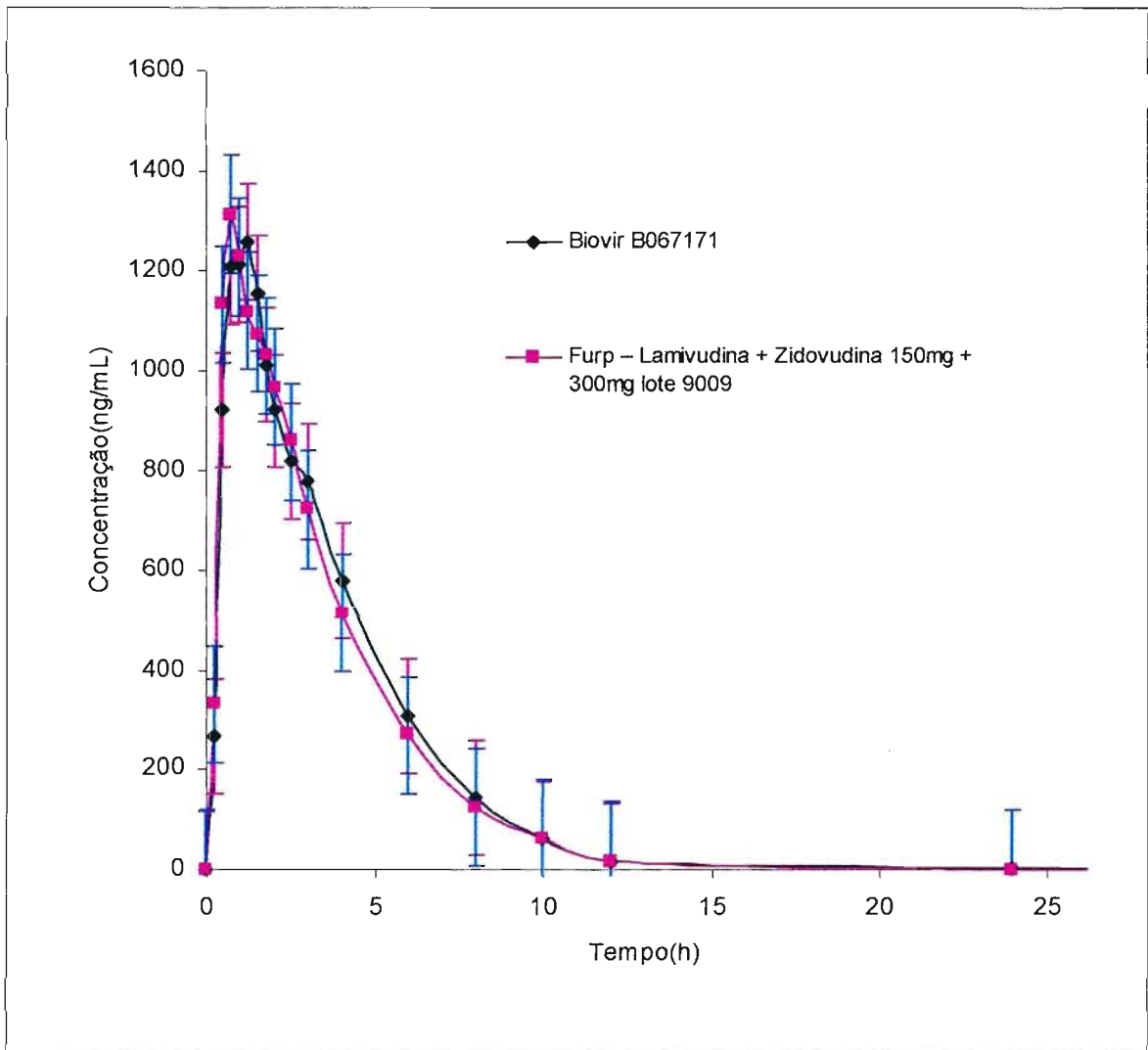


Figura 6.2 Curvas médias de “concentração plasmática de lamivudina *versus* tempo” após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO
DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

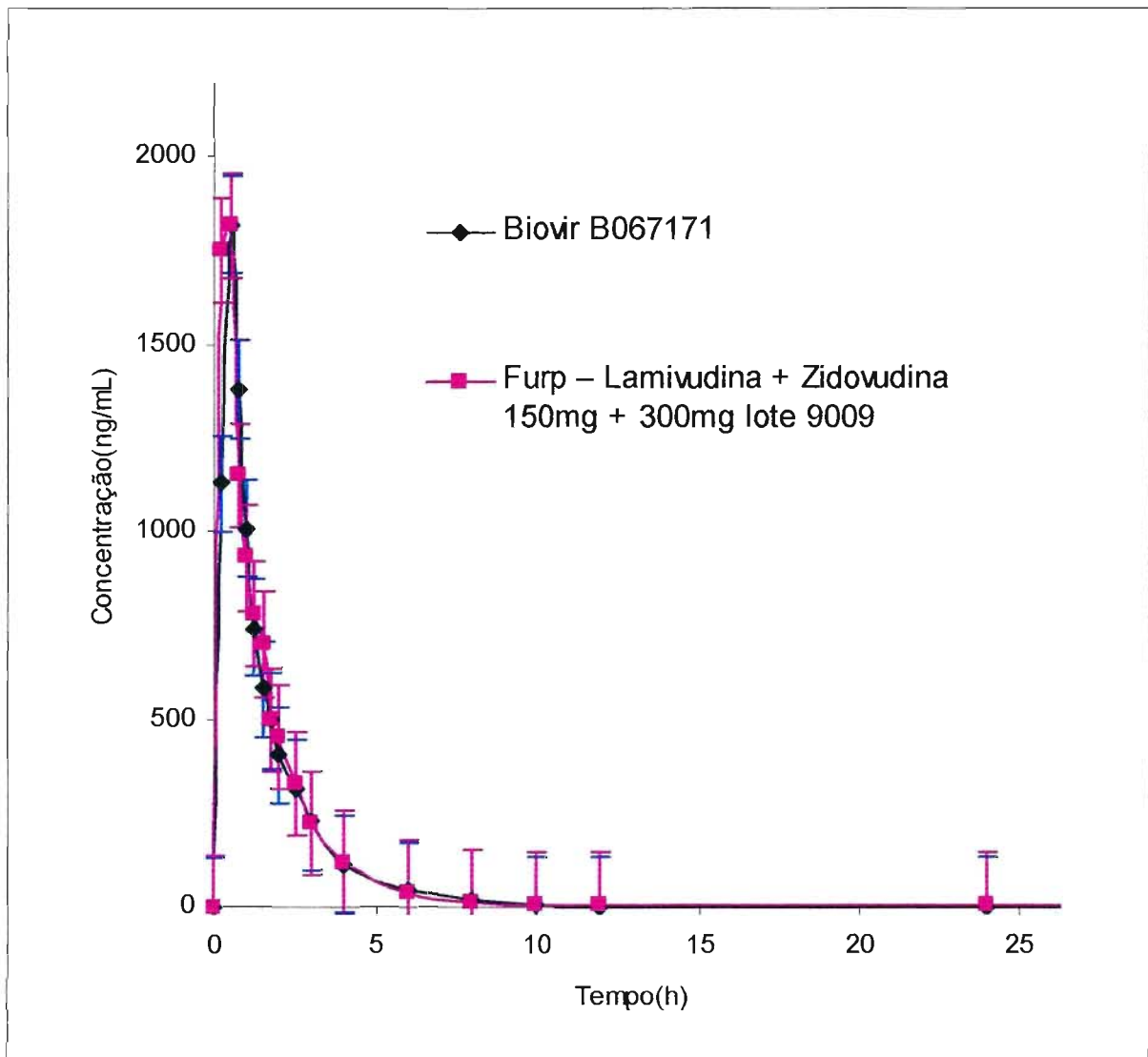


Figura 6.3 Curvas médias de “concentração plasmática de zidovudina *versus* tempo” após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Nas Tabelas 6.6 e 6.7 estão contidos os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos C_{max} , t_{max} , $t_{(1/2)\beta}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, obtidos após administração, respectivamente, dos produtos referência (Biovir[®], lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009), a 24 voluntários sadios.

Tabela 6.6. Valores médios dos parâmetros farmacocinéticos referentes a lamivudina, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir[®] lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. CV = coeficiente de variação, DP = desvio padrão

Produtos		Parâmetros farmacocinéticos				
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	ASC_{0-t} (ng.h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	$T_{(1/2)\beta}$
Referência	Média	1,04	1526,33	4936,10	5305,76	1,99
	D.P.	0,54	431,03	1227,06	1313,97	0,57
	C.V. (%)	51,36	28,24	24,86	24,76	28,41
Teste	Média	0,97	1585,61	4760,07	5069,16	2,00
	D.P.	0,53	416,34	1409,24	1386,52	0,53
	C.V. (%)	54,51	26,26	29,61	27,35	26,53

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.7 Valores médios dos parâmetros farmacocinéticos referentes a zidovudina, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. CV = coeficiente de variação, DP = desvio padrão

Produtos		Parâmetros farmacocinéticos				
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	ASC_{0-t} (ng.h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	$T_{(1/2 \beta)}$
Referência	Média	0,60	2406,56	2341,32	2561,68	1,41
	D.P.	0,40	1139,74	775,00	775,66	0,55
	C.V. (%)	80,86	47,36	33,10	30,28	38,83
Teste	Média	0,55	2652,80	2538,17	2770,21	1,47
	D.P.	0,43	1153,55	919,03	943,22	0,61
	C.V. (%)	77,84	43,48	36,21	34,04	41,68

Para o delineamento do ensaio foram utilizados dois produtos (teste e referência), administrados a 24 voluntários, que foram alocados ao acaso em dois grupos. Durante a etapa clínica cada voluntário recebeu uma dose dos medicamentos teste e referência, sendo os períodos aqui denominados Fase A e B, separadas por um intervalo de 7 dias (wash out). Foram realizados cálculos para verificar a interferência dos produtos, grupos ou períodos e conseqüentemente a adequação do planejamento do estudo que estão apresentados nas Tabelas 6.8 e 6.9.

Tabela 6.8 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica obtidos para lamivudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios

Fonte de Variação	Nível Descritivo (p)		
	$\ln C_{max}$	$\ln ASC_{0-t}$	$\ln ASC_{0-\infty}$
Produto	0,5860	0,2798	0,2400
Grupo	0,1319	0,0861	0,0942
Período	0,3870	0,5653	0,4441

$p > 0,05$: não há efeito

Tabela 6.9 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica obtidos para zidovudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios

Fonte de Variação	Nível Descritivo (p)		
	$\ln C_{max}$	$\ln ASC_{0-t}$	$\ln ASC_{0-\infty}$
Produto	0,3949	0,2646	0,2711
Grupo	0,5370	0,7879	0,8348
Período	0,8942	0,1842	0,2456

$p > 0,05$: não há efeito

Os intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios, são apresentados nas Tabelas 6.10 e 6.11.

CAPÍTULO VI - BIODISPONIBILIDADE RELATIVA: CONCEITOS, PARÂMETROS TÉCNICOS E APLICAÇÃO DO TESTE A COMPRIMIDOS REVESTIDOS CONTENDO LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA

Tabela 6.10 Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) e razões para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos para lamivudina, após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150 mg + 300 mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios.

	ln C_{max}	ln ASC_{0-t}	ln $ASC_{0-\infty}$
IC 90 %	93 – 115%	88 – 103%	88 – 102%
Razão (CV)	103,49% (21,41%)	94,95% (16,31%)	

Tabela 6.11 Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) e razões para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos para zidovudina, após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios.

	Ln C_{max}	ln ASC_{0-t}	ln $ASC_{0-\infty}$
IC 90 %	90 – 141%	97 – 120%	97 – 118%
Razão (CV)	112,51% (49,78%)	107,77% (23,04%)	

Nas tabelas 6.12 e 6.13 estão os valores do poder estatístico dos testes utilizados para determinação dos intervalos de confiança 90% (IC 90%).

Tabela 6.12 Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do IC 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos para lamivudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios.

Parâmetro	Poder estatístico (%)
In C_{max}	93
In ASC_{0-t}	99
In $ASC_{0-\infty}$	100

Tabela 6.13 Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do IC 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos para zidovudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios.

Parâmetro	Poder estatístico (%)
In C_{max}	NQ
In ASC_{0-t}	92
In $ASC_{0-\infty}$	95

NQ = Não quantificável

6.9 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após cumprirem os requisitos necessários aos testes de equivalência farmacêutica, os produtos Biovir® lote B067171, produzido pela GlaxoSmithKline (referência) e Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg - Lote 9009, produzido pela Fundação para o

Remédio Popular – FURP (teste) foram avaliados no estudo de biodisponibilidade relativa. Ambos os produtos são classificados como equivalentes farmacêuticos, por conterem os mesmos fármacos, na mesma dosagem e na mesma forma farmacêutica. Eles tem sua qualidade assegurada e cumprem as especificações farmacopéicas, entretanto, isto não atesta a intercambialidade entre ambos. A realização do estudo *in vivo* mostra-se necessária para conclusões definitivas sobre a biodisponibilidade relativa ou bioequivalência dos produtos em estudo.

A avaliação da biodisponibilidade relativa dos produtos foi efetuada por meio de um estudo quantitativo, com delineamento aleatório cruzado e aberto. O fato deste tipo de estudo ser realizado em seres humanos, agrega determinada variabilidade aos resultados. A seleção de um grupo homogêneo de voluntários e a padronização das condições experimentais minimizam, mas não eliminam a variabilidade referente ao ensaio de biodisponibilidade relativa (Storpiertis, 1999). O delineamento empregando estudo cruzado, permite administrar a todos os voluntários tanto o produto teste quanto o referência, em duas fases distintas. Isto contribui para diminuir a variabilidade, uma vez que os dois produtos são absorvidos sob as mesmas condições fisiológicas de cada indivíduo (Balthasar, 1999).

As curvas médias de "concentração plasmática em função do tempo" obtidas após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina lote 9009) apresentaram perfis de decaimento plasmático semelhantes. As curvas médias referentes aos dados de concentração plasmática de lamivudina e zidovudina obtidos dos 24 voluntários, durante o período de 36 horas, podem ser visualizadas nas Figuras 6.2 e 6.3, respectivamente.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a lamivudina apresentaram valores de ASC_{0-t} de 4936,10 ng.h/mL e 4760,07 ng.h/mL, $ASC_{0-\infty}$ de 5305,76 ng.h/mL e 5069,16 ng.h/mL; C_{max} de 1526,33 ng/mL e 1585,61 ng/mL e t_{max} 1,04 h e 0,97 h, respectivamente, para os produtos referência e teste. Para a zidovudina os valores

obtidos foram ASC_{0-t} de 2341,32 ng.h/mL e 2538,17 ng.h/mL, $ASC_{0-\infty}$ de 2561,68 ng.h/mL e 2770,21 ng.h/mL e C_{max} de 2406,56 ng/mL e 2652,80 ng/mL e t_{max} 0,60 h e 0,55 h, respectivamente, para os produtos referência e teste. Estes resultados mostraram-se semelhantes aos descritos em outros trabalhos (Moore *et al.*, 1999). Os valores de desvio padrão e coeficiente de variação calculados a partir dos dados obtidos dos 24 voluntários não variaram significativamente para a lamivudina (Tabela 6.6), mas observou-se uma variação mais pronunciada nos resultados referentes a zidovudina (Tabela 6.7).

Estudos realizados por Mentré e colaboradores (1993) demonstraram que a zidovudina apresenta alta variabilidade inter e intra-individual. O método consistiu na quantificação de ZDV e seu metabólito glicuronizado (GZDV), no plasma e na urina de 36 pacientes com AIDS. Foram determinados os valores médios de volume de distribuição (V_d), meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) e *clearance* (CL) no primeiro dia e após 35 dias de tratamento contínuo. Os resultados obtidos foram: V_d 94,4 L (CV 90%) e 112L (CV 139%); $t_{1/2\beta}$ 0,81h (CV 107%) e 0,75h (CV 181%); CL 117 L.h⁻¹ (CV 57%) e 295 L.h⁻¹ (CV 196%). A eficácia a longo prazo dos agentes anti-retrovirais está relacionada à sua capacidade em prevenir o surgimento de infecções oportunistas. Com base nos estudos, os autores puderam concluir que nem as variáveis cinéticas ou clínicas nem a concentração individual da ZDV são capazes de prever a ocorrência de infecções oportunistas (Mentré *et al.*, 1993).

A análise multivariada, realizada por meio da análise de variância (ANOVA), possibilita avaliar a existência de efeitos de período, grupo e produto. A observação de efeito de período ou fase não invalida o estudo de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência, uma vez que a ANOVA verifica a igualdade dos produtos (tratamentos), independentemente da ocorrência dos mesmos. A presença de diferenças estatisticamente significativas entre as fases, não são desejáveis, mas caso ocorram não invalidam o ensaio, desde que as causas sejam devidamente investigadas e justificadas. O efeito de grupo ou seqüência relaciona-se com a ordem em que os produtos são

administrados aos voluntários. Esta observação tem pouca influência na análise dos dados e ocorre em cerca de 10% dos estudos de bioequivalência. Este efeito pode ser ignorado se o estudo aplicou dose única; incluiu apenas voluntários saudáveis e normais; o fármaco não consistiu em uma molécula endógena; foi aplicado adequado período de "wash out" entre as duas fases e o estudo preencheu todos os critérios científicos e estatísticos preconizados (protocolo de ensaio; validação da metodologia analítica; coleta adequada de dados; análise estatística apropriada e intervalos de confiança adequados). O último efeito avaliado é o efeito produto, que consiste em indicar se existe ou não igualdade entre os produtos avaliados. A constatação deste indica que os produtos não são iguais, mas não implica que eles não sejam clinicamente equivalentes. Produtos clinicamente equivalentes devem apresentar resultados dentro do intervalo de confiança de 90% e, assim, estar de acordo com os critérios de biodisponibilidade relativa e bioequivalência (Kano, 2002).

Nas Tabelas 6.8 (3TC) e 6.9 (ZDV) estão os valores do nível descritivo (p) para as variáveis do estudo. Os valores superiores a 0,05 indicaram que não houve diferença significativa entre as duas fases do ensaio, entre os dois grupos de indivíduos alocados ao acaso durante o ensaio e entre os dois produtos em relação aos parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} , e $ASC_{0-\infty}$. Estes resultados comprovaram adequado planejamento e execução da etapa clínica.

Os intervalos de confiança 90% (IC 90%) para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos para lamivudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina lote 9009) a 24 voluntários saudáveis foram, respectivamente, 93% a 115%, 88% a 103% e 88% a 102%. Os intervalos de confiança 90% (IC 90%) para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos para zidovudina após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina lote 9009) a 24 voluntários saudáveis foram, respectivamente, 90% a 141%, 97% a 120% e 97% a 118%.

Segundo a ANVISA (Brasil, 2003b) dois medicamentos são considerados bioequivalentes ou apresentam biodisponibilidade relativa equivalente, quando o intervalo de confiança 90% para as seguintes razões: ASC_{0-t} teste/ ASC_{0-t} referência e C_{max} , teste / C_{max} , referência, entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos dos produtos teste e referência estiverem compreendidos entre 80 a 125%. No caso da lamivudina, observa-se que os intervalos de confiança obtidos para os dois parâmetros farmacocinéticos situam-se dentro dos limites preconizados pela ANVISA (Brasil, 2003b). Em relação à zidovudina, os intervalos de confiança obtidos para o parâmetro ASC_{0-t} situa-se dentro dos limites definidos pela ANVISA. Este parâmetro refere-se à extensão da absorção, ou seja, à quantidade de fármaco absorvida pelo organismo. O mesmo não ocorre em relação ao parâmetro C_{max} , relacionado à velocidade da absorção. Segundo a ANVISA, outros limites de intervalo de confiança de 90% para C_{max} , previamente estabelecidos no protocolo para estudo de bioequivalência, poderão ser aceitos mediante justificativas científicas.

Segundo a FDA, dois produtos podem ser considerados bioequivalentes, desde que os limites para o intervalo de confiança de 90%, obtidos a partir da razão entre as velocidades (C_{max}) e as extensões (ASC) de absorção dos produtos teste e referência, estejam compreendidos entre os limites de -20 a +25%, ou seja, 80 a 125% (United States, 2001).

No caso de medicamentos utilizados de forma crônica, como as associações de lamivudina e zidovudina (Eron *et al.*, 2000), os fatores que determinam sua eficácia e segurança são o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio estacionário e a concentração média do fármaco no estado de equilíbrio estacionário (DiPiro *et al.*, 1996). O tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio estacionário corresponde a cinco vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, a qual não depende da formulação, pois é característica específica de cada fármaco. Assim, o estado de equilíbrio estacionário deverá ser atingido no mesmo intervalo de tempo para produtos com equivalente

extensão de absorção, quando administrados sob o mesmo esquema terapêutico (Shargell & Yu, 1993).

Os resultados do presente estudo demonstraram a alta variabilidade da ZDV em relação ao parâmetro C_{max} , com coeficiente de variação intra-sujeito de 47%. A ANOVA não possibilitou a detecção de efeito produto em relação ao parâmetro C_{max} obtido para a zidovudina, sugerindo que não existe diferença significativa entre os produtos teste e referência para este parâmetro, e a obtenção de IC 90% fora dos limites preconizados deve-se à grande variabilidade observada entre os valores de C_{max} para zidovudina.

Segundo a legislação nacional para estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de produtos contendo fármacos de alta variabilidade, ou seja, com coeficiente de variação intra-individual maior que 30%, pode-se utilizar um delineamento cruzado replicado. Estes delineamentos podem ser com quatro seqüências e dois períodos; com duas seqüências e quatro períodos; com quatro seqüências e quatro períodos e com duas seqüências e três períodos (Brasil, 2003c). Neste tipo de delineamento, os voluntários recebem duas vezes cada um dos produtos, devendo as formulações teste e referência serem do mesmo lote. Embora este tipo de delineamento possa diminuir a variabilidade do ensaio, no caso específico deste estudo ele seria dificilmente aplicável. Um dos fatores que influenciariam significativamente a sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, seria a exposição de voluntários sadios humanos a quatro doses de dois fármacos, ou seja, a absorção de oito doses de agentes anti-retrovirais. Estes tipos de delineamento poderiam ocasionar maior predisposição ao surgimento de efeitos adversos (Aoki *et al.*; 1999). É importante ressaltar também que estes delineamentos não proporcionam garantias de que a variabilidade seria minimizada a ponto de tornar possível o cálculo do poder do teste estatístico. Alguns autores consideram que o modelo de absorção de primeira ordem convencional não é adequado para avaliar os dados referentes à ZDV. Um modelo de absorção mais complexo, considerando duas fases de absorção já foi empregado,

sugerindo que a ZDV pode ter dois sítios distintos de absorção com velocidades diferentes ou ainda que algum mecanismo de transporte ativo possa estar envolvido (Mentré *et al.*, 1999).

A EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, 2000) agência europeia reguladora para medicamentos, sugere que em certos casos, seria possível ampliar os limites do IC 90% para 75 a 133% referentes ao parâmetro farmacocinético C_{max} . Isto é possível desde que os produtos atendam aos seguintes requisitos: não possuam estreita janela terapêutica ou margem de segurança ou não sejam indicados para patologias severas, onde é de suma importância uma resposta terapêutica segura, além da proposição prévia, pelo pesquisador, de tais limites no protocolo de estudo.

No Canadá estão sendo realizados estudos e discussões sobre os requisitos necessários aos testes de bioequivalência de fármacos críticos. Estes são caracterizados pelas significativas alterações na concentração plasmática do fármaco quando ocorre pequena alteração na dose administrada. Isto pode acarretar ineficácia terapêutica ou mesmo reações adversas graves, persistentes ou irreversíveis durante o uso. A zidovudina está incluída neste grupo, onde os requisitos para análise dos parâmetros farmacocinéticos obtidos de estudos de bioequivalência são mais restritivos. O intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t} deve estar compreendido dentro dos limites de 90 a 112% e para C_{max} entre 80 e 125%, sendo que os resultados encontrados devem ser semelhantes quando os medicamentos são administrados na presença e na ausência de alimentos (Health Canada, 2002).

A determinação da concentração plasmática máxima (C_{max}) pode causar significativo impacto no cálculo do intervalo de confiança dos estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência. Para determinar corretamente o C_{max} é necessário que os valores de concentração imediatamente anteriores e posteriores sejam menores que a

concentração de C_{max} . Quando a concentração plasmática da primeira amostra coletada (tempo de 0 a 15 minutos) corresponde ao C_{max} ela pode comprometer a habilidade do estudo em determinar o verdadeiro C_{max} . O impacto desta observação no poder e na exatidão do teste para IC90% de C_{max} pode ser ainda mais significativo quando ocorrer em grande número de indivíduos ou o fármaco em estudo apresentar alta variabilidade (Jackson *et al.*, 2000). Durante a determinação de C_{max} para a ZDV, referente aos 24 voluntários, observou-se que este parâmetro foi determinado na primeira amostra coletada em 7 voluntários para o produto referência e 9 para o produto teste conforme pode ser observado na Tabela contida no anexo 6.4. Jackson e colaboradores (2000) sugerem que um dos artifícios para diminuir a influência destes valores de C_{max} no estudo de biodisponibilidade relativa seria a retirada dos dados referentes a estes indivíduos. Isto é aplicável quando a variabilidade intra-individual para a constante de absorção (K_a) e o *clearance* forem menores ou iguais a 20%. Neste tipo de estudo, o número de voluntários (N) influi significativamente nos resultados. A análise de dados utilizando um "N" menor pode ocasionar diminuição ainda maior no poder do teste. No caso específico da ZDV os autores consideraram possível um aumento dos limites para o IC 90% quando são incluídos os dados de voluntários cujo valor de C_{max} corresponde a concentração do fármaco no primeiro tempo de coleta plasmática (Jackson *et al.*, 2000).

A variabilidade de parâmetros farmacocinéticos, inerentes à ZDV esta sendo bastante estudada. Autores correlacionaram peso e área corporal com a concentração plasmática, o *clearance* e o volume de distribuição aparente após administração oral de ZDV. Durante o estudo era esperada uma correlação entre peso corpóreo e volume de distribuição, uma vez que a ZDV pode ser considerada como um fármaco lipossolúvel e com ampla distribuição pelos tecidos. Os resultados obtidos demonstraram que devido ao significativo metabolismo hepático, as concentrações plasmáticas de ZDV podem ser melhor relacionadas com a capacidade metabólica do que com o peso corpóreo (Sahai *et al.*, 1994). A velocidade de glicuronidação hepática da ZDV segue uma cinética de primeira ordem, semelhante ao que ocorre com a morfina e o etinilestradiol. Um estudo avaliando a atividade enzimática da glicuronosiltransferase sob a ZDV, em 93 fígados

humanos, pôde concluir que existe alta variabilidade na velocidade de glicuronidação da ZDV e que este fenômeno pode modular a concentração de fármaco ativo no plasma (Pacifi *et al.*, 1996). Os autores sugerem ainda que é desnecessária a individualização da dose para indivíduos cujo peso corpóreo está dentro dos limites de $\pm 20\%$ do peso ideal (Sahai *et al.*, 1994). A variação de peso corpóreo aceitável para voluntários participantes dos estudos de biodisponibilidade relativa é de $\pm 15\%$ (Brasil, 2003b), portanto este parâmetro pode ser excluído como fonte considerável de variabilidade para o estudo.

6.10 CONCLUSÃO

Os produtos Biovir® lote B067171 e FURP - Lamivudina + Zidovudina lote L 9009 apresentaram resultados dos parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} referentes a lamivudina de acordo com os requisitos de biodisponibilidade relativa estabelecidos pela ANVISA (Brasil, 2003a).

Os produtos Biovir® lote B067171 e FURP - Lamivudina + Zidovudina lote L 9009 apresentaram resultados dos parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ referentes a zidovudina de acordo com os requisitos de biodisponibilidade relativa estabelecidos pela ANVISA (Brasil, 2003a), porém os resultados referentes a C_{max} apresentaram-se fora dos limites especificados.

Os resultados do estudo puderam caracterizar a alta variabilidade do fármaco zidovudina que apresentou um valor de coeficiente de variação para C_{max} superior a 30%.

As características farmacocinéticas da zidovudina são bastante estudadas, porém este volume de trabalhos ainda não possibilita conclusões definitivas. O conhecimento exato do mecanismo de absorção da zidovudina e de modelos matemáticos que possibilitem o cálculo da quantidade de fármaco que é inativada antes da absorção poderiam contribuir significativamente para os estudos *in vivo* que comparam produtos contendo zidovudina.

A estimativa do poder do teste e do número de voluntários necessários ao estudo de biodisponibilidade relativa, também poderia ser auxiliada por esses resultados.

Devido à relevância clínica e terapêutica da utilização de zidovudina no tratamento de portadores do HIV, justifica-se uma intensificação de estudos relativos a este fármaco.

6.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E.P.; PAGE, L.M.; FLETCHER, C.V. Clinical pharmacokinetics of zidovudine. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.30, n.4, p.251-262, 1996.

ARANCÍBIA, A. Calidad biofarmacêutica: estudos "in vivo" e "in vitro". *Acta Farm. Bonaerense*, La Plata, v.10, n.2, p.123-133, 1991.

AOKI, F.Y. Infecções virais. In: PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFAMAN, B.B. *Farmacologia Integrada*. São Paulo: Manole, 1999. P. 445-460.

AULTON, M.E., ed. *Pharmaceutics: the science of dosage form design*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996. 734p.

BALTHASAR, J.P. Bioequivalence and bioequivalency testing. *Am. J. Pharm. Educ.*, Bethesda, v.63, p.194-198, 1999.

BENET, L.Z. Understanding bioequivalence testing. *Transplant. Proc.*, New York, v.31, n.3A, suppl.S, p.7S-9S, 1999.

BLUM, M.R.; LIAO, S.H.T.; GOOD, S.S.; MIRANDA, P. Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. *Am. J. Med.*, Orlando, v.85, suppl.2A, p.189-194, 1988.

BOIS, F.Y.; TOZER, T.N.; HAUCK, W.W.; CHEN, M.L.; PATNAIK, R.; WILLIAMS, R.L. Bioequivalence: performance of several measures of extent of absorption. *Pharm. Res.*, Norwell, v.11, n.5, p.715-722, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Dados e Pesquisas. Documentos e Publicações. Boletim epidemiológico Aids DST. Editorial. Disponível em <http://www.aids.gov.br/sitebol/inferior.htm>. Acesso em: 01 jul. 2002a.

BRASIL. Resolução RDC n.894, de 29 de maio de 2003. "Guia para protocolo e relatório técnico de estudos de bioequivalência". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003a.

BRASIL. Resolução RDC n.896, de 29 de maio de 2003. "Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003b.

BRASIL. Resolução RDC n.898, de 29 de maio de 2003. "Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003c.

BRASIL. Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. via Internet, no endereço eletrônico. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 10 jun 2003d.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.36, n.1, p.13-21, 2000.

DIPIRO, J.T., BLOUIN, R.A., PRUEMER, J.M., SPRUILL, W.J. Concepts in Clinical Pharmacokinetics. 3rd edition. American Society of Health System Pharmacists, Bethesda, 1996. 322p.

ERON, J.J.; YETZER, E.S.; RUANE, P.J.; BECKER, S.; SAWYERR, G.A.; FISHER, R.L.; TOLSON, J.M.; SHAEFER, M.S. Efficacy, safety and adherence with a twice-daily combination lamivudine/zidovudine tablet formulation, plus a protease inhibitor, in HIV infection. *AIDS*, New York, v.14, n.6, p.671-681, 2000.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Proprietary Medicinal Products. *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. London: EMEA, 2000. 18p.

GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 406p.

HEALTH CANADA. Bioequivalence Requirements: Critical Dosage Drugs (Discussion paper). *Therapeutic Products Directorate*. 5p. 2002. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut>. Acesso em: 10 ab 2003.

HOETELMANS, R.M.W.; PROFIJT, M.; MENNHORST, P.L.; MULDER, J.W.; BEIJNEN, J.H. Quantitative determination of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (lamivudine) in human plasma, saliva and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.713, n.2, p.387-394, 1998.

JACKSON, A.J.; CONNER, D.P.; MILLER, R. First measured plasma concentration value as C_{max} ; impact on the C_{max} confidence interval in bioequivalence studies. *Biopharm. Drug Dispos.*, Bognor Regis, v.21, p.139-146, 2000.

JOHNSON, M.A.; VERPOOTEN, G.A.; DANIEL, M.J. Single-dose pharmacokinetics of lamivudine in subjects with impaired renal function and effect of haemodialysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Oxford, v.46, p.21-27, 1999.

KANO, E.K. *Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: estudos in vitro e in vivo (bioequivalência)*. São Paulo, 2002. 233p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KNOBEN, J.E.; SCOTT, G.R.; TONELLI, R.J. An overview of the FDA publication approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Bethesda, v.47, n.12, p.2696-2700, 1990.

MENTRÉ, F.; ESCOLANO, S.; DIQUET, B.; GOLMARD, J.L.; MALLET, A. Clinical pharmacokinetics of zidovudine: inter and intraindividual variability and relationship to long term efficacy and toxicity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Heidelberg, v.45, p.397-407, 1993.

MEREDITH, P. Generic drugs: therapeutics equivalence. *Drug Saf.*, Auckland, v.15, n.4, p.233-242, 1996.

MIDHA, K.K.; RAWSON, M.J.; HUBBARD, J.W. Bioequivalence: switchability and scaling. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.6, p.81-91, 1998.

MOORE, K.H.P.; SHAW, S.; LAURENT, A.L.; LLOYD, P.; DUNCAN, B.; MORRIS, D.M.; O'MARA, M.J.; PAKES, G.E. Lamivudine/zidovudine as a combined formulation tablet: bioequivalence compared with lamivudine and zidovudine administered concurrently and the effect of food on absorption. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.39, p.593-605, 1999.

MORAES, M.E.A.; MORAES, O.M. Ensaios clínicos de medicamentos no Brasil. *Farmacos Med.*, São Paulo, v.5, p.36-40, 2000.

PACIFICI, G.M.; EVANGELISTI, L.; GIULIANI, L.; METELLI, R.M.; GIORDANI, R. Zidovudine glucuronidation in human liver: interindividual variability. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, Deisenhofen-Muenchen, v.34, n.8, p.329-334, 1996.

PASBT, G.; JAEGER, H., Review of methods and criteria for the evaluation of bioequivalence studies. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Heidelberg, v.38, p.5-10, 1990.

SAHAI, J.; GALLICANO, K.; ORMSBY, E.; GARBER, G.; CAMERON, D.W. Relationship between body weight, body surface area and serum zidovudine pharmacokinetic parameters in adult, amle HIV-infected patients. *AIDS*, New York, v.8, p.793-796, 1994.

SERRA, C.H.R. *Avaliação biofarmacotécnica de comprimidos contendo cefalexina: cinética de dissolução e bioequivalência*. São Paulo, 1998. 206p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 3.ed. London: Prentice Hall, 1993. 626p.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.31, n.2, p.63-70, 1995.

STORPIRTIS, S. *Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos*. São Paulo, 1999. 72p. [Apostila].

UNITED STATES. National Archives and Records Administration. Office of the Federal Register. *Code of Federal Regulations: Title 21: Part 320: Bioavailability and bioequivalence requirements*. Washington: US Government Printing Office, 2001. 26p.

UNITED States Pharmacopeia: USP 24; The National Formulary: NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. 2569p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations,. Thirty-fourth report. Geneva, World Health Organization . 1996, Annex 9 (WHO Technical Report Series, No. 863) 44p.

6.12 ANEXOS

ANEXO 6.1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 139/2003

São Paulo, 25 de novembro de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Jacqueline de Souza Azevedo

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de novembro passado, **APROVOU** as alterações do projeto "Avaliação de Bioequivalência de comprimidos contendo Lamivudina 150mg e Zidovudina 300mg dos Laboratórios Furp e Glaxo-Smithkline" (Protocolo nº 123) apresentado por Vossa Senhoria, que passou a ter o título de: "**Avaliação da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg dos Laboratórios Furp e Glaxo-Smithkline**".

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Silvia Storpirts
FBF

ANEXO 6.2

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO
(Pesquisa Científica em Seres Humanos – Resolução CNS 196/96 e 251/97)

1. IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Nome: _____ Sexo: _____
 Identidade: _____ Nascimento: ___/___/_____
 Endereço: _____
 Telefone: () _____

2. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE COMPRIMIDOS CONTENDO LAMIVUDINA 150 mg E ZIDOVUDINA 300 mg DOS LABORATÓRIOS FURP e GLAXO- SMITHKLINE .

Pesquisadores envolvidos:

Profa. Dra. Sílvia Storpirtis (Orientadora/Coordenadora); Profa. Dra. Valentina Porta; Msc. Jacqueline de Souza e Dr. Raimundo Saraiva de Oliveira Neto

Avaliação de risco: risco mínimo

3. INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO

Descrição resumida da projeto (esclarecer o voluntário sobre a finalidade da pesquisa): Este estudo pretende comparar dois tipos de comprimidos contendo uma associação de lamivudina e zidovudina, produzidos por duas indústrias diferentes. Ambos são agentes anti-retrovirais, indicados para o tratamento de indivíduos com AIDS.

Importância do Estudo (esclarecer ao voluntário porque o estudo deve ser realizado dessa forma): Para avaliar se dois medicamentos vão se comportar da mesma maneira no organismo humano e se eles poderão ser substituídos um pelo outro estes medicamentos devem ser genéricos. Este estudo torna possível verificar se os medicamentos testados são ou não genéricos.

Procedimentos (esclarecer o voluntário sobre o quê vai ser feito): para ser incluído no estudo, você será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com coleta de uma amostra de sangue e uma de urina. Na véspera do estudo você deverá chegar a Clínica Paris & Paris Medicina do Futuro S/C Ltda, Rua Icem, n.48 Tatuapé, São Paulo) às 19:00 horas e permanecerá internado até o dia seguinte. Você não poderá levar nenhum tipo de alimento para o hospital pois, a partir do momento da internação, você receberá dieta padronizada. Após jejum de 12 horas, ou seja, às 8:00h tomará um dos produtos com água. Para avaliar a absorção do fármaco pelo organismo serão realizadas coletas de 8 mL de sangue. Essas coletas serão feitas nos tempos 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 24 e 36 horas, após a administração do medicamento. O volume total de sangue coletado será de 144 mL em cada etapa. Além disso, o jejum deverá ser mantido até quatro horas depois de tomar o medicamento. Este procedimento será repetido por mais uma vez, com o outro produto, com intervalo de cinco a seis dias. Para evitar que sua veia seja perfurada muitas vezes, será colocado um sistema apropriado para a retirada de sangue.

Ocorrência de efeitos indesejáveis (esclarecer os voluntários sobre possíveis efeitos indesejáveis associados ao ensaio): O medicamento contendo a associação de lamivudina mais zidovudina é usado para o tratamento da AIDS e já é comercializado mundialmente. Sua utilização é aprovada em países da Europa, nos E.U.A. e no Brasil pelo Ministério da Saúde. A lamivudina geralmente é bem tolerada. A zidovudina apresenta maior probabilidade de ocasionar efeitos adversos. Os efeitos adversos que ocorrem com maior frequência são dor de cabeça, náusea e mal estar/cansaço. Em pacientes sem os sintomas da doença ou quase assintomáticos, especialmente aqueles que recebem as doses diárias reduzidas, os efeitos adversos são pouco comuns.

O principal efeito adverso relatado pelo uso de zidovudina é a diminuição da atividade da medula óssea (mielossupressão) o que pode levar a anemia, após o uso contínuo do medicamento. Este efeito é mais comum em pacientes com AIDS em estágio avançado e que utilizam o medicamento em doses múltiplas. Porém, como a administração será de dose única composta de 150mg de lamivudina e 300mg de zidovudina o aparecimento de efeito adverso é pouco provável. Entretanto, os fármacos devem ser utilizados com cautela por portadores de insuficiência renal. Durante as coletas de sangue algumas pessoas podem sentir fraqueza e até mesmo desmaiar por causa da picada. Também podem surgir hematomas e dor no local da picada. Entretanto, esses efeitos são passageiros e não são graves. A coleta de amostras será acompanhada por um médico que poderá atendê-lo no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

Benefícios esperados: Alguns tipos de remédio não necessitam de ensaios em seres humanos para verificar se agem da mesma forma no organismo e se podem ser substituídos entre si. Entretanto, conforme os critérios estabelecidos na Resolução 84/2002 do Ministério da Saúde, este não é o caso da associação contendo lamivudina e zidovudina. Os resultados deste estudo serão utilizados para registro de medicamento genérico de lamivudina + zidovudina. Assim, embora não exista nenhum benefício direto aos voluntários por sua participação no estudo aqui descrito, o mesmo trará benefícios indiscutíveis aos pacientes com AIDS. Estes terão acesso a medicamentos genéricos que são mais baratos que os de marca e assim poderão ter mais condições de manter um tratamento adequado. Este estudo possui grande importância, pois a AIDS é uma doença que ainda não tem cura e o uso correto de medicamentos de qualidade para o tratamento é essencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Métodos alternativos existentes: Atualmente, não existem outros métodos que possam ser aplicados em estudos desse tipo.

Forma de acompanhamento e assistência: O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer esclarecimentos nos telefones 3039 9283 ou 3091 3623 (Profa. Dra. Sílvia Storpirtis) 3091 3623 ou 3091 2217 (Profa. Dra. Valentina Porta; Msc. Jacqueline De Souza Azevedo) e 293-9830 (Dr. Raimundo Saraiva de Oliveira Neto).

Garantia de sigilo: Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e que os dados particulares são confidenciais.

Ressarcimento de despesas: Cada voluntário receberá R\$ 300,00 (trezentos reais) como forma de ressarcimento das despesas decorrentes de sua participação na pesquisa.

Indenização (Seguro): Durante um período de 1 ano, a partir da data de início do estudo clínico, os voluntários estarão sob cobertura de um Seguro Médico de Responsabilidade Civil e Profissional feito pelos médicos investigadores com a Rural Seguradora (apólice N° 02513097-0001), a qual garante uma maior segurança para os voluntários. Na ocorrência de um evento adverso sério com um voluntário durante o período do estudo clínico, o voluntário será prontamente atendido pela equipe responsável; esta informação

será passada imediatamente a todos os setores envolvidos (Coordenador Médico, Monitor responsável do Patrocinador, CEP, CONEP e ANVISA). A responsabilidade pela conduta será do Coordenador Médico e seus Médicos Investigadores; o custeio de todos os procedimentos envolvidos será de responsabilidade do Patrocinador.

Outros esclarecimentos: Você terá garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir, em qualquer etapa do estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

4. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter sido devidamente informado sobre a justificativa e objetivos da pesquisa e os procedimentos a que serei submetido, e receber a garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e espontânea vontade, em participar da pesquisa “Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg dos laboratórios FURP e GLAXO SMITHKLINE”.

Voluntário

Pesquisador

Testemunha 1

Testemunha 2

ANEXO 6.3

Tabela 6.3.1. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 1

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	201,91	280,10	685,09	1196,44
0,50	723,89	1223,08	3207,58	3802,84
0,75	1405,80	1117,36	1942,46	1503,28
1,00	1527,59	991,84	890,02	850,33
1,25	1740,68	1126,61	717,45	657,05
1,50	1561,40	988,25	65,50	451,09
1,75	1232,57	923,38	421,15	353,84
2,00	1293,17	1207,66	334,49	334,32
2,50	848,39	1001,02	190,47	192,45
3,00	1229,92	1066,54	186,70	155,52
4,00	906,32	883,21	0,00	91,49
6,00	473,98	649,64	0,00	0,00
8,00	493,55	449,97	0,00	0,00
10,0	406,04	306,31	0,00	0,00
12,0	90,94	178,34	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

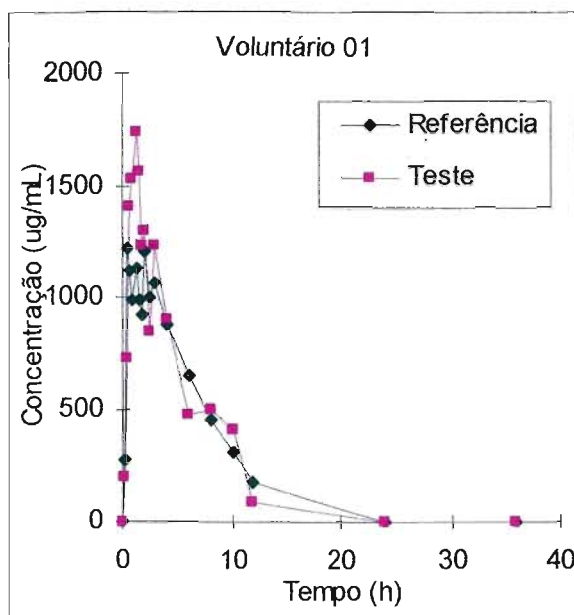


Figura 6.3.1. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 1.

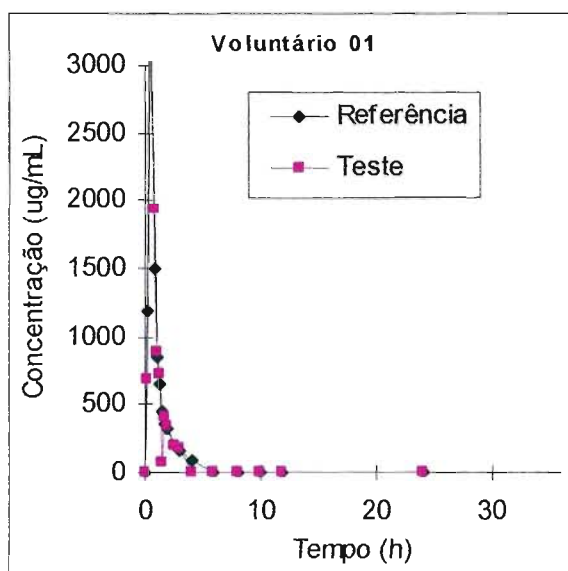


Figura 6.3.2. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 1.

Tabela 6.3.2. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 2

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,00	173,38	1447,13	1965,09
0,50	1013,95	1144,83	2747,66	2852,51
0,75	1642,84	1323,99	1289,88	1872,11
1,00	1453,10	1599,69	1088,45	1574,99
1,25	969,62	1710,80	1084,46	1176,54
1,50	1312,33	1665,46	726,13	839,35
1,75	1560,66	1586,49	541,46	723,78
2,00	1152,81	1253,21	512,32	523,87
2,50	971,69	1181,96	322,00	324,38
3,00	844,88	940,64	285,68	310,32
4,00	569,01	601,19	176,07	176,26
6,00	215,24	279,69	113,70	113,39
8,00	129,77	156,35	0,00	88,48
10,0	83,87	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

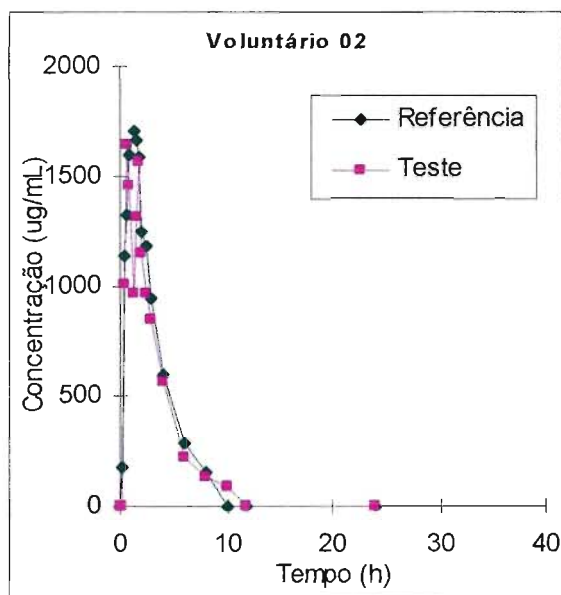


Figura 6.3.3. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 2.

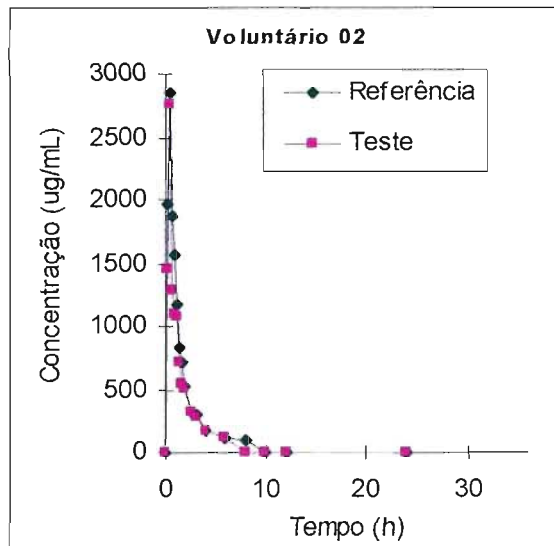


Figura 6.3.4. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 2.

Tabela 6.3.3. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 3

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,00	0,00	0,00	147,05
0,50	0,00	107,62	119,50	723,26
0,75	93,99	324,26	933,23	1895,76
1,00	426,31	527,87	2697,22	1753,68
1,25	435,58	752,77	1802,01	1514,55
1,50	436,67	926,94	1468,65	1047,41
1,75	208,85	809,42	189,35	793,91
2,00	425,79	775,91	900,89	606,16
2,50	363,41	642,58	646,89	415,48
3,00	392,97	514,50	429,92	289,59
4,00	313,96	583,56	213,70	147,95
6,00	123,29	317,68	103,12	0,00
8,00	0,00	121,85	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

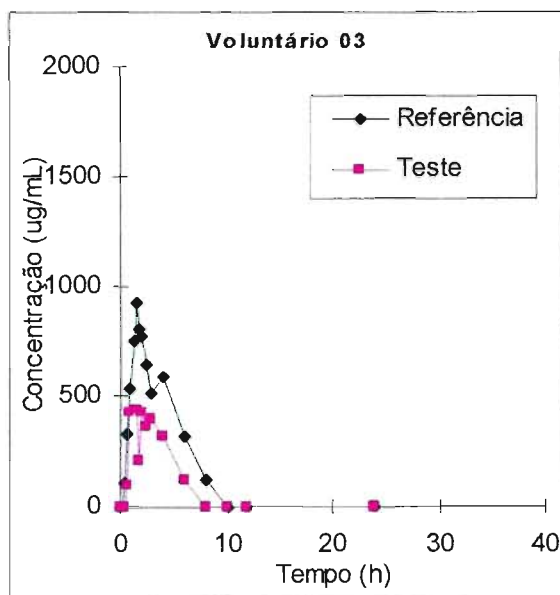


Figura 6.3.5. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 3.

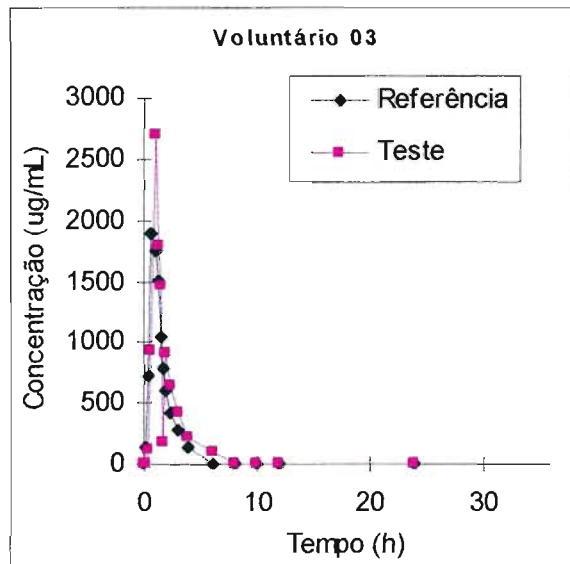


Figura 6.3.6. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 3.

Tabela 6.3.4. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 4

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	97,14	0,00	501,64	0,00
0,75	325,00	0,00	762,44	0,00
1,00	359,81	0,00	507,39	0,00
1,25	344,24	93,48	683,05	157,50
1,50	1017,11	302,25	2602,65	431,47
1,75	1730,56	523,40	1402,90	1158,61
2,00	1344,14	590,52	770,77	987,53
2,50	1018,87	1069,40	463,21	1231,34
3,00	751,49	1448,52	300,92	550,56
4,00	539,82	731,59	136,30	199,47
6,00	247,96	386,07	0,00	0,00
8,00	85,10	167,62	0,00	0,00
10,0	0,00	115,46	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

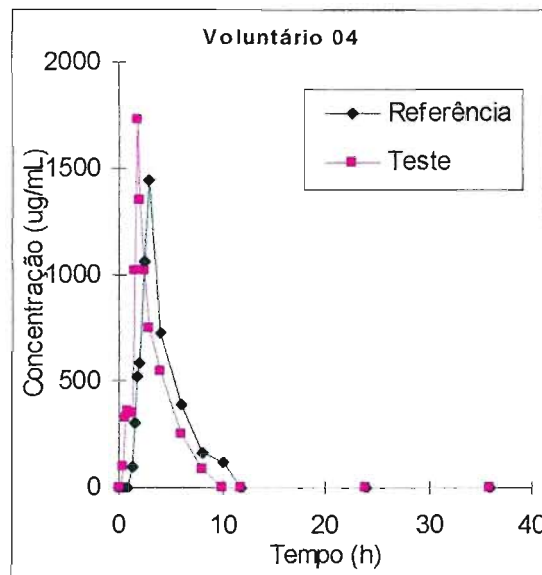


Figura 6.3.7. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 4.

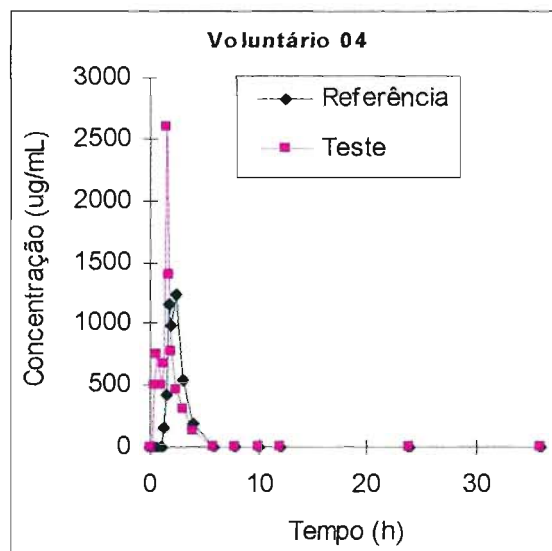


Figura 6.3.8. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 4.

Tabela 6.3.5. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 5

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	673,93	466,83	4210,98	1987,92
0,50	1939,40	1746,30	3294,76	2121,44
0,75	1878,53	1690,87	1738,22	1319,92
1,00	1770,37	1497,45	1127,35	950,89
1,25	1353,87	1519,52	1020,37	678,91
1,50	996,93	1435,15	595,89	430,60
1,75	915,17	1156,29	605,88	280,18
2,00	961,53	1181,95	559,62	265,87
2,50	1089,95	1122,39	299,10	177,09
3,00	807,65	965,25	203,12	108,22
4,00	460,03	618,51	98,81	0,00
6,00	222,73	278,95	0,00	0,00
8,00	86,65	102,12	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

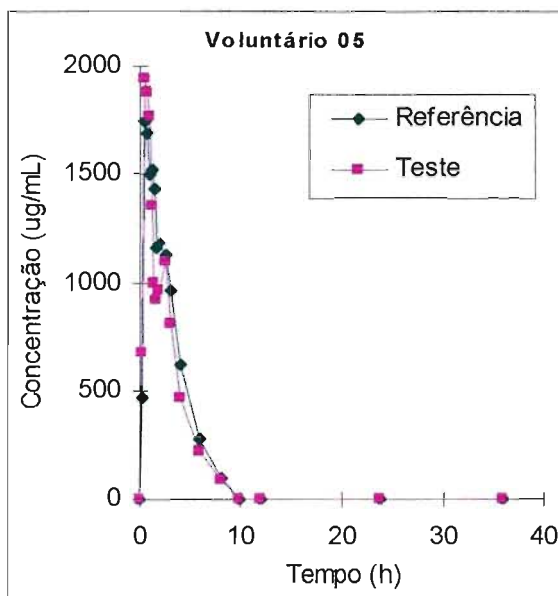


Figura 6.3.9. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 5.

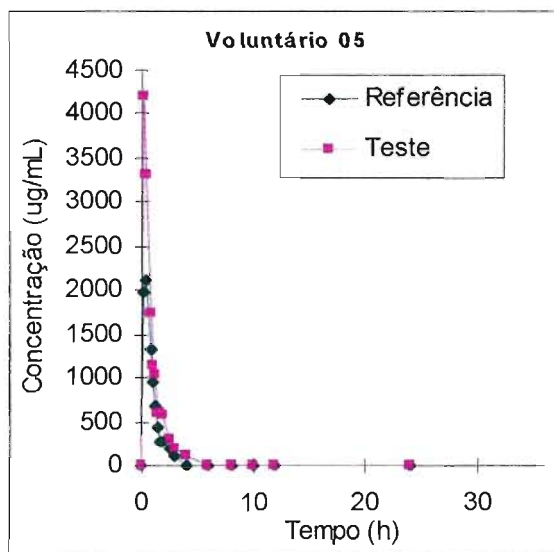


Figura 6.3.10. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 5.

Tabela 6.3.6. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 6

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	119,21	760,79	683,72	4769,51
0,50	624,32	1725,16	1475,95	2627,12
0,75	906,33	1450,72	1173,51	1537,83
1,00	1328,46	957,89	1092,28	1148,86
1,25	1438,90	775,13	950,80	863,36
1,50	1504,31	721,07	699,50	572,19
1,75	1321,70	627,46	472,88	512,82
2,00	1192,58	596,70	392,00	394,79
2,50	844,31	613,08	338,93	284,78
3,00	657,80	578,42	229,51	159,78
4,00	336,87	314,55	102,11	86,51
6,00	140,57	191,83	0,00	191,06
8,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

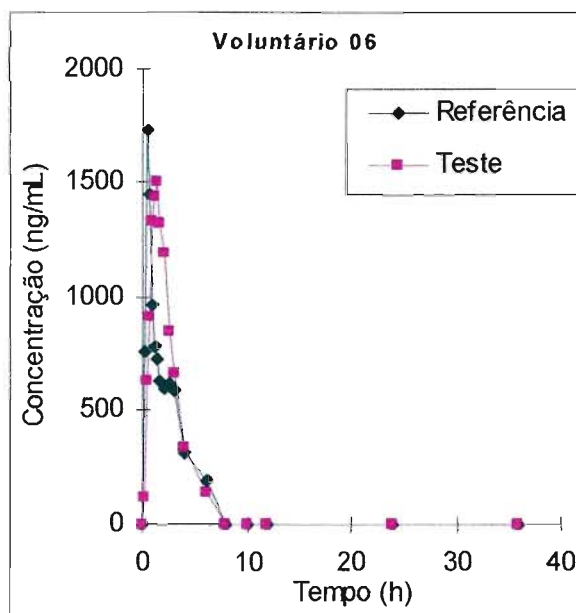


Figura 6.3.11. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 6.

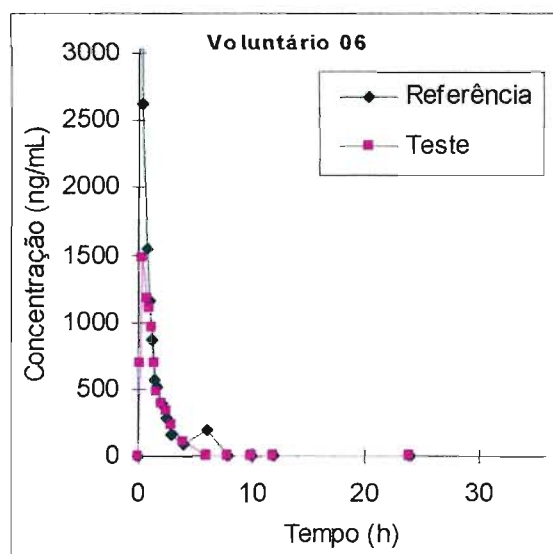


Figura 6.3.12. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 6.

Tabela 6.3.7. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 7

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	591,57	0,00	4955,90	0,00
0,50	1900,13	0,00	1336,54	215,54
0,75	1893,72	358,35	905,26	724,91
1,00	1341,53	1132,07	377,62	650,69
1,25	1079,68	1049,98	534,96	487,38
1,50	912,49	1108,97	468,14	455,43
1,75	776,75	868,05	311,55	322,05
2,00	702,45	771,23	225,61	299,15
2,50	618,31	689,29	187,06	285,72
3,00	585,96	781,69	177,76	296,65
4,00	347,55	595,51	93,45	182,87
6,00	124,14	271,82	0,00	0,00
8,00	0,00	104,53	0,00	84,68
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

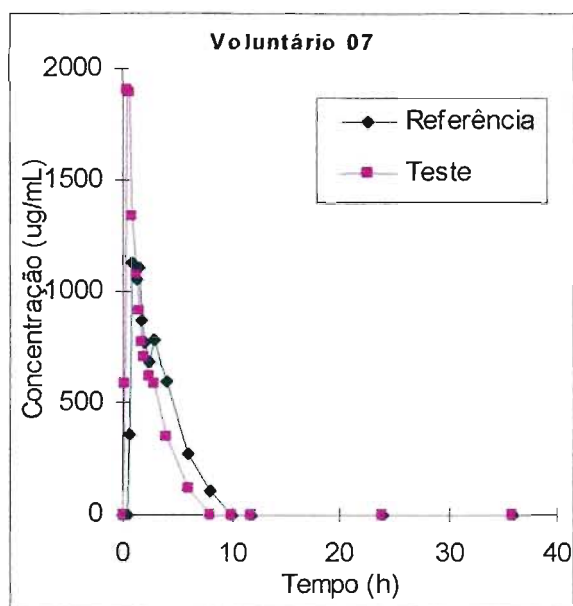


Figura 6.3.13. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 7.

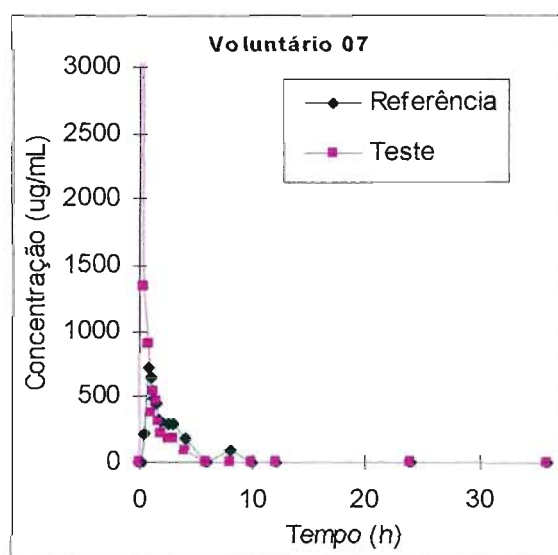


Figura 6.3.14. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 7.

Tabela 6.3.8. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 8

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	111,97	81,51	440,27	224,81
0,50	713,41	541,90	1305,67	843,59
0,75	1233,03	819,44	700,26	491,75
1,00	1273,26	871,47	714,50	325,63
1,25	1527,39	1082,76	758,57	590,92
1,50	1662,50	1523,20	679,34	851,44
1,75	1758,82	1203,38	547,40	342,85
2,00	1537,84	1146,05	359,92	264,65
2,50	1153,85	942,84	255,78	196,13
3,00	873,15	946,01	147,22	185,35
4,00	636,66	565,68	0,00	0,00
6,00	273,91	318,77	0,00	0,00
8,00	169,35	152,68	0,00	0,00
10,0	123,31	137,25	0,00	0,00
12,0	84,88	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

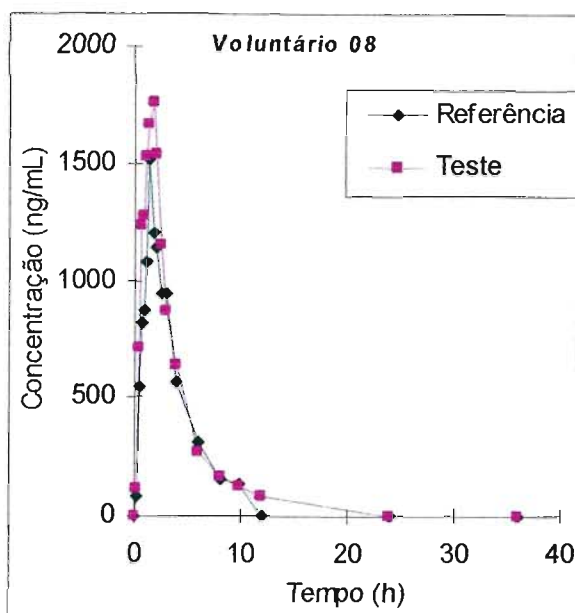


Figura 6.3.15. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 8.

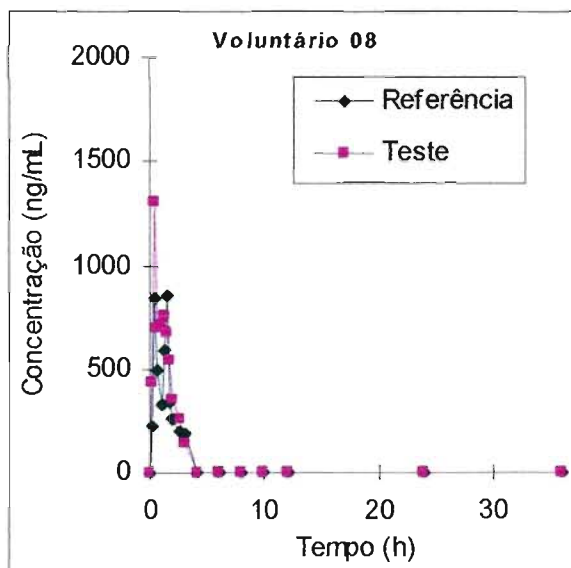


Figura 6.3.16. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 8.

Tabela 6.3.9. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 9

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	427,06	0,00	4491,05	213,80
0,50	1299,02	882,21	2074,57	2477,27
0,75	1504,02	1150,92	1174,03	1310,37
1,00	1261,93	1234,16	873,09	853,60
1,25	1033,52	1290,20	470,68	630,65
1,50	1282,91	1074,27	587,95	437,59
1,75	1174,57	986,77	488,92	415,43
2,00	875,65	897,53	383,29	339,92
2,50	880,81	794,46	280,12	292,06
3,00	660,60	659,95	220,57	200,22
4,00	458,45	544,73	156,98	128,22
6,00	231,52	227,41	109,26	85,82
8,00	81,52	90,31	93,74	0,00
10,0	0,00	0,00	91,89	0,00
12,0	0,00	0,00	86,73	0,00
24,0	0,00	0,00	104,93	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

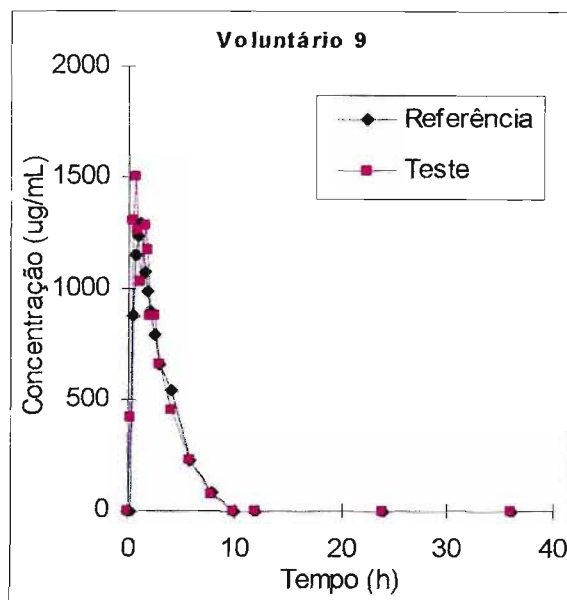


Figura 6.3.17. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 9.

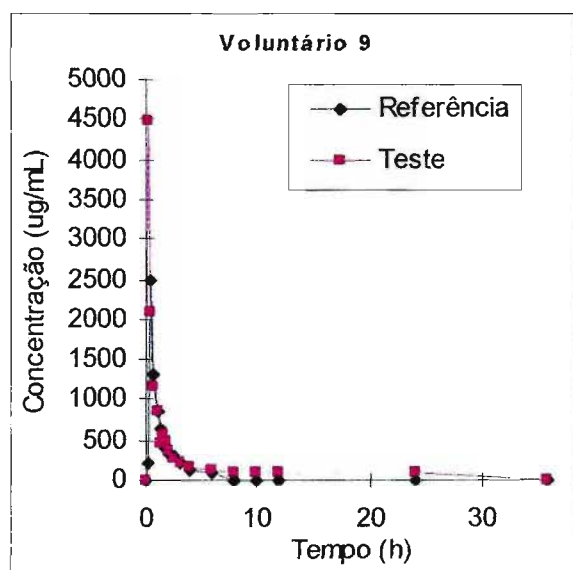


Figura 6.3.18. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 9.

Tabela 6.3.10. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 10

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	200,01	463,75	983,96	4768,17
0,50	920,43	854,04	1816,97	1544,51
0,75	1284,17	766,46	935,02	763,49
1,00	1116,86	620,31	563,25	532,56
1,25	1058,04	635,89	477,42	423,94
1,50	806,69	581,94	416,10	325,88
1,75	809,34	603,85	338,11	277,17
2,00	791,73	577,18	276,14	201,41
2,50	1015,53	563,46	173,43	138,93
3,00	820,14	604,22	121,65	109,14
4,00	688,22	557,68	0,00	0,00
6,00	462,10	502,59	0,00	0,00
8,00	161,26	223,30	0,00	116,86
10,0	225,55	141,54	0,00	0,00
12,0	131,39	89,06	0,00	0,00
24,0	0,00	81,84	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

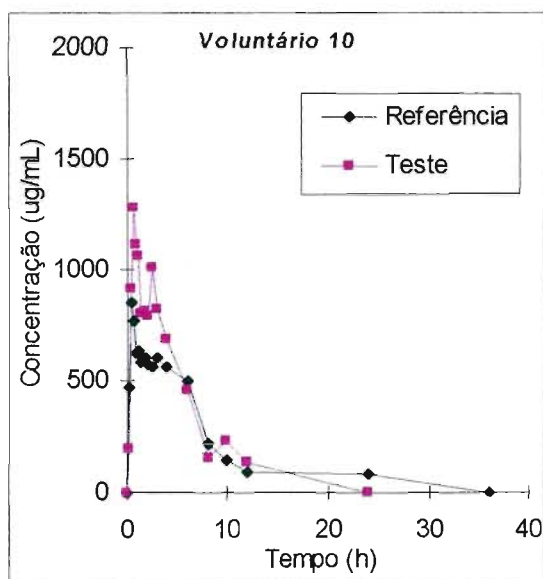


Figura 6.3.19. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 10.

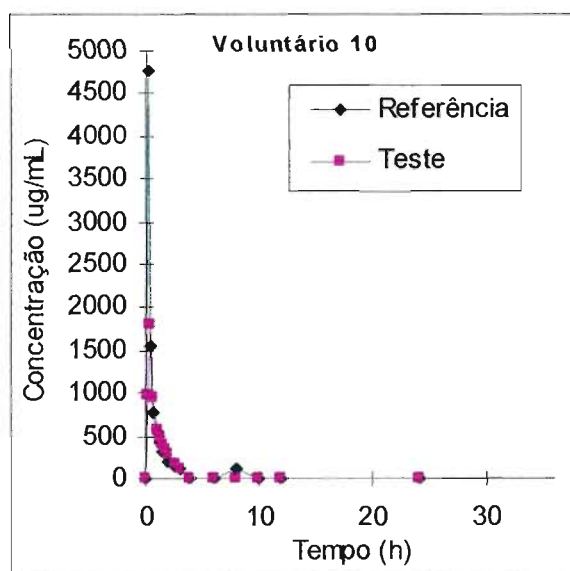


Figura 6.3.20. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 10.

Tabela 6.3.11. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 11

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,00	0,00	527,13	500,74
0,50	525,41	554,22	1121,25	1418,95
0,75	1077,47	814,39	969,99	722,45
1,00	1093,03	814,41	569,79	506,45
1,25	1079,46	806,12	419,70	420,72
1,50	1081,50	694,41	322,35	411,89
1,75	997,16	664,44	193,38	322,95
2,00	867,86	589,18	167,19	235,30
2,50	710,86	460,87	119,79	160,94
3,00	483,08	422,92	96,00	143,65
4,00	367,56	282,84	0,00	0,00
6,00	210,21	119,95	0,00	0,00
8,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

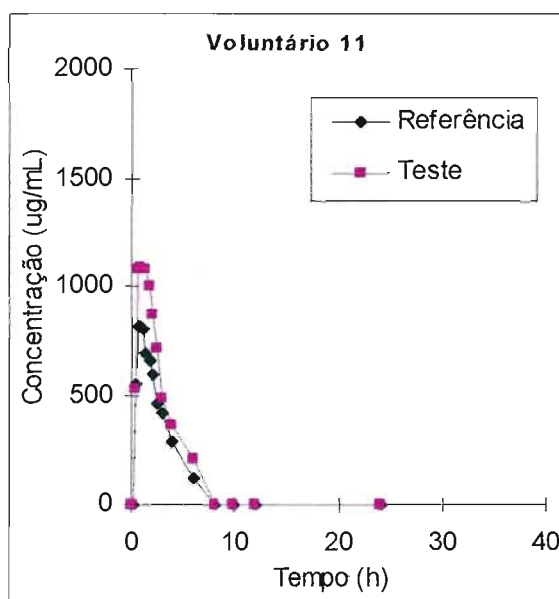


Figura 6.3.21. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 11.

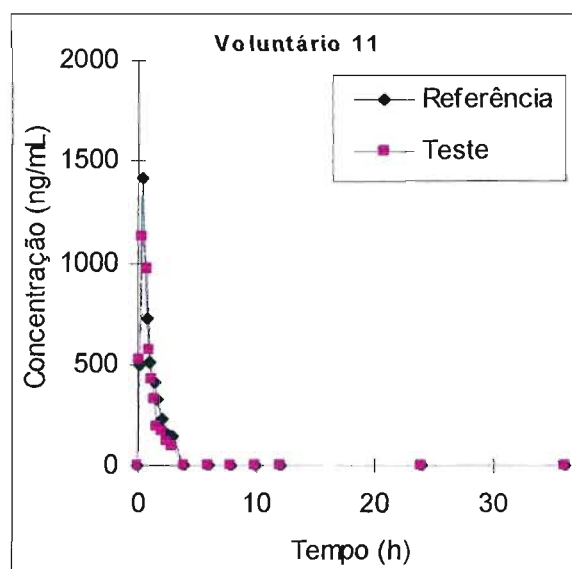


Figura 6.3.22. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 11.

Tabela 6.3.12. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 12

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	738,03	98,44	4512,57	436,42
0,50	2396,45	784,81	2707,11	2104,61
0,75	2070,92	1493,48	1146,19	2054,86
1,00	2074,40	1591,47	657,90	1241,59
1,25	1964,40	2083,91	612,64	625,83
1,50	1330,15	1602,98	743,18	497,83
1,75	1096,57	1312,78	429,04	334,71
2,00	939,44	1166,95	325,09	253,53
2,50	794,32	967,88	212,87	216,67
3,00	673,60	1013,22	123,20	147,85
4,00	571,13	706,68	0,00	0,00
6,00	310,01	389,89	0,00	0,00
8,00	203,84	294,55	0,00	0,00
10,0	89,11	179,59	0,00	0,00
12,0	88,89	118,89	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

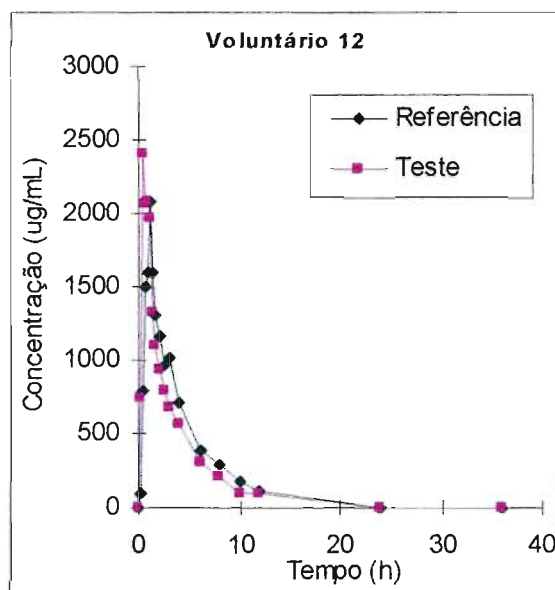


Figura 6.3.23. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 12.

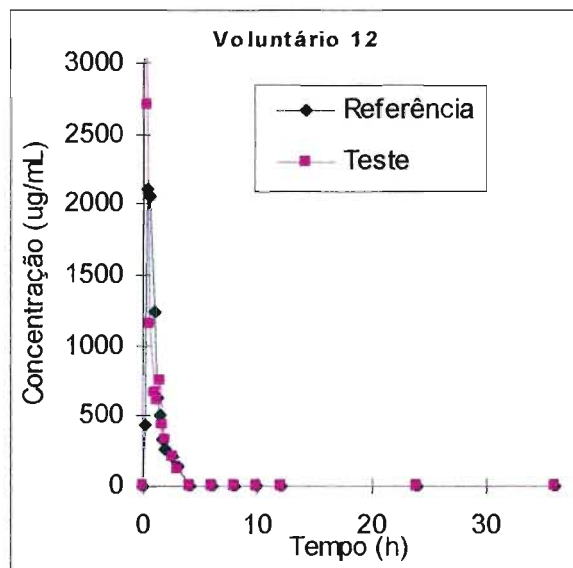


Figura 6.3.24. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 12.

Tabela 6.3.13. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 13

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	398,97	274,67	1435,84	302,78
0,50	2065,92	2226,18	1473,11	1583,65
0,75	1768,69	2334,18	818,11	857,66
1,00	1669,63	1954,64	655,61	631,90
1,25	1466,99	1652,95	492,58	474,25
1,50	1097,78	1384,78	390,10	324,71
1,75	1013,21	1022,39	310,02	265,42
2,00	1002,31	967,21	258,10	290,54
2,50	814,03	690,63	173,95	208,29
3,00	712,70	619,18	121,55	154,44
4,00	437,84	462,32	85,81	111,64
6,00	249,57	169,80	0,00	0,00
8,00	98,93	0,00	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

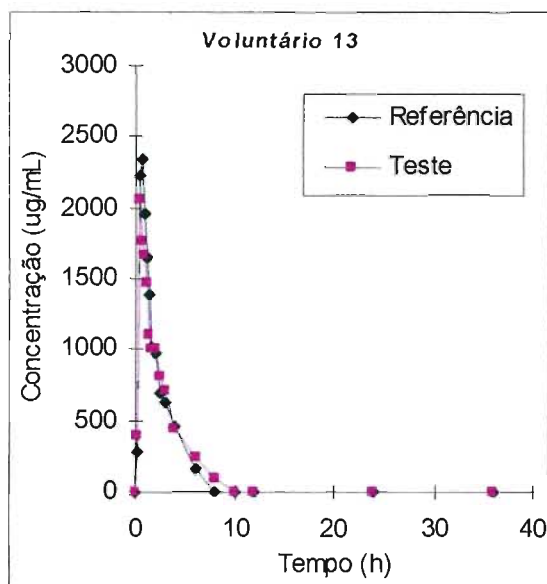


Figura 6.3.25. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 13.

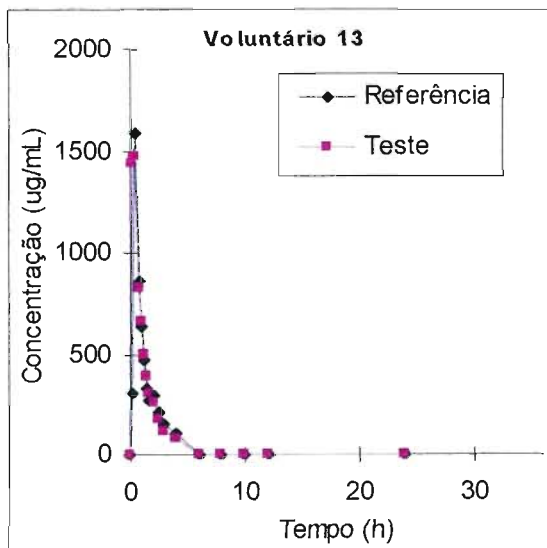


Figura 6.3.26. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 13.

Tabela 6.3.14. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 14

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	827,47	0,00	172,08	87,60
0,50	1033,97	339,98	1388,11	1104,74
0,75	1239,78	858,06	1536,49	1340,02
1,00	958,42	1206,48	1569,65	1129,65
1,25	1000,84	1268,77	1415,65	684,54
1,50	955,17	1044,00	830,68	511,55
1,75	628,37	1013,06	512,47	521,02
2,00	1197,35	932,83	401,91	508,85
2,50	964,49	944,17	277,75	268,04
3,00	882,12	791,36	219,79	170,56
4,00	683,63	586,23	122,66	103,68
6,00	263,65	359,66	0,00	0,00
8,00	100,29	159,39	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

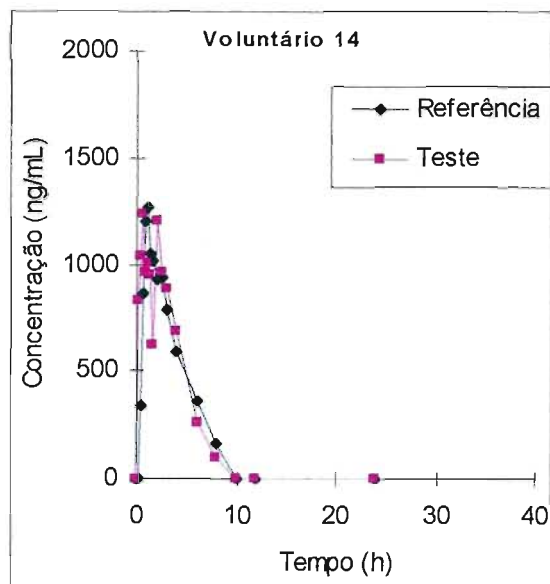


Figura 6.3.27. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 14.

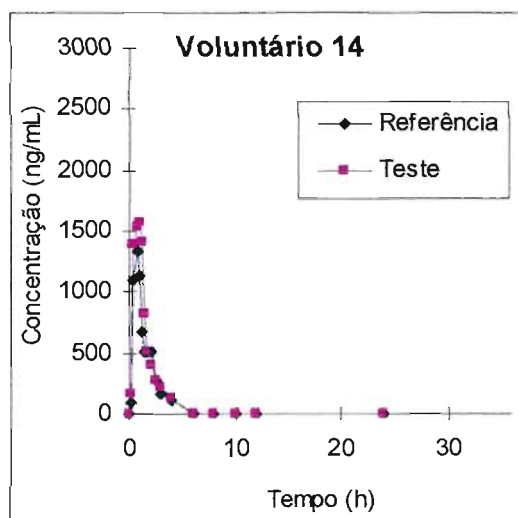


Figura 6.3.28. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 14.

Tabela 6.3.15. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 15

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,00	163,51	185,73	1568,94
0,50	150,93	1047,51	565,92	3328,49
0,75	282,14	1776,30	657,77	2980,24
1,00	383,08	1821,59	675,97	2131,74
1,25	528,64	1577,16	1279,50	1113,06
1,50	761,86	1279,03	1441,74	738,87
1,75	1110,75	1017,18	1355,00	599,58
2,00	1373,80	891,74	1768,40	506,97
2,50	2091,27	875,56	1467,65	357,62
3,00	1546,81	841,43	549,22	246,85
4,00	982,98	756,30	345,73	156,53
6,00	512,27	345,16	122,17	84,77
8,00	277,48	101,23	82,89	0,00
10,0	81,81	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

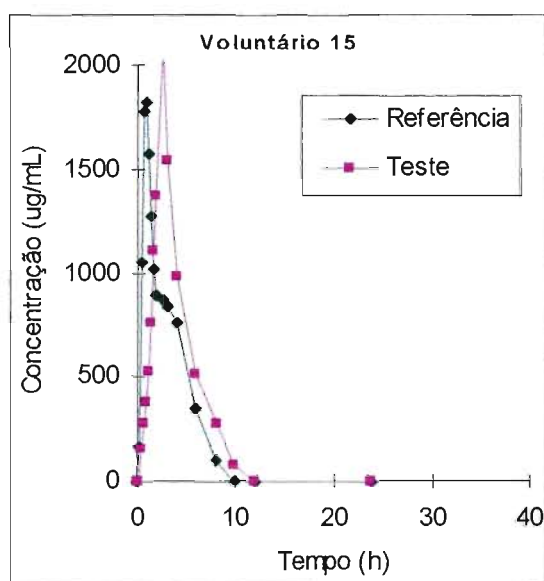


Figura 6.3.29. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir[®] lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 15.

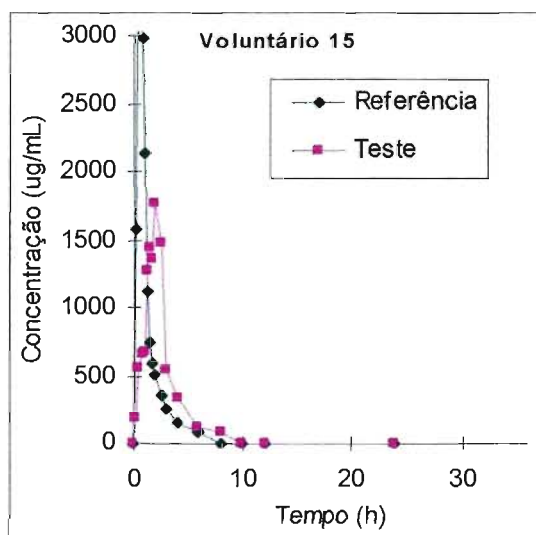


Figura 6.3.30. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir[®] lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 15.

Tabela 6.3.16. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 16

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	399,49	382,93	1827,72	859,67
0,50	1334,24	1122,13	2122,59	2772,15
0,75	1106,09	1501,75	1172,49	1585,38
1,00	995,85	775,27	959,22	1216,43
1,25	840,16	1314,87	655,57	904,06
1,50	780,21	1117,24	515,18	726,31
1,75	804,61	1066,11	417,49	555,30
2,00	715,18	895,52	301,75	392,45
2,50	648,72	778,04	196,52	259,26
3,00	606,62	791,93	148,47	210,51
4,00	507,78	776,39	99,14	108,90
6,00	355,33	389,38	0,00	0,00
8,00	191,83	192,30	0,00	0,00
10,0	99,15	141,66	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

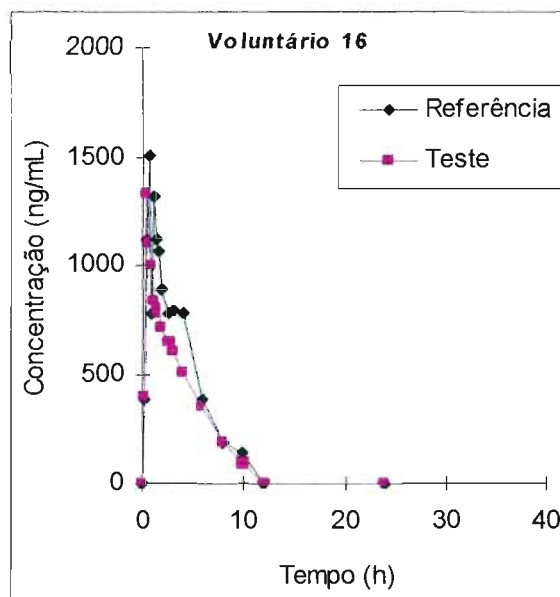


Figura 6.3.31. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 16.

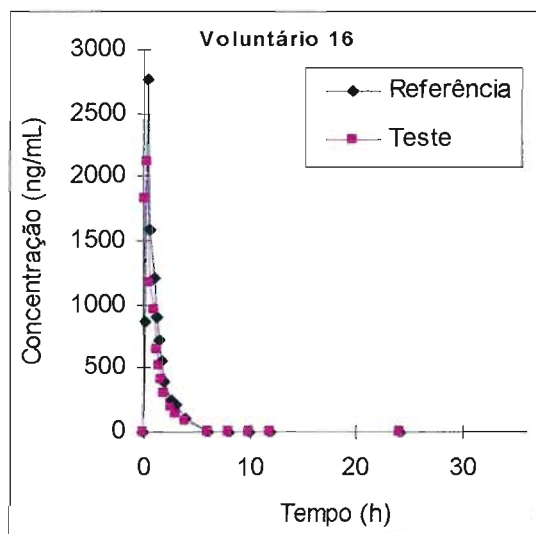


Figura 6.3.32. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 16.

Tabela 6.3.17. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 17

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	976,22	983,62	3915,67	3996,24
0,50	1734,27	2096,37	2450,50	2353,66
0,75	2174,47	2240,54	1638,46	1662,89
1,00	2176,52	2020,07	1144,28	1232,49
1,25	2015,08	1955,42	855,81	744,78
1,50	1779,23	1866,72	650,09	653,08
1,75	1443,29	1646,84	419,69	450,36
2,00	1198,70	1465,24	360,06	333,93
2,50	921,96	960,69	242,27	212,75
3,00	819,70	799,29	176,94	148,24
4,00	565,17	593,79	117,04	107,13
6,00	390,34	258,04	85,89	0,00
8,00	252,13	139,04	0,00	0,00
10,0	94,09	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

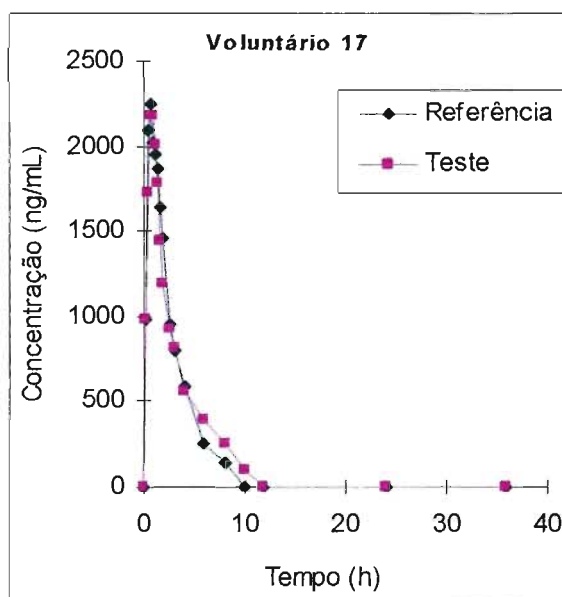


Figura 6.3.33. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 17.

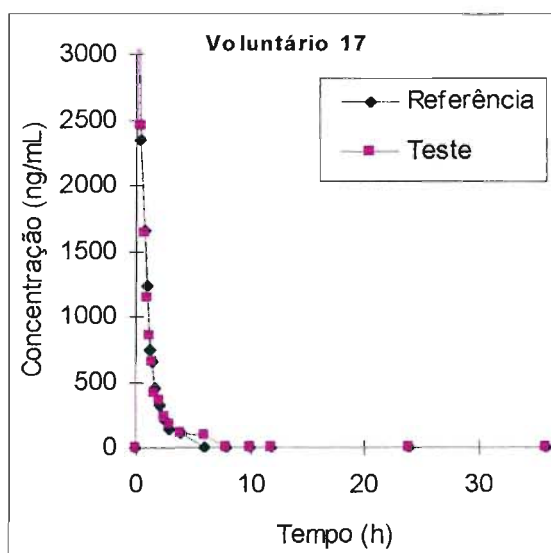


Figura 6.3.34. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 17.

Tabela 6.3.18. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 18

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	492,42	662,64	2950,91	3693,66
0,50	1146,27	1105,07	2110,08	1814,78
0,75	1487,80	1039,62	1514,96	1234,10
1,00	1372,62	1022,43	1035,79	778,56
1,25	1297,40	939,14	568,84	623,98
1,50	1242,59	991,57	450,64	505,65
1,75	1150,74	839,82	374,40	384,74
2,00	1028,17	747,47	280,75	312,95
2,50	895,13	532,26	211,31	191,53
3,00	624,60	517,12	155,54	178,51
4,00	374,06	385,87	119,42	125,35
6,00	180,58	125,21	83,98	82,42
8,00	118,54	87,13	0,00	0,00
10,0	0,00	80,63	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

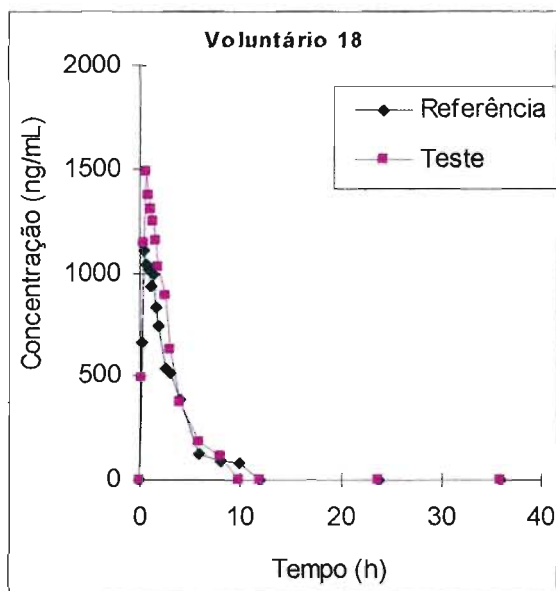


Figura 6.3.35. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 18.

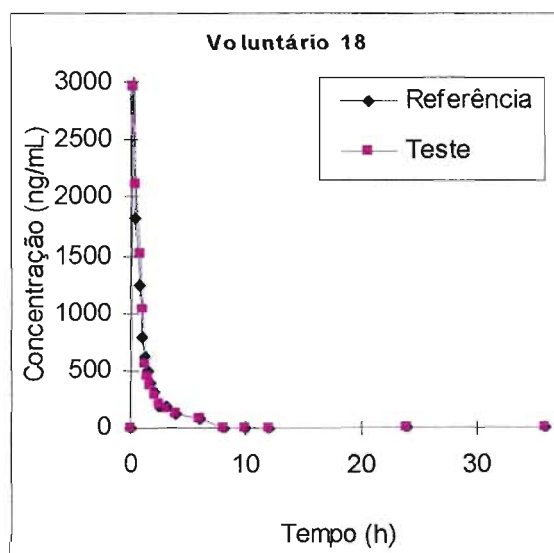


Figura 6.3.36. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 18.

Tabela 6.3.19. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 19

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	449,98	1015,09	2377,73	2346,95
0,50	1684,28	1008,00	1123,50	1452,80
0,75	1704,15	1226,26	644,13	783,46
1,00	1358,96	1094,92	488,06	522,84
1,25	1183,19	1133,62	414,80	359,91
1,50	990,87	943,04	344,81	299,05
1,75	894,72	854,10	297,36	273,95
2,00	818,50	836,06	273,98	308,20
2,50	768,04	848,19	221,35	213,74
3,00	660,06	786,89	168,91	147,38
4,00	496,20	511,49	105,56	93,59
6,00	292,96	296,25	0,00	0,00
8,00	134,95	163,94	0,00	0,00
10,0	89,78	95,34	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

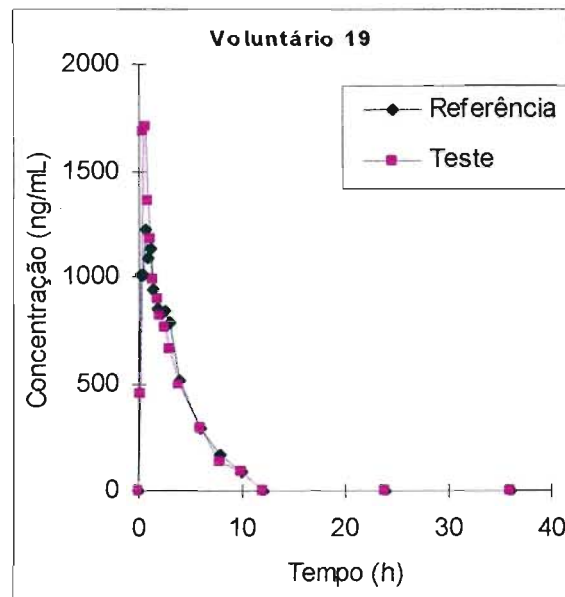


Figura 6.3.37. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 19.

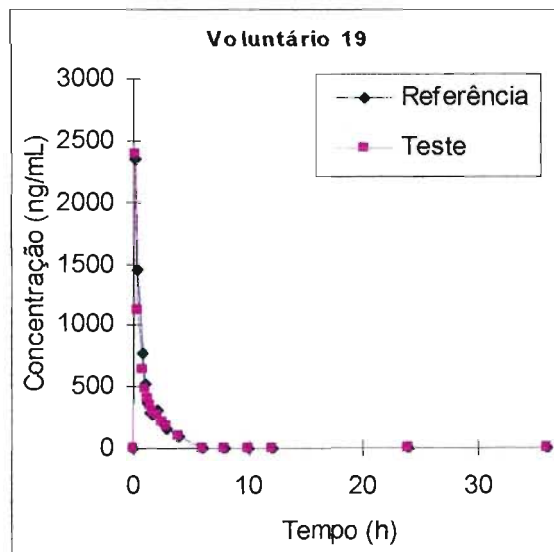


Figura 6.3.38. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 19.

Tabela 6.3.20. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 20

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,00	0,00	487,07	178,99
0,50	667,56	280,29	3822,66	675,01
0,75	1659,57	577,12	1533,27	1445,15
1,00	1505,70	812,66	967,14	1238,98
1,25	975,02	1131,98	745,41	940,32
1,50	869,20	1362,18	593,24	617,98
1,75	875,86	1238,26	529,80	405,34
2,00	725,30	754,63	395,32	252,43
2,50	624,06	823,54	255,11	239,78
3,00	705,32	746,44	185,17	157,31
4,00	779,54	880,52	106,10	80,12
6,00	370,50	529,76	0,00	0,00
8,00	83,38	225,15	0,00	0,00
10,0	0,00	187,36	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

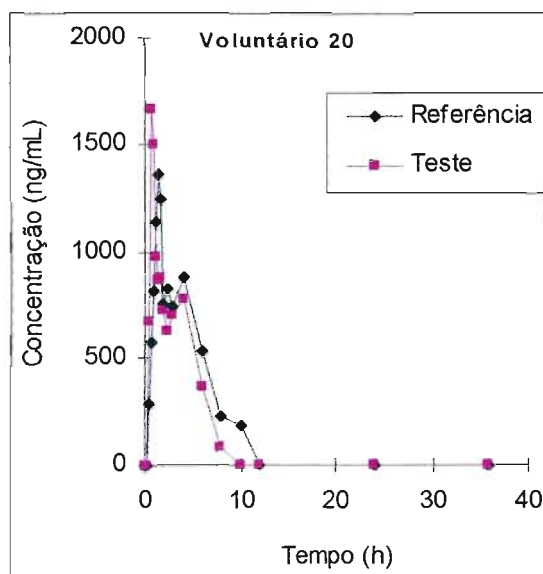


Figura 6.3.39. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 20.

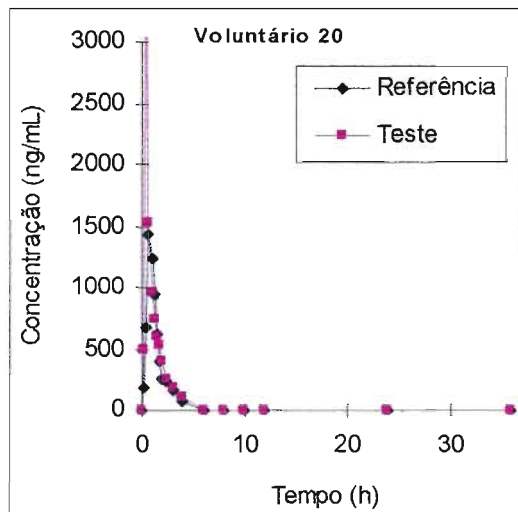


Figura 6.3.40. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 20.

Tabela 6.3.21. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 21

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	22,32	10,71	1507,17	297,29
0,50	208,77	67,67	2173,42	1363,24
0,75	365,47	205,12	837,34	2125,91
1,00	318,52	337,30	605,12	1152,76
1,25	245,56	417,51	424,97	602,50
1,50	212,15	416,74	286,51	398,75
1,75	229,67	343,31	201,74	338,55
2,00	260,16	279,66	178,93	241,17
2,50	473,72	464,73	130,35	161,20
3,00	358,85	431,46	82,85	133,89
4,00	519,33	688,90	0,00	0,00
6,00	640,19	793,08	0,00	0,00
8,00	360,15	423,81	0,00	0,00
10,0	214,96	452,47	0,00	0,00
12,0	305,06	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

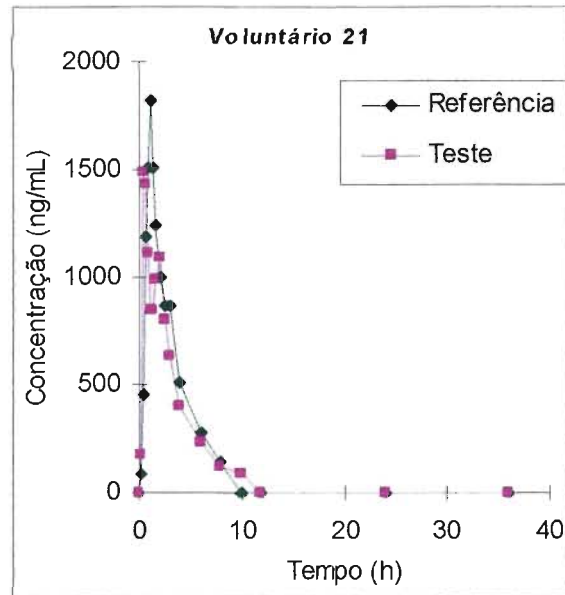


Figura 6.3.41. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 21.

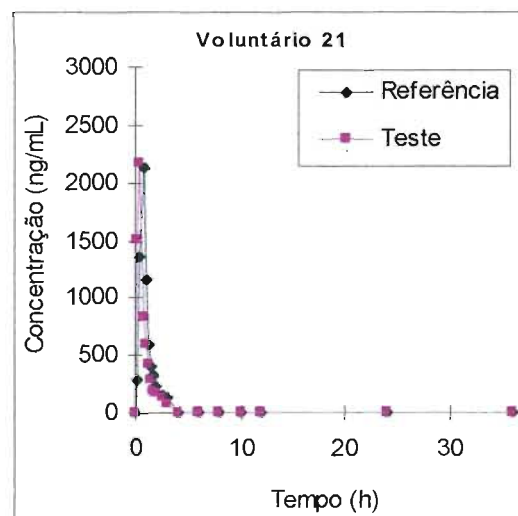


Figura 6.3.42. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 21.

Tabela 6.3.22. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 22

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	414,82	0,00	1514,07	397,33
0,50	1348,71	818,80	1694,29	1762,28
0,75	1374,68	1433,64	1016,29	1369,61
1,00	1177,28	1573,38	821,45	1089,94
1,25	936,34	1457,01	644,86	776,11
1,50	848,26	1169,93	505,13	692,13
1,75	774,93	997,94	375,21	613,59
2,00	763,49	994,78	358,56	453,53
2,50	848,62	824,31	298,84	304,80
3,00	524,74	688,37	241,61	223,82
4,00	279,17	501,91	186,82	158,04
6,00	228,16	273,02	0,00	101,27
8,00	143,03	129,82	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

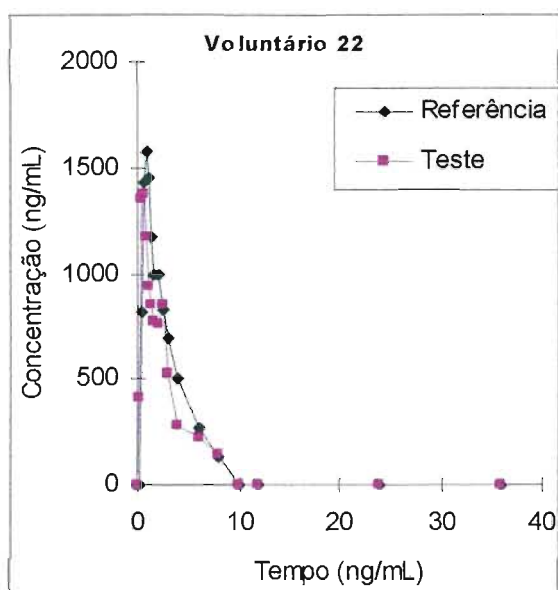


Figura 6.3.43. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 22.

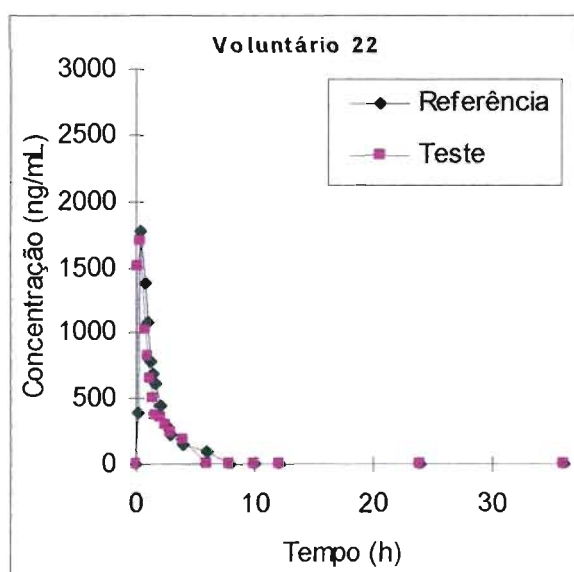


Figura 6.3.44. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 22.

Tabela 6.3.23. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 23

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	300,44	0,00	3149,01	419,19
0,50	1046,63	464,16	1521,60	2252,90
0,75	880,10	1275,88	943,46	1482,60
1,00	917,54	1666,67	843,28	935,00
1,25	1046,00	1502,75	539,77	652,57
1,50	1136,67	1103,99	377,49	580,65
1,75	832,62	923,32	320,72	517,72
2,00	656,72	810,31	282,26	471,89
2,50	456,40	638,62	207,83	341,85
3,00	366,99	570,84	165,53	273,74
4,00	271,44	316,30	117,08	122,95
6,00	111,26	137,56	0,00	0,00
8,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

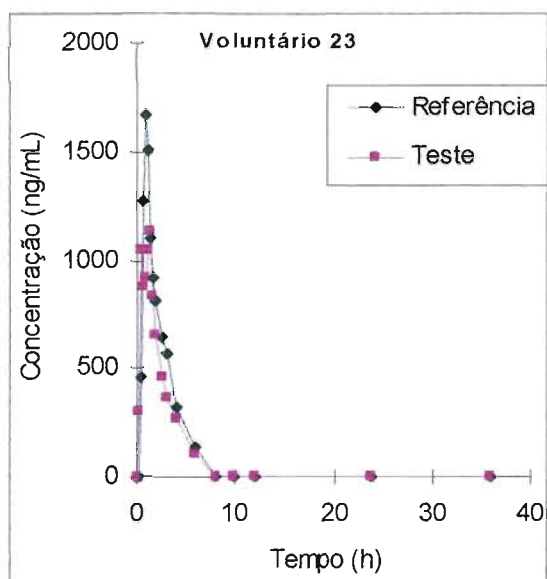


Figura 6.3.45. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 23.

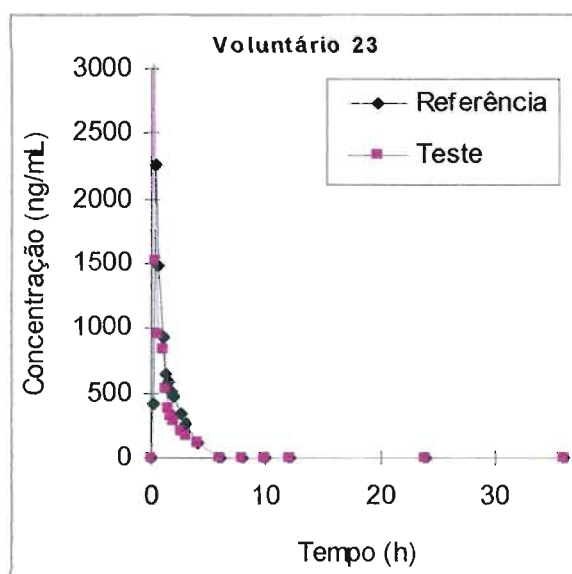


Figura 6.3.46. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 23.

Tabela 6.3.24. Concentrações plasmáticas de lamivudina e zidovudina após a administração dos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) ao voluntário 24

Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)			
	Lamivudina		Zidovudina	
	Teste	Referência	Teste	Referência
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	448,28	519,18	1504,24	2091,34
0,50	1365,37	1582,22	886,89	1310,01
0,75	1087,84	2225,94	655,14	995,20
1,00	820,30	1841,04	576,43	808,44
1,25	716,56	1472,87	484,46	577,53
1,50	564,61	1328,49	449,18	472,77
1,75	635,17	1165,09	325,39	397,73
2,00	570,39	1017,85	296,02	311,81
2,50	482,70	843,53	167,34	224,92
3,00	482,97	659,59	113,10	141,44
4,00	400,81	616,77	83,21	92,00
6,00	287,78	314,01	0,00	0,00
8,00	62,38	232,44	0,00	0,00
10,0	107,54	101,24	0,00	0,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00
36,0	0,00	0,00	0,00	0,00

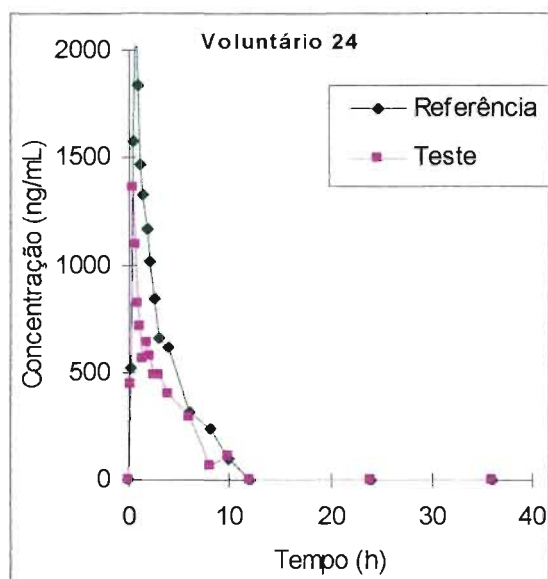


Figura 6.3.47. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de lamivudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 24.

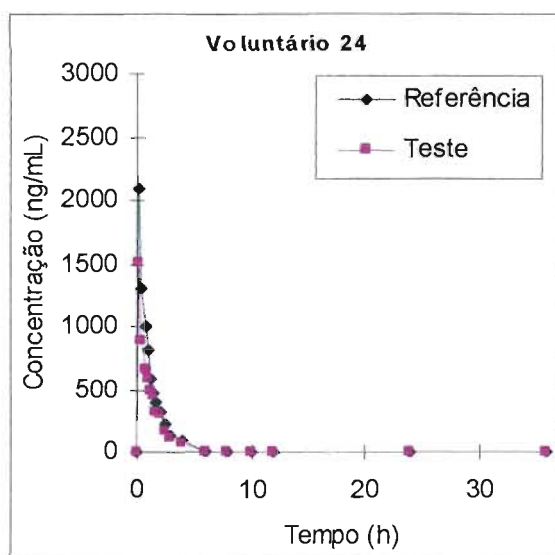


Figura 6.3.48. Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após quantificação de zidovudina contida nos produtos teste (Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg, Lote 9009; produzido pela Fundação para o Remédio Popular – FURP) e referência (Biovir® lote B067171, produzido por GlaxoSmithKline) administrados ao voluntário 24.

ANEXO 6.4

Tabela 6.4.1 Parâmetros farmacocinéticos referentes a lamivudina, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. CV = coeficiente de variação, DP = desvio padrão

Vol.	Referência					Teste				
	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	ASC ₀₋₁ (ngxh/mL)	ASC _{0-∞} (ngxh/mL)	t _{(1/2)el} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	ASC ₀₋₁ (ngxh/mL)	ASC _{0-∞} (ngxh/mL)	t _{(1/2)el} (h)
1	0,50	1223,08	7730,97	8501,65	2,99	1,25	1740,68	8127,60	8408,18	2,14
2	1,25	1710,80	5685,08	6149,45	2,06	0,75	1642,84	5167,33	5523,32	2,94
3	1,50	926,94	3492,90	3804,05	1,77	1,50	432,67	1630,69	1940,46	1,74
4	3,00	1448,52	4392,54	4775,11	2,30	1,75	1730,56	3936,32	4120,56	1,50
5	0,50	1746,30	5694,26	5921,04	1,54	0,50	1939,40	5115,50	5323,15	1,66
6	0,50	1725,16	3382,33	3697,27	1,14	1,50	1504,31	3819,40	4029,45	1,04
7	1,00	1132,07	3890,91	4131,21	1,59	0,50	1900,13	3781,47	4021,63	1,34
8	1,50	1523,20	5070,27	5489,48	2,12	1,75	1758,82	6051,60	6365,62	2,56
9	1,25	1290,20	4245,62	4452,39	1,59	0,75	1504,02	4492,22	4730,86	2,03
10	0,50	854,04	5768,76	6027,11	2,19	0,75	1284,17	5830,18	6316,44	2,56
11	1,00	814,41	2399,77	2697,94	1,72	1,00	1093,03	3268,24	4025,48	2,50
12	1,25	2083,91	6830,39	7443,88	3,58	0,50	2396,45	6323,90	6609,07	2,22
13	0,75	2334,18	4748,14	5132,99	1,57	0,50	2065,92	4942,53	5208,53	1,86
14	1,25	1268,77	4606,06	5095,59	2,13	0,75	1239,78	4906,88	5115,90	1,44
15	1,00	1821,59	5499,83	5664,89	1,13	2,50	2091,27	6661,04	6795,00	1,13
16	0,75	1501,75	5608,46	6014,49	1,99	0,50	1334,24	4567,80	4878,52	2,17
17	0,75	2240,54	6377,47	6760,61	1,91	1,00	2176,52	6826,80	7091,32	1,95
18	0,50	1105,07	3668,47	3885,23	1,86	0,75	1487,80	4389,82	4802,43	2,41
19	0,75	1226,26	4929,49	5264,62	2,44	0,75	1704,15	4942,44	5246,07	2,34
20	1,50	1362,18	5623,17	6061,14	1,62	0,75	1659,57	4744,92	4969,12	1,86
21	1,25	1826,90	4879,99	5332,46	2,18	0,50	1491,61	4429,81	4734,87	2,36
22	1,00	1573,38	4592,89	4976,86	2,05	0,75	1374,68	3841,02	4453,55	2,97
23	1,00	1666,67	3397,49	3692,62	1,49	1,50	1136,67	2808,13	3083,06	1,71
24	0,75	2225,94	5951,15	6366,06	2,84	0,50	1365,37	3636,08	3867,30	1,49
Média	1,04	1526,33	4936,10	5305,76	1,99	0,97	1585,61	4760,07	5069,16	2,00
DP	0,54	431,03	1227,06	1313,97	0,57	0,53	416,34	1409,24	1386,52	0,53
CV (%)	51,36	28,24	24,86	24,76	28,41	54,51	26,26	29,61	27,35	26,53

Tabela 6.4.2: Parâmetros farmacocinéticos referentes a zidovudina, obtidos após administração dos produtos referência (Biovir® lote B067171) e teste (FURP – Lamivudina + Zidovudina 150mg + 300mg, lote 9009) a 24 voluntários sadios. CV= coeficiente de variação, DP = desvio padrão

Vol.	Referência					Teste				
	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	ASC (ngxh/mL)	ASC _{0-∞} (ngxh/mL)	t _{(1/2)el} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	ASC _{0-t} (ngxh/mL)	ASC _{0-∞} (ngxh/mL)	t _{(1/2)el} (h)
1	0,50	3802,84	2587,70	2770,42	1,38	0,50	3207,58	2249,66	2520,23	1,00
2	0,50	2852,51	3922,14	4199,42	2,17	0,50	2747,66	3176,48	3562,56	2,35
3	0,75	1895,76	2695,12	2910,54	1,01	1,00	2697,25	3209,88	3433,76	1,50
4	2,50	1231,34	1935,55	2132,01	0,68	1,50	2602,65	2429,50	2601,60	0,88
5	0,50	2121,44	2157,76	2278,17	0,77	0,25	4210,98	3709,51	3846,63	0,96
6	0,25	4769,51	3739,02	3813,87	0,60	0,50	1475,95	2176,81	2307,78	0,89
7	0,75	724,91	1550,52	1725,60	1,43	0,25	4955,90	2580,68	2726,02	1,08
8	1,50	851,44	1161,40	1470,72	1,16	0,50	1305,67	1586,17	1801,69	1,01
9	0,50	2477,27	2286,49	2479,08	1,56	0,25	4491,05	5051,26	5359,78	2,04
10	0,25	4768,17	2502,64	2693,37	1,13	0,50	1816,97	1603,39	1751,77	0,85
11	0,50	1418,95	1280,66	1571,73	1,40	0,50	1121,25	1177,49	1350,52	1,25
12	0,50	2104,61	2064,33	2338,48	1,29	0,25	4512,57	2961,31	3106,80	0,82
13	0,50	1583,65	1494,84	1772,09	1,72	0,50	1473,11	1711,67	1900,89	1,53
14	0,75	1340,02	1849,38	2018,26	1,13	1,00	1569,65	2372,04	2594,89	1,26
15	0,50	3328,49	3988,87	4231,64	1,98	2,00	1768,40	4195,13	4427,31	1,94
16	0,50	2772,15	2643,95	2828,58	1,18	0,50	2122,59	2289,90	2510,85	1,54
17	0,25	3996,24	3169,72	3414,02	1,58	0,25	3915,67	3418,94	3599,83	1,46
18	0,25	3693,66	2876,32	3204,96	2,76	0,25	2950,91	2842,11	3259,52	3,44
19	0,25	2346,95	1889,52	2063,91	1,29	0,25	2377,73	1815,49	2030,80	1,41
20	0,75	1445,15	1748,04	1858,89	0,96	0,50	3822,66	2637,38	2820,03	1,19
21	0,75	2125,91	1774,26	2001,78	1,18	0,50	2173,42	1662,06	1802,56	1,17
22	0,50	1762,28	2503,91	2895,81	2,68	0,50	1694,29	2201,32	2813,43	2,27
23	0,25	2252,90	2324,82	2601,48	1,56	0,25	3149,01	2316,28	2626,52	1,84
24	0,25	2091,34	2044,73	2205,48	1,21	0,25	1504,24	1541,54	1729,33	1,56
Média	0,60	2406,56	2341,32	2561,68	1,41	0,55	2652,80	2538,17	2770,21	1,47
DP	0,49	1139,74	775,00	775,66	0,55	0,43	1153,55	919,03	943,22	0,61
CV (%)	80,86	47,36	33,10	30,28	38,83	77,84	43,48	36,21	34,05	41,68

CAPÍTULO VII

ESTUDOS DE PERMEABILIDADE UTILIZANDO MODELOS *IN VITRO*

7.1 INTRODUÇÃO

A absorção de fármacos no trato gastrointestinal é um dos importantes determinantes da biodisponibilidade oral. Esta absorção intestinal ocorre principalmente por difusão simples, processo no qual são importantes certas propriedades físico-químicas como hidrofobicidade e estado de ionização do fármaco. Algumas falhas na capacidade destas propriedades físico-químicas em estimar a proporção e a velocidade de absorção de fármacos levaram ao estudo de modelos *in vitro* para determinação da sua permeabilidade intestinal (Grass & Sweetana, 1999; Katsura & Inui, 2003).

Desde 1980, o desenvolvimento de técnicas como membranas isoladas de vesículas e sistema de cultura de células, tem contribuído para elucidar o mecanismo de transporte de vários fármacos, bem como, nutrientes através da membrana plasmática do intestino delgado e do túbulo renal proximal. O desenvolvimento de métodos isolando vesículas de membranas basolateral e de borda em escova das células epiteliais permitiu a caracterização dos mecanismos envolvidos no transporte de vários compostos. Dentre os tipos celulares utilizados como modelos *in vitro* podem ser citadas: as células Caco-2, oriundas de adenocarcinoma de cólon humano que são utilizadas para caracterizar o transporte transepitelial de vários compostos (Katsura & Inui, 2003); as células TC-7 que são subclones isolados das células Caco-2, sendo morfológicamente semelhantes com presença de borda em “escova”, microvilosidades e formação de junções, porém são aparentemente mais homogêneas e apresentam vantagens como menor tempo de crescimento; borda em escova mais desenvolvida e secreção de glicoproteínas mais semelhante ao epitélio intestinal (Gres *et al.*, 1998); as células 2/4/A1, que são originadas do intestino fetal de ratos (Tavelin *et al.*, 1999); as células Madin-Darby originadas de rim canino (MDCK) e sua variação MDCK-MDR1 adicionada do gene humano MDR1 (Irvine *et al.*, 1991; Putnam *et al.*, 2002). Estas últimas apresentam elevados níveis de P-gp e outros transportadores do processo secretório, que estão localizados na porção apical das células da monocamada (Tang *et al.*, 2002).

As células Caco-2 se diferenciam espontaneamente em enterócitos durante sua cultura em filtros permeáveis e porosos. Assemelhando-se as células da monocamada, apresentam rápida multiplicação celular e podem ser utilizadas para prever a absorção oral de fármacos por transporte passivo (transcelular e paracelular), em humanos (Balimane *et al.*, 2000; Horie *et al.*, 2003).

Nos últimos anos houve um crescente emprego de células Caco-2 nos ensaios de permeabilidade e absorção de fármacos, nos estudos mecanísticos, como “ferramenta” pela indústria farmacêutica, na descoberta de novos fármacos e como sistema integrado a métodos de dissolução para prever a relação dissolução-absorção (Artursson & Magnusson, 1990; Rubas *et al.*, 1993; Artursson & Borchardt, 1997; Ginsk & Polli, 1999; Ginski *et al.*, 1999; Lentz *et al.*, 2000; Gershanik *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2001).

Embora sejam poucas, existem limitações ao emprego de células Caco-2 como ferramenta para avaliar a absorção. Dentre elas podemos citar: 1) O reduzido número de transportadores (como peptídeos); o que pode explicar por que antibióticos beta-lactâmicos (cefalexina, amoxicilina) apresentam baixa permeabilidade através da monocamada de células de Caco-2, mas são completamente absorvidos *in vivo* (Chong *et al.*, 1996). 2) A baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos com baixo peso molecular (ranitidina, atenolol, furosemida, hidroclorotiazida, etc.) que apresentam fraca permeabilidade (igual ou menor à do manitol) através de células Caco-2, embora em humanos a absorção seja maior que 50% (Balimane *et al.*, 2000). 3) A presença de co-solventes (metanol, etanol, propilenoglicol e polietilenoglicol em concentrações maiores que 1-2% ((v/v)) que, no sistema, podem danificar a membrana. 4) A aderência física do fármaco ao filtro de policarbonato apresentando reduzida permeação. 5) O elevado tempo de crescimento das células Caco-2. A preparação das células da monocamada requer um período de cultura de três semanas. Entretanto, este tempo pode ser reduzido para menos de uma semana por modificações simultâneas no material de revestimento e no meio de crescimento. A redução no período de cultura proporciona uma monocamada funcional com maior produtividade, além de reduzir a contaminação por fungos e bactérias (Chong *et al.*, 1996; Chong *et al.*, 1997; Balimane *et al.*, 2000).

As células MDCK, quando cultivadas em membranas semi permeáveis, se diferenciam em epiteliais colunares, com junções semelhantes às células Caco-2. Este modelo foi descrito inicialmente em 1989 (Cho *et al*, 1989), e posteriormente, foi utilizado para avaliar a permeabilidade *in vitro* de novos compostos (Irvine *et al*, 1991). As células MDCK foram inseridas em cultura de membranas de alta densidade e incubadas por 3 dias, representando um tempo significativamente inferior ao necessário para o crescimento de células Caco-2. A permeabilidade de 55 compostos, já descrita na literatura, foi avaliada pelos métodos MDCK e Caco-2 e, em ambos, apresentou resultados semelhantes. Porém, o nível de expressão de transportadores entre estes modelos pode ser grosseiramente diferente (Balimane *et al*, 2000). Ainda não são conclusivos os estudos sobre a correspondência entre estes dados de permeabilidade e os valores de absorção humana para compostos secretados ou transportados ativamente.

As células MDCK são largamente utilizadas para estudar a fisiologia tubular distal renal, incluindo o transporte de íons. Os íons Na⁺ e Cl⁻ são filtrados nos rins e cerca de 5 a 10% de sua reabsorção é regulada por co-transportadores. As células MDCK representam um dos poucos modelos que expressam quantidade adequada de co-transportadores. Estes estudos são relevantes no delineamento da terapêutica com compostos diuréticos tiazídicos empregados no tratamento da hipertensão (Jong *et al.*, 2003; Wegmann & Nüsing., 2003).

A terapêutica anti-HIV deve ser estabelecida de maneira a possibilitar a adequada absorção oral dos agentes anti-retrovirais, contribuindo assim para o sucesso da terapia (Aoki, 1999). A absorção e a biodisponibilidade de fármacos pode ser influenciada principalmente por três fatores: liberação do fármaco no sítio de absorção, dissolução no líquido gastrintestinal e permeabilidade através das membranas (Benet *et al.*, 1996).

A absorção de fármacos pode ser diminuída por dois fatores principais: a secreção ativa, que é caracterizada pelo transporte das moléculas da mucosa para o lúmen intestinal e o metabolismo de primeira passagem ocasionado pela ação do citocromo P450 (CYP) 3A (Benet *et al.*, 2004). A secreção ativa ocorre principalmente pela ação

de glicoproteínas (P-gp) dependentes de ATP (170-180 KDa), que fazem parte do grupo dos transportadores responsáveis pela resistência a diferentes fármacos (*multidrug resistance* - MDR) (Leung & Bendayan, 1999). Atualmente são conhecidos, em humanos, dois genes que codificam estes transportadores: MDR1 e MDR3 (Tang *et al.*, 2002).

As P-gp são encontradas em inúmeros órgãos e tecidos principalmente aqueles responsáveis pela eliminação de fármacos, incluindo cérebro, fígado, intestino, glândula adrenal, placenta, barreira hemato-encefálica e rim (Kim & Benet, 2004). No intestino delgado estão localizadas na porção apical da membrana (Benet *et al.*, 2004). A avaliação da interação entre os agentes anti-retrovirais e as P-gp é importante, uma vez que estudos demonstraram que o vírus HIV-1 pode desengatilhar sua expressão em cultura de células (Leung & Bendayan, 1999). Elevados níveis de P-gp podem limitar diretamente a absorção oral, além de ocasionar variabilidade e não linearidade dos parâmetros farmacocinéticos (Collett *et al.*, 2004).

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a dissolução e a permeação intestinal dos fármacos representam dois fenômenos limitantes da absorção e, conseqüentemente, de sua ação terapêutica. Para compostos absorvidos passivamente (e alguns ativamente) a velocidade de permeação obtida por meio destes modelos *in vitro* pode ser correlacionada com a porcentagem de fármaco absorvida (Cummins *et al.*, 2004). Muitos autores tem demonstrado a possibilidade de prever a absorção oral de fármacos em humanos baseado nos resultados de permeabilidade obtidos utilizando células Caco-2 (Artursson & Karlsson, 1991; Artursson *et al.*, 2001; Ingels & Augustijns, 2002).

No presente estudo foram comparados os resultados do transporte bi-direcional de 3TC e ZDV através de membranas obtidas com as células MDCK, MDCK-MDR1 e Caco-2, visando avaliar a influência de transportadores, a concentração e a co-administração dos fármacos. Para verificar as mudanças na permeabilidade de 3TC e ZDV foram testadas três condições diferentes: 1) com e sem a inibição de P-gp; 2) utilizando

crescentes concentrações de ambos os fármacos concomitantemente e 3) aumentando-se a concentração de 3TC sem alterar a concentração de ZDV

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 MATERIAL

As substâncias químicas de referência referentes a Zidovudina e Lamivudina foram gentilmente cedidos pela FURP (Fundação para o Remédio Popular, Brasil) e o inibidor das glicoproteínas GG918 (GF 120918; GlaxoSmithKline, Research Triangle Parck, NC) foi doado pelo produtor. A [3H]-digoxina (atividade específica 19 Ci/mmol), um composto radioativamente marcado, utilizado como controle durante o processo de cultura das células foi comprado da NEN life Science Products, Inc (Boston Massachusetts). Os filtros de polietileno (polyethylene terephthalate -PET), com diâmetro de 4.2 cm² e as placas com seis receptáculos para a cultura das células foram obtidas da Fisher Scientific (Santa Clara, CA). Todos os solventes foram grau HPLC e adquiridos da Fisher Scientific.

7.2.2 CONDIÇÕES PARA A CULTURA DE CÉLULAS

As células MDCK e MDCK-MDR1 foram generosamente cedidas pela Dra. Ira Pastan do Instituto Nacional do Câncer (USA). Estas foram cultivadas em meio Dulbecco's Eagle's-H21 modificado e adicionado de 10% de soro de feto bovino (FBS) previamente inativado pelo calor; 1,0% de penicilina e estreptomicina; 1,0% de aminoácido não essencial e 80 ng/mL de colchicina para as células MDCK-MDR1 (Todos comprados por meio do setor de Meios para Cultura de Células da Universidade da Califórnia, UCSF - *Cell Culture Facility, San Francisco, CA*). As células foram transferidas para os filtros PET, obtendo-se uma densidade de aproximadamente 250.000 células/filtro. As condições adequadas ao crescimento celular foram mantidas durante 7 dias, até que as

células se tornaram confluentes e adequadas ao experimento. Durante este período foram realizadas trocas do meio de cultura, três dias após a transferência e um dia antes do estudo de permeabilidade.

As células Caco-2 foram obtidas do *American Type Culture Collection* (Rockville, MD) e cultivadas em meio de cultura Eagle's menos essencial (MEM) contendo L-glutamina 2mM, glicose 5,5 mM, e bicarbonato de sódio 2,2 g/L (2,6mM). O meio de cultura foi modificado adicionando-se 1,0% de piruvato de sódio, 1,0 % de aminoácido não essencial e 10% de FBS inativado pelo calor (UCSF - *Cell Culture Facility, San Francisco, CA*). As células foram transferidas para os filtros PET, obtendo-se uma densidade de aproximadamente 250.000 células/filtro e mantidas em condições adequadas para o crescimento por 21 dias. O meio de cultura foi trocado 24 horas após a transferência das células; posteriormente, duas vezes por semana e 24 horas antes do experimento. Todas as células foram cultivadas à temperatura de 37 °C, com umidade composta de 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

7.2.3 ESTUDO DE PERMEABILIDADE ATRAVÉS DAS CÉLULAS MDCK-MDR1; MDCK E CACO-2.

Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas com tampão Hank's contendo HEPES 25nM, 1% de FBS e pH ajustado para 7,4. As células foram mantidas com este tampão por 20 minutos a 37 °C. A resistência elétrica transepitelial (TEER) foi medida em cada receptáculo, usando aparelho Millicell (Millipore Corporation, Bedford, MA) equipado com eletrodos. Os valores da TEER variaram entre 200-250 $\Omega\text{-cm}^2$ para as células MDCK, 900 - 1500 $\Omega\text{-cm}^2$ para MDCK- MDR1 e 240 - 320 $\Omega\text{-cm}^2$ para Caco-2. Para avaliar a viabilidade das células Caco-2 foi realizado, em cada dia de experimento, utilizando uma placa o transporte transepitelial de digoxina sobre a forma de radio composto. Os resultados encontrados mostraram-se de acordo com a literatura (Collett *et al.*, 2004) com valor médio de P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm desvio padrão de $2,09 \pm 0,60$. Para medir o efeito das P-gp durante a permeação de 3TC e ZDV foram preparadas soluções utilizando tampão Hank's modificado contendo 2,5

$\mu\text{g/mL}$ e $5,0 \mu\text{g/mL}$ de cada fármaco. Estas soluções foram utilizadas para avaliar o transporte bidirecional de ambos na presença e na ausência de GG 918, um inibidor das glicoproteínas. Para a avaliação do transporte no sentido $A \rightarrow B$ foram adicionados $1,5 \text{ mL}$ da solução contendo o fármaco no lado apical (A) e $2,5 \text{ mL}$ da solução solução de Hank's tamponada e modificada no lado basolateral (B). O transporte no sentido $B \rightarrow A$ foi avaliado adicionando-se $2,5 \text{ mL}$ da solução contendo o fármaco no lado B e $1,5 \text{ mL}$ da solução de Hank's tamponada e modificada no lado A. O efeito das glicoproteínas na absorção de 3TC e ZDV foi medido comparando-se o transporte transepitelial dos fármacos em ambas as direções com inibição (após adição em ambos os lados de 500 nM de GG918) e sem inibição das P-gp.

Para a avaliação do efeito da co-administração de 3TC no transporte de ZDV, em ambas direções, $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$, foram realizados durante os estudos *in vitro*, transportes bidirecionais de ambos os fármacos concomitantemente e em concentrações crescentes de $2,5$; 5 ; 10 e $15 \mu\text{g/mL}$.

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. As células foram incubadas a 37°C , sob agitação moderada. Durante o estudo foram retiradas alíquotas de $150 \mu\text{L}$ do compartimento receptor após 1 , 2 e 3 horas do início do experimento. Foi realizada a reposição de meio, ocasionando a manutenção do volume inicial. Após a coleta de amostra referente a 3 horas, a solução contida na porção apical foi removida e cada filtro foi imerso em três béqueres contendo cerca de 200 mL de solução salina gelada. Os receptáculos foram invertidos para remoção do líquido residual. As células foram lavadas e posteriormente extraídas utilizando uma alíquota de $200 \mu\text{L}$ de água e uma alíquota de $200 \mu\text{L}$ de metanol. Os volumes foram somados, agitados sob vórtex por 1 minuto, sonicados por 7 minutos e centrifugados por 10 minutos a $10\,000 \text{ g}$. O líquido sobrenadante foi analisado por LC/MS/MS de acordo com procedimento descrito a seguir.

7.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA UTILIZANDO LC/MS/MS

Um instrumento micromass Quatro Ultima (waters, Milford, MA) com eletrospray ion positivo foi utilizado. O monitoramento da reação múltipla foi realizado de 268,0 – 127,0 m/z para ZDV e de 230,0 – 112,0 m/z para 3TC. O cone de voltagem e a energia de colisão foram 15V e 10eV, respectivamente. Para separação das amostras foi utilizada uma coluna analítica ODS C18 (4,6 X 50 nm, 5 μ m de tamanho da partícula) (Thermo Hypersil, Keystone Scientific Operations, Bellefonte, PA). O método empregou duas fases móveis compostas por 6% de metanol adicionado de 0,1% de ácido fórmico (Eluente A) e 20% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Eluente B). Estas foram combinadas em sistema gradiente conforme descrição a seguir: 0-0,5 min, 0-100%; 0,5-3,5 min, 50-50%; 3,5-4,0 min, 100-0% dos eluentes A e B respectivamente. Durante as análises manteve-se um fluxo de 1,0 mL/min de 0 a 4 min aumentando para 1,5 mL/min a partir de 4,5min até o tempo de corrida que foi de 6 minutos. Houve uma divisão de 1/10 do fluxo na entrada do detector de massas.

7.2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores de permeabilidade aparente (P_{app}) (cm/s) foram calculados (Eq 7.1) de acordo com a velocidade de transporte dos fármacos, medida pelo fluxo dos mesmos através das células (ng por hora):

$$\text{Eq. 7.1 } P_{app} = \frac{\text{Velocidade de transporte}}{\text{Área da Membrana} \times \text{Conc no compartimento doador}}$$

7.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios *in vitro* foram apresentados como média \pm desvio padrão referentes a 3 determinações (n=3). Os dados obtidos foram agrupados dois a dois e analisados utilizando o teste *t* de student. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de *p* inferiores a 0,05.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 TRANSPORTE BIDIRECIONAL E INIBIÇÃO DA PERMEAÇÃO DE 3TC E ZDV ATRAVÉS DE CÉLULAS MDCK-MDR1 E CACO-2.

O transporte bidirecional de 3TC e ZDV, separadamente, foi avaliado através das células MDCK-MDR1 e Caco-2, com e sem a adição do inibidor das P-gps: GG 918. A verificação da polarização do transporte dos fármacos foi realizada medindo-se o fluxo transepitelial em ambas direções $B \rightarrow A$ e $A \rightarrow B$.

Nas Figuras 7.1 e 7.3 estão representados os gráficos de transporte transepitelial de lamivudina em função do tempo, realizado através das células MDCK-MDR1 e Caco-2, com e sem inibição das P-gps. Nas Figuras 7.2 e 7.4 estão representados os gráficos de transporte transepitelial de zidovudina em função do tempo, realizado através das células MDCK-MDR1 e Caco-2, com e sem inibição das P-gps. De acordo com os resultados apresentados pode-se verificar que o fluxo de ambos os fármacos foi maior no sentido $B \rightarrow A$ em relação ao $A \rightarrow B$.

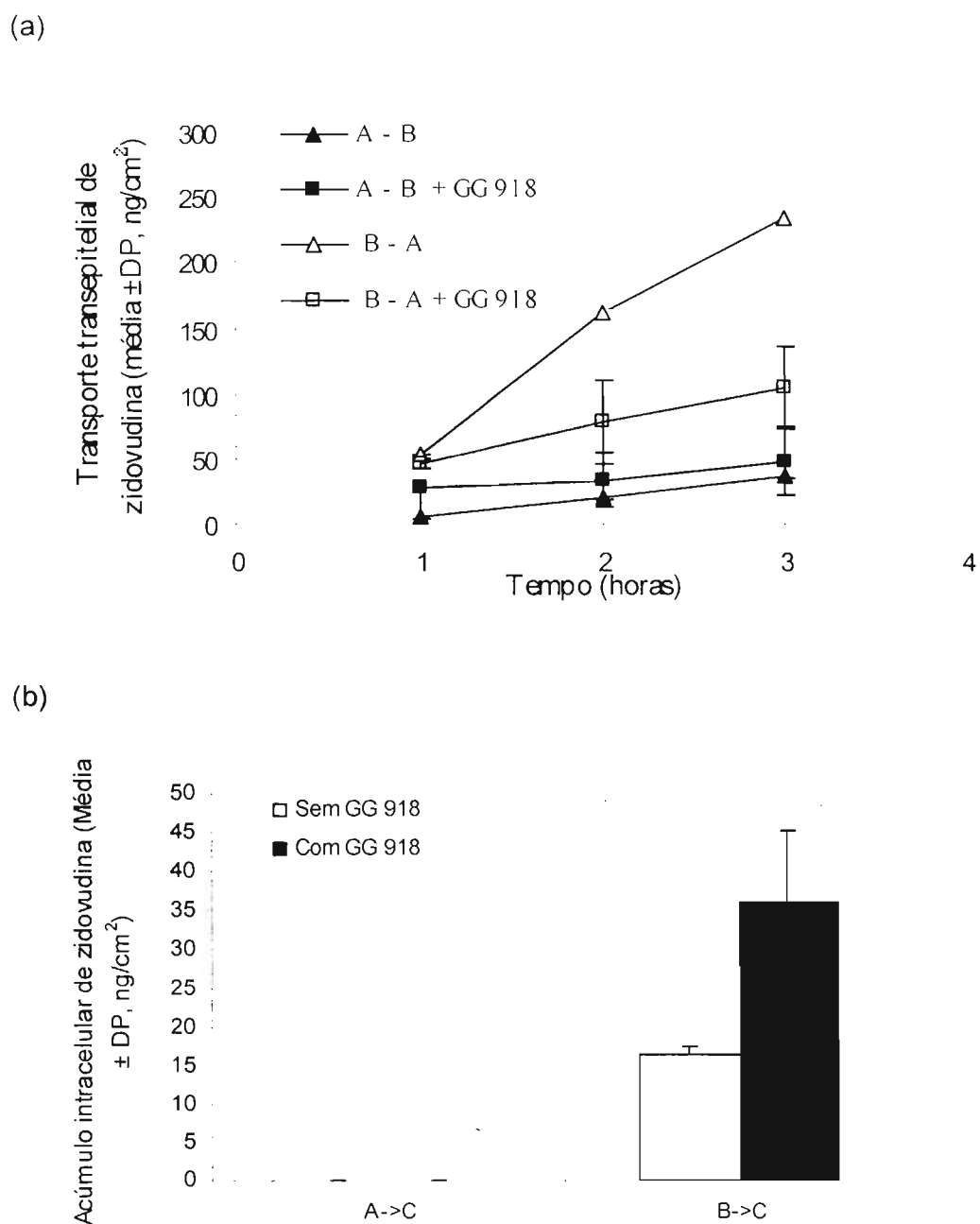
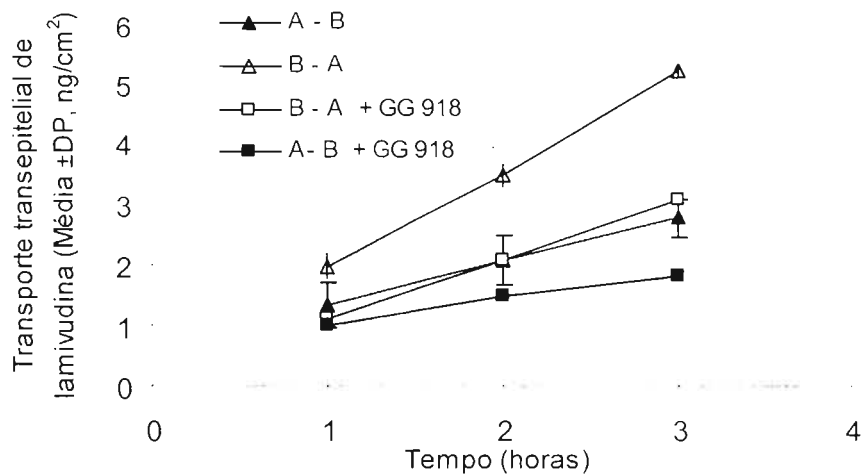


Figura 7.1 Transporte transepitelial de zidovudina ($2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) através das células MDCK-MDR1 (a) e acúmulo intracelular (b).

(a)



(b)

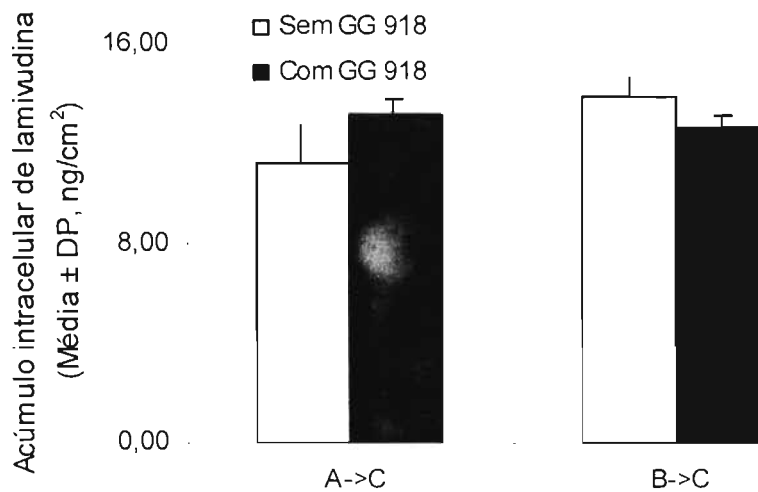
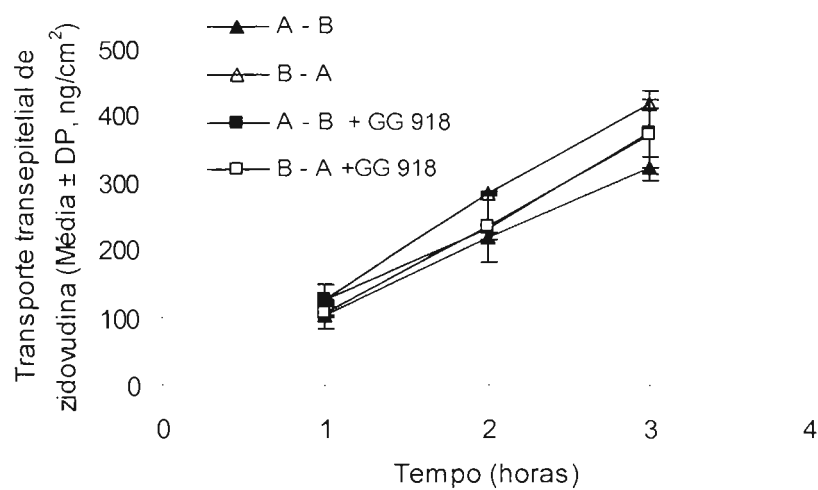


Figura 7.2 Transporte transepitelial de lamivudina (2,5 µg/mL) através das células MDCK-MDR1 (a) e acúmulo intracelular (b).

(a)



(b)

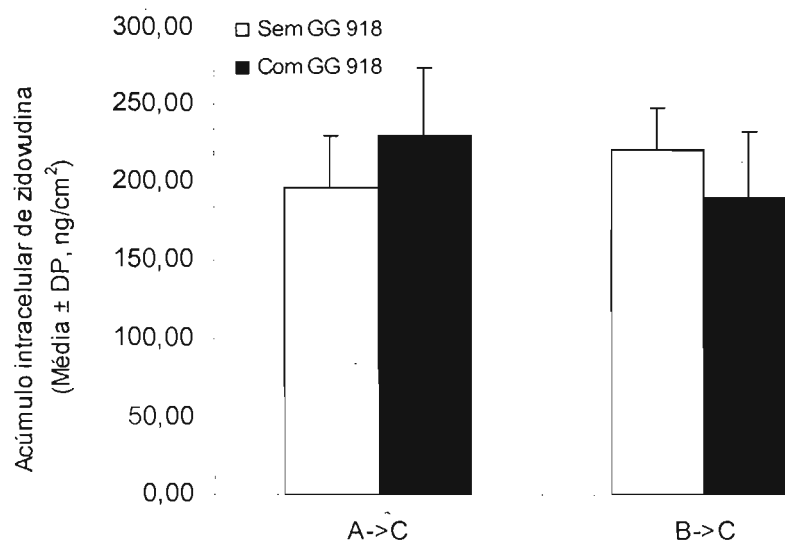
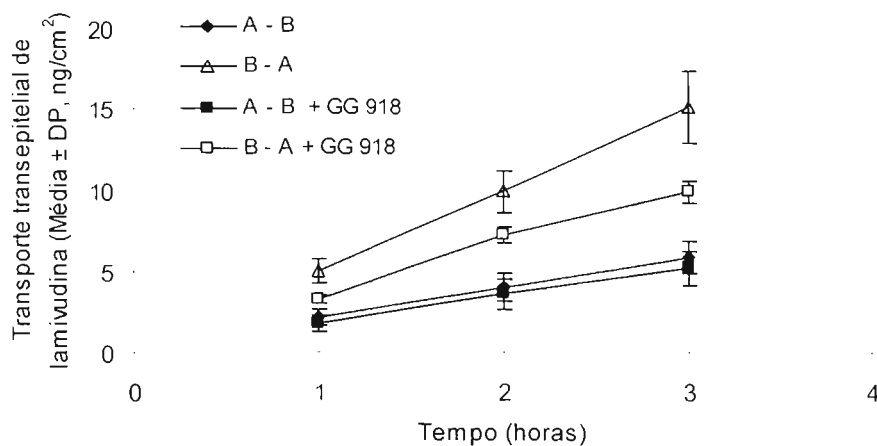


Figura 7.3 Transporte transepitelial de zidovudina (5 µg/mL) através das células Caco-2 (a) e acúmulo intracelular (b).

(a)



(b)

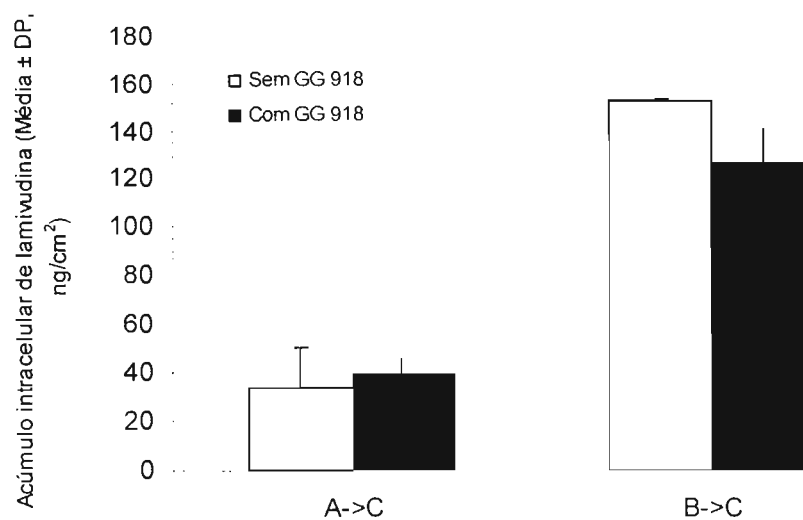


Figura 7.4 Transporte transepitelial de lamivudina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) através das células Caco-2 (a) e acúmulo intracelular (b).

Na Tabela 7.1 estão contidos os valores de P_{app} referentes ao transporte de ambos os fármacos através da membrana de monocamada formada por células MDCK-MDR1 e Caco-2. Os estudos utilizando células Caco-2 demonstraram um decréscimo dos valores de P_{app} , para ambos os fármacos, após a adição de 500nM de GG 918. Este

decréscimo foi estatisticamente significativo para o transporte de lamivudina no sentido B→A. Os estudos utilizando células MDCK-MDR1 apresentaram resultados de P_{app} estatisticamente significativos na direção B→A para zidovudina e em ambas as direções (B→A e A→B) para lamivudina. O acúmulo intracelular dos fármacos após adição de GG 918 demonstrou um aumento no sentido A→B e diminuição no sentido B→A. Estes resultados sugerem que ambos os fármacos são substratos para as P-gps, porém maiores influências deste transportador podem ser observadas na permeação da lamivudina.

Tabela 7.1 Transporte transepitelial e inibição de Zidovudina e lamivudina através de células da monocamada

Condição	P app (A→B) ± SD (X 10 ⁶ cm/s)	P app (B→A) ± SD (X 10 ⁶ cm/s)	Fluxo (B→A/A→B) ± SD	Acúmulo (ng/cm ²) A → C	B → C	B→C/ A→C
Zidovudina						
MDR1-MDCK (2,5µg/mL) + GG 918 (500 nM)	1,73 ± 0,03	9,98* ± 0,88	5,79 ± 0,62	0,02	16,58	828
Caco-2 (5,0 µg/mL) + GG 918 (500 nM)	1,09 ± 1,01	3,26* ± 1,55	4,25 ± 2,57	0,02	36,16	1808
Lamivudina						
MDR1-MDCK (2,5µg/mL) + GG 918 (500 nM)	0,08** ± 0,00	0,18** ± 0,02	2,27 ± 0,19	11,13	13,90	1,25
Caco-2 (5µg/mL) + GG 918 (500 nM)	0,04** ± 0,00	0,11** ± 0,00	2,53 ± 0,21	13,05	12,63	0,97
	1,05 ± 0,15	2,83* ± 0,41	2,74* ± 0,64	34,34	152,58	4,44
	0,95 ± 0,16	1,84* ± 0,14	1,98* ± 0,42	39,65	126,72	3,20

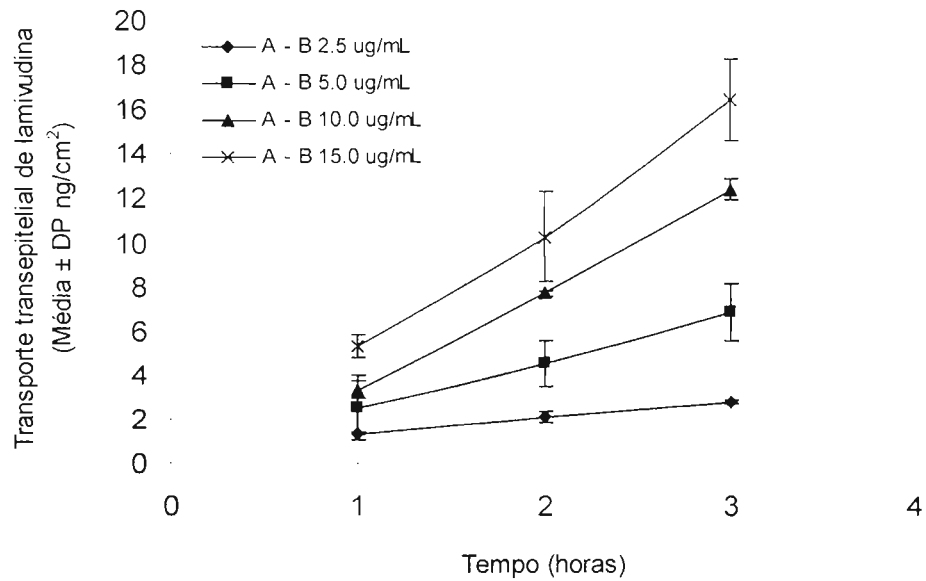
*p < 0,05, diferença estatisticamente observada, usando teste t pareado, bi-caudal.

** p < 0,01, diferença estatisticamente observada, usando teste t pareado, bi-caudal.

7.3.2 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO CONCENTRAÇÃO/PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS LAMIVUDINA E ZIDOVUDINA UTILIZANDO CÉLULAS MDCK, MDCK-MDR1 E CACO-2

Os gráficos representando o transporte transepitelial conjunto de 3TC e ZDV em concentrações iguais e crescentes estão apresentados nas Figuras 7.5 para células MDCK; Figura 7.6 para células MDCK-MDR1 e Figura 7.7 para células Caco-2. Com base nos resultados obtidos é possível observar um aumento no transporte dos fármacos em ambas as direções ($B \rightarrow A$ e $A \rightarrow B$). Os resultados de P_{app} apresentados na Tabela 7.2 demonstraram um aumento para ambos os fármacos, em ambas as direções, utilizando as células Caco-2, diminuíram utilizando as células MDCK e não apresentaram mudanças significativas utilizando células MDCK-MDR1.

(a)



(b)

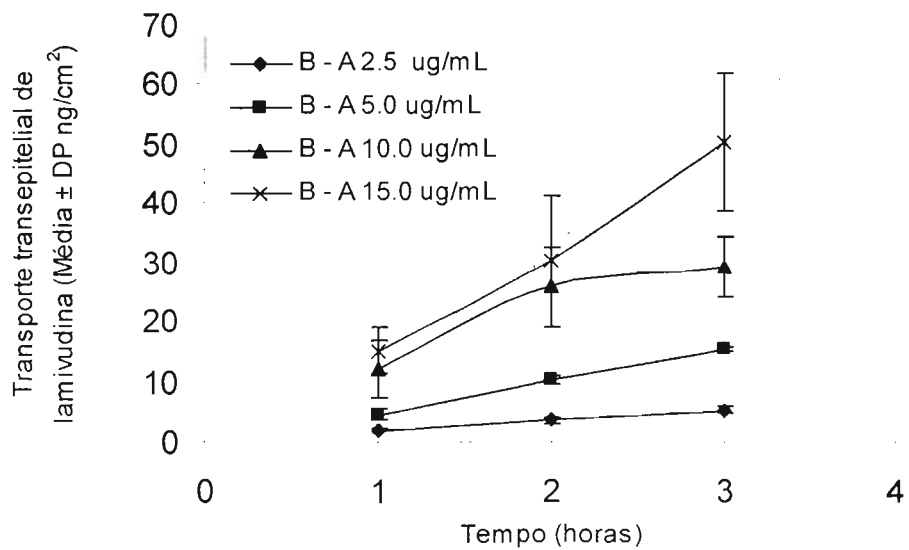
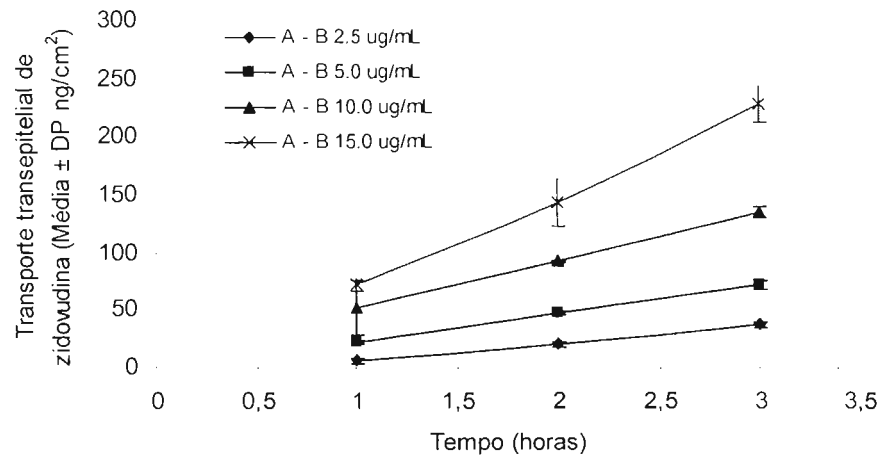


Figura 7.5 Resultados do transporte transepitelial de lamivudina em associação com concentrações iguais e crescentes de zidovudina (de 2,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$) através de células MDCK-MDR1, nas direções A→B (a) e B→A (b).

(a)



(b)

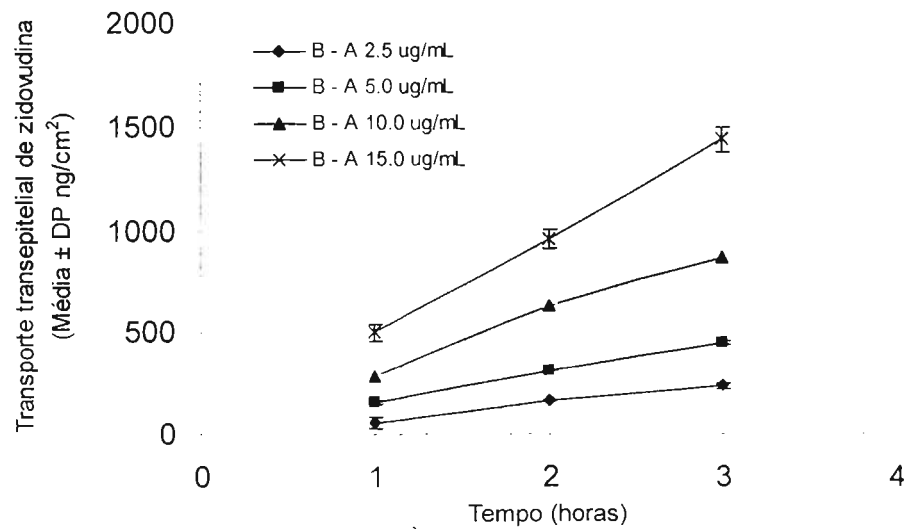
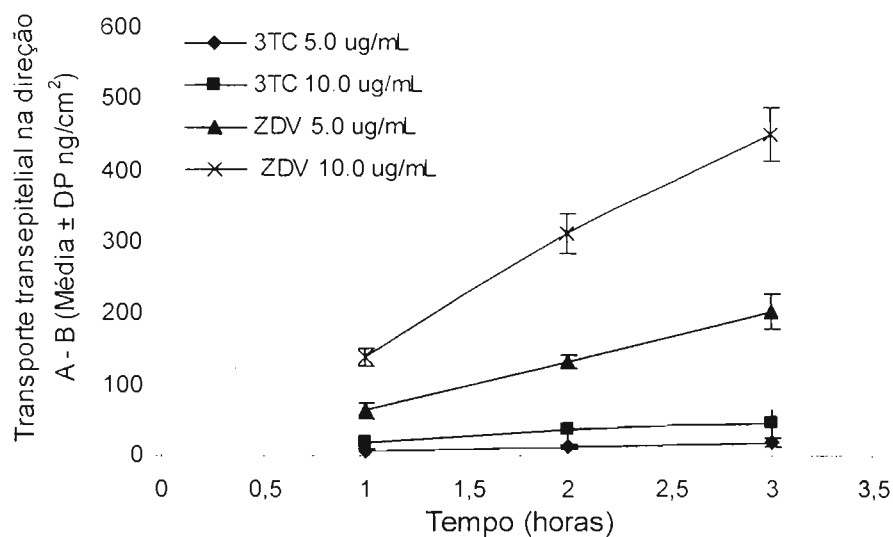


Figura 7.6 Resultados do transporte transepitelial de zidovudina em associação com concentrações iguais e crescentes de lamivudina (de 2,5 a 15 µg/mL) através de células MDCK-MDR1, nas direções A→B (a) e B→A (b).

(a)



(b)

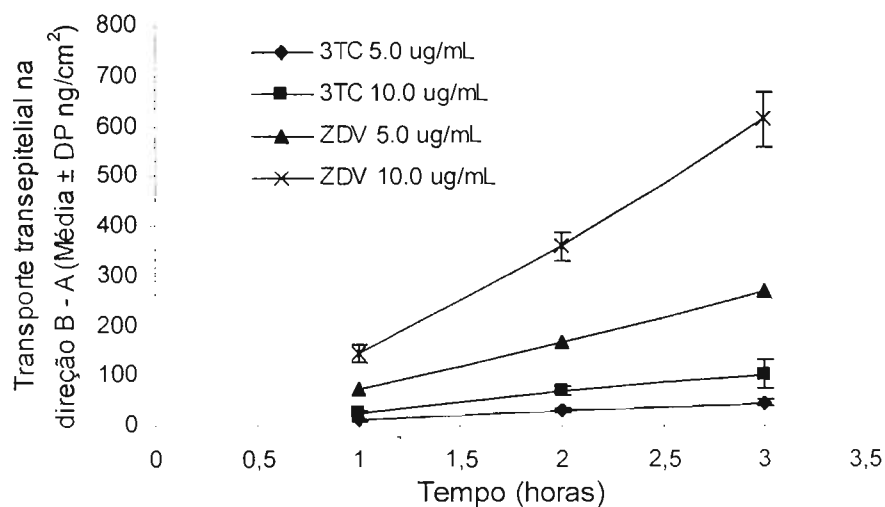


Figura 7.7 Transporte transepitelial de lamivudina e zidovudina associadas em concentrações (5 e 10 ug/mL) iguais e crescentes através de células Caco-2, nas direções A→B (a) e B→A (b).

Os resultados obtidos para lamivudina demonstraram moderada permeabilidade *in vitro*. Estes valores não estão totalmente de acordo com os dados de

biodisponibilidade *in vivo*, que são superiores a 80% (Perry & Faulds, 1997; Souza & Storpirtis, 2004).

Tabela 7.2 Transporte transepitelial conjunto de Zidovudina e Lamivudina através de células da monocamada

Condição	P app (A→B) ± SD (X 10 ⁻⁶ cm/s)	P app (B→A) ± SD (X 10 ⁻⁶ cm/s)	Fluxo (B→A/A→B) ± SD	acúmulo (ng/cm ²)		B→C/ A→C
				A →C	B → C	
MDR1-MDCK (5µg/mL)(18,7µM) (10µg/mL)(37,4µM)	1,39 ± 0,12	8,05 ± 0,50	5,81 ± 0,66	57,02	67,32	1,18
	1,16 ± 0,35	8,61 ± 0,79	7,76 ± 1,95	98,36	104,79	1,07
Zidovudina MDCK (5µg/mL)(18,7µM) (10µg/mL)(37,4µM)	4,34 ± 0,23	3,53 ± 1,73	1,53 ± 1,31	51,25	115,20	2,25
	3,81 ± 0,22	2,54 ± 0,11	0,67 ± 0,06	90,76	163,22	1,80
Caco-2 (5µg/mL)(18,7µM) (10µg/mL)(37,4µM)	38,9 ± 4,12	53,7 ± 2,54	1,38 ± 0,20	154,22	288,68	1,87
	43,27 ± 5,37	65,38 ± 4,32	1,21 ± 0,70	404,46	431,00	1,07
MDR1-MDCK (5µg/mL) (22,3µM) (10µg/mL) (44,6µM)	0,12 ± 0,00	0,30 ± 0,02	2,60 ± 0,35	43,24	27,95	0,65
	0,13 ± 0,00	0,01 ± 0,18	1,93 ± 1,18	55,90	51,82	0,93
Lamivudina MDCK (5µg/mL) (22,3µM) (10µg/mL) (44,6µM)	0,54 ± 0,07	2,71 ± 1,33	7,09 ± 3,85	25,21	116,21	4,61
	0,48 ± 0,05	0,47 ± 0,01	0,99 ± 0,10	49,76	104,89	2,11
Caco-2 (5µg/mL) (22,3µM) (10µg/mL) (44,6µM)	3,46 ± 1,13	8,89 ± 1,02	2,77 ± 1,02	116,51	517,68	4,44
	4,07 ± 1,58	10,50 ± 4,21	3,15 ± 2,07	262,25	621,66	2,37

7.3.3 EFEITOS DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE LAMIVUDINA NO TRANSPORTE DE ZIDOVUDINA ATRAVÉS DAS MEMBRANAS FORMADAS POR MONOCAMADAS DE CÉLULAS CACO-2.

A absorção de um fármaco pode ser alterada pela inibição da secreção (Transporte na direção B→A) deste devido à co-administração de outros fármacos. Esta hipótese foi avaliada determinando-se o transporte de zidovudina em um mesmo sistema contendo concentrações crescentes de lamivudina (Figura 7.8). De acordo com o gráfico é possível verificar que ao se aumentar a concentração de lamivudina, o transporte de zidovudina na direção A →B também aumenta. O efeito da elevação da concentração de lamivudina não é observado no transporte de zidovudina na direção B→A. Na Tabela 7.3 estão apresentados os resultados do transporte bidirecional de zidovudina em células Caco-2. Mesmo sem alterar a concentração de zidovudina, ao se aumentar a concentração de lamivudina é possível observar um aumento na inclinação da reta obtida por meio da quantidade de fármaco em função do tempo. De acordo com os resultados do teste t, a lamivudina apresentou uma influência estatisticamente significativa no transporte de zidovudina na direção A →B, quando sua concentração foi igual a 10µg/mL.

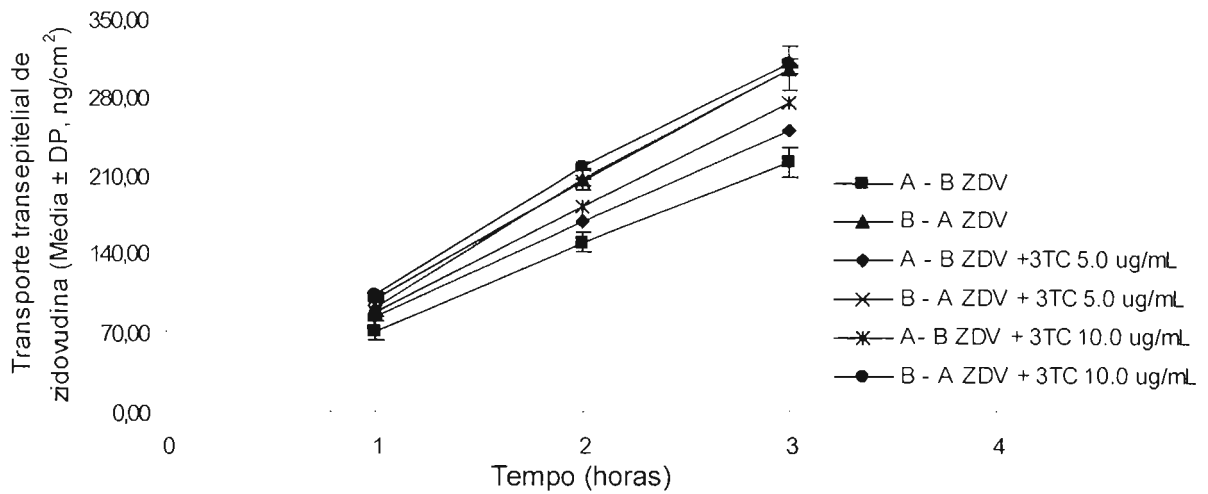


Figura 7.8 Transporte transepitelial de Zidovudina através de células Caco-2 em associação a concentrações crescentes de lamivudina

Tabela 7.3 Resultados referentes ao transporte transepitelial de Zidovudina, através de células Caco-2, na presença de concentrações crescentes de lamivudina

Conc. de Lamivudina	Inclinação dq/dt (n=3)		t teste	
	A → B	B → A	A → B	B → A
Controle (0,0 µg/mL)	0,240	0,285		
	0,191	0,290		
	0,189	0,317		
5,0 µg/mL (18,7 µM)	0,246	0,267	0,275	0,208
	0,222	0,289		
	0,222	0,282		
10,0 µg/mL (37,4µM)	0,267	0,261	0,048*	0,266
	0,243	0,298		
	0,268	0,275		

* Significativamente diferente do controle, p <0,05

7.4 DISCUSSÃO

A elevada expressão de P-gp, um membro da super família (ABC) de transportadores dependentes de ATP, é um dos mecanismos pelos quais as células apresentam resistência aos fármacos durante a terapia antitumoral e anti retroviral (Kim & Benet, 2004). Estudos indicam que muitos hormônios sexuais esteróides são substratos para o transporte mediado pelas P-gps, sendo também capazes de induzir a expressão de P-gp *in vitro*, a nível de proteínas e de RNA mensageiro (Kim & Benet, 2004). Estas informações podem contribuir para entender e prever algumas influências na absorção de 3TC e ZDV, uma vez que ambos os fármacos são substratos para as P-gps. A alta variabilidade na absorção de ZDV, em mulheres, pode ser atribuída a alterações hormonais ocasionadas naturalmente ou pela ingestão de derivados sintéticos de estrógeno e progesterona.

Os resultados do transporte transepitelial de 3TC, com e sem adição de GG 918, apresentaram diferenças entre a utilização das células MDCK-MDR1 e Caco-2. Estas diferenças podem ser devidas à influência de outros transportadores, além das P-gps, na secreção do fármaco.

Uma hipótese seria a ação da proteína relacionada à resistência ao câncer de seio (*Breast cancer resistance protein*) denominada Bcrp, que é outro conhecido transportador da super família ABC. Bcrp é expresso nas membranas de borda em escova, sendo também inibido pela ação de GG 918. Este transportador está relacionado com a secreção de fármacos hidrofóbicos (principalmente anti-tumorais) e como as P-gps podem limitar de maneira semelhante a absorção de fármacos (Burger *et al.*, 2004).

Os estudos de permeabilidade utilizando células Caco-2 possibilitam a obtenção de coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}), que representam a velocidade de difusão do fármaco de acordo com a área da superfície da

membrana e a concentração do fármaco na solução doadora. A comparação dos valores de P_{app} obtidos nas direções absorptiva ($A \rightarrow B$) e secretória ($B \rightarrow A$) pode indicar o envolvimento de mecanismos de transporte ativo. As P-gps podem ser responsáveis pela secreção de fármacos do sangue para o lúmen intestinal (da direção basolateral para apical). O transporte nesta direção pode funcionar como uma barreira na absorção oral de fármacos (Aungst, 1999).

O Sistema de Classificação Biofarmaceutica (SCB) é uma classificação científica de fármacos de acordo com sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior concentração usada farmacologicamente é solúvel em 250 mL ou menos de meio com pH entre 1,0-7,5. A classificação da permeabilidade é baseada diretamente na extensão da absorção intestinal do fármaco em humanos ou indiretamente pela medida da proporção de massa transferida através de membranas intestinais humanas (Yu *et al.*, 2002). Um fármaco é considerado pouco absorvido (0-20%) quando o coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) é menor que 1×10^{-6} , moderadamente absorvido (20-70%) quando está compreendido entre $1-10 \times 10^{-6}$ e bem absorvido (70-100%) quando é maior que 10×10^{-6} (Yee, 1997).

Segundo Aungst (1999), fármacos que são significativamente secretados no intestino podem ter sua absorção afetada em função da dose ou da co-administração de fármacos. Uma consequência desta afirmação é a biodisponibilidade oral dose-dependente, que aumenta com o aumento das doses devido à saturação do transporte secretório. Outra possível observação é a inibição deste transporte pela co-administração de fármacos. Esta hipótese foi avaliada pela determinação da permeabilidade de ZDV concomitantemente ao aumento da concentração de 3TC utilizando células Caco-2 como modelo (Figura 7.8). A 3TC em concentração duas vezes maior a concentração de ZDV ocasionou uma alteração na permeabilidade de ZDV na direção $A \rightarrow B$ (absorção), mas não afetou significativamente o transporte na direção $B \rightarrow A$ (secreção).

7.5 CONCLUSÃO

Os fármacos 3TC e ZDV são substratos para as P-gps, embora não sejam muito afetados por estes transportadores (não são bons substratos). O transporte transepitelial de ambos os fármacos através das células Caco-2 aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração em ambas as direções (A →B e B →A). O transporte de ZDV através das células Caco-2 não mostra mudanças significativas com o aumento da concentração de 3TC, exceto para concentração de 10 µg/mL na direção A→B .

Os resultados do estudo de permeabilidade sugerem que a ZDV tem alta permeabilidade e alta solubilidade, podendo ser classificada como Classe I e a 3TC apresenta moderada permeabilidade e alta solubilidade podendo ser incluída na Classe III do SCB. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que as P-gp não afetam significativamente a absorção de 3TC e ZDV, não podendo explicar a alta variabilidade *in vivo* da absorção de ZDV.

7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, F.Y. Infecções virais. In: PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFAMAN, B.B. *Farmacologia Integrada*. São Paulo: Manole, 1999. P. 445-460.

ARTURSSON, P.; MAGNUSSON, C. Epithelial transport of drug in cell culture. II. Effect of extracellular calcium concentration on paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.79, n.7, p.595-600, 1990.

ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: caco-2 and beyond. *Pharm. Res.*, Norwell, v.14, n.12, p.1655-1658, 1997.

ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial

(Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.175, p.880-885, 1991.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Amsterdam, v.56, p.27-43, 2001.

AUNGST, B.J. P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Amsterdam, v.39, p.105-116, 1999.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, Amsterdam, v.44, p.301-312, 2000.

BENET, L.Z.; WU, C.Y.; HEBERT, M.F.; WACHER, V.J. Intestinal drug metabolism and antitransport processes: a potential paradigm shift in oral drug delivery. *J. Controlled Release*, Saint Louis, v.39, p.139-143, 1996.

BENET, L.Z.; CUMMINS, C.L.; WU, C.Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.277, p.3-9, 2004.

BURGER, H.; VAN TOL, H.; BOERSMA, A.W.M.; BROK, M.; WIERMER, E.A.C.; STOTER, G.; NOOTER, K. Imatinib mesylate (STI 571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, Birmingham, v.104, n.9, p.2940-2942, 2004.

CHO, S.; DANDO, S.; MORRISON, R. Evaluation of biocat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm. Res.*, Norwell, v.14, p.1835-1837, 1997.

CHONG, S.; DANDO, S.A.; SOUCEK, K.M.; MORRISON, R.A. *In vitro* permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of *in vivo* absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. *Pharm. Res.*, Norwell, v.13, p.120-123, 1996.

CHONG, S.; DANDO, S.A.; MORRISON, R.A. Evaluation of Biocoat Intestinal Epithelium Differentiation Environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm. Res.*, Norwell, v.14, p.1835-1837, 1997.

COLLETT, A.; TANIANIS-HUGHES, J.; HALLIFAX, D.; WARHURST, G. Predicting P-glycoprotein effects on oral absorption: correlation of transport in

Caco-2 with drug pharmacokinetics in wild-type and *mdr1a* (-/-) mice *in vivo*. *Pharm. Res.*, Norwell, v.21, n.5, p.819-826, 2004.

CUMMINS, C.L.; JACOBSEN, W.; CHRISTIANS, U.; BENET, L.Z. CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.308, n.1, p. 143-155, 2004.

GERSHANIK, T.; HALTNER, E.; LEHR, C.-M.; BENITA, S. Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with Caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.211, p.29-36, 2000.

GINSKI, J.M.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution-absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.177, p.117-125, 1999.

GINSKI, J.M.; TANEJA, R.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system. *AAPS PharmSci.*, Alexandria, v.1, n.3, p.1-12, 1999.

GRASS, G.; SWEETANA, S. A correlation for permeabilities of passively transported compounds in monkey and rabbit jejunum. *Pharm. Res.*, Norwell, v.6, p.857-862, 1989.

GRES, M.; JULIAN, B.; BOURRIE, M.; ROQUES, C.; BERGER, M.; BOULENC, X.; BERGER, Y.; FABRE, G. Correlation between oral drug absorption in human, and apparent drug permeability in TC-7cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parenteral Caco-2 cell line. *Pharm. Res.*, Norwell, v.15, n.5, p.726-733, 1998.

HORIE, K., TANG, F., BORCHARDT, R.T. Isolation and characterization of Caco-2 subclones expressing high levels of multidrug resistance protein efflux transporter. *Pharm. Res.*, Norwell, v.20, n.2, p.161-167, 2003.

INGELS, F.M.; AUGUSTIJNS, P.F. Biological, pharmaceutical and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.92, n.8, p.1545-1557, 2003.

IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.88, p.28-33, 1999.

JONG, J.C.; WILLEMS, P.H.G.M.; HEUVEL, L.P.W.J.V.D.; KNOERS, N.V.A.M.; BINDELS, R.J.M. Function expression of the human thiazide-sensitive NaCl

cotransporter in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, Hagerstown, v.14, p.2428-2435, 2003.

KATSURA, T.; INUI, K. Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metab. Pharmacokin.*, Tokyo, v. 18, n.1, p.1-15, 2003.

KIM, W.Y.; BENET, L.Z. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)- Mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression *in vitro*. *Pharm. Res.*, Norwell, v.21, n.7, p.1284-1293, 2004.

KOBAYASHI, M.; SADA, N.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K.; MIYAZAKI, K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.221, p.87-94, 2001.

LENTZ, K.A.; HAYASHI, J.; LUCISANO, L.J.; POLLI, J.E. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and a application to the biopharmaceutics classification system. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.200, p.41-51, 2000.

LEUNG, S.; BENDAYAN, R. Role of P-glycoprotein in the renal transport of dideoxynucleoside analog drugs. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, v. 77, p. 625-630, 1999.

PERRY, C.M.; FAULDS, D. Lamivudine. a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*, Auckland, v.53, n.4, p.657-680, 1997.

PUTNAM, W.S.; PAN, L.; TSUTSUI, K.; TAKAHASHI, L.; BENET, L.Z. Comparison of bidirectional cephalixin transport across MDCK and Caco-2 cell monolayers: Interactions with peptide transporters. *Pharm. Res.*, Norwell, v.19, n.1, p.27-33, 2002.

RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G.M. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm. Res.*, Norwell, v.10, n.1, p.113-118, 1993.

SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.40, n.1, p.9-19, 2004.

TANG, F.; HORIE, K.; BORCHARDT, R.T. Are MDCK cells transfected with the human MDR1 gene a good model of the human intestinal mucosa? *Pharm. Res.*, Norwell, v.19, n.6, p.765-772, 2002.

TAVELIN S.; TAIPALENSUU, J.; SÖDERBERG, L.; MORRISON, R.; CHONG, S.; ARTURSSON P. Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. *Pharm. Res.*, Norwell, v.20, n.3, p.397-405, 1999.

YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharm. Res.*, Norwell, v.14, n.6, p.763-766, 1997.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEDHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.L.; LEE, V.H.L.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm. Res.*, Norwell, v.19, n.7, p.921-925, 2002.

WEGMANN, M.; NÜSING, R.M. Prostaglandin E2 stimulates sodium reabsorption in MDCK C7 cells, a renal collection duct principal cell model. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids*, Amsterdam, v.69, p.315-322, 2003.

CONCLUSÃO GERAL

O método cromatográfico desenvolvido para quantificação *in vitro* de lamivudina e zidovudina, mostrou-se preciso e exato.

Os perfis de dissolução obtidos para ambos os produtos, mostraram-se mais semelhantes utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução e possibilitaram maior diferenciação entre os produtos teste e referência, utilizando ácido clorídrico 0,01M. Isto ocorreu tanto para 3TC quanto para ZDV.

Os produtos teste (Furp – Lamivudina + Zidovudina 150 + 300 mg; Lote 9009) e referência (Biovir®, Lote B067171) cumpriram os requisitos necessários, podendo ser considerados equivalentes farmacêuticos.

O método bioanalítico desenvolvido foi adequado para a quantificação de 3TC e ZDV em amostras plasmáticas, possibilitando sua utilização em estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência.

A zidovudina apresentou alta variabilidade na sua absorção, o que pode ser comprovado pelo coeficiente de variação obtido para o parâmetro C_{max} que foi superior a 30%.

Os produtos apresentaram equivalência entre a velocidade e quantidade de lamivudina absorvida e a quantidade de zidovudina absorvida.

Os estudos de permeabilidade possibilitaram classificar ZDV como altamente solúvel e permeável podendo ser incluída na classe I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica e 3TC como altamente solúvel e moderadamente permeável (SCB → classe III).

Ambos são substratos para P-gp porém sem significativa alteração na absorção e os estudos de permeabilidade não puderam explicar a alta variabilidade da ZDV