

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

Tecnologia Analítica em processo (PAT): método espectroscópico
como alternativa ao método clássico para uniformidade de conteúdo
e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos
revestidos

ANDRÉ LUIS DA SILVA NOVAES

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Tecnologia Analítica em processo (PAT): método espectroscópico como alternativa ao método clássico para uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos

ANDRÉ LUIS DA SILVA NOVAES

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências: Fármaco e Medicamentos.

Área de Concentração: Controle e Produção Farmacêuticos

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Novaes, André Luis da Silva
N935t Tecnologia analítica em processo (PAT): método espectroscópico como alternativa ao método clássico para uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos / André Luis da Silva Novaes. -- São Paulo, 2013.
105p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Espectroscopia no infravermelho I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

ANDRÉ LUIS DA SILVA NOVAES

Tecnologia Analítica em processo (PAT): método espectroscópico
como alternativa ao método clássico para uniformidade de conteúdo
e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos
revestidos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/ Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

São Paulo , _____ de _____.

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família, e em especial:

A minha amada esposa, *Renata*, pelo carinho, compreensão e incentivo no decorrer deste trabalho e por não ter permitido que eu esmorecesse diante de todas as dificuldades enfrentadas.

À minha mãe, *Maria Antônia*, e a meu pai, *José Martins* (em memória), pelo exemplo de luta, garra, honestidade e amor. Exemplos que moldaram meu caráter e que ainda hoje direcionam meus passos.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por guiar meus passos e por sempre colocar pessoas iluminadas em meu caminho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, minha estimada escola, e ao programa de Fármaco e Medicamentos por abrir as portas do mestrado mesmo diante da impossibilidade da dedicação exclusiva.

Principalmente à Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pelos seus ensinamentos, pela sua atenção, pelo seu exemplo e por ter acreditado até o final.

Ao Prof. Dr. Felipe Rebello por sua fundamental contribuição para a estruturação deste trabalho.

À Fundação para o Remédio Popular "Chopin Tavares de Lima" - FURP pela oportunidade e pela disponibilização de materiais para o estudo.

À United States Farmacopeia Brasil Ltda, por proporcionar a flexibilidade necessária para a concretização do mestrado, e em especial ao Dr. Luiz Rogério Moreira da Silva e demais colegas do Laboratório de Padrões de Referência, pela compreensão e apoio no decorrer de todo o programa.

Resumo

Novaes, A. L. S. **Tecnologia Analítica em processo (PAT): método espectroscópico como alternativa ao método clássico para uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos**. XXX f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A zidovudina, conhecida como AZT, é um inibidor da transcriptase reversa, enquanto que a lamivudina é um fármaco antirretroviral que atua na inibição da síntese de ácidos nucleicos. Estes são dois dos 21 fármacos componentes dos medicamentos distribuídas pelo Ministério da Saúde Brasileiro em programas de combate a Síndrome da imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS), configurando-se assim uma grande demanda de produção de medicamentos com estes fármacos. Programas de Tecnologia Analítica em Processo (Process Analytical technology - PAT), embasadas por avanços nos guias internacionais da Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requerimentos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para o uso Humano (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH) e pela agência norte-americana para a Administração de Alimentos e Medicamentos (Food and Drugs Administration - FDA), estão ganhando força como alternativas para aumentar a eficiência e a segurança na produção de medicamentos, tanto para aqueles já em processo produtivo como também para medicamentos em fase de desenvolvimento. Estes últimos são denominados desenvolvimento em programas de Qualidade por Design (QbD). Métodos de quantificação por espectroscopia (NIR, MID, RAMAM, entre outras) são reconhecidos como ferramentas para a PAT. Neste contexto propôs-se comparar objetivamente o método tradicional de quantificação destes dois fármacos frente a um método de quantificação desenvolvido utilizando-se a espectroscopia no infravermelho médio (MID). Prepararam-se assim 41 amostras de calibração e 23 amostras de validação, compostas por misturas de zidovudina, lamivudina e placebo (qs) em escala laboratorial, na faixa de 80 a 120% da concentração nominal de uma associação comercial dos dois fármacos. As concentrações de referência de todas as preparações foram determinadas empregando-se o método de referência por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia - USP). Subsequentemente, obtiveram-se cinco espectros no infravermelho de cada uma das preparações, na faixa de 450 a 4000 cm^{-1} . Os espectros foram então pré-processados e utilizados para a construção de um modelo de calibração multivariado por PLS (mínimo quadrados parciais), de acordo com a ASTM E1655-05. Adicionalmente, o método de CLAE foi transferido para um método de UPLC de acordo com o Capítulo Geral <621> descrito no volume 37(3) do Fórum da USP (United States Pharmacopeia). O desempenho do método MID foi então comparado com o método tradicional, bem como com o novo método de quantificação por UPLC. Foram definidas assim regiões de confiança para embasar a utilização dos métodos desenvolvidos. O método de quantificação por MID apresentou uma grande variabilidade enquanto que o método por UPLC foi totalmente comparável com o método tradicional, reduzindo o tempo de corrida de 60 minutos para 12.55 minutos.

Palavras chave: PAT, MID, UPLC, lamivudina e zidovudina.

Abstract

Novaes, A. L. S. **Process Analytical Technology (PAT): spectroscopic method as an alternative to the classical method for content uniformity and quantification of lamivudine and zidovudine in tablets.** XXX f. Thesis (Master in Science: Drug and Medicines) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

Zidovudine, also known as AZT is a reverse transcriptase inhibitor, whereas lamivudine is an antiretroviral drug that acts on the inhibition of nucleic acid synthesis. These are two of the 21 active ingredients components of medicines distributed by Brazilian Health Ministry in programs against the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), becoming thus a great demand for production of these two drugs. Process Analytical Technology (PAT) programs, supported by advances in international guides from the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) and by the FDA (Food and Drugs Administration), are gaining momentum as alternatives to increase efficiency and safety in the production of medicines, both for those medicines already in the production process as well as to those medicines under development. The latter are called Quality by Design (QbD) programs. Spectroscopy quantification methodologies methodologies (NIR, MID, Ramam, among others) are recognized as PAT tools. In this context it was proposed to compare objectively the traditional method for quantification of these two drugs against a quantification method developed using the MID (middle infrared spectroscopy). Thus 41 calibration and 23 validation samples, comprising of laboratorial scale mixtures of lamivudine, zidovudine and placebo (qs), were prepared in the range equivalent to 80 to 120% of the nominal concentration of the commercial tablets product. The concentrations of all calibration and validation samples were determined using the HPLC reference method of USP (United States Pharmacopeia). Subsequently, there were obtained five infrared spectra of each of the preparations in the range 450-4000 cm^{-1} . The spectra were then pre-processed and used to build a multivariate calibration model for PLS (Partial Least Squares) according to ASTM E1655-05. Additionally, the HPLC method was transferred to a UPLC method according to General Chapter <621> described in volume 37 (3) Forum USP (United States Pharmacopeia). The performance of the method MID was then compared with the traditional method and with the new method of quantification by UPLC. Confidence regions were built to support the use of the methods developed. The MID quantification method presented considerable variability, while the method the UPLC method was fully comparable to the traditional method. Another advantage of the UPLC method was the reduction of running time from 60 minutes to 12:55 minutes.

Key word: PAT, MID, UPLC, lamivudine and zidovudine.

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Validação cruzada para amostras de calibração RMSECV pelo número de variáveis espectrais.....	41
Figura 4.1 – Acessório de DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) da marca PiKe (Easydiff) (disponível em: http://www.piketech.com/DR-EasiDiff-TM.html).....	53
Figura 4.2 – Esquema de fracionamento das Amostras do Produto Comercial	54
Figura 4.3 – Intervalos de preparação dos calibradores nas diferentes faixas de concentração.....	55
Figura 4.4 – Fluxograma de preparo das amostras para análise por CLAE.....	58
Figura 4.5 – Representação esquemática dos limites de tolerância obtidos para lamivudina	64
Figura 5.1 – Curva de calibração no infravermelho médio (MID) para a lamivudina	76
Figura 5.2 – Curva de calibração no infravermelho médio (MID) para a zidovudina	79
Figura 5.3: Representação esquemática dos limites de tolerância obtidos para lamivudina	82
Figura 5.4: Representação esquemática dos limites de tolerância obtidos para zidovudina	83
Figura 6.1 – Espectros de Absorção da lamivudina (vermelho) e da zidovudina (preto), obtidos utilizando-se o acessório de Reflectância Difusa.....	86
Figura 6.2 – Concentração lamivudina nas Amostras de Validação (seção 4.2.3): CLAE, UPLC e MID pela respectiva concentração nominal.....	89
Figura 6.3 – Concentração lamivudina nas Amostras de Validação (seção 4.2.3): CLAE, UPLC e MID pela respectiva concentração nominal.....	90
Figura 6.3 – Concentração das Amostras de Validação (seção 4.2.3) por MID versus CLAE - lamivudina.....	92
Figura 6.3 – Concentração das Amostras de Validação (seção 4.2.3) por MID versus CLAE - zidovudina.....	93

Lista de Tabelas

Tabela 5.1 – Concentrações nominais e normalizadas para as <i>Amostras de Calibração</i> (seção 4.2.3)	68
Tabela 5.2 – Concentrações nominais e normalizadas para as <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3).....	69
Tabela 5.3 – Concentração das <i>Amostras de Calibração</i> (seção 4.2.3) por CLAE	71
Tabela 5.4 – Concentração <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3) por CLAE	72
Tabela 5.5 – Concentrações das <i>Amostras do Produto Comercial</i> (seção 4.2.2) por CLAE	72
Tabela 5.6 – Concentração das <i>Amostras de Calibração</i> (seção 4.2.3) por UPLC.....	74
Tabela 5.7 – Concentração das <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3) por UPLC	75
Tabela 5.8 – Concentrações das <i>Amostras do Produto Comercial</i> (seção 4.2.2) por UPLC.....	75
Tabela 5.9 – Quantificação da lamivudina por MID nas <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3) utilizando-se os espectros médios de cada uma das preparações	77
Tabela 5.10 – Quantificação da lamivudina por MID nas <i>Amostras do Produto Comercial</i> (seção 4.2.2) utilizando-se os espectros médios de cada uma das preparações	77
Tabela 5.11 – Estatística Descritiva: Quantificação da lamivudina por MID para as cinco replicatadas das <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3)	78
Tabela 5.12 – Quantificação da zidovudina por MID nas <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3) utilizando-se os espectros médios de Zidovudina cada uma das preparações	80
Tabela 5.13 – Quantificação da zidovudina por MID nas <i>Amostras do Produto Comercial</i> (seção 4.2.2) utilizando-se os espectros médios de cada uma das preparações	80
Tabela 5.14 – Estatística Descritiva: Quantificação da zidovudina por MID para as cinco replicatadas das <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.3)	81
Tabela 6.1 – Coeficiente de ajustamento (R^2) das <i>Amostras de Validação</i> (seção 4.2.2)	90
Tabela 6.2 – Concentrações normalizadas para as <i>Amostras do Produto Comercial</i> (seção 4.2.2) utilizando-se os diferentes métodos	91

Lista de Quadros

Quadro 2.1 – Origem (nacional ou importado) dos antirretrovirais utilizados no SUS) ..	26
Quadro 2.2 – Regiões Espectrais do Infravermelho	35
Quadro 4.1 – Condições cromatográficas do método de referência USP35/NF30	59
Quadro 4.2 – Condições cromatográficas do método de UPLC.....	61
Quadro 4.3 – Parâmetros de calibração PLS para a lamivudina.....	63
Quadro 4.4 – Parâmetros de calibração PLS para a lamivudina.....	64

Lista de Abreviaturas

AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome, ou Síndrome da imunodeficiência Adquirida)

ARVs (Medicamentos Antirretrovirais)

C18 (Octadodecil silano)

CGMP (Current Good Manufacturing Practices , ou Boas Práticas de Fabricação)

CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

CV (Cross Validation, ou validação cruzada)

DAD (Diode Array Detector, ou Detector por Arranjo de Diodos)

DAD (Diode Array Detector, ou Detector por Arranjo de Fotodiodos)

DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy, ou Espectroscopia de Reflectância Difusa com Transformada de Fourier)

DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform, ou Espectroscopia de Reflectância Difusa por Transformada de Fourier)

DST (Doenças sexualmente transmissíveis)

EUA (Estados Unidos da América)

FDA (Food and Drug Administration, ou agência norte-americana para a Administração de Alimentos e Medicamentos)

FURP (Fundação para o Remédio Popular "Chopin Tavares de Lima")

HIV(Human Immunodeficiency Virus, ou Vírus da Imunodeficiência Humana)

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ou Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requerimentos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para o uso Humano).

k (variáveis espectrais, ou comprimentos de onda)

LEI (Limite especificação Inferior)

LES (Limite especificação superior)

LTI (Limite de tolerância inferior)

LTS (tolerância superior)

MID (Middle infrared, ou Infravermelho Médio)

MS/GM (Ministério da Saúde/ Gabinete do Ministro)

NF (National Formulary, ou Formulário Nacional)

OMC (Organização Mundial do Comércio)

PAT (Process Analytical technology, ou Tecnologia Analítica em Processo)

PCC (Parâmetros Críticos de Controle)

PDA (Photodiode Array Detector, ou Detector por Arranjo de Diodos)

PLS (Partial Least Square regression, ou Regressão por Mínimos Quadrados Parciais)

QbD (Quality by Design, ou Qualidade por Design)

RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais)

RMSECV (raiz quadrada da soma do quadrado dos resíduos)

RS (Reference Standard, ou Padrão de Referência)

SUS (Sistema Único de Saúde)

T-CD4 (Linfócitos-T CD4)

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, ou Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

USP (United States Pharmacopeia, ou Farmacopeia Americana)

USP Lamivudine RS (padrão de referência da Farmacopeia Americana para a lamivudina)

USP Zidovudine RS (padrão de referência da Farmacopeia Americana para a zidovudina)

UV (Ultraviolet, ou Ultravioleta)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. AIDS NO BRASIL.....	23
2.1.1. <i>Histórico e Incidência</i>	23
2.1.2. <i>Antirretrovirais (ARVs): acesso universal pelo SUS</i>	25
2.1.3. <i>Pacientes atendidos e critérios de elegibilidade</i>	28
2.1.4. <i>Reflexos da terapia com medicamentos antirretrovirais</i>	29
2.2. PAT: UM DESAFIO À INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	31
2.2.1. <i>Modernização regulatória da FDA</i>	31
2.2.1. <i>Controle intensivo e a modernização da Indústria</i>	31
2.2.1. <i>Programas de Tecnologia Analítica em Processo - PAT</i>	32
2.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	35
2.4. ESPECTROSCOPIA POR REFLETÂNCIA DIFUSA NO INFRAVERMELHO MÉDIO - MID.....	37
2.5. CALIBRAÇÃO DE MULTIVARIADA.....	38
2.5.1. <i>Regressão por Mínimos Quadrados - PLS</i>	38
2.5.2. <i>Construção de modelos de Calibração</i>	39
2.5.3. <i>Validação de modelos multivariados</i>	42
2.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE	43
2.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA – UPLC.....	44
3. OBJETIVO	48
4. MATERIAL E MÉTODO	50
4.1. MATERIAL DE ESTUDO E CONSUMÍVEIS.....	51
4.1.1. <i>Padrões de referência</i>	51
4.1.2. <i>Materiais</i>	51
4.1.3. <i>Equipamentos/ Programas</i>	52

4.2. MÉTODO	53
4.2.1. Instrumentação.....	53
4.2.2. Fracionamento das Amostras do Produto Comercial	54
4.2.3. Preparação das Amostras de Calibração e Validação	54
4.2.4. Preparação da Solução de Padrão dos Fármacos.....	56
4.2.5. Quantificação dos ativos por CLAE.....	57
4.2.6. Quantificação dos ativos por UPLC.....	60
4.2.7. Calibração e quantificação no Infravermelho médio - MID	62
4.2.8. Limites de tolerância.....	64
5. RESULTADOS.....	66
5.2. CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DOS COMPRIMIDOS COMERCIAIS	67
5.3. CONCENTRAÇÃO NOMINAL DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.....	67
5.4. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	69
5.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE	69
5.4.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - UPLC.....	72
5.4.3. Quantificação da lamivudina no Infravermelho Médio – MID	76
5.4.1. Quantificação da zidovudina no Infravermelho Médio – MID	78
5.4.2. Intervalos de Tolerância lamivudina	81
5.4.3. Intervalos de Tolerância Zidovudina.....	82
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO	96
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	98

1. Introdução

A Síndrome da imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS) continua sendo uma grave questão de saúde pública. No final de 2010 estimava-se que mais de 34 milhões de pessoas estariam infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus - HIV) em todo mundo. No Brasil desde 1980 até junho de 2012 foram registrados aproximadamente 656.701 casos de AIDS.

A crescente demanda por medicamentos antirretrovirais (AVRs) tende a pressionar ou mesmo ameaçar a sustentabilidade dos programas do governo brasileiro de livre acesso aos medicamentos antirretrovirais. A continuidade deste programa é principalmente uma questão humanitária e de saúde pública, mas possui também relevante caráter estratégico e financeiro para o país.

É um desafio para a indústria nacional produzir mais, de forma mais eficiente e segura. Neste sentido, quanto mais ferramentas para aumentar a eficiência e reduzir custos forem avaliadas e incorporadas aos processos produtivos, maior será a possibilidade de sustentabilidade do programa brasileiro de livre acesso aos medicamentos AVRs, com simultâneo fortalecimento da indústria farmacêutica local. Naturalmente que o aumento da eficiência e a redução de custos devem ser associados ao incremento da segurança dos medicamentos, e nunca significar um fator de risco à saúde do pacientes.

Em 2002 a agência norte-americana para a Administração de Alimentos e Medicamentos (Food and Drug Administration - FDA) inseriu no contexto farmacêutico a Tecnologia Analítica em Processo (Process Analytical Technology - PAT), ao estimular a indústria farmacêutica a aumentar a introdução de novas pesquisas em tecnologias analíticas. Essa iniciativa abre claramente perspectivas

para a implantação de novas tecnologias no controle de processo, no controle de qualidade de matérias-primas, de produtos intermediários e de produtos acabados.

Na última década números crescentes de aplicações de métodos espectroscópicos têm sido relatadas, nas mais diversas áreas, tais como no desenvolvimento de novos medicamentos, na melhoria de atributos de medicamentos que já estão no mercado, na transferência de processo de da escala semi-industrial para a escala industrial, no monitoramento de reações químicas, no monitoramento e controle de processos, controle de qualidade de medicamentos, identificação de falsificações, dentre outros. Essas tecnologias podem ser empregadas para entender e controlar mais eficientemente os processos produtivos, assegurando assim maior qualidade aos medicamentos acabados.

Internacionalmente agência norte-americana para a Administração de Alimentos e Medicamentos (Food and Drugs Administration - FDA) vem incentivando a adoção de novas tecnologias analíticas ao contexto da produção, garantia de qualidade e controle de qualidade da indústria farmacêutica. Dentre estas tecnologias destacam-se os Programas de Tecnologia Analítica em Processo (Process Analytical technology - PAT), os quais se caracterizam por metodologias científicas para a gestão de riscos e controle dos processo industriais.

Na produção, o emprego de programas PAT possibilita o controle de processo por meio de Parâmetros Críticos de Controle (PCC) e em tempo real, podendo as mensurações serem realizadas nos modos *in line* (medições invasivas ou não invasivas diretamente dentro do processo produtivo), *on line* (medições efetuadas quando a amostra é retirada do processo e retorna ao processo) e *at line* (mensurações efetuadas quando a amostra é retirada e analisada paralelamente ao processo produtivo). O controle amplo e continuado das etapas críticas do processo

produtivo asseguram de forma consistente a qualidade do produto final, abrindo, em estágios mais avançados de entendimento do produto e do processo, a possibilidade da liberação em tempo real.

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com a Fundação para o Remédio Popular “Chopin Tavares de Lima”– FURP, que é um dos principais produtores de medicamentos antirretrovirais do país, entre os quais se destaca a associação lamivudina + zidovudina, na forma de comprimidos revestidos. Esta associação, juntamente com o tenofovir, compõem os medicamentos de primeira escolha para o tratamento inicial dos pacientes que entram em terapia com medicamentos antirretrovirais.

Embora o laboratório produtor disponha de alta capacidade produtiva, o tempo envolvido nas análises de controle em processo e do produto acabado retarda significativamente a liberação dos produtos. Os métodos utilizados para a determinação do teor de princípios ativos e uniformidade de conteúdo empregam cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), perfazendo muitas horas de análise.

Assim, a possibilidade do emprego de programas PAT no controle de qualidade da associação Lamivudina + Zidovudina comprimidos revestidos seria de interesse considerável, uma vez que poderia reduzir o tempo de análise para a liberação dos lotes produzidos, com incremento em sua qualidade.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de calibração multivariada utilizando o método espectroscópico na região do infravermelho médio (middle infrared - MID) para a determinação rápida da uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos. Os resultados obtidos através do modelo de regressão multivariado foram comparados estatisticamente com o método tradicional de

quantificação por CLAE. Paralelamente propôs-se a transferência do método de referência de CLAE para UPLC, o qual foi igualmente avaliado.

2. Revisão da Literatura

2.1. AIDS no Brasil

2.1.1. Histórico e Incidência

Os primeiros casos da Síndrome da imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS) registrados ocorreram nos EUA (Estados Unidos da América) em 1977 e 1978, e só foram diagnosticados como tal em 1982. No Brasil, o primeiro caso ocorreu em 1980 e foi diagnosticado como AIDS também em 1982¹.

Em 1984 ocorreu em São Paulo o primeiro programa de controle da AIDS, promovido pela Secretaria de Estado da Saúde ¹. Em 1985 uma iniciativa federal tornou vigente a primeira portaria do Ministério da Saúde (MS) sobre o tema¹, a Portaria nº 236, de 2 de maio de 1985², a qual criou o Programa de Controle da SIDA ou AIDS, atualmente Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. A criação desta portaria teve como intuito aprovar diretrizes para programas de controle da AIDS, coordenar as ações em vigilância epidemiológica no âmbito nacional, atribuir responsabilidades no âmbito governamental e determinar as medidas a serem tomadas com relação à confirmação e notificação de novos casos, identificação de casos suspeitos e grupos de risco. Alguns grupos, como por exemplo, usuários de drogas injetáveis, profissionais do sexo e homossexuais, estavam mais expostos à contaminação, assim os grupos de risco foram muito enfatizados no início da pandemia. Este foco foi posteriormente substituído pelos comportamentos de risco, uma vez que crescente número de casos passaram a ser registrados em todos os segmentos da sociedade.

Apesar dos esforços iniciais, desde seu surgimento os casos de infecção aumentaram exponencialmente. Em 2011 estimava-se que viveriam no mundo

aproximadamente 34 milhões de pessoas contaminadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus - HIV)³. No Brasil, desde o início da pandemia até junho de 2012, 656.701 casos de infecção pelo HIV foram registrados. Neste mesmo período, registraram-se 65.500 gestantes e 17.539 menores de cinco anos portadores do vírus. No país, os casos de óbitos, em decorrência de complicações da AIDS, de 1980 até 2011 já somavam 253.706 casos⁴.

Considerando-se os casos confirmados/ notificados de AIDS e excluindo-se os óbitos, viveriam no Brasil aproximadamente 400 mil portadores do vírus HIV. No entanto, estimativas populacionais apontam para números bem maiores. Em 2006 estimava-se que aproximadamente 630 mil pessoas estariam infectadas no país⁵. Assim, pode-se considerar que milhares de pessoas vivem no Brasil ignorando o fato de serem portadores do HIV. Este desconhecimento pode explicar o motivo pelo qual o número de pessoas contaminadas continua aumentando. Em 2000 foram registrados 30.297 novos casos da doença e em 2009, ano da última estimativa realizada, registrou-se 37.539 novos casos, aumento de quase 23%⁶. Fatores comportamentais também podem ser apontados como responsáveis pelo aumento no número de casos. Apesar de todas as campanhas de conscientização promovidas pelo Ministério da Saúde e do volume de informações disponíveis sobre a prevenção da AIDS e de Doenças sexualmente transmissíveis (DST), em 2008 registrou-se que apenas 59,9% dos indivíduos entre 14 e 54 anos afirmaram que haviam utilizado preservativos na última relação sexual com parceiros casuais, considerando os 12 meses anteriores⁷.

Com relação à incidência populacional, este indicador está relativamente estável desde 2002. Aproximadamente 17,9 novos casos de infecção são notificados

anualmente para cada 100.000 habitantes⁸. Por ser a região mais populosa, a região sudeste concentra o maior número de registros da doença, com 367.540 casos, aproximadamente 56% de todas as notificações da doença no período de 1980 a junho de 2012⁴. Considerando-se todas as regiões do país, desde 2000 até 2008 registram-se declínios na taxa de incidência populacional nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, enquanto que houve aumento deste índice nas regiões Norte, Nordeste e Sul⁵.

2.1.2. Antirretrovirais (ARVs): acesso universal pelo SUS

O governo brasileiro iniciou a distribuição gratuita do antirretroviral zidovudina através do SUS (Sistema Único de Saúde) em 1991⁹. Em 1996 foi aprovada a Lei nº 9.313, de 13 novembro de 1996¹⁰, a qual dispõe sobre a universalidade de acesso aos medicamentos para o tratamento de portadores do vírus HIV bem como dos doentes de AIDS. Esta lei prevê ainda uma revisão anual das estratégias de combate a AIDS, visando inclusive à inclusão de fármacos mais modernos.

Na Portaria nº 533, de 28 de março de 2012¹¹, o Ministério da Saúde publicou a lista de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME, a RENAME/2012¹². De acordo com esta relação o Ministério da Saúde disponibilizou, para a utilização no SUS, 21 fármacos componentes dos diversos medicamentos antirretrovirais, os quais podem ser classificados em três categorias distintas, ou seja, os inibidores de protease, os inibidores de transcriptase reversa não-nucleosídeos e os inibidores da transcriptase reversa. Destes fármacos, 10 deles possuem medicamentos produzidos no país, enquanto que 11 são componentes de medicamento importados¹³. No total 43 medicamentos antirretrovirais fazem parte da RENAME/12¹², destes 14 são produzidos no Brasil,

enquanto que 29 são comprados diretamente dos laboratórios internacionais (Quadro 2.1)⁸.

Origem dos Antirretrovirais utilizados no SUS	
Nacional	Importado
Didanosina (ddl) 4g pó para solução oral	Abacavir (ABC) 300mg
Efavirenz (EFZ) 600mg	Abacavir (ABC) 300mg
Estavudina (d4T) 30mg	Atazanavir (ATV) 150mg*
Estavudina (d4T) 1mg/ml pó para solução oral	Atazanavir (ATV) 200mg
Indinavir (IDV) 400mg	Atazanavir (ATV) 300mg
Lamivudina (3TC) 150mg	Darunavir (DRV) 75mg
Lamivudina (3TC) 10mg/ml solução oral	Darunavir (DRV) 150mg
Nevirapina (NVP) 200mg	Darunavir (DRV) 300mg
Saquinavir (SQV) 200ml	Didanosina (ddl) EC 250mg
Tenofovir (TDF) 300 mg	Didanosina (ddl) EC 400mg
Zidovudina (AZT) 100mg	Efavirenz (EFZ) 200mg
Zidovudina (AZT) 10mg/ml solução injetável	Efavirenz (EFZ) 30mg/ml solução oral
Zidovudina (AZT) 10mg/ml solução oral	Enfuvirtida (T-20)
Zidovudina (AZT) 300mg + Lamivudina (3TC) 150mg (associação com dosagem fixa)	Etravirina 100mg
	Fosamprenavir (FPV) 700mg
	Fosamprenavir (FPV) 50mg/ml solução oral
	Lopinavir/Ritonavir (LPV/r) 100/25mg
	Lopinavir/Ritonavir (LPV/r) 200/50mg
	Lopinavir/Ritonavir (LPV/r) 80/20mg/ml solução oral
	Nevirapina (NVP) 50mg/5ml suspensão oral
	Oseltamivir 30 mg*
	Oseltamivir 45 mg*
	Oseltamivir 75 mg*
	Raltegravir 400mg
	Ritonavir (RTV) 100mg
	Ritonavir 80mg/ml solução oral
	Tipranavir 250 mg
	Tipranavir 100mg/ml solução oral
	Zanamivir 5 mg pó inalante*

*Descritos na RENAME/2012¹²

Quadro 2.1 – Origem (nacional ou importado) dos antirretrovirais utilizados no SUS)

Um acordo recente incluirá também, a partir de 2015, o atazanavir como um dos fármacos componentes de medicamentos fabricados no Brasil¹⁴.

Apesar de controverso, uma vez que os licenciamentos e ameaças de licenciamentos compulsórios de medicamentos antirretrovirais, praticados pelo governo brasileiro, violam as regras internacionais de direito a propriedade intelectual, o programa brasileiro de livre acesso aos medicamentos antirretrovirais é considerado um modelo de ação pública. O Brasil foi o primeiro país de renda média a oferecer acesso gratuito aos medicamentos antirretrovirais, e mesmo com as crescentes pressões internacionais, principalmente das grandes companhias farmacêuticas, as quais exigiram retaliações na Organização Mundial do Comércio (OMC), o Brasil tem sido hábil em manter, nacional e internacionalmente, uma imagem de soberania, pioneirismo e respeito aos direitos humanos graças a sua política de enfrentamento à epidemia de AIDS⁹.

Estima-se que no período de 2000 a 2007 aproximadamente dois bilhões de dólares tenham sido gastos em procedimentos laborais, procedimentos ambulatoriais, internações hospitalares, aquisição de medicamentos antirretrovirais, políticas de incentivo, entre outros gastos, relacionados ao combate e prevenção à AIDS. Deste total aproximadamente 1,5 bilhões de dólares foram gastos com a aquisição de medicamentos antirretrovirais¹⁵. Em 2010 estimava-se que o valor total pago por internações no SUS, em decorrência de complicações da AIDS, desde o início a epidemia no Brasil, pudesse chegar a 11 bilhões de dólares¹⁶. É exatamente neste ponto, que a política de livre acesso a medicamentos antirretrovirais mostra-se de vital importância estratégica e financeira, pois as estimativas mostram que para cada dólar gasto na aquisição de medicamentos antirretrovirais gera-se uma economia de dois dólares em custos de hospitalização⁹.

2.1.3. Pacientes atendidos e critérios de elegibilidade

Atualmente mais de 200.000 portadores do vírus HIV recebem terapia com medicamentos antirretrovirais e medicamentos associados ao tratamento da AIDS^{17;18}. Este número corresponde a 95,3% dos indivíduos com contagem de células T-CD4 inferior a 200/mm³, critério atual de elegibilidade para o início da terapia com medicamentos antirretrovirais¹⁹. Um pronunciamento recente do Ministério da Saúde comunicou oficialmente uma revisão destes critérios para o início da terapia com medicamentos antirretrovirais. Devido a esta revisão seriam incluídos no programa outros 35 milhões de portadores do HIV, os quais ainda não estão sob terapia por não se enquadrarem nos critérios de elegibilidade atuais²⁰. Segundo esta nova diretriz, serão incluídos no programa todos os pacientes sintomáticos, independentemente da contagem de T-CD4, todos os paciente assintomáticos com contagem de T-CD4 inferior a 500 células/mm³ e todos os pacientes com contagem de T-CD4 maior do que 500 células/mm³, porém com infecção concomitante pela hepatite B e com indicação para o tratamento da mesma. A critério médico, serão incluídos ainda todos os pacientes com contagem de T-CD4 maior do que 500 células/mm³, porém com alto risco de desenvolverem doenças cardíacas, pacientes com contagem de T-CD4 maior do que 500 células/mm³, porém que apresentem neoplasias que necessitam de tratamento imunossupressor e gestantes independentemente da contagem de T-CD4. No caso de parceiros soro discordantes, o casal deverá ser orientado com relação à profilaxia por meio da utilização de medicamentos antirretrovirais. Pacientes não enquadrados nas categorias acima mencionadas e sem o exame de contagem de linfócitos T-CD4, não devem iniciar terapia com medicamentos antirretrovirais.

2.1.4. Reflexos da terapia com medicamentos antirretrovirais

Se comparado com o número total estimado de infectados, o número de pacientes em tratamento pode estar subdimensionado. No entanto, muitas consequências diretas já podem ser enumeradas como, por exemplo, o aumento da expectativa de vida, a redução das hospitalizações de pacientes em terapia com medicamentos antirretrovirais e uma relativa melhora na qualidade de vida destes pacientes.

A sobrevida mediana dos pacientes diagnosticados com AIDS entre 1980 e 1989 era de apenas 5.1 meses. Esta expectativa aumentou para 18 meses em pacientes diagnosticados em 1995 e 58 meses para aqueles diagnosticados em 1996²¹. Atualmente esta expectativa de vida pode ser ainda maior. Considerando-se um estudo realizado nas regiões Sul e Sudeste do país com pacientes diagnosticados em 1998 e 1999 não foi possível determinar o corte exato da mediana de sobrevida dos pacientes, uma vez que ao final do estudo aproximadamente 59% do pacientes apresentaram sobrevida maior do que 108 meses (nove anos)²². Este estudo apontou o diagnóstico precoce e a terapia com medicamentos antirretrovirais como sendo decisivos para o aumento da expectativa de vida dos pacientes.

Adicionalmente, a taxa de hospitalização dos pacientes em terapia com medicamentos antirretrovirais também apresentou decréscimo significativo, passando de 0,63 em 1998 para 0,13 em 2008²³. Em 2010 registrou-se uma taxa de hospitalizações de 0,18 em pacientes que utilizavam medicamentos antirretrovirais²⁴.

Outro fator que deve ser considerado é a qualidade de vida (QV) de pacientes crônicos, ponto de preocupação da Organização Mundial de Saúde (OMS). A própria

definição de saúde da OMS coloca o bem-estar mental e social no mesmo nível do bem-estar físico:

“saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não apenas a ausência de doenças”²⁵.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta uma diretriz específica elaborada para a definição e avaliação da qualidade de vida dos pacientes HIV/AIDS²⁶. Esta avaliação é multifatorial, sofrendo, portanto, a influência de fatores diversos como a coexistência de outras doenças associadas à síndrome, a manifestação com maior ou menor intensidade de efeitos colaterais devido à medicação, a baixa sensação de independência pelo uso permanente de medicações, a condição socioeconômica, a utilização de drogas de abuso, a escolaridade do paciente, a idade, o sexo, dentre outros fatores^{23;27}. Ainda assim, é um consenso que pacientes com baixas contagens de células T-CD4 e altas cargas virais (CV), são mais suscetíveis aos sintomas da doença, a infecções oportunistas e conseqüentemente passam a apresentar baixas percepções de boa saúde e qualidade de vida^{23;28}. Adicionalmente, o acompanhamento adequado dos pacientes HIV/AIDS e a sensação de estarem em estágios avançados de tratamento, como por exemplo, a utilização de mais que quatro regimes diferentes de medicamentos antirretrovirais, foram considerados fatores importantes para a adesão dos pacientes ao tratamento²⁹. Menores níveis de T-CD4 e altos níveis de carga viral, no entanto, foram encontrados em pacientes que abandonaram o tratamento. A aderência à terapia é igualmente multifatorial e de complexo dimensionamento. No entanto, estudos mostraram que cerca de 25% dos pacientes em terapia com AVR não apresentam boa aderência ao tratamento^{30;31}.

2.2. PAT: Um desafio à Indústria Farmacêutica

2.2.1. Modernização regulatória da FDA

Em agosto de 2002, a agência norte-americana para a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) anunciou uma iniciativa denominada de “Boas Práticas de Fabricação para o Século XXI”. Esta iniciativa caracterizava uma nova tendência na regulamentação dos conceitos adotados para melhoria e modernização da qualidade no âmbito da produção e controle da indústria farmacêutica, considerando medicamentos de uso humano, veterinário e produtos biológicos³². Assim as legislações referentes à produção de medicamentos, insumos e ativos, bem como os programas de controle de qualidade foram revisadas. Esta iniciativa teve como focos principais encorajar a adoção de novas tecnologias pela indústria nas áreas de produção, garantia e controle de qualidade, facilitar a submissão à FDA de métodos alternativos e a adoção de sistemas da gestão de risco pela indústria. Adicionalmente, a FDA procurou endereçar as incertezas na análise dos termos regulatórios e assegurar que suas políticas de inspeção estivessem baseadas no estado da arte em Ciências Farmacêutica.

As ações da FDA foram norteadas pela análise de risco, pelo embasamento científico, pela busca de sistemas de qualidade integrados e pela busca de cooperação internacional. Contudo, o foco principal permaneceu o mesmo, que é a minimização dos riscos à saúde associados à produção de medicamentos³².

2.2.1. Controle intensivo e a modernização da Indústria

No passado, devido a grande incerteza com relação à fabricação de medicamentos, a FDA buscava controlar cada mínimo aspectos dos processos

produtivos. Se por um lado este controle promoveu uma grande padronização, por outro lado a indústria farmacêutica tem sido relutante em modernizar seus processos e equipamentos pela percepção de que estas mudanças podem ocasionar entraves regulatórios³². Adicionalmente, produtos antigos avaliados por novas tecnologias por vezes resultam em novos questionamentos regulatórios. No geral, certos problemas no processo produtivo podem não ser visíveis sob a ótica dos sistemas de controle atuais.

Neste cenário a indústria não desenvolveu sua completa potencialidade, uma vez que nos últimos anos significativos avanços ocorreram nas áreas de tecnologia de fabricação³³, sistemas de gerenciamento da qualidade e de riscos. Tais avanços incorporam mecanismos capazes de detectar, analisar, prevenir ou corrigir problemas e acumular dados históricos por lote, os quais podem ser utilizados para aumentar a robustez e garantir a melhoria contínua dos processos produtivos.

A modernização da indústria incorpora assim maior qualidade, menor número de erros, retrabalhos e conseqüentemente maior eficiência. Adicionalmente, um maior controle e conhecimento sobre os processos produtivos determinam maior confiabilidade e segurança dos medicamentos para a população³².

Um grande esforço vem sendo empreendido pelo FDA para difundir a percepção de que a adoção de novas tecnologia de controle baseadas em análise de risco por parte da indústria farmacêutica podem coexistir com os atuais sistemas de garantia da qualidade implementados baseados nos guias para as Boas Práticas de Fabricação (Current Good Manufacturing Practices - CGMP)³⁴.

2.2.1. Programas de Tecnologia Analítica em Processo - PAT

Na última década quantidades consideráveis de pesquisas e desenvolvimentos empregando métodos espectroscópicos na região do Infravermelho Próximo (Near infrared – NIR) têm sido realizados . Esta tendência pode ser explicada principalmente pela publicação pelo FDA de um guia voltado especialmente para a implementação de programas de Tecnologia Analítica em Processo (Process Analytical technology – PAT)³⁵ na indústria farmacêutica. Os métodos espectroscópicos associados a avanços na área da quimiometria constituem as principais ferramentas para a implementação de programas PAT^{36,37,38}. As principais vantagens deste tipo de metodologia constituem-se na rápida aquisição de dados, na possibilidade da utilização de medições não invasivas, não destrutivas, empregando mínima preparação de amostras e a compatibilidade testes métodos para utilização por meio de sondas. Outra vantagem é que os métodos espectroscópicos podem oferecer uma ampla gama de informações a respeito do processo, tanto de natureza química quanto de natureza físico-química, dependendo da região e da técnica escolhida para o monitoramento.

Todas estas características contribuem para a utilização destas técnicas no controle do processo produtivo, podendo este ser realizado em modo on-line, in-line ou at-line. O termo "On-line" refere-se ao controle simultâneo de um processo ou etapa do processo produtivo. "In-line" refere-se ao monitoramento efetuado dentro do reactor, misturador, liofilizador, etc, enquanto que a mensuração realizada paralelamente a linha de produção, ou seja, nas imediações desta, é denominado monitoramento "at-line"⁰⁵¹.

A FDA, com o seu guia para indústria sobre métodos inovadores de desenvolvimento, fabricação e garantia da qualidade³⁵, procurou estimular a inovação e o aumento da eficiência da indústria farmacêutica, incentivando o

desenvolvimento de métodos alternativos de controle e liberação de insumos farmacêuticos e medicamentos, baseados em princípios científicos e ferramentas que suportem as tomadas de decisão imediata sobre o processo de fabricação. Neste guia a FDA também enfatiza que este tipo de abordagem não constitui entraves regulatórios para a aprovação de registro de produtos, ou alterações envolvendo produtos que já se encontram no mercado³⁵. Desta forma, a implementação da PAT, pela adoção de sistemas para análise e controle contínuos do processo de fabricação, por meio de medidas em tempo real de atributos das matérias-primas, materiais em processo e processados para assegurar a qualidade do produto terminado, ganhou relevância.

Além dos aspectos importantes já mencionados, a PAT pode ser utilizada nas diversas fases de desenvolvimentos de medicamentos, desde de a escala de bancada até a transposição do processo para a escala industrial. Para medicamentos já comercializados, ela pode ser utilizada para melhorar a eficiência do processo produtivo; melhorar atributos do produto ou, em estágios mais avançados de conhecimento do produto e do processo, a PAT poderá substituir o atual teste para o controle final de liberação, como no caso de liberação paramétrica para produtos estéreis³⁸.

De forma convencional, o controle de processo corresponde à análise química ou física dos materiais *in line* ou *on line*. O escopo clássico dessa abordagem tradicional preconiza os testes para liberação final do produto terminado. Entre as vantagens dos programas que utilizam conceitos da PAT em relação à análise laboratorial convencional destacam-se: i) a velocidade da análise permitindo rápida retroalimentação do sistema de qualidade; ii) a eliminação da amostragem manual,

com ganho em segurança, ao eliminar erros do operador e a possibilidade de se manter a integridade da amostra.

2.3. Espectroscopia no infravermelho

A região do infravermelho (IV) compreende a radiação com número de onda no intervalo de 12500 a 10 cm^{-1} , ou comprimento de onda de 0,78 a 1000 μm . Esta região pode ser dividida em três subgrupos, ou seja, infravermelho próximo (Near Infrared – NIR), infravermelho médio (Middle Infrared – MID) e infravermelho distante (Far Infrared – FAR). Os limites de cada uma das regiões são apresentados no Quadro 2.2 ³⁹.

Região	Tipo de Absorção	Intervalo de Número de onda (cm^{-1})	Região em comprimento de onda (μm)
Próximo (NIR)	Região de Sobretons	12500 a 4000	0,8 a 2,5
Médio (MID)	Região de vibração/rotação	4000 a 200	2,5 a 50
Distante (FAR)	Região de Rotação	200 a 10	50 a 1000

Quadro 2.2 – Regiões Espectrais do Infravermelho

A região do infravermelho próximo (NIR - 12800 a 4000 cm^{-1}) é principalmente utilizada em aplicações para análises quantitativas de compostos orgânicos, tanto de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, sendo empregada nas mais diversas áreas e setores industriais. A região do infravermelho médio (MID - 4000 a 200 cm^{-1}) é certamente a que possui o maior número de pesquisas e aplicações. Esta região começou a ser utilizada nos anos 50 para análise qualitativa de compostos orgânicos, uma vez que esta região espectral apresenta grande quantidade de informações que podem ser utilizadas para a caracterização de grupos funcionais. O

desenvolvimento de novas tecnologias instrumentais e de interfaces com programas capazes de gerar modelos de calibração multivariada permitiu a utilização desta região espectral também em aplicações quantitativas. A região espectral do infravermelho distante (FAR - 200 a 10 cm^{-1}) é utilizada principalmente em aplicações com compostos inorgânicos⁴⁰.

Independentemente da região espectral utilizada, os espectros de IR são originados a partir de transições energéticas de uma molécula de um estado vibracional para outro. As ligações entre os átomos que compõem uma molécula vibram em frequências que podem variar na medida em que as moléculas absorvem ou liberam energia para o meio. Em aplicações do infravermelho, ocorrem transições vibracionais/ rotacionais quando as moléculas absorvem luz ressonante em frequências particulares e são excitadas para níveis de energia mais altos. A frequência particular capaz de causar transições energéticas é específica de acordo com os átomos componentes da molécula, tipos de ligação e grupos funcionais presente na molécula. Na região do MID, especialmente na região espectral de 1200 cm^{-1} a 700 cm^{-1} , ocorrem principalmente transições fundamentais, dando origem a uma região conhecida como região de impressão digital. Por essa razão a região do MID foi inicialmente utilizada na identificação de compostos orgânicos. Por outro lado, na região do NIR, existem dois tipos principais de fenômenos vibracionais denominados bandas de sobretoms, que ocorrem na região de 12800 cm^{-1} a 5500 cm^{-1} , e bandas de combinação, que ocorrem na região de 5500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Estes fenômenos vibracionais devem-se principalmente a estiramentos e deformações angulares de transições fundamentais não sendo possível associá-las a grupos funcionais específicos. Assim, essa região é útil na análise quantitativa e não na análise qualitativa de compostos orgânicos³⁹.

2.4. Espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio - MID

Análises de amostras sólidas no infravermelho podem ser realizadas utilizando-se métodos por transmissão ou métodos por reflectância. Em aplicações de métodos por transmissão as amostras são dispersas em uma matriz não absorvente como, por exemplo, o KBr, e a radiação atravessa esta preparação com caminho óptico fixo para todos os números de comprimento de onda. Métodos por reflectância são comumente utilizados na análise de amostras sólidas pulverizadas, sem a necessidade da dispersão em matriz não absorvente ⁴⁰

Nas aplicações de métodos por reflectância a radiação incide diretamente na amostra, é refletida e detectada, sendo a porção refletida utilizada na construção dos espectros de absorção. Neste tipo de aplicação, o caminho óptico é variável, uma vez que radiações com número de onda que não são absorvidos penetram mais profundamente na amostra do que aqueles que são absorvidos ⁴⁰.

A Espectroscopia de Reflectância Difusa com Transformada de Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy - DRIFTS) tem sua aplicação prática bastante difundida na literatura, podendo ser utilizada em equipamentos que operam na região do infravermelho próximo ⁴⁰, no entanto, os mesmos princípios são aplicáveis para a calibração no infravermelho médio⁴¹.

Este tipo de aplicação foi até recentemente pouco utilizada em análises quantitativas, devido a limitações inerentes à técnica. Porém, a utilização da transformada de Fourier, das recentes evoluções das técnicas quimiométricas e do advento de programas de computador integrados, capazes de gerar modelos de calibração multivariados, é cada vez mais comum no desenvolvimento de métodos para análise de misturas complexas, como os medicamentos, empregando-se preparações mínimas ou inexistentes. Este tipo de aplicação do método de

refletância difusa abre a possibilidade de análises de fármacos com extrema rapidez, tanto para identificação quanto para análises quantitativas ⁴⁰.

2.5. Calibração de Multivariada

2.5.1. Regressão por Mínimos Quadrados - PLS

O termo PLS é utilizado para descrever uma série de algoritmos matemáticos utilizados para correlacionar o espectro medido para um conjunto de amostras de calibração com seus respectivos valores de referência. Os valores de referência podem ser mensurações de propriedades ou de concentrações de componentes, obtidos a partir testes de referência. O objetivo principal é a construção de modelos de calibração multivariados que podem ser aplicados ao espectro de amostras em análise, para estimar suas propriedades ou concentrações desconhecidas de seus componentes. Esta técnica é tipicamente utilizada para a construção de modelos multivariados lineares, ou seja, assume-se que a propriedade ou concentração do componente investigado pode ser modelado como uma função linear do espectro obtido para a amostra em estudo⁴¹.

Em linhas gerais, a técnica de regressão linear múltipla por PLS envolve a aplicação da expressão clássica da lei de Beer-Lambert à espectroscopia:

$$A = KC \text{ (ou } dA / d\lambda = KC)$$

Onde, as matrizes A e $dA/d\lambda$ representam respectivamente a ordem-zero de absorção e as matrizes de absorção derivativa; C representa a matriz de concentração, e K é o coeficiente de calibração da matriz ³⁷.

A técnica de PLS só pode ser aplicada a sistemas onde todos os componentes da amostra são conhecidos. Se houver a possibilidade de contaminantes nas amostras, ou houver componentes desconhecidos, os quais não foram considerados nas misturas das amostras de calibração, o modelo não será capaz de prever as concentrações de constituintes com precisão^{37,41}.

2.5.2. Construção de modelos de Calibração

Para a o desenvolvimento de modelos de calibração multivariados é necessário o estabelecimento de amostras de calibração as quais devem, idealmente: i) conter todos os componentes que estarão presentes nas amostras a serem analisadas pelo modelo; ii) conter concentrações dos componentes que extrapolem aquelas esperadas para as amostras a serem quantificadas; iii) conter concentrações representativas, uniformemente distribuídas ao longo de toda a faixa de calibração, podendo-se adicionar mais amostras de nas regiões da faixa de calibração onde se deseje aprimorar a quantificação; iv) conter quantidades de amostras suficientes para que se possa definir estatisticamente as relações entre os espectros das amostras e as propriedades ou concentrações de componentes a serem modeladas ⁴¹.

Para misturas simples, as amostras de calibração podem ser preparadas para atender todos os requerimentos citados acima. No caso de misturas complexas, a obtenção de um conjunto ideal de amostras de calibração torna-se muito difícil, se não impossível. Neste caso o modelo de calibração deve ser testado estatisticamente para garantir sua validade⁴¹.

O número de amostras necessárias para o desenvolvimento de uma modelo de calibração multivariado depende da complexidade das amostras a serem

analisadas. Se a amostra a ser analisado conter poucos componentes que variam em concentração uma pequeno número de amostras de calibração será adequando para definir a correlação entre as variáveis e as concentrações ou propriedades. No entanto, se é esperado que a concentração de muitos componentes variem na amostra a ser analisada, então muitas amostras de calibração serão necessárias para a construção do modelo. A estimativa do número adequado de amostras de calibração necessárias somente pode ser realizada após o desenvolvimento do modelo e avaliação do número de variáveis espectrais (k), ou seja, número de comprimentos de onda entregados na construção do modelo⁴¹

Se o modelo de calibração utilizar três ou menos variáveis espectrais, então um mínimo de 24 amostra de calibração deverão ser utilizadas após a eliminação dos outliers. Para modelos de calibração construídos com mais de três variáveis espectrais, um número mínimo de amostras de calibração igual a $6k$ deverá ser empregado⁴¹.

A otimização do modelo de calibração pode ser realizado via software, selecionando-se as regiões e o número de variáveis espectrais necessárias para o melhor ajustamento possível da reta de regressão multivariada.

Um dos métodos quimiométricos mais utilizados para a determinação do número ideal de variáveis espectrais (k) a serem utilizadas no modelo de calibração é conhecido como validação cruzada (ou Cross Validation - CV). Este método baseia na capacidade de precisão do valor de uma amostra de calibração utilizando-se um modelo de calibração gerado pela demais amostras. Cada uma das amostras é progressivamente deixada de fora (método leave-one-out, ou deixe-uma-fora) e tem seu valor estimado pelas demais. O processo é repetido até que todas as amostras

tenham sido previstas e a raiz quadrada da soma do quadrado dos resíduos (RMSECV) é calculado como:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (y_x - y_i)^2}{n}}$$

Onde y_x é o valor previsto e y_i é o valor de referência. Os valores de RMSECV são então plotados em um gráfico onde as abcissas representam o número de variáveis espectrais e as coordenadas representam os valores de RMSECV calculados (Figura 2.1).

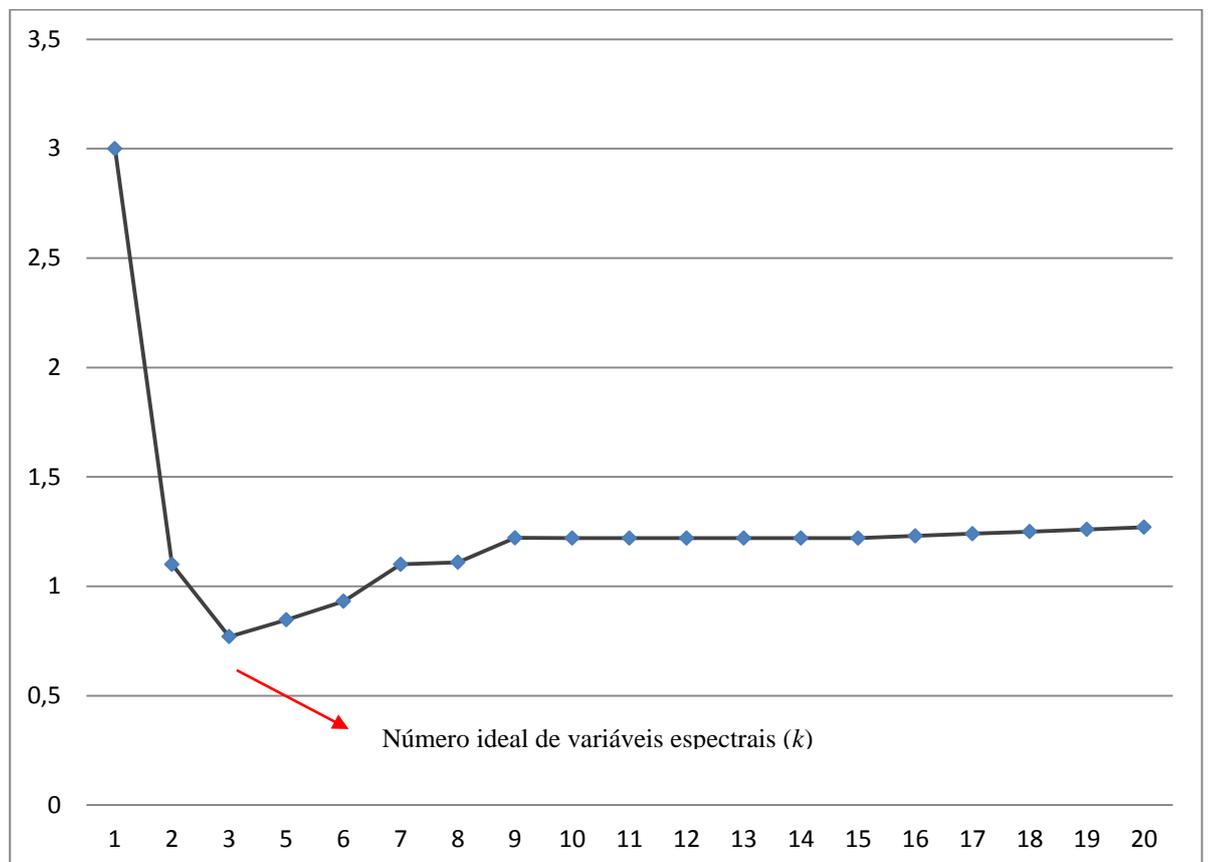


Figura 2.1 - Validação cruzada para amostras de calibração RMSECV pelo número de variáveis espectrais

O número ideal de variáveis espectrais é aquele que gerar o menor valor de RMSECV possível⁴².

2.5.3. Validação de modelos multivariados

A validação de modelos de calibração multivariados é realizada através da aplicação do modelo construído a um conjunto de amostras de validação com propriedades ou concentrações de referência conhecidas e comparando-se estatisticamente os valores estimados obtidos pelo modelo com os valores de referência conhecidos. A validação requer o teste completo do modelo desenvolvido para assegurar que este está tendo um desempenho de acordo com as expectativas⁴¹.

Para a validação de modelos de calibração multivariados é necessário o estabelecimento de amostras de validação as quais devem, idealmente: i) conter amostras com todos os componentes químicos que estarão presentes nas amostras a serem analisadas posteriormente pelo modelo; ii) conter amostras com variações de concentração dos componentes químicos na mesma magnitude de variação esperada para as amostras a serem analisadas pelo modelo; iii) conter amostras com concentrações representativas em toda a faixa de variação esperada para as amostras a serem analisadas pelo modelo, com especial atenção para concentração que podem ocorrer raramente; iv) conter um número de amostras suficientes para que se possa testar estatisticamente as relações entre os espectros das amostras e as propriedades ou concentrações de componentes modelados⁴¹.

Para misturas simples, as amostras de validação podem ser preparadas para atender todos os requerimentos citados acima. No caso de misturas complexas, a

obtenção de um conjunto ideal de amostras de validação torna-se muito difícil, se não impossível⁴¹.

O número de amostras a serem utilizadas na validação de um modelo de regressão multivariado depende da complexidade do modelo. Para modelos com número de variáveis espectrais (k) iguais ou menores do que cinco ($k \leq 5$), devem ser utilizadas um mínimo de 20 amostras de validação. Se o modelo utilizar mais de cinco variáveis espectrais ($k > 5$) então um número de amostras de validação mínimo igual a $4K$ deverá ser idealmente utilizado⁴¹.

2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

O primeiro aparato comercializado para análise química quantitativa utilizando-se técnicas de separação foi um cromatógrafo gasoso datado de 1955. O escopo de utilização desta técnica expandiu-se continuamente nas décadas de 1970 e 1980. No entanto, o requerimento principal para sua utilização é que os compostos analisados sejam voláteis, tendo considerável pressão de vapor frente ao aquecimento das amostras e da coluna cromatográfica. Este pré-requisito limita muito a utilização da técnica, pois uma grande variedade de compostos não podem ser volatilizados ou mesmo aquecidos como, por exemplo, fármacos, polímeros, proteínas corantes, entre outros. Na verdade apenas cerca de 20% de todos os compostos conhecidos podem ser analisados utilizando-se a cromatografia gasosa

43

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Líquida de Alta Performance, ou simplesmente Cromatografia Líquida, foi desenvolvida mais tardiamente, possivelmente porque esta técnica só pôde alcançar sua potencialidade após o desenvolvimento da tecnologia de preparação das fases

estacionárias, sistemas de bombeamento eficientes e detectores. Foi só no final dos anos 1960 que as pesquisas e desenvolvimento de métodos por CLAE se intensificaram. Foi somente em 1967 que o primeiro equipamento de CLAE prático foi desenvolvido para a análise de nucleotídeos⁴³.

A CLAE é uma técnica de separação baseada na interação entre uma fase sólida (fase estacionária) e uma fase líquida (fase móvel). A separação pode se dar por meio dos fenômenos de partição, adsorção ou troca iônica, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. As fases estacionárias mais utilizadas são compostas por sílica modificada pela adição de cadeia longas de hidrocarbonetos, dentre as quais a mais comum é a octadecilsilano ou C18. O cromatógrafo CLAE consiste principalmente de: i) reservatório para fase móvel; ii) sistema de bombeamento multicanal de alta pressão; iii) sistema de injeção; iv) coluna cromatográfica; v) detector; e vi) sistema de coleta e tratamento de dados⁴⁴.

Atualmente esta técnica é universalmente difundida e utilizada nas mais diversas áreas do conhecimento. Na indústria farmacêutica, dentre todas as técnicas analíticas empregadas, a CLAE é certamente a mais importante na quantificação e determinação de impurezas de excipientes, ativos e produtos finalizados, bem como nos testes de desempenho, como, por exemplo, teste dissolução e de uniformidade de conteúdo para os produtos finalizados.

2.7. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – UPLC

Dentre as desvantagens dos sistemas CLAE clássicos estão os longos tempo de análise e o grande consumo de solvente e geração de resíduos. Nos últimos anos vários avanços tecnológicos foram alcançados no sentido de tornarem estes

métodos cromatográficos mais rápidos, mais baratos e com impacto menor para o meio ambiente.

Foi desta evolução que surgiu a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Ultra Performance Liquid Chromatograph – UPLC). Estes avanços foram conseguidos principalmente pela redução do tamanho das partículas das colunas cromatográficas, as quais tipicamente são da ordem de 10 μ m ou 5 μ m para CLAE e 1,7 μ m ou menores para o UPLC. A redução do tamanho das partículas a princípio exigiu que os equipamentos fossem adaptados para resistir a pressões tais como 15000 psi, ainda mais altas do que aquelas registrados para sistemas CLAE, que normalmente trabalham em uma faixa de pressão de 4000 psi⁴⁵.

A redução do tamanho das partículas em contra partida, aumentou de forma significativa a eficiência das colunas cromatográficas, principalmente pelo aumento exponencial do número de pratos teóricos que estas colunas são capazes de atingir.

A Farmacopeia Americana (USP) em seu Fórum (Pharmacopeial Forum) PF 35 (6)⁴⁶, publicou um artigo propondo metodologias para o cálculo da transferência dos parâmetros cromatográficos de métodos farmacopéicos de CLAE para UPLC. Este documento apresenta um racional científico para a alteração do tamanho das partículas e das dimensões da coluna cromatográfica, mantendo no mínimo o poder de separação equivalente ao método oficial, tanto para métodos em regime isocrático ou gradiente. Em teoria, tais alterações poderiam ser implementadas sem a necessidade de revalidação do método farmacopéico, mas sim da verificação do método sob as novas condições

Os principais ajustes propostos são:

i) Diâmetro da coluna: Pode ser ajustado livremente desde que a velocidade linear seja mantida constante, de acordo com o seguinte cálculo,

$$F2 = F1 \cdot \frac{dp,1}{dp,2}$$

Onde, F1 é a vazão do método original, F2 é a vazão do novo método, $d_{p,1}$ e $d_{p,2}$ são respectivamente o diâmetro da partícula da coluna do método original e da nova coluna.

ii) Tempo de análise: O tempo de análise deve ser dimensionado de acordo com o seguinte cálculo,

$$ta,2 = ta,1 \cdot \frac{dp,2^2}{dp,1^2}$$

Onde, $t_{a,1}$ é o tempo de análise do método original, $t_{a,2}$ é o tempo de análise do método do novo método, $d_{p,1}$ e $d_{p,2}$ são respectivamente o diâmetro da partícula da coluna do método original e da nova coluna.

iii) Volume de injeção: Deve ser ajustado para a nova coluna conforme o seguinte calculo,

$$Vi,2 = Vi,1 \cdot \frac{l2 \cdot d2^2}{l1 \cdot d1^2}$$

Onde, $V_{i,1}$ é o volume de injeção na coluna do método original, $V_{i,2}$ o volume de injeção na nova coluna, $l1$ e $d1$ são respectivamente o comprimento e o diâmetro da coluna no método original, enquanto que $l2$ e $d2$ são respectivamente o comprimento e o diâmetro da nova coluna.

iv) Volume de cada seguimento do gradiente: No caso de métodos gradiente o volume de cada um seguimentos pode ser determinado coforme seguinte calculo,

$$V_{g,s,2} = V_{g,s,1} \cdot \frac{l_2 \cdot d_2^2}{l_1 \cdot d_1^2}$$

Onde, $V_{g,s,1}$ é o volume do segmento método original, $V_{g,s,2}$ é o volume do mesmo segmento no novo método, l_1 e d_1 são respectivamente o comprimento e o diâmetro da coluna no método original, enquanto que l_2 e d_2 são respectivamente o comprimento e o diâmetro da nova coluna.

v) Tempo de cada segmento do gradiente: No caso de métodos gradiente o tempo de cada um seguimentos deve ser ajustado de acordo com o volume de casa um dos seguimentos coforme seguinte calculo,

$$t_{g,s,2} = t_{g,s,1} \left[\frac{V_{g,s,2}}{F_2} \right] \left[\frac{F_1}{V_{g,s,1}} \right]$$

Onde, $t_{g,s,1}$ é o tempo do seguimento no método original, $t_{g,s,2}$ é o tempo do mesmo segmento novo método, $V_{g,s,1}$ é o volume do segmento no método original, $V_{g,s,2}$ é o volume do mesmo segmento no novo método, enquanto que F_1 e F_2 são respectivamente a vazão do método original e do novo método.

3. Objetivo

Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de método rápido para a determinação da uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos. O referido método de quantificação consistiu da construção de modelos de regressão linear multivariados utilizando-se os espectros obtidos por Espectroscopia de Reflectância Difusa com Transformada de Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy – DRIFTS), na região do infravermelho médio, para preparações laboratoriais de calibradores e de amostras de validação. Os resultados obtidos através do modelo de calibração multivariado foram estatisticamente comparados com aqueles obtidos através do método de referência por CLAE, descrito na Farmacopeia Americana USP 35/NF30. Alternativamente, propôs-se avaliar a potencial substituição do método CLAE por UPLC, sem a pretensão de validação deste método.

4. Material e Método

4.1. Material de Estudo e Consumíveis

4.1.1. Padrões de referência

USP Lamivudine RS, item 1356836, lote H0I378, U. S. Pharmacopeia - USP;

USP Zidovudine RS, item 1724500, lote H0F263, U. S. Pharmacopeia - USP

4.1.2. Materiais

Zidovudina fármaco, lote 11.10.34978, FURP;

Lamivudina fármaco, lote 11.10.35405, FURP;

Placebo industrial da Associação *Lamivudina (150mg) e Zidovudina (300mg) comprimidos revestidos*, doado pela FURP;

Associação *Lamivudina (150mg) e Zidovudina (300mg) comprimidos revestidos* (medicamento terminado), doado pela FURP;

Coluna Symmetry C18, 25 cm X 3 mm, 5µm, Waters (Dublin, Irlanda);

Coluna Acquity-T3 C18, 10 cmX 2,1 mm, 1.8 µm, Waters (Dublin, Irlanda);

Acetonitrila 99,9% (41,05 g/mol), grau CLAE, J. T. Baker;

Metanol 99,9% (32,04 g/mol), grau CLAE, J. T. Baker;

Acetato de Amônio 99% (77,08 g/mol), J. T. Baker;

Ácido acético glacial 99,9% (60,05 g/mol), J. T. Baker;

Membrana de filtração em Nylon, 0,22 µm, Millipore (Bedford, EUA);

Membrana de filtração em Éster Celulose, 0,22 µm, Millipore (Bedford, EUA);

Filtro para seringa Millex em Éster Celulose, 0,45 µm, Millipore (Bedford, EUA);

Filtro para seringa Millex em Nylon, 0,22 µm, Millipore (Bedford, EUA);

Água purificada, proveniente de sistema Millipore Integral 10 (Bedford, EUA);

Frascos âmbar para sistema CLAE, capacidade de 2 mL e com tampa pré-cortada da marca Agilent.

4.1.3. Equipamentos/ Programas

Cromatógrafo por CLAE Agilent, serie 1260 (DAD) (EUA);

Cromatógrafo por UPLC, Acquity H-class (Detector UV), Waters (Milford, EUA);

Espectrofotômetro JASCO 600, (400 cm⁻¹ até 7000 cm⁻¹) (Japão);

Microbalança Mettler Toledo MX-5 (Greifensee, Suíça);

Balança Analítica Excellence XS (Greifensee, Suíça);

Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10, Millipore (Bedford, EUA);

pHmetro SevenEasy, Mettler Toledo (Brasil);

Acessório de DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) Easydiff da marca PiKe (EUA);

Programa Spectra Manager, JASCO (Japão);

Banho de ultra-som Nova ética (Brasil);

Kit para filtração Pirex, capacidade de 500 mL em boro-silicato;

Bomba para filtração de fase móvel Waters;

Empower 2.0. Waters (Milford, EUA);

Minitab Versão 16. (State College, EUA);

Mortar e Pistilo de ágata.

4.2. Método

4.2.1. Instrumentação

Para a condução do presente trabalho foram utilizados o espectrofotômetro JASCO 600, na região MID (middle infrared) de 450 cm^{-1} até 4000 cm^{-1} , com o acessório de DRIFTS (figura 4.1), controlado pelo programa Spectra Manager.

Utilizaram-se ainda o cromatógrafo por CLAE Agilent serie 1260 equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e o cromatógrafo por UPLC Waters, Acquity H-class com detector UV, ambos controlados pelo programa Empower 2.0. No tratamento estatístico foi utilizado o pacote estatístico Minitab Versão 16, instalado em um microcomputador convencional.



Figura 4.1 – Acessório de DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) da marca PIKE (Easydiff) (disponível em: <http://www.piketech.com/DR-EasiDiff-TM.html>)

4.2.2. Fracionamento das Amostras do Produto Comercial

O peso médio dos comprimidos da *Associação Lamivudina (150mg) e Zidovudina (300mg) comprimidos revestidos* foi determinado a partir da pesagem de 20 comprimidos retirados aleatoriamente da embalagem comercial do produto.

Em seguida cinco amostras foram preparadas pela maceração até completa pulverização de cinco grupos compostos por cinco comprimidos retirados aleatoriamente da embalagem comercial do produto. As amostras pulverizadas foram codificadas sequencialmente como A01, A02, A03, A04 e A05 (figura 4.2). Este conjunto de amostras será denominado simplesmente como *Amostras do Produto Comercial* no decorrer deste trabalho.

Todas as *Amostras do Produto Comercial* foram transferidas para frascos com tampas herméticas, armazenadas em dessecador sob sílica gel e dentro de um refrigerador (2 °C a 8 °C).

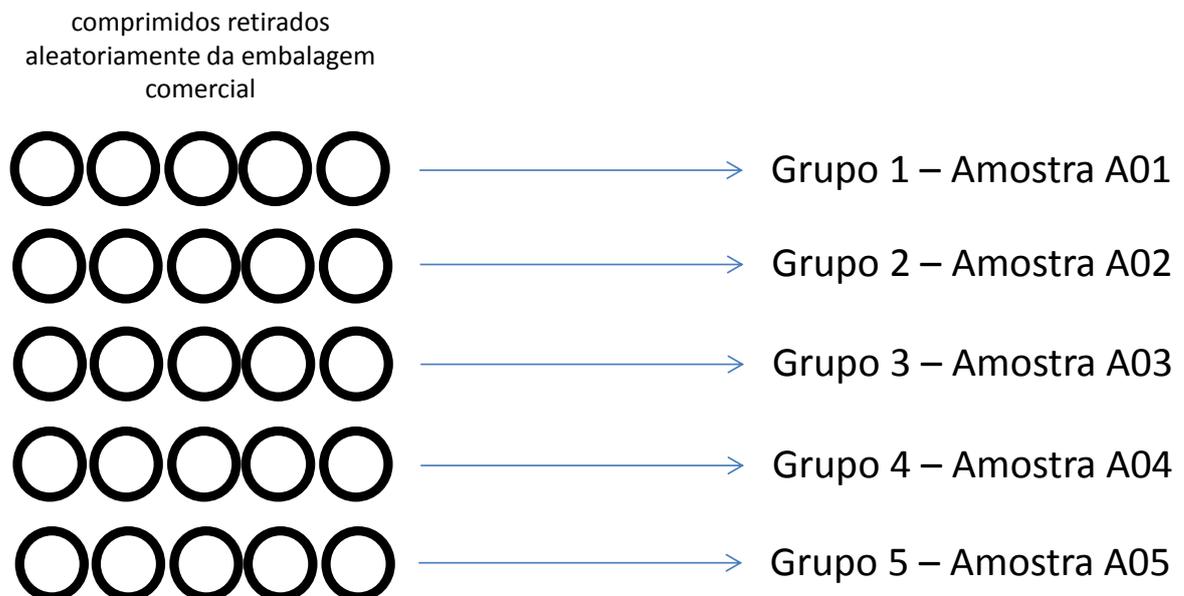


Figura 4.2 – Esquema de fracionamento das *Amostras do Produto Comercial*

4.2.3. Preparação das Amostras de Calibração e Validação

Prepararam-se 41 amostras de calibração e 23 amostras de validação, por meio da pesagem e homogeneização de quantidades variáveis de lamivudina, zidovudina e placebo industrial (qs), equivalentes ao intervalo de 80% até 120% da concentração nominal nos comprimidos em estudo.

Os componentes de cada uma das amostras de calibração e validação foram pesados em balança analítica com resolução de 0,001 mg, transferidos para um mortar de ágata e macerados com o auxílio de um pistilo de ágata até completa pulverização e homogeneização.

Utilizou-se intervalos de 0,5% entre os calibradores na faixa de concentração de 95% a 105%, 1% nas faixas de concentração de 90% a 95% e de 105% a 110% e intervalos de 2% entre os calibradores nas faixas de concentração de 80% -90% e de 110%-120% (figura 4.3).

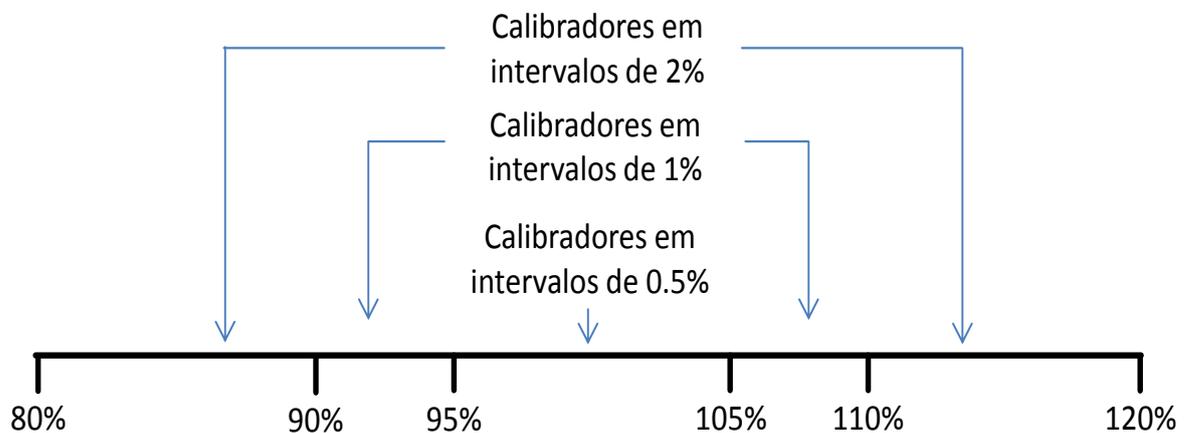


Figura 4.3 – Intervalos de preparação dos calibradores nas diferentes faixas de concentração

As amostras de calibração foram codificadas sequencialmente como C01, C02, ..., C40 e C41. Este conjunto de amostras será denominado simplesmente como *Amostras de Calibração* no decorrer deste trabalho.

As concentrações das amostras de validação foram escolhidas aleatoriamente dentro de cada uma das faixas de concentração da curva de calibração e compreenderam toda a faixa de trabalho da curva de calibração. As amostras de validação foram codificadas sequencialmente como V01, V02, ..., V22 e V23. Este conjunto de amostras será denominado simplesmente como *Amostras de Validação* no decorrer deste trabalho.

Os valores nominais em porcentagem para as *Amostras de Calibração* e para as *Amostras de Validação* foram calculados a partir das massas pesadas de lamivudina, zidovudina e placebo industrial utilizadas na preparação de cada uma das amostras.

As *Amostras de Calibração* e as *Amostras de Validação* foram transferidas para frascos com tampas herméticas, armazenadas em dessecador sob sílica gel e dentro de um refrigerador (2 °C a 8 °C).

4.2.4. Preparação da Solução de Padrão dos Fármacos

Tomadas exatas de 3,935 mg do padrão de referência *USP Lamivudine RS* (padrão de referência da Farmacopeia Americana para a lamivudina) e de 8,054 mg do padrão de referência *USP Zidovudine RS* (padrão de referência da Farmacopeia Americana para a zidovudina) foram pesadas em microbalança e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. Os padrões foram dissolvidos e diluídos para o volume total do balão com diluente (Quadro 4.1). Esta solução contendo 0,1574 mg/mL do padrão de referência *USP Lamivudine RS* e 0,3222 mg/mL do padrão de referência *USP Zidovudine RS* será denominada simplesmente como *Solução Padrão dos Fármacos* no decorrer deste trabalho.

Esta solução foi transferida para frascos ambares com tampas herméticas, e armazenadas em refrigerador (2 °C à 8 °C). Conforme a necessidade, alíquotas desta solução foram filtradas para frascos de CLAE, utilizando-se filtros de seringa Millex em Nylon de 0,22 µm, e injetados no sistema cromatográfico.

4.2.5. Quantificação dos ativos por CLAE

O método padrão eleito para a quantificação da lamivudina e zidovudina nas *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3), foi o método farmacopeico por CLAE descrito na monografia de Comprimidos de Lamivudina e Zidovudina (Lamivudine and Zidovudine Tablets) e publicado no compêndio da Farmacopeia Americana volume 35 (USP35/ NF30)⁴⁷.

Para garantir um desempenho adequado do sistema cromatográfico CLAE, efetuou-se o teste de adequabilidade do sistema⁴⁴ empregando-se cinco injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4.), conforme condições cromatográficas descritas no Quadro 4.1.

Cada uma das amostras dos grupos das *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) foram preparados em duplicata de acordo com o método farmacopeico (figura 4.4).

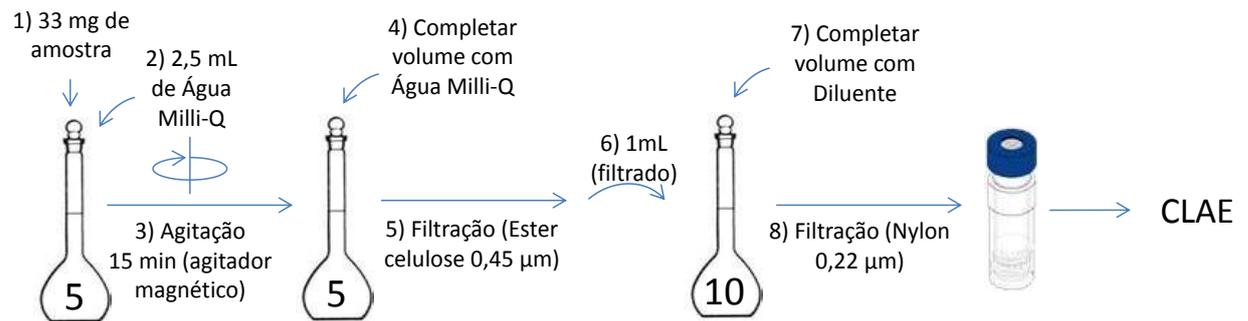


Figura 4.4 – Fluxograma de preparo das amostras para análise por CLAE

Aproximadamente 33 mg de cada uma das amostras foram pesados com exatidão e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se cerca de 2,5 mL de água milli-Q e agitou-se por 15 min com auxílio de um agitador magnético. O volume do balão volumétrico foi completado com água milli-Q e seu conteúdo foi homogeneizado. A suspensão resultante foi então filtrada através filtros de seringa Millex em Ester Celulose de 0,45 µm. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, transferiu-se 1 mL do filtrado para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente (Quadro 4.1). A solução final foi filtrada através de filtro de seringa Millex em Nylon de 0,22 µm para frascos de CLAE ambarados e injetada no sistema cromatográfico conforme condições cromatográficas descritas no Quadro 4.1.

A quantificação dos ativos no sistema CLAE foi feita comparando-se as áreas obtidas para as *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) com as áreas obtidas utilizando-se a *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4.), injetada sucessivamente ao longo de toda a corrida cromatográfica.

Material e Método

Regime	Gradiente																																				
Fase Móvel	Solução A: Solução 25 mM de Acetato de Amônio em água Milli-Q, com pH ajustado para 4.0 com ácido acético glacial, filtrado em membrana de Éster Celulose (0,22 µm) e degaseificado em banho de ultrassom por 15 min;																																				
	Solução B: Metanol filtrado através de Membrana em Nylon (0,22 µm) e degaseificado em banho de ultrassom por 15 min;																																				
	Solução C: Acetonitrila filtrada através de Membrana em Nylon (0,22 µm) e degaseificada em banho de ultrassom por 15 min.																																				
	Gradiente																																				
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Solução A</th> <th>Solução B</th> <th>Solução C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">95</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">15</td> <td style="text-align: center;">95</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">30</td> <td style="text-align: center;">70</td> <td style="text-align: center;">30</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">38</td> <td style="text-align: center;">70</td> <td style="text-align: center;">30</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">38,1</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">45</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">45,1</td> <td style="text-align: center;">95</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">60</td> <td style="text-align: center;">95</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> </tbody> </table>		Solução A	Solução B	Solução C	0	95	5	0	15	95	5	0	30	70	30	0	38	70	30	0	38,1	0	0	100	45	0	0	100	45,1	95	5	0	60	95	5	0
		Solução A	Solução B	Solução C																																	
	0	95	5	0																																	
	15	95	5	0																																	
	30	70	30	0																																	
	38	70	30	0																																	
38,1	0	0	100																																		
45	0	0	100																																		
45,1	95	5	0																																		
60	95	5	0																																		
Diluyente	Solução A e Solução B (19:1)																																				
Coluna	Symmetry C18 (Waters), 25 cm X 3 mm, 5µm.																																				
Vazão	0,5 mL/min																																				
Detecção	UV 270 nm																																				
Injeção	10 µL																																				
Temperatura	25 °C																																				

Quadro 4.1 – Condições cromatográficas do método de referência USP35/NF30

4.2.6. Quantificação dos ativos por UPLC

Para garantir um desempenho adequado do sistema cromatográfico UPLC, efetuou-se o teste de adequabilidade do sistema empregando de cinco injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4.), conforme condições cromatográficas descritas no Quadro 4.2.

Todas as amostras preparadas para a quantificação da lamivudina e da zidovudina para análise por CLAE foram também injetadas no cromatográfico UPLC conforme condições descritas no Quadro 4.2.

A quantificação dos ativos por UPLC foi feita comparando-se as áreas obtidas para cada um dos preparos das *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) com as áreas obtidas utilizando-se a *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4), injetada sucessivamente ao longo de toda a corrida cromatográfica.

Material e Método

Regime	Gradiente																																				
Fase Móvel	<p>Solução A: Solução 25 mM de Acetato de Amônio em água Milli-Q, com pH ajustado para 4.0 com ácido acético glacial, filtrado em membrana de Éster Celulose (0,22 µm) e degaseificado em banho de ultrassom por 15 min;</p> <p>Solução B: Metanol filtrado através de Membrana em Nylon (0,22 µm) e degaseificado em banho de ultrassom por 15 min;</p> <p>Solução C: Acetonitrila filtrada através de Membrana em Nylon (0,22 µm) e degaseificada em banho de ultrassom por 15 min.</p>																																				
	Gradiente																																				
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Solução A</th> <th>Solução B</th> <th>Solução C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>3,73</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>6,67</td> <td>70</td> <td>30</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>8,24</td> <td>70</td> <td>30</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>8,26</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9,61</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9,63</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>12,55</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		Solução A	Solução B	Solução C	0	95	5	0	3,73	95	5	0	6,67	70	30	0	8,24	70	30	0	8,26	0	0	100	9,61	0	0	100	9,63	95	5	0	12,55	95	5	0
		Solução A	Solução B	Solução C																																	
	0	95	5	0																																	
	3,73	95	5	0																																	
	6,67	70	30	0																																	
	8,24	70	30	0																																	
	8,26	0	0	100																																	
	9,61	0	0	100																																	
9,63	95	5	0																																		
12,55	95	5	0																																		
Diluyente	Solução A e Solução B (19:1)																																				
Coluna	C18, 10 cmX 2,1 mm, 1.8 µm																																				
Vazão	0,3 mL/min																																				
Detecção	UV 270 nm																																				
Injeção	2 µL																																				
Temperatura	35 °C																																				

Quadro 4.2 – Condições cromatográficas do método de UPLC

4.2.7. Calibração e quantificação no Infravermelho médio - MID

As *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) foram analisadas em equipamento JASCO 600, na região do infravermelho médio (MID), com o auxílio do acessório de DRIFTS (Easydiff), utilizando-se micro amostrador e cinco replicatas por amostra, ou seja, cinco transferências/ compactações distintas no amostrador para cada amostra. Antes de cada preparação as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um mortar e pistilo de ágata. Após cada leitura e antes da realização da preparação seguinte, as amostras foram devolvidas aos recipientes originais e homogeneizadas novamente utilizando-se um mortar e pistilo de ágata. As leituras foram registradas utilizando-se o programa Spectra Manager através da coleta de 32 espectros com resolução de 4 cm^{-1} e na região espectral de número de onda a partir de 450 cm^{-1} até 4000 cm^{-1} .

A eliminação do ruído de fundo foi realizada zerando-se o equipamento com KBr pulverizado antes da leitura das amostras.

Os espectros representativos de cada uma das *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) e das *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) foram obtidos a partir do espectro médio das cinco leituras, os quais foram calculados utilizando-se o programa Spectra Manager.

Os espectros médios das *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) foram então utilizados na construção de dois modelos de calibração por regressão multivariada pelo método dos Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Square regression – PLS), um para cada fármaco em estudo.

Os parâmetros de calibração utilizados para a construção dos modelos de regressão multivariados para a lamivudina e para a zidovudina no MID são apresentados respectivamente nos Quadros 4.3 e 4.4.

Cada um dos modelos de regressão multivariado obtido foi utilizado para a quantificação do seu respectivo fármaco nas *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). Para a quantificação das *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) utilizaram-se os espectros médios obtidos para cada uma das amostras, enquanto que na quantificação das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3), além do espectro médio, utilizaram-se também todos os cinco espectros MID obtidos para avaliar a repetibilidade do método de calibração multivariado. A estatística descritiva para os valores de concentração deste grupo foi calculada utilizando-se o programa Minitab 16.

Pré-tratamento: Espectro médio entre as cinco replicatas.

Faixas de cálculo:

1409.71 - 1390.42 cm^{-1} (Linha de Base: 1409.71 - 1390.42 cm^{-1})

1615.09 - 1507.10 cm^{-1} (Linha de Base: 1558.20 cm^{-1})

2000.78 - 1922.68 cm^{-1} (Linha de Base: 2000.78 - 1922.68 cm^{-1})

3369.03 - 3289.96 cm^{-1} (Linha de Base: 3289.00 cm^{-1})

Número de Fatores: 5

Quadro 4.3 – Parâmetros de calibração PLS para a lamivudina

Pré-tratamento: Espectro médio entre as cinco replicatas.

Faixas de cálculo:

2255.34 - 1995.96 cm^{-1} (Linha de Base: 2255.34 - 1995.96 cm^{-1})

3497.27 - 3412.42 cm^{-1} (Linha de Base: 3497.27 - 3412.42 cm^{-1})

Número de Fatores: 5

Quadro 4.4 – Parâmetros de calibração PLS para a lamivudina

4.2.8. Limites de tolerância

Os valores de repetibilidade dos modelos de calibração multivariado foram utilizados para calcular os limites de tolerância para a quantificação de cada um dos fármacos em estudos no modelo MID. Estes limites delimitam duas regiões de rejeição nos extremos da faixa de especificação do produto e são numericamente equivalentes ao intervalo de confiança (figura 4.5) calculado para cada um dos métodos de calibração. O valor de repetibilidade média de cada um dos modelos foi calculado pela média dos desvio padrão relativos (DPR%) de cada uma das Amostras de Validação (seção 4.2.3).

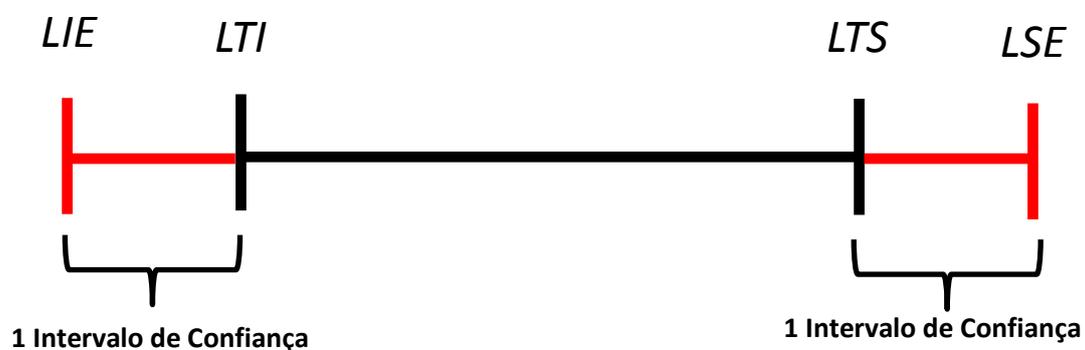


Figura 4.5 – Representação esquemática dos limites de tolerância obtidos para lamivudina

Calcularam-se assim os valores dos limites de tolerância inferior (LTI) e limites de tolerância superior (LTS):

$$LTI = LEI + 2 * Erro amostral$$

$$LTS = LES - 2 * Erro amostral$$

$$Erro amostral = t_{n-1} * \left(\frac{Repetibilidade Média}{\sqrt{n}} \right)$$

Onde:

LEI = Limite especificação Inferior;

LES = Limite especificação superior;

n = número de replicatas;

t_{n-1} = valor padrão da distribuição t-student para um nível de significância de 5% e n-1 replicatas.

5. Resultados

5.2. Concentração teórica dos comprimidos comerciais

O peso médio obtido para a pesagem de 20 comprimidos comerciais foi igual a 671,420 mg. Uma vez que a dosagem nominal é igual a 150 mg para a lamivudina e 300 mg para a zidovudina, foi possível estimar as concentrações teóricas dos dois fármacos nos comprimidos da associação *Lamivudina (150mg) e Zidovudina (300mg) comprimidos revestidos* (medicamento comercial) como sendo igual a 22,34% para a lamivudina e 44,68% para zidovudina.

5.3. Concentração nominal das *Amostras de Calibração e Validação*

Os valores nominais em porcentagem para as *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e para as *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) estão sumarizados nas Tabelas 5.1 e 5.2. Nestas tabelas são apresentados também os valores normalizados para 100% utilizando-se as concentrações teóricas de lamivudina (22,34%) e zidovudina (44,68%) nos comprimidos comerciais, ou seja:

$$\text{Concentração Normalizada (lamivudina)} = \frac{\% \text{ nominal lamivudina} * 100}{22,34\%}$$

$$\text{Concentração Normalizada (zidovudina)} = \frac{\% \text{ nominal lamivudina} * 100}{44,68\%}$$

Resultados

Tabela 5.1 – Concentrações nominais e normalizadas para as Amostras de Calibração (seção 4.2.3)

Amostra	Lamivudina (%)		Zidovudina (%)	
	Nominal	Normalizada	Nominal	Normalizada
C01	23,421	104,84	46,461	103,99
C02	18,416	82,43	37,523	83,98
C03	26,728	119,64	51,945	116,26
C04	22,925	102,62	46,142	103,27
C05	21,362	95,62	40,571	90,80
C06	20,970	93,87	41,528	92,95
C07	24,020	107,52	48,700	109,00
C08	23,377	104,64	47,009	105,21
C09	17,971	80,45	36,647	82,02
C10	18,994	85,02	39,310	87,98
C11	24,176	108,22	47,861	107,12
C12	22,159	99,19	43,140	96,55
C13	21,111	94,50	42,486	95,09
C14	24,591	110,07	47,293	105,85
C15	21,609	96,73	44,228	98,99
C16	25,371	113,57	50,943	114,02
C17	22,474	100,60	45,928	102,79
C18	22,321	99,92	42,672	95,51
C19	25,915	116,00	52,710	117,97
C20	19,223	86,05	40,285	90,16
C21	23,073	103,28	44,965	100,64
C22	21,824	97,69	44,033	98,55
C23	21,694	97,11	44,511	99,62
C24	21,891	97,99	42,981	96,20
C25	23,005	102,98	45,110	100,96
C26	21,249	95,12	43,837	98,11
C27	22,298	99,81	44,690	100,02
C28	22,132	99,07	43,387	97,11
C29	26,312	117,78	50,196	112,35
C30	22,691	101,57	46,786	104,71
C31	20,782	93,03	42,011	94,03
C32	21,542	96,43	43,582	97,54
C33	20,316	90,94	41,129	92,05
C34	19,560	87,56	35,787	80,10
C35	20,231	90,56	38,499	86,17
C36	25,134	112,50	53,652	120,08
C37	23,123	103,50	45,861	102,64
C38	22,688	101,56	45,287	101,36
C39	23,613	105,70	49,307	110,36
C40	24,493	109,64	48,236	107,96
C41	23,528	105,32	45,543	101,93

Resultados

Tabela 5.2 – Concentrações nominais e normalizadas para as Amostras de Validação (seção 4.2.3)

Amostra	Concentração Lamivudina (%)		Concentração Zidovudina (%)	
	Nominal	Normalizada	Nominal	Normalizada
V01	17,900	80,13	35,742	79,99
V02	18,825	84,27	37,531	84,00
V03	19,821	88,72	39,349	88,07
V04	20,226	90,54	40,259	90,10
V05	20,451	91,54	40,642	90,96
V06	20,800	93,11	41,549	92,99
V07	21,224	95,01	42,474	95,06
V08	21,514	96,30	42,845	95,89
V09	21,681	97,05	43,317	96,95
V10	21,874	97,92	43,811	98,06
V11	22,065	98,77	44,287	99,12
V12	22,439	100,44	44,687	100,02
V13	22,634	101,32	45,195	101,15
V14	22,810	102,10	45,666	102,21
V15	22,978	102,86	46,103	103,18
V16	23,175	103,74	46,541	104,16
V17	23,278	104,20	47,034	105,27
V18	23,902	106,99	47,760	106,89
V19	24,333	108,92	48,754	109,12
V20	24,612	110,17	49,189	110,09
V21	25,126	112,47	50,010	111,93
V22	25,916	116,01	51,835	116,01
V23	26,843	120,15	53,636	120,05

5.4. Quantificação das amostras

5.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

O teste de adequabilidade do sistema cromatográfico CLAE evidenciou o correto funcionamento do cromatógrafo. O desvio padrão relativo para cinco injeções foi igual a 0,1% tanto para lamivudina quanto para a zidovudina, sendo que o método padrão exige que o valor para este parâmetro não seja maior do que 2,0%. Outro parâmetro analisado foi a resolução da lamivudina e de seu diastereoisômero. O valor obtido para este parâmetro foi igual a 2,2, sendo que o método oficial determina que este parâmetro não seja inferior a 1,5.

Outros parâmetros registrados foram: fator capacidade igual a 4.9 para a lamivudina e 17.3 para a zidovudina; fator de cauda igual a 1.0 para os dois ativos; e número de pratos teóricos de 13500 para lamivudina e 24400 para a zidovudina. Estes parâmetros são apenas informativos e não possuem especificações descritas no método oficial.

Registram-se tempos de retenção de aproximadamente $12,3 \pm 0,4$ minutos para lamivudina e $32,8 \pm 0,1$ minutos para a zidovudina.

A estabilidade em refrigerador ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4.) foi avaliada e considerada estável tanto para a lamivudina quanto para a zidovudina. Um intervalo de aproximadamente 220 horas foi necessário para a quantificação das *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). No decorrer de todo este intervalo foram realizadas injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4) intercaladas com as injeções das amostras. Um total de 24 injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4) foram realizadas e apresentaram um desvio padrão relativo de 0,48% para lamivudina e de 0,18% para a zidovudina.

A área média das 24 injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4) foi utilizada no cálculo da concentração dos fármacos nas *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). Estas concentrações são apresentadas nas Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5.

Resultados

Tabela 5.3 – Concentração das Amostras de Calibração (seção 4.2.3) por CLAE

Amostra	Lamivudina CLAE (%)	Zidovudina CLAE (%)
C01	22,903	45,557
C02	18,087	36,497
C03	26,532	51,545
C04	22,387	45,370
C05	20,764	39,499
C06	20,509	40,416
C07	23,754	48,415
C08	23,070	46,333
C09	17,769	36,315
C10	18,595	38,541
C11	23,451	47,162
C12	21,905	42,346
C13	20,780	42,011
C14	23,884	46,883
C15	21,393	43,411
C16	25,044	50,506
C17	22,117	45,416
C18	22,076	42,457
C19	25,637	52,214
C20	19,146	40,650
C21	22,565	44,377
C22	21,644	43,988
C23	21,122	43,776
C24	21,416	42,250
C25	22,746	44,649
C26	20,869	43,374
C27	21,589	44,119
C28	21,694	42,585
C29	25,737	49,466
C30	22,173	46,235
C31	20,183	40,695
C32	21,267	43,150
C33	19,910	40,763
C34	18,742	34,775
C35	19,579	37,688
C36	24,623	53,100
C37	22,796	45,374
C38	22,576	45,003
C39	23,123	48,605
C40	24,059	47,584
C41	23,055	45,117

Resultados

Tabela 5.4 – Concentração Amostras de Validação (seção 4.2.3) por CLAE

Amostra	Lamivudina CLAE (%)	Zidovudina CLAE (%)
V01	17,501	35,394
V02	18,166	36,457
V03	19,780	38,823
V04	19,648	39,657
V05	20,004	39,390
V06	19,970	40,788
V07	20,972	41,258
V08	20,769	41,869
V09	21,123	42,691
V10	21,626	43,158
V11	21,350	43,522
V12	21,929	44,011
V13	21,642	44,382
V14	22,189	44,741
V15	22,112	45,464
V16	22,515	46,118
V17	22,952	46,787
V18	23,383	46,884
V19	24,062	48,348
V20	24,194	48,670
V21	24,617	49,667
V22	25,311	51,277
V23	26,218	52,595

Tabela 5.5 – Concentrações das Amostras do Produto Comercial (seção 4.2.2) por CLAE

Amostra	Lamivudina CLAE (%)	Zidovudina CLAE (%)
A01	21,764	43,395
A02	21,649	43,512
A03	21,657	43,293
A04	21,718	43,066
A05	21,764	43,401

5.4.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - UPLC

De forma similar ao observado para o sistema cromatográfico CLAE, o UPLC também apresentou resultados satisfatórios para o teste de adequabilidade do sistema. O desvio padrão relativo para cinco injeções foi igual a 0,1% para ambos os ativos. A resolução obtida para a o pico da lamivudina e seu diastereoisômero foi

igual a 2,5. O fator capacidade registrado foi de 7.7 para a lamivudina e 21.1 para a zidovudina. A lamivudina apresentou um fator cauda de 1.3 e a zidovudina de 1.2 para o mesmo parâmetro. O número de pratos teóricos observado para a lamivudina foi de 15900 e para a zidovudina 224000.

Registram-se tempos de retenção de aproximadamente $3,7 \pm 0,5$ minutos para lamivudina e $7,8 \pm 0,1$ minutos para a zidovudina.

Todas as amostras preparadas para as quantificações por CLAE, ou seja, *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3), foram injetadas no sistema UPLC conforme condições cromatográficas do quadro 4.2.

A estabilidade da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4) também foi avaliada no sistema cromatográfico UPLC, e esta solução foi considerada estável. O mesmo intervalo de aproximadamente 220 horas foi necessário para a quantificação das amostras por UPLC, uma vez que o tempo desta análise estava atrelado ao tempo de análise por CLAE. As amostras foram preparadas e injetadas paralelamente nos dois sistemas e o mais rápido possível. Um total de 30 injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4) foram realizadas intercaladas as amostras, ao longo de todo o intervalo de análise e apresentaram um desvio padrão relativo de 0,60% para lamivudina e de 0,63% para a lamivudina.

Resultados

Tabela 5.6 – Concentração das Amostras de Calibração (seção 4.2.3) por UPLC

Amostra	Lamivudina UPLC (%)	Zidovudina UPLC (%)
C01	22,538	44,958
C02	17,926	36,256
C03	26,395	51,543
C04	22,234	45,132
C05	20,618	39,285
C06	20,351	40,103
C07	23,575	48,106
C08	22,934	46,110
C09	17,661	36,059
C10	18,522	38,333
C11	23,387	47,077
C12	21,804	42,214
C13	20,726	41,876
C14	23,835	46,824
C15	21,350	43,310
C16	24,992	50,497
C17	22,018	45,245
C18	22,028	42,317
C19	25,587	52,238
C20	19,145	40,613
C21	22,691	44,538
C22	21,747	44,083
C23	21,194	43,855
C24	21,462	42,248
C25	22,788	44,699
C26	20,845	43,264
C27	21,628	44,080
C28	21,640	42,363
C29	25,752	49,495
C30	22,374	46,442
C31	20,199	40,532
C32	21,308	43,082
C33	19,974	40,719
C34	18,872	34,821
C35	19,589	37,598
C36	24,563	52,903
C37	22,760	45,183
C38	22,608	44,939
C39	23,168	48,639
C40	24,100	47,589
C41	23,086	45,052

A área média das 30 injeções da *Solução Padrão dos Fármacos* (seção 4.2.4) foi utilizada no cálculo das concentrações dos ativos nas *Amostras do Produto*

Resultados

Comercial (seção 4.2.2), *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) e estão apresentadas nas Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8.

Tabela 5.7 – Concentração das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) por UPLC

Amostra	Lamivudina UPLC (%)	Zidovudina UPLC (%)
V01	17,547	35,334
V02	18,458	36,919
V03	19,938	38,989
V04	19,804	39,829
V05	20,186	39,590
V06	20,099	40,976
V07	21,159	41,553
V08	20,853	42,066
V09	21,113	42,679
V10	21,666	43,253
V11	21,711	43,914
V12	22,294	44,460
V13	21,998	44,743
V14	22,504	45,017
V15	22,402	45,749
V16	22,581	45,982
V17	23,077	46,855
V18	23,483	46,856
V19	24,158	48,265
V20	24,253	48,564
V21	24,947	50,186
V22	25,577	51,764
V23	26,353	53,007

Tabela 5.8 – Concentrações das *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) por UPLC

Amostra	Lamivudina UPLC (%)	Zidovudina UPLC (%)
A01	21,629	43,058
A02	21,818	43,727
A03	21,733	43,615
A04	21,737	43,338
A05	21,787	43,605

5.4.3. Quantificação da lamivudina no Infravermelho Médio – MID

A Figura 5.1 apresenta a curva de calibração obtida pelo método de PLS para a lamivudina, sendo que o eixo das abscissas representa os valores de referência, ou seja, as concentrações de lamivudina nas *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) obtidas pelo método de referência (CLAE), enquanto que o eixo das ordenadas representa os valores preditos pelo modelo de regressão multivariado para estas mesmas amostras.

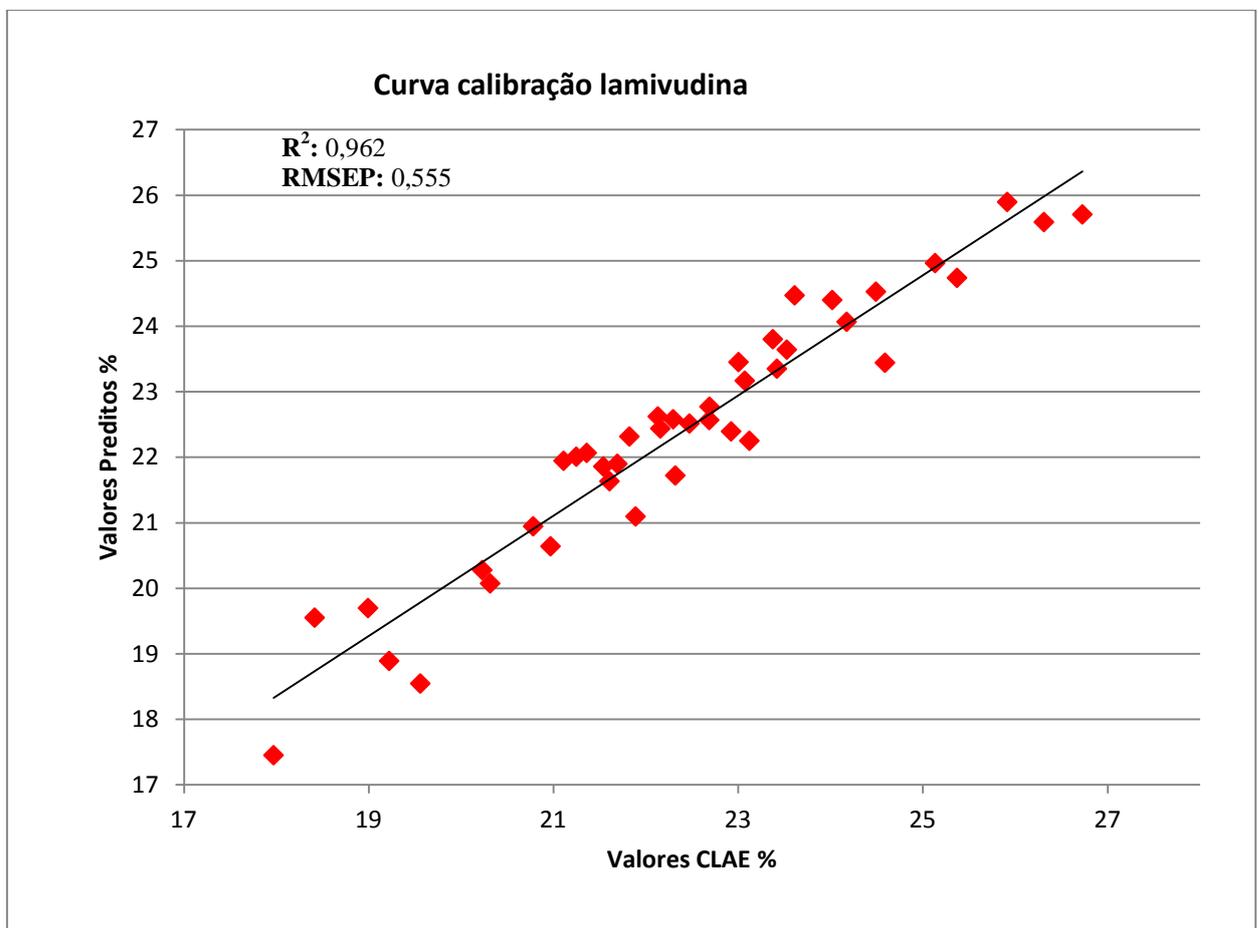


Figura 5.1 – Curva de calibração no infravermelho médio (MID) para a lamivudina

Nas Tabelas 5.9 e 5.10 são apresentados os valores da quantificação da lamivudina nas *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) e *Amostras do Produto*

 Resultados

Comercial (seção 4.2.2) respectivamente, utilizando-se os espectros médios conforme descrito na seção 4.2.7.

Tabela 5.9 – Quantificação da lamivudina por MID nas *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) utilizando-se os espectros médios de cada uma das preparações

Amostra	Lamivudina MID (%)
V01	18,723
V02	18,990
V03	19,688
V04	21,309
V05	21,882
V06	21,313
V07	21,683
V08	22,376
V09	22,463
V10	22,549
V11	22,679
V12	23,178
V13	23,162
V14	22,977
V15	23,338
V16	23,630
V17	23,846
V18	24,062
V19	24,073
V20	24,468
V21	24,627
V22	25,617
V23	25,813

Tabela 5.10 – Quantificação da lamivudina por MID nas *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) utilizando-se os espectros médios de cada uma das preparações

Amostra	Lamivudina MID (%)
A01	18,14
A02	15,74
A03	16,94
A04	16,50
A05	17,42

A Tabela 5.11 apresenta a estatística descritiva dos resultados da quantificação da lamivudina utilizando-se o respectivo modelo de regressão

Resultados

multivariada (Figura 5.1) aplicado a cada uma das cinco leituras das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) conforme procedimento descrito na seção 4.2.7.

Tabela 5.11 – Estatística Descritiva: Quantificação da lamivudina por MID para as cinco replicatas das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3)

Ensaio	Média	SD(%)	RSD(%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
V01	18,997	0,277	1,458	18,716	18,779	18,861	19,283	19,387
V02	18,126	1,754	9,677	16,706	16,935	17,195	19,782	21,009
V03	19,305	1,462	7,573	16,761	18,066	20,007	20,193	20,249
V04	20,278	1,116	5,504	18,828	19,353	20,186	21,248	21,892
V05	20,617	0,724	3,512	19,882	20,089	20,540	21,183	21,818
V06	19,494	0,564	2,893	18,668	19,018	19,440	19,996	20,176
V07	20,887	1,235	5,913	19,586	19,809	20,628	22,096	22,682
V08	22,042	0,668	3,031	21,351	21,361	22,115	22,687	22,791
V09	22,409	0,514	2,294	21,593	21,986	22,507	22,783	23,007
V10	22,581	0,447	1,980	21,972	22,174	22,520	23,017	23,035
V11	22,111	0,884	3,998	21,164	21,445	21,837	22,915	23,512
V12	22,929	1,080	4,710	21,858	21,900	22,949	23,949	24,431
V13	22,957	0,963	4,195	21,351	22,119	23,175	23,686	23,760
V14	23,267	0,816	3,507	22,874	22,877	22,919	23,831	24,725
V15	22,818	0,818	3,585	22,017	22,045	22,754	23,622	23,922
V16	22,043	0,777	3,525	20,853	21,355	22,077	22,714	22,893
V17	23,453	1,139	4,857	21,507	22,525	23,666	24,275	24,308
V18	24,574	0,979	3,984	23,795	23,876	24,005	25,557	26,101
V19	24,706	0,630	2,550	24,321	24,326	24,361	25,260	25,791
V20	24,791	0,619	2,497	23,718	24,316	24,947	25,189	25,306
V21	26,561	0,846	3,185	25,252	25,790	26,630	27,297	27,341
V22	26,833	0,958	3,570	25,567	25,901	26,939	27,714	27,985
V23	27,314	0,866	3,171	25,827	26,630	27,459	27,927	27,985
Repetibilidade Média lamivudina:			3,964					

5.4.1. Quantificação da zidovudina no Infravermelho Médio – MID

A Figura 5.2 apresenta a curva de calibração obtida pelo método de PLS para a zidovudina, sendo que o eixo das abcissas representa os valores de referência, ou seja, as concentrações de lamivudina nas *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) obtidas pelo método de referência (CLAE), enquanto que o eixo das ordenadas representa os valores preditos pelo modelo de regressão multivariada para estas mesmas amostras.

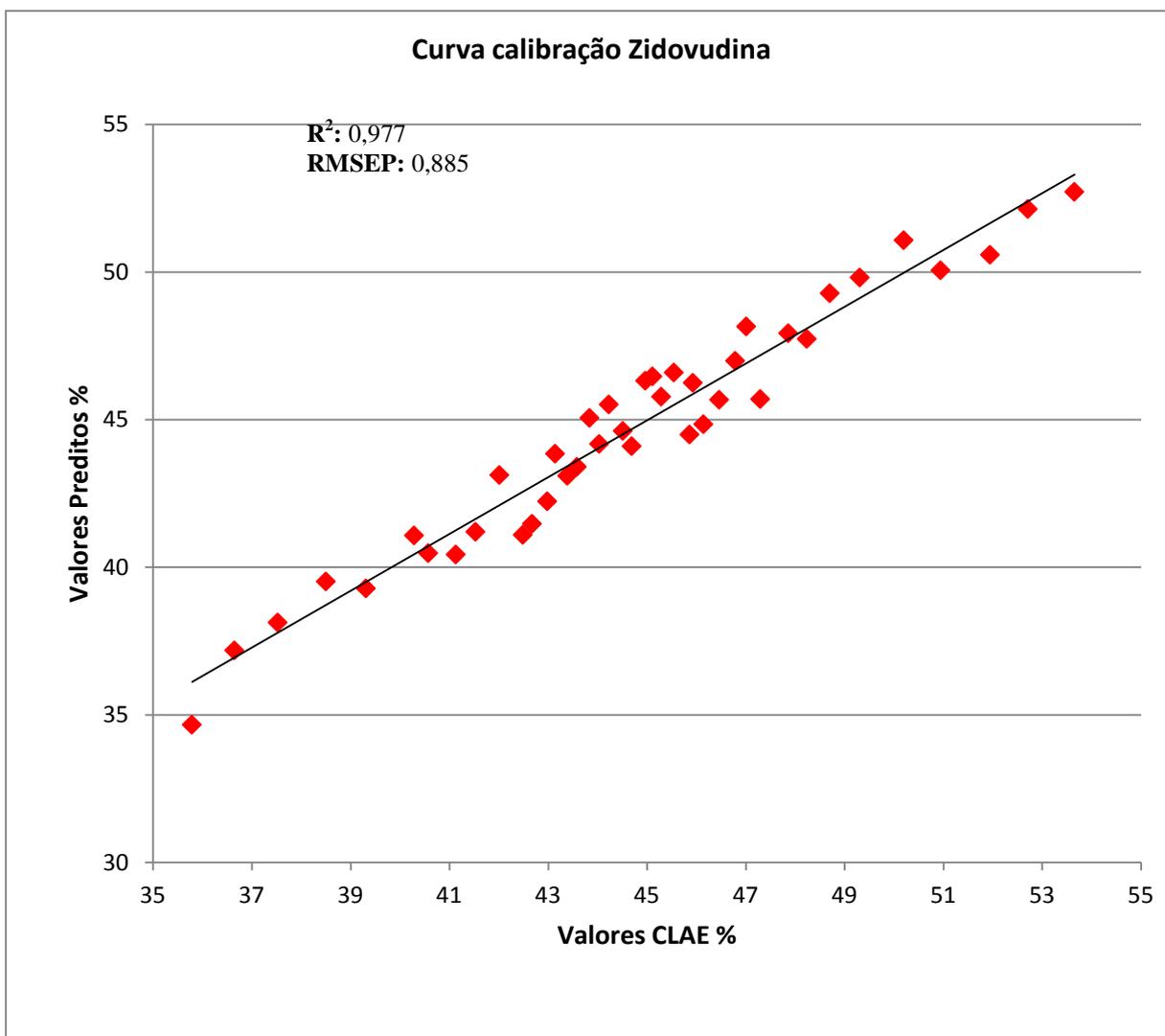


Figura 5.2 – Curva de calibração no infravermelho médio (MID) para a zidovudina

As Tabelas 5.12 e 5.13 apresentam respectivamente os valores da quantificação da zidovudina nas *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) e *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) utilizando-se os espectros médios conforme descrito na seção 4.2.7.

 Resultados

Tabela 5.12 – Quantificação da zidovudina por MID nas *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) utilizando-se os espectros médios de Zidovudina cada uma das preparações

Amostra	Zidovudina MID (%)
V01	34,329
V02	34,907
V03	35,817
V04	40,014
V05	40,270
V06	40,102
V07	41,188
V08	41,864
V09	40,001
V10	40,941
V11	42,250
V12	44,192
V13	43,159
V14	43,169
V15	44,147
V16	44,625
V17	46,716
V18	46,750
V19	45,641
V20	46,583
V21	48,500
V22	48,770
V23	48,580

Tabela 5.13 – Quantificação da zidovudina por MID nas *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) utilizando-se os espectros médios de cada uma das preparações

Amostra	Lamivudina MID (%)
A01	42,32
A02	41,24
A03	42,81
A04	43,09
A05	43,21

A Tabela 5.14 apresenta a estatística descritiva dos resultados da quantificação da zidovudina utilizando-se o respectivo modelo de regressão

Resultados

multivariada (Figura 5.2) aplicado a cada uma das cinco leituras das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) conforme procedimento descrito na seção 4.2.7.

Tabela 5.14 – Estatística Descritiva: Quantificação da zidovudina por MID para as cinco replicatas das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3)

Ensaio	Média	SD(%)	RSD(%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
V01	34,532	1,649	4,775	32,158	32,897	34,978	35,944	36,295
V02	35,410	3,240	9,150	31,190	32,420	34,920	38,650	38,700
V03	36,720	2,590	7,053	34,320	34,420	35,970	39,380	40,280
V04	38,636	1,685	4,361	36,587	37,160	38,210	40,324	40,806
V05	40,610	2,740	6,747	36,650	38,010	40,810	43,100	43,580
V06	38,690	3,090	7,987	33,960	36,110	39,200	41,010	42,540
V07	42,410	3,130	7,380	38,600	39,110	43,390	45,210	45,610
V08	41,170	3,460	8,404	37,110	37,770	41,810	44,240	45,770
V09	45,220	3,170	7,010	40,920	42,520	44,370	48,350	48,590
V10	43,950	3,230	7,349	41,400	41,640	42,040	47,210	48,930
V11	44,099	2,163	4,905	41,359	41,910	44,825	45,925	46,742
V12	43,660	3,940	9,024	39,740	39,870	43,900	47,340	49,090
V13	45,050	4,240	9,412	38,330	41,190	45,960	48,450	49,420
V14	45,737	1,545	3,378	44,546	44,585	45,562	46,977	48,353
V15	47,020	2,720	5,785	43,250	44,580	46,970	49,500	50,470
V16	49,510	4,320	8,726	43,960	45,590	48,670	53,840	54,230
V17	45,970	3,540	7,701	41,770	42,570	46,340	49,190	50,770
V18	48,610	3,520	7,241	43,290	45,630	49,230	51,280	53,030
V19	49,460	5,490	11,100	43,560	44,010	49,970	54,660	56,440
V20	50,653	2,234	4,410	47,623	48,529	50,750	52,728	53,309
V21	48,302	1,718	3,557	46,357	46,977	47,922	49,816	51,000
V22	53,080	2,380	4,484	51,220	51,300	51,810	55,510	56,700
V23	53,059	1,281	2,414	51,047	51,826	53,608	54,018	54,308
Repetibilidade Média Zidovudina:			6,624					

5.4.2. Intervalos de Tolerância lamivudina

O intervalo de tolerância para a quantificação da lamivudina MID foi calculado a partir da repetitividade média obtida pela aplicação do modelo de calibração multivariado da lamivudina a cada uma das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). Assim o erro amostral obtido foi igual a 4,56%, sendo o número de mensurações (n) igual a 5, o valor de t_{n-1} igual a 2,571 e repetitividade média para o fármaco igual a 3,964% (Tabela 5.11). Assim os valores dos limites de tolerância obtido foram de

99,1% para o Limite de Tolerância Inferior (LTI) e 100,9% para o Limite de Tolerância Superior (LTS) (Figura 5.3).

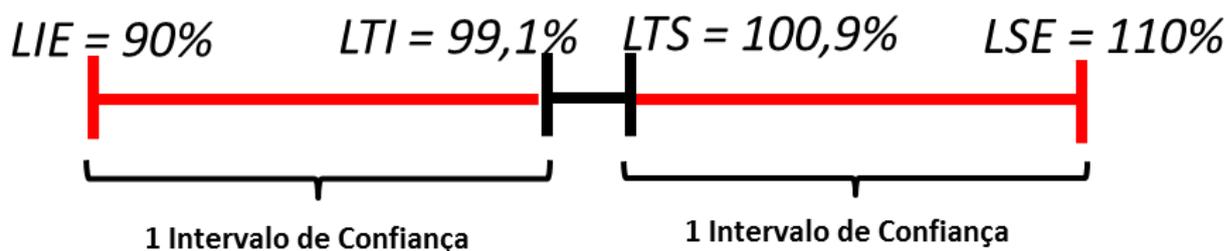


Figura 5.3: Representação esquemática dos limites de tolerância obtidos para lamivudina

5.4.3. Intervalos de Tolerância Zidovudina

No caso da quantificação da zidovudina, o intervalo de tolerância para a quantificação deste fármaco por MID foi calculado a partir da repetitividade média obtida pela aplicação do modelo de calibração multivariado da zidovudina a cada uma das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). Assim o erro amostral obtido foi igual a 7,62%, sendo o número de mensurações (n) igual a 5, o valor de t_{n-1} igual a 2,571 e repetitividade média para o fármaco igual a 6,624% (Tabela 5.14). Os valores dos limites de tolerância obtidos foram de 107,6% para o Limite de Tolerância Inferior (LTI) e 92,4% para o Limite de Tolerância Superior (LTS) (Figura 5.4).

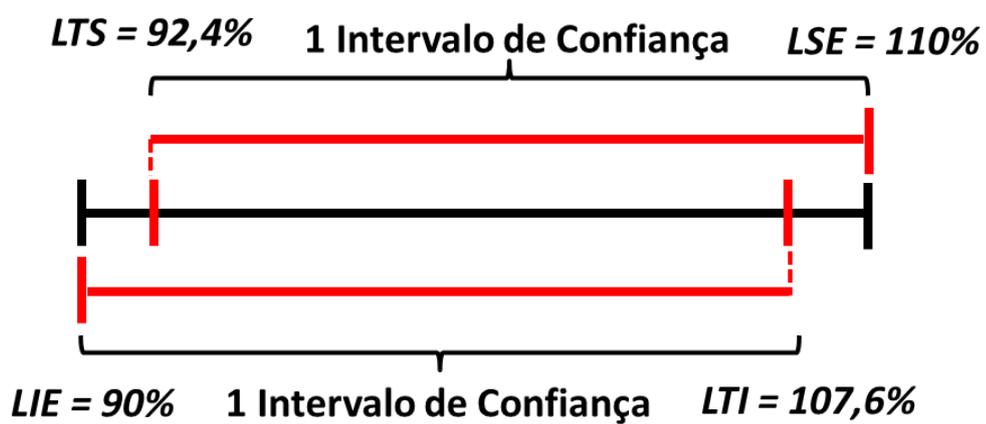


Figura 5.4: Representação esquemática dos limites de tolerância obtidos para zidovudina

6. Discussão

Análises espectroscópicas na região do infravermelho (IV) são extremamente difundidas na indústria farmacêutica. No entanto, apesar de nos últimos anos muitas aplicações para a espectroscopia no infravermelho terem sido descritas, desde análise de líquidos, composição de gases, análises de substâncias sólidas, caracterização de estado físico de substâncias, controle em processo, controle de qualidade, identificações de falsificações entre outras, sua ampla utilização na indústria local ainda se limita as análises qualitativas de identidade de componentes ativos ou excipientes.

O presente trabalho buscou desenvolver um método rápido para a determinação da uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos, utilizando-se os espectros obtidos por Espectroscopia de Reflectância Difusa com Transformada de Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy – DRIFTS), na região do infravermelho médio, e utilizando-se preparações laboratoriais de *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3).

A escolha do espectrofotômetro na região do infravermelho médio deveu-se principalmente a grande disponibilidade deste equipamento no controle de qualidade da indústria farmacêutica em geral. A grande maioria das aplicações e desenvolvimentos de métodos quantitativos utilizando-se espectroscopia no infravermelho descritas na literatura são realizadas na região do infravermelho próximo, possivelmente pela facilidade da adaptação de sondas, as quais facilitam as leituras e minimizam a variabilidade destas. No entanto, as técnicas estatísticas de calibração, bem como os parâmetros utilizados para avaliar a validade dos modelos são igualmente úteis na calibração e validação de modelos de regressão na região do infravermelho médio.

Os testes iniciais mostraram uma grande sobreposição das bandas de lamivudina pela zidovudina em todo o espectro de absorção na região de 450 cm^{-1} até 4000 cm^{-1} (Figura 6.1), verificando-se assim a necessidade da construção de modelos de regressão linear multivariados para a quantificação dos ativos por MID. As setas pretas e vermelhas indicam as regiões com melhores potenciais para a utilização em modelos de calibração multivariados, ou seja, com menor interferência entre os espectros dos fármacos, sendo que a cor vermelha refere-se a lamivudina enquanto que a cor pretas refere-se a lamivudina. Não foram registradas bandas de absorção dos ativos na faixa de 4000 cm^{-1} até 7000 cm^{-1}).

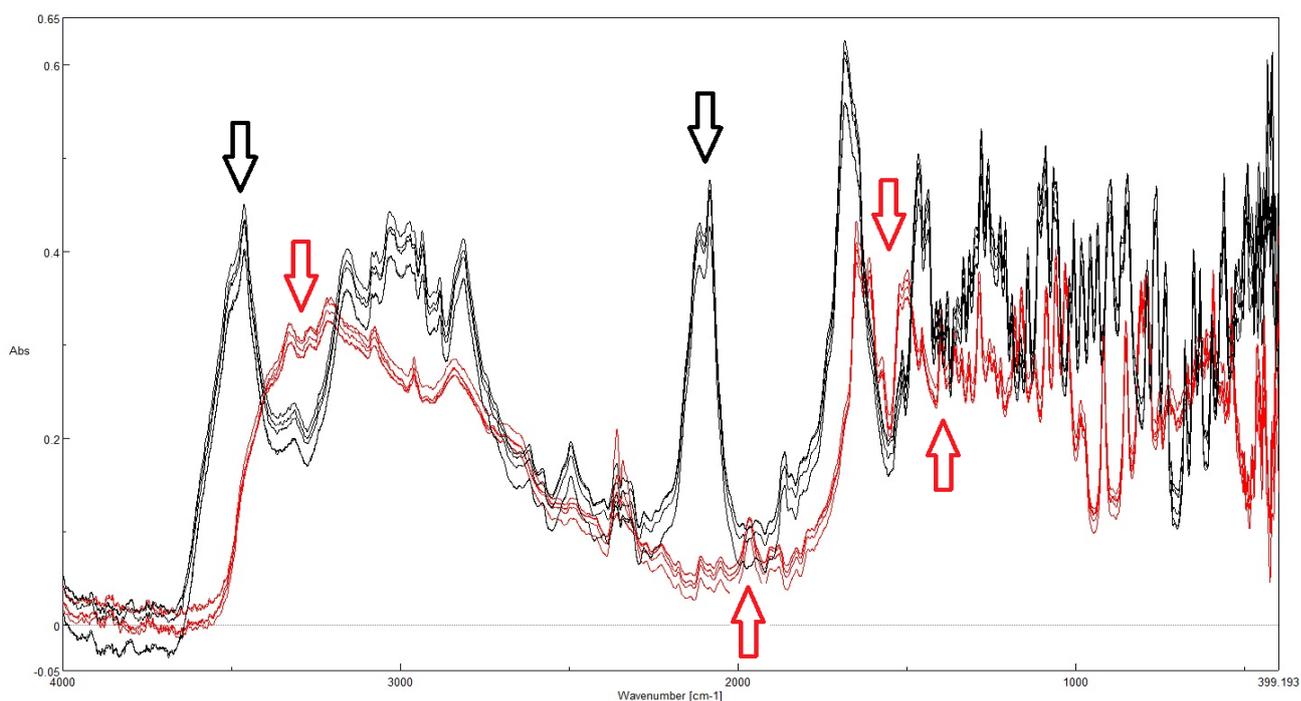


Figura 6.1 – Espectros de Absorção da lamivudina (vermelho) e da zidovudina (preto), obtidos utilizando-se o acessório de Reflectância Difusa

A obtenção de amostras representativas para utilização na calibração de métodos de regressão linear multivariado é sempre um fator complicador deste tipo

de abordagem, uma vez que geralmente as amostras do processo produtivo não apresentam a variabilidade necessária para gerarem modelos robustos para a quantificação. Optou-se assim pela preparação de *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3), através da pesagem em escala laboratorial de amostras contento quantidade variáveis dos fármacos e de placebo industrial. A mesma estratégia foi utilizada para a preparação de *Amostras de Validação* (seção 4.2.3), as quais foram úteis na avaliação da validade dos modelos propostos.

A preparação das *Amostras de Calibração* (seção 4.2.3) e *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) mostrou-se bastante laboriosa devido ao grande número de amostras necessárias para a construção e avaliação dos modelos de regressão multivariados. No presente trabalho um total de 64 amostras foram preparadas para a construção dos modelos de regressão multivariados, demandando um total de 576 pesagens individuais e um tempo estimado de 10 horas contínuas.

A obtenção dos espectros também somou várias horas de análise, uma vez que um grande cuidado deve ser empregado para manter a uniformidade das preparações das leituras. Um total de 325 leituras foram realizadas utilizando-se o micro amostrador do acessório Easydiff (Pike). Estima-se que um total de quase 30 horas contínuas foram necessárias para a finalização desta etapa

Com relação a obtenção dos valores de referência através da CLAE, esta foi a etapa mais laboriosa de todas, com um total de 138 preparações de amostras para análise por CLAE, cerca de 30 horas contínuas de preparação e outras 160 horas contínuas de análise em sistema cromatográfico. O tempo necessário para as análises por UPLC não foram relevantes uma vez que foram utilizadas as mesmas amostras preparadas para a análise por CLAE.

Conclusão

Considerando-se que em uma rotina normal de trabalho não é possível a realização de tantas horas de trabalho contínuos, bem como a velocidade de execução vai variar de acordo com característica pessoais e da experiência dos analista, as etapas iniciais de obtenção dos modelos de calibração multivaria pode levar de um mês a alguns meses. No entanto, uma vez gerado o modelo, este pode ser continuamente monitorado através da inclusão substituição periódica de leitura antigas por novas leituras dos calibradores já preparados.

Na utilização rotineira de modelos de calibração multivariados faz-se necessário a avaliação da robustez dos modelos ao longo do tempo, da vida útil dos equipamentos e da estabilidade das amostras de calibração. O presente trabalho não avaliou a robustez pelo tempo para dos modelos de calibração multivariados construídos para lamivudina e zidovudina.

As Figuras 6.2 e 6.3 apresentam o gráfico de dispersão para as concentrações obtidas para cada método de quantificação, ou seja, CLAE, UPLC e método de regressão multivariado pelos respectivos valores nominais de concentração (seção 5.3), para lamivudina e zidovudina respectivamente. Com a análise destes gráficos é possível verificar uma perfeita sobreposição dos valores de concentração obtidos tanto pelo método CLAE quanto pelo método UPLC. Em relação aos valores de concentração obtidos experimentalmente pelo método MID esta sobreposição não é perfeita. É possível observar ainda que os coeficientes angulares são coincidentes para os métodos CLAE e UPLC, mais destoante para o método MID.

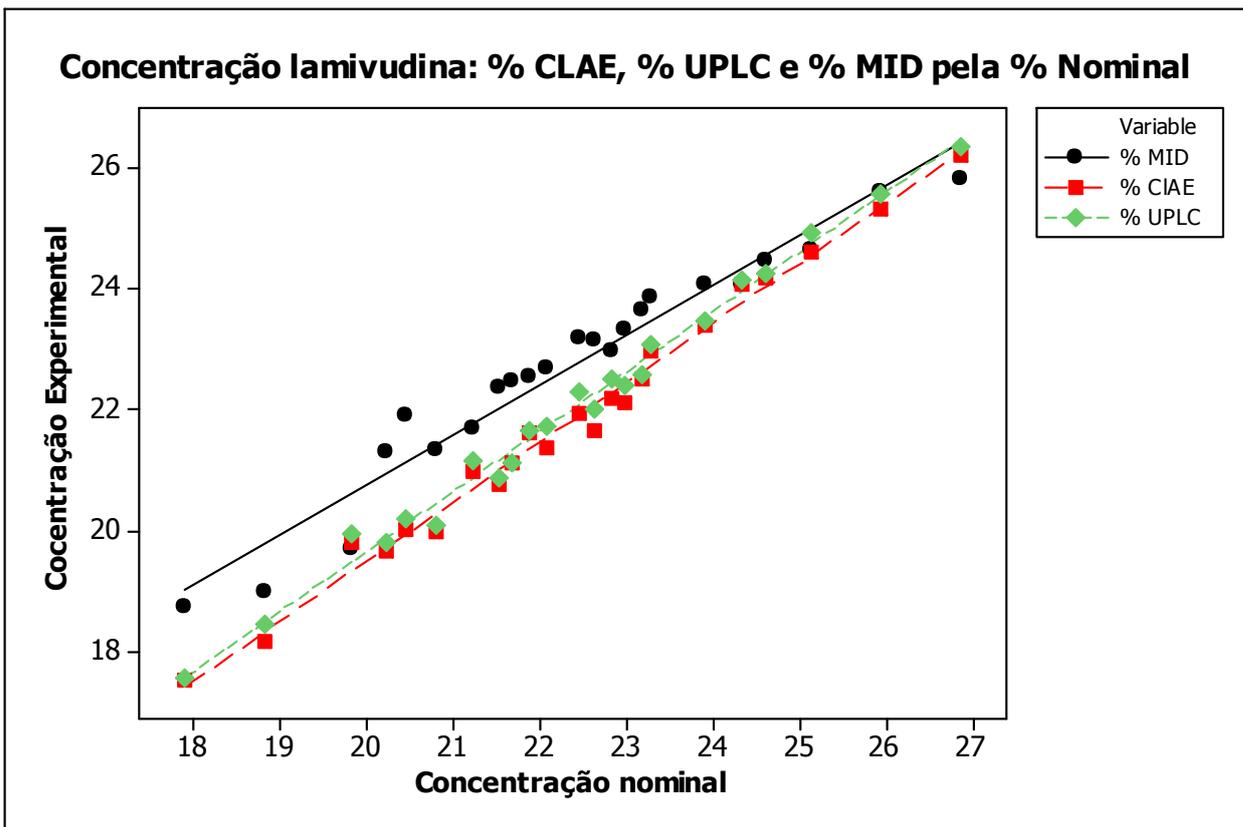


Figura 6.2 – Concentração lamivudina nas Amostras de Validação (seção 4.2.3): CLAE, UPLC e MID pela respectiva concentração nominal

A exatidão dos métodos pode ser evidenciada através da avaliação do coeficiente de ajustamento (R^2) das retas dos valores experimentais pela concentração conhecida das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). Um valor de coeficiente de ajustamento igual a um significa um ajustamento perfeito e quanto mais próximo de um valor for o coeficiente angular obtido, mais forte será a evidência de que o método é capaz de gerar resultados exatos. Neste sentido, os valores dos coeficientes angulares observados para cada um dos métodos e ativos são apresentados na Tabela 6.1.

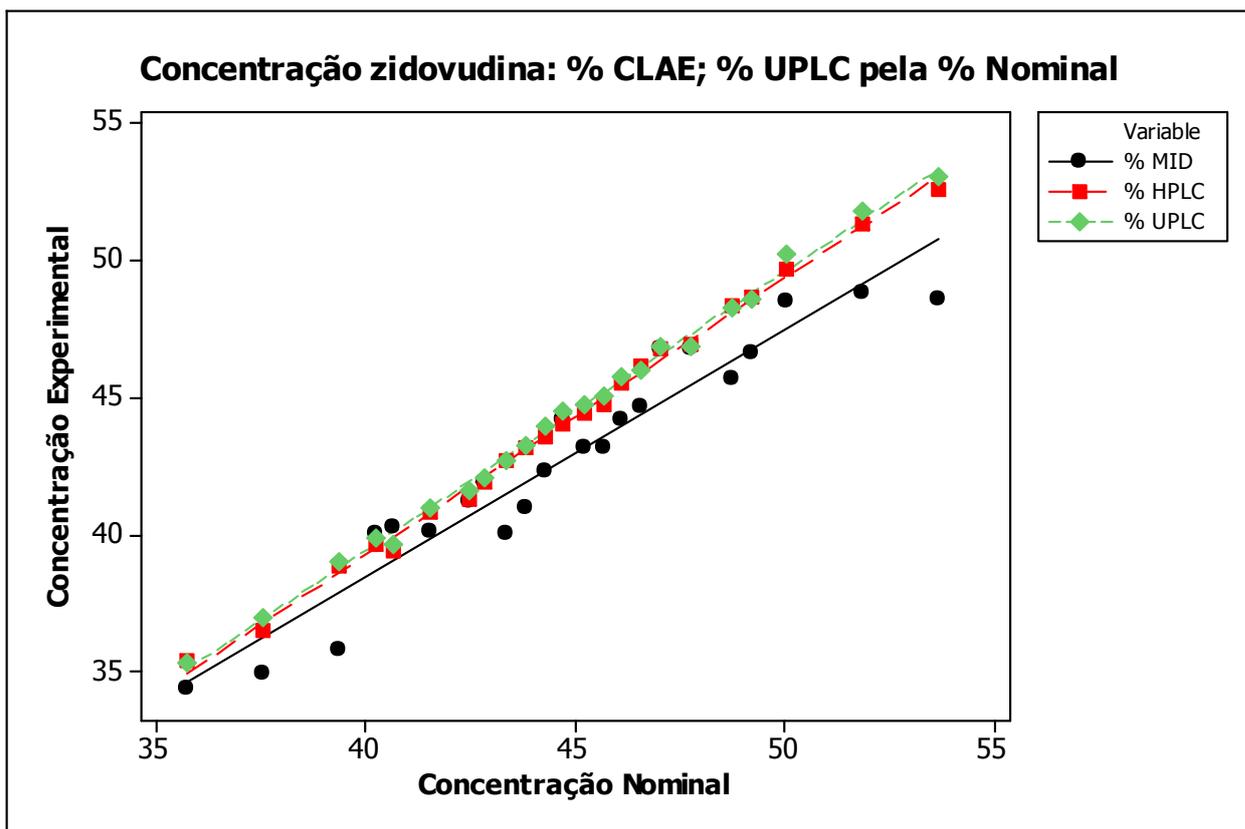


Figura 6.3 – Concentração lamivudina nas Amostras de Validação (seção 4.2.3): CLAE, UPLC e MID pela respectiva concentração nominal

Tabela 6.1 – Coeficiente de ajustamento (R^2) das Amostras de Validação (seção 4.2.2)

Método	Lamivudina	Zidovudina
CLAE	0,990	0,996
UPLC	0,991	0,996
MID	0,952	0,927

É possível afirmar que tanto o método CLAE quanto o método UPLC foram capazes de gerar resultados exatos. Com relação ao método MID os coeficientes de ajustamento obtidos para os dois ativos foram relativamente baixos, mostrando uma tendência de inexatidão dos resultados gerados.

Conclusão

Esta inexatidão pode explicar os valores destoantes obtidos para a quantificação da lamivudina nas Amostras do Produto Comercial (seção 4.2.2). Os valores normalizados para a quantificação dos ativos através de cada um dos métodos são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Concentrações normalizadas para as *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) utilizando-se os diferentes métodos

Método	Lamivudina		Zidovudina	
	(%) Experimental	Desvio Padrão	(%) Experimental	Desvio Padrão
CLAE	96,79	± 0,25	96,99	± 0,38
UPLC	96,93	± 0,32	97,29	± 0,61
MID	75,56	± 4,05	95,20	± 1,79

A partir da análise dos resultados obtidos para as *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2) é possível afirmar para ambos os fármacos os métodos CLAE e UPLC apontaram a conformidade do produto com relação a especificação da monografia. No entanto, o modelo MID mostrou-se ineficaz frente ao método de referência para quantificação dos fármacos nas *Amostras do Produto Comercial* (seção 4.2.2).

Com relação a quantificação da lamivudina pelo modelo MID, este método gerou um resultado extremamente destoante tanto do método de referência quanto do método UPLC proposto. O método para quantificação da zidovudina pelo modelo MID alcançou resultados relativamente melhores, tanto para a quantificação quanto para o desvio observado. Se considerado o valor final da quantificação sem ponderações de erro incorrido, este fármaco estaria dentro da especificação para o produto. No entanto, se for considerado o desvio obtido o resultado final estaria fora da especificação.

É importante salientar que um método de quantificação deve ser preciso, caso contrário o erro amostral torna-se demasiadamente grande, gerando como consequência regiões de rejeição demasiadamente grandes. Ambos os modelos de regressão multivariados apresentaram grande variabilidade na quantificação das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3). As figuras 6.3 e 6.4 ilustram respectivamente a dispersão entre as concentrações de lamivudina e zidovudina pelo método MID pelo método CLAE para as amostras de *Amostras de Validação* (seção 4.2.3).

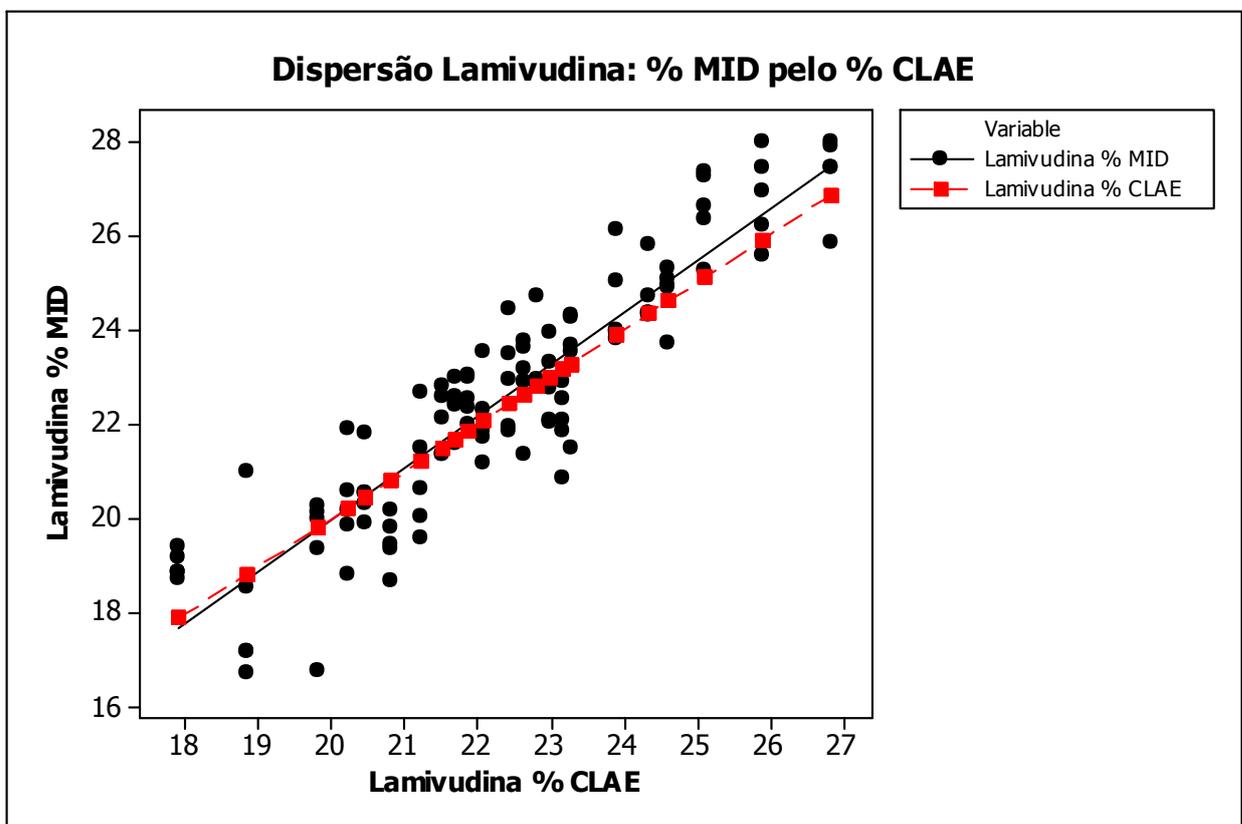


Figura 6.3 – Concentração das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) por MID versus CLAE - lamivudina

Através dos valores de repetibilidade média das *Amostras de Validação* (seção 4.2.3) foi possível calcular os limites de tolerância (seções 5.4.2. e 5.4.3.) para a quantificação dos ativos utilizando-se os modelos multivariados propostos. No caso da lamivudina as regiões de rejeição observadas foram muito grandes,

reduzindo a região de aceitação do resultado para cerca de 1,8% (de 99,1% a 100,9%), ou seja, para que um produto seja avaliado como dentro da especificação, o resultado obtido na análise de MID para este fármaco deve estar contido dentro do intervalo de 99,1% até 100,9%, inviabilizando assim um uso prático para o método avaliado. Para a zidovudina as regiões de rejeição foram ainda maiores, causando uma sobreposição entre o limite de tolerância inferior (LTI) e limites de tolerância superior (LTS) para o ativo. Na prática esta sobreposição significa que para qualquer valor encontrado para a concentração da zidovudina na faixa de 90% até 110% não é possível afirmar que este valor esteja dentro da especificação.

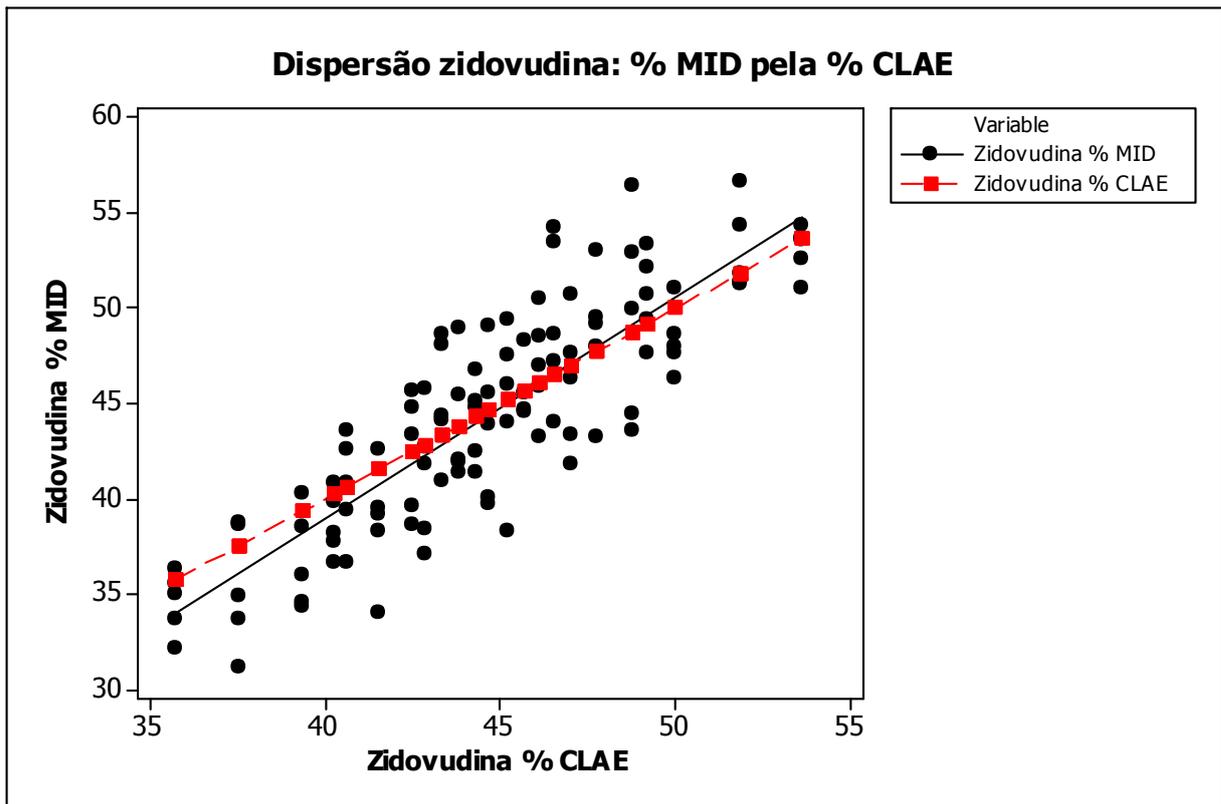


Figura 6.3 – Concentração das Amostras de Validação (seção 4.2.3) por MID versus CLAE - zidovudina

Estes resultados desfavoráveis podem estar associados a múltiplos fatores, como por exemplo, a dificuldade na padronização do tamanho de partícula das

Conclusão

amostras, a criticidade da preparação das amostras no amostrador para as leituras, a região espectral escolhida, a grande similaridade estrutural dos compostos entre outros.

A padronização do tamanho das partículas das amostras tem papel fundamental para a obtenção de espectros de qualidade e com boa reprodutibilidade. Todas as amostras foram exaustivamente trituradas com o auxílio de um mortar e pistilo de Ágata, no entanto, este método por si só pode não ter sido suficiente para a obtenção de uma distribuição homogênea do tamanho das partículas em todas as amostras.

A preparação/ compactação das amostras no amostrador durante as leituras desempenha um papel igualmente decisivo. Um extremo cuidado foi tomado com o objetivo de manter uma preparação uniforme para todas as amostras, mas é natural imaginar que por mais cuidado que se tome certa variabilidade na leitura sempre existirá.

A maior desvantagem do método oficial para quantificação da lamivudina e zidovudina em comprimidos é o longo tempo da corrida cromatográfica. Neste sentido, propôs-se um método rápido de análise por UPLC.

Os parâmetros cromatográficos tanto para o CLAE quanto para o UPLC foram considerados equivalentes, sendo que o método de UPLC diminuiu o tempo de corrida de 60 para 12,55 min. Os valores dos coeficientes de ajustamento (R^2) para estes dois métodos indicam ainda que estes foram eficientes em gerar resultados igualmente exatos.

Apesar de seu bom desempenho o método de análise por UPLC apresentou alguns problemas. Nas condições propostas foi observada a formação de “ombros” para os dois ativos. Outro problema verificado foi uma variação significativa no

Conclusão

tempo de retenção principalmente para a lamivudina (aproximadamente 14%), o que pode estar relacionada ao tempo insuficiente para o reequilíbrio da coluna em cada ciclo de gradiente.

7. Conclusão

Podemos considerar que os modelos de regressão linear múltiplos para a determinação da uniformidade de conteúdo e doseamento de lamivudina e zidovudina em comprimidos revestidos, empregando-se DRIFTS, na região do infravermelho médio, apresentaram altas variabilidades e, portanto, não são consideradas adequadas para a quantificação dos ativos nas faixas de concentração estabelecidas na especificação do produto.

Por outro lado, a transferência do método oficial de CLAE para UPLC foi realizado a contento. Os resultados obtidos para os sistemas CLAE e UPLC foram comparados estatisticamente e apresentaram resultados similares. Assim sistemas UPLC poderiam ser considerados como alternativas cabíveis para a redução do tempo de análise em controle de qualidade para o produto comercial estudado.

Cenário e Perspectivas:

As limitações na aplicabilidade dos métodos espectroscópicos para as quantificações inicialmente pretendidas não foram consideradas definitivas. Apesar de a metodologia de quantificação por UPLC ter obtido melhores resultados, esta técnica foi considerada como sendo um aperfeiçoamento do método clássico, e continua apresentando limitações intrínsecas que impossibilitam sua utilização em programas PAT. Conforme discutido, os fármacos estudados apresentam sobreposições importantes em toda a região espectral estudada. Assim, nossa intenção é prosseguir o trabalho com estes fármacos avaliando outras possibilidades de pré-tratamentos dos espectros, número de espectros e faixas espectrais utilizadas para a calibração, itens que não puderam ser contemplados no decorrer do período do mestrado. Os resultados derivados deverão constar de artigos científicos publicados, desafio que já está sendo trabalhado.

8. Referência Bibliográfica

- 1 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **História da AIDS**. Principais fatos históricos relacionados a AIDS desde de sua descoberta. Disponível em: < www.aids.gov.br/pagina/historia-da-aids >. Acesso em: 21 nov. 2012.
 - 2 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **PORTARIA Nº 236, DE 2 DE MAIO DE 1985**. Portaria que criou o Programa de Controle da SIDA ou AIDS (hoje Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais). Disponível em: < www.aids.gov.br/legislacao/2012/51440 >. Acesso em: 21 nov. 2012.
 - 3 Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). **UNAIDS World AIDS Day Report | 2012**. Relatório global sobre o progresso dos programas e incidência de casos de AIDS no mundo. Disponível em: < www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/JC2434_WorldAIDSday_results_en.pdf >. Acesso em: 15 dez. 2012.
 - 4 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico AIDS - DST**. Estatísticas relacionadas a AIDS no Brasil - Ano IX - nº 01 - até a semana epidemiológica 26 - junho 2012 Disponível em: < www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2012 >. Acesso em: 22 nov. 2012.
 - 5 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Relatório de Progresso da Resposta Brasileira ao HIV/ AIDS (2008-2009)**. Metas e Compromissos Assumidos pelos Estados Membros da Sessão Especial da Assembleia Geral das Nações Unidas em HIV/ AIDS - Relatório de Progresso do País (2010) Disponível em: < www.aids.gov.br/publicacao/2010/ungass-metas-relatorio-de-progresso-da-resposta-brasileira-ao-hiv-aids-2008-2009-ungass >.
 - 6 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Incidência Anual de AIDS**. Incidência de AIDS em indivíduos com 13 anos ou mais de idade segundo o sexo por ano de diagnóstico, Brasil, 2000-2009. Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids >. Acesso em: 27 nov. 2012.
 - 7 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Uso de Preservativos**. Proporção (%) de indivíduos de 15 a 54 anos, sexualmente ativos, segundo uso de preservativo. Brasil, 2004 e 2008. Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids/ >.
 - 8 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Relatório de Progresso da Resposta Brasileira ao HIV/ AIDS (2010-2011)**. Metas e Compromissos Assumidos pelos Estados Membros da Sessão Especial da Assembleia Geral das Nações Unidas em HIV/ AIDS - Relatório de Progresso do País (2012) Disponível em: < www.aids.gov.br/publicacao/2012/ungass_metas_relatorio_de_progresso_da_resposta_brasileira_ao_hiv_aids_2010_2011 >.
-

-
- 9 LAGO, R. F. D.; COSTA, N. D. R. Dilemas da política de distribuição de medicamentos antirretrovirais no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, p. 3529-3540, 2010.
- 10 Presidência da República - Casa Civil. **LEI Nº 9.313, DE 13 DE NOVEMBRO DE 1996**. Lei que dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de AIDS. Disponível em: < www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9313.htm >. Acesso em: 23 nov. 2012.
- 11 Ministério da Saúde - Gabinete do Ministro. **Portaria MS/GM nº 533, de 28 de março de 2012**. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Disponível em: < bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html >. Acesso em: 23 Nov. 2012.
- 12 Ministério da Saúde - Gabinete do Ministro. **RENAME 2012**. Anexo da Portaria MS/GM nº 533, de 28 de março de 2012 que elenca a relação de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Disponível em: < portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CONITECANEXOSRENAME.pdf >. Acesso em: 23 Nov. 2012.
- 13 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Brasil é citado como referência em relatório anual**. UNAIDS: Acesso universal ao tratamento é uma das iniciativas da política de aids brasileira reconhecida no cenário da saúde pública global - Publicado em 19 jul. 2012. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/6206/162/brasil-e-citado-como-referencia-em-relatorio-anual.html> >. Acesso em: 27 Nov. 2012.
- 14 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Antirretroviral Atazanavir terá fabricação nacional**. 30 nov. 2012 : Ministério da Saúde anuncia fabricação nacional do Atazanavir. Publicado em: 30 nov. 2012. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8381/162/antirretroviral-atazanavir-%3Cbr%3Etera-fabricacao-nacional.html> >. Acesso em: 13 Dez. 2012.
- 15 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Gasto anual com AIDS**. Gasto anual, em US\$ mil constantes, do Ministério da Saúde com AIDS, segundo item de despesa. Brasil, 2000-2007. Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids >. Acesso em: 27 nov. 2012.
- 16 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Valor pago com internações no SUS**. Estimativa do valor pago em internações decorrentes de AIDS desde o início da epidemia até 2010. . Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids >. Acesso em: 27 nov. 2012.
-

-
- 17 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Número de pacientes em Terapia com ARV**. Estimativa do número de paciente de AIDS em terapia com medicamentos antiretrovirais (ARVs) 2010. Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids >. Acesso em: 27 nov. 2012.
- 18 ERNESTO, A. S. et al. Usefulness of pharmacy dispensing records in the evaluation of adherence to antiretroviral therapy in Brazilian children and adolescents. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Brasil, v. 16, p. 315-320, 2012.
- 19 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Proporção de indivíduos recebendo terapia Antirretroviral**. Proporção de indivíduos com 15 anos ou mais infectados com HIV em fase avançada recebendo terapia Antirretroviral. Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids >. Acesso em: 28 nov. 2012.
- 20 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Consenso Adulto 2012 - versão preliminar**. Síntese das principais modificações das diretrizes nacionais da antecipação do tratamento para reduzir a transmissão do HIV: i) Recomendações de terapia antirretroviral para adultos vivendo com HIV/aids no Brasil – 2012; ii) Início de TARV para pessoas vivendo com HIV em parcerias sorodiscordantes. Disponível em: < www.aids.gov.br/node/52140 >. Acesso em: 29 nov. 12.
- 21 MARINS, J. R. P. et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. **AIDS**, v. 17 nº 11, p. 1675–1682, 2003.
- 22 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Sobrevida de pacientes com aids dobra em 12 anos. Tempo médio passa dos 58 meses para 108**. Aumento da sobrevida de doentes de AIDS registrada em estudo encomendado pelo *Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais* com cerca de 2 mil adultos diagnosticados entre 1998 e 1999. Disponível em: < www.aids.gov.br/noticia/Sobrevida-de-pacientes-com-aids-dobra-em-12-anos-tempo-médio-passa-dos-58-meses-para-108 >.
- 23 JUNIOR, P. R. B. D. S.; SZWARCOWALD, C. L.; CASTILHO, E. A. D. Self-rated health by HIV-infected individuals undergoing antiretroviral therapy in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. Rio de Janeiro, Brasil, p. S56-S66, 2011.
- 24 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Monitor AIDS. **Taxa de internações por aids no SUS por pacientes em terapia ARV**. Estimativa da proporção de pacientes em terapia com medicamentos antirretrovirais (ARV) e que necessitam de internações no SUS Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids/ >.
- 25 United Nations. **Constitution of the World Health Organization**. Genebra, Suíça, 2006.
-

- 26 United Nations. **WHOQOL-HIV Instrument**. Genebra, Suíça, 2012.
- 27 CAMPOS, L. N.; CÉSAR, C. C.; GUIMARÃES, M. D. C. Quality of life among hiv-infected patients in brazil after initiation of treatment. **Clinical Science**, v. 64(9), p. 867-875, 2009.
- 28 FERREIRA, B. E.; OLIVEIRA, I. M.; PANIAGO, A. M. M. Qualidade de vida de portadores de HIV/AIDS e sua relação com linfócitos CD4+, carga viral e tempo de diagnóstico. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Brasil, p. 75-84, 2012.
- 29 SILVA, M. C. F. et al. Risk-Factors for Non-Adherence to Antiretroviral Therapy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51(3), p. 135-139, 2009.
- 30 SCHILKOWSKY, L. B.; PORTELA, M. C.; SÁ, M. D. C. Fatores associados ao abandono de acompanhamento ambulatorial em um serviço de assistência especializada em HIV/aids na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, p. 187-197, 2011.
- 31 Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Taxa de aderência à terapia ARV**. Proporção (%) de indivíduos em terapia anti-retroviral (TARV) que tomaram mais de 95% das doses prescritas nos últimos três dias. Disponível em: < sistemas.aids.gov.br/monitoraids >.
- 32 Food and Drug Administration - FDA. **Pharmaceutical CGMPs for the 21st century - a risk-based approach - Final Report**. Rockville, USA, 2004.
- 33 JAMRÓGIEWICZ, M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 1-10, 2012.
- 34 Food and Drug Administration - FDA. **Guidance for Industry: Quality Systems Approach to Pharmaceutical CGMP Regulations**. Rockville, USA, 2006.
- 35 Food and Drug Administration - FDA. **Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance**. Rockville, USA, 2004.
- 36 LUNDSTEDT-ENKEL, K. et al. Different multivariate approaches to material discovery, process development, PAT and environmental process monitoring. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 84, p. 201-207, 2006.
- 37 EL-GINDY, A.; HADAD, G. M. Chemometrics in Pharmaceutical Analysis: An Introduction, Review, and Future Perspectives. **Journal of AOAC International**, Maryland, EUA, v. 95, nº 03, p. 609-623, 2012.
-

- 38 SARRAGUÇA, M. C.; LOPES, J. A. Quality control of pharmaceuticals with NIR: From lab to process line. **Vibrational Spectroscopy**, v. 49, p. 204-210, 2009.
- 39 JEFFERY, G. H. et al. **Vogel's TEXTBOOK OF QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS**. Quinta Edição. 1989.
- 40 SOUZA, J. S. D.; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, nº 03, p. 437-445, 2006.
- 41 American Society for Testing and Materials (ASTM) Committee. **E1655 – 05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. West Conshohocken, USA, 2005.
- 42 BRAGA, J. W. B. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada, aplicada na determinação de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo e médio**. 2004. 153 (Mestrado). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.
- 43 BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic Methods**. Quinta Edição. 1999.
- 44 United States Pharmacopeial Convention - USP. **USP36 / NF31: General Chapter <621> CHROMATOGRAPHY** Rockville, USA, 2013.
- 45 WREN, S. A. C.; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 140-146, 2006.
- 46 United States Pharmacopeial Convention - USP. **Pharmacopeial Forum 35(6) - Stimuli to the Revision Process: Transfer of HPLC Procedures to Suitable Columns of Reduced Dimensions and Particle Sizes**. Rockville, USA, 2009.
- 47 United States Pharmacopeial Convention - USP. **USP35 / NF30: Lamivudine and Zidovudine Tablets monograph**. Rockville, USA, 2012.
-