



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VINICIUS RICARDO ACQUARO JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DISSOLUÇÃO DO ANTIRRETROVIRAL
TENOFVIR UTILIZADO NO TRATAMENTO DE AIDS E
HEPATITE**

VINICIUS RICARDO ACQUARO JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DISSOLUÇÃO DO ANTIRRETROVIRAL
TENOFVIR UTILIZADO NO TRATAMENTO DE AIDS E
HEPATITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A186d Acquaro Junior, Vinicius Ricardo.

Desenvolvimento de métodos analíticos para dissolução do antirretroviral tenofovir utilizado no tratamento de AIDS e hepatite / Vinicius Ricardo Acquaro Junior. – Londrina, 2014.

88f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Hepatite B – Tratamento – Teses. 3. AIDS (Doença) – Tratamento – Teses. 4. Biofarmacêutica – Teses. 5. Medicamentos genéricos – Teses. 6. Indústria farmacêutica – Controle de qualidade – Teses. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

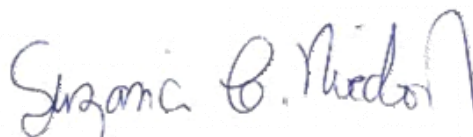
CDU 543

VINICIUS RICARDO ACQUARO JUNIOR

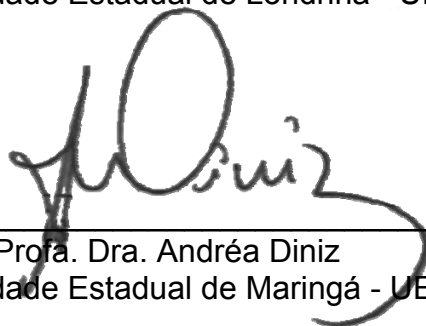
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DISSOLUÇÃO DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR UTILIZADO NO
TRATAMENTO DE AIDS E HEPATITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

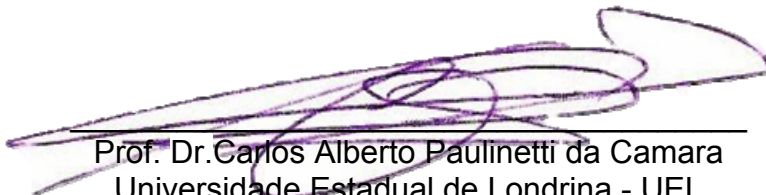
BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Profa. Dra. Andréa Diniz
Universidade Estadual de Maringá - UEM



Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de abril de 2014.

Aos meus pais Vinicius e Janete,
Pelo exemplo de vida, dignidade e
retidão de caráter
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra. Suzana Lucy Nixdorf pela valiosa orientação, compreensão, paciência, grande amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

À Secretaria Municipal de Saúde de Londrina pelo fornecimento da amostra de FTD, à Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda pelo fornecimento do padrão de FTD e ao LM-UEL pelo fornecimento do placebo.

À Profa.Dra. Marlene Maria Fregonezi Nerypelos valiosos ensinamentos e grande amizade.

A Prof. Dr.Carlos Alberto Paulinetti da Camara e aos alunos Alan e Leandro pela ajuda com o FIA.

Aos docentes dos Departamentos de Química, Tecnologia de Alimentos, Bioquímica, Física, Engenharia Civil, Matemática, Estatística e Administração, pelo incentivo, atenção e conhecimentos transmitidos.

Aos companheiros de laboratório, por todo auxílio prestado contribuindo para realização deste trabalho, em especial Tiago, Yuri, Lycio, Drielle e Thais.

A todos amigos da Química e de Londrina, em especial: Ana Paula Luiz, João Paulo Trevizan Baú, Isadora Vieira, Vanildo Neto, pela amizade, companheirismo em todas as horas e por me mostrarem que o caminho árduo, pode ser adorável quanto se tem amigos.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto: Ronaldo, William, Amilton, Fernando, Luiz Fernando e Fábio, pela força e companheirismo de tantos anos permanecendo mesmo a longa distância.

A família, em especial a meus pais, Vinicius e Janete, aos meus irmãos, Vanessa, Vivien e Victor e aos meus sobrinhos Pietro e Vincent, por todo amor e atenção que me deram forças, me preparando para chegar até aqui.

A vida ensina que se não sabemos onde queremos chegar, qualquer lugar serve. Mas demoramos muito tempo para nos tornarmos a pessoa que queremos ser, e o tempo corre. Aprender ao menos onde não queremos chegar e quem não queremos ser é de maior importância para que consigamos chegar lá, e descobrir o que tem do outro lado.

(Vinicius Acquaro Jr)

ACQUARO JR, Vinicius Ricardo. **Desenvolvimento de métodos analíticos para dissolução do antirretroviral tenofovir utilizado no tratamento de AIDS e hepatite** . 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina. 2014.

RESUMO

A AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) é uma doença pandêmica, que representa questão de Saúde Pública considerando as milhões de pessoas infectadas, especialmente nos Países menos desenvolvidos, e os altos custos dos antirretrovirais. Em 2010, o governo brasileiro quebrou a patente do antirretroviral fumarato de tenofovir desopoxila (TDF), comercializado sob o nome de Viread[®], considerando ser estratégico para o tratamento da AIDS e hepatite B. Isto estimulou a concorrência das indústrias farmacêuticas para a produção do TDF genérico, distribuído nas redes públicas desde 2011. Entretanto, os métodos descritos na literatura para a determinação do TDF, na sua grande maioria, são parafluídos biológicos e medicamentos em associação utilizando cromatografia. Contudo, ainda não foi encontrada monografia oficial para o TDF. Portanto, considerando o valor agregado e estratégico do ensaio de dissolução para o desenvolvimento e controle de qualidade dos medicamentos, este trabalho objetivou desenvolver e validar métodos para quantificação e dissolução de comprimidos de TDF. Como diferencial, utilizou planejamento experimental e eficiência de dissolução para encontrar as melhores condições analíticas. Buscou-se versatilidade, com aplicação de um sistema *lab-made* automatizado, controlado via software, utilizando a análise de injeção de fluxo (FIA) para realizar a coleta sequencial das amostras nas 6 cubas e a diluição *on-line*, com leitura em espectrofotômetro UV. O planejamento fatorial utilizou o tempo de dissolução e a velocidade de agitação como variáveis independentes. Não houve diferença significativa em nível de 5% na dissolução, mostrando que o ensaio pode ser realizado em qualquer velocidade ou tempo dentro do intervalo testado. Estabeleceu-se então, o uso do aparato de pá em 50 rpm, com 900 mL de meio, e tempo de coleta de 30 minutos. Diferentes tipos de filtros e modos de filtração foram testados sem interferência significativa ($p > 0,05$), optando-se pelo filtro qualitativo de 1 mm na dissolução convencional e de lã de vidro para dissolução automatizada FIA-UV. Os meios de dissolução: aquoso; HCl 0,1 mol L⁻¹; HCl 0,01 mol L⁻¹; e tampão fosfato pH 7,4, foram avaliados pelo perfil de dissolução, e a porcentagem de eficiência de dissolução foi calculada, sendo o HCl 0,1 mol L⁻¹ considerado o de melhor eficiência. Os métodos de teor; dissolução convencional; em sistema de fluxo desenvolvidos e validados mostraram-se: específicos e seletivos, sem interferência do placebo no UV; lineares, com limites de detecção e quantificação adequados na faixa terapêutica dos comprimidos; precisos, repetitivos para quantificação e dissolução intradia e inter-dias; exatos, com recuperações médias na faixa recomendada pela ANVISA. Desta forma, considera-se que os métodos propostos constituem alternativa viável e ferramenta analítica aplicável ao desenvolvimento e controle de qualidade dos comprimidos de TDF genérico.

Palavras-chave: Planejamento experimental. Dissolução. Instrumentação. FIA. UV.

ACQUARO JR, Vinicius Ricardo. **Development of analytical methods for antiretroviral tenofovir dissolution testing applied in AIDS and hepatitis B treatment.** 2014. 88 p. Master Degree Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Londrina. 2014.

ABSTRACT

AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) is a pandemic disease, which represents public health issue, having millions of people infected, especially in less developed countries, given to high-costs of antiretroviral drugs. In 2010, Brazilian government broke the patent of antiretroviral tenofovir disoproxil fumarate (TDF) traded under Viread® name, considering being strategic for AIDS and hepatitis B treatment. This, stimulated national pharmaceutical industry competition for production of TDF generic, distributed in public health care since 2011. However, methods described in literature for TDF determination, in their major, use chromatography for biological fluids with association of medicines. However, it still not found any official monograph for TDF. Therefore, considering strategic value of dissolution testing for development and quality control of medicines, this study aimed to develop and validate methods for quantify TDF tablets and dissolution testing. As differential, experimental design and dissolution efficiency were applied to find the best analytical conditions, seeking versatility, with application of fully automated lab-made system, controlled by software, using flow injection analysis (FIA) to perform sequential samples collection in 6 baths, filtered and on-line diluted, reading on UV spectrophotometer. Factorial design used dissolution time and rotation speed as independent variables, show no significant difference at 5 % level of dissolution, showing that assay can be performed at any speed or time within the tested range. Analytical condition established, paddle apparatus at 50 rpm, with 900 mL of medium, and collection time of 30 minutes. Different types of filters and filtration modes were tested without significant interference ($p > 0.05$), so 1 mm qualitative filter was chosen for classical dissolution and glass wool for FIA-UV automated dissolution. Dissolution media: water, HCl 0.1 mol L^{-1} , HCl 0.01 mol L^{-1} , and phosphate buffer pH 7.4 were evaluated by dissolution profile and efficiency of dissolution was calculated, showing that HCl 0.1 mol L^{-1} has the best efficiency. The methods developed and validated for content, conventional dissolution testing, and using flow system proved to be: specific and selective without placebo interference in UV; linear, with appropriate detection and quantitation limits within therapeutic range of tablets dosage; precise, with repeatability for intra-day and inter-day quantification; accurate, with average recoveries within ANVISA recommended range. Thus, it is considered that proposed methods are feasibly, an analytical tool applicable to development and quality control of generic TDF tablets.

Keywords: Experimental design. Dissolution testing. Instrumentation. FIA. UV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)	15
Figura 2 - Ciclo da replicação viral do HIV	24
Figura 3 - Conversão do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em tenofovir	27
Figura 4 - Conversão do tenofovir em tenofovir difosfato.....	27
Figura 5 - Sistema FIA desenvolvido por Ruzicka.....	35
Figura 6 - Módulo USB (PUSB-4RL) utilizado para ligar e desligar os reles	48
Figura 7 - Válvula solenoide de baixa pressão de três vias (NResearch 161T031)	49
Figura 8 - Válvula seletora de 10 vias	50
Figura 9 - Modelo esquemático da válvula seletora com seu controlador.....	50
Figura 10 - Filtros não preenchidos (a) e preenchidos com lã de vidro (b)	51
Figura 11 - Imagem digitalizada do software CONTROL-FIA e dos macrocomandos	52
Figura 12 - Imagem do tratamento de dados utilizando software UTI-FIA, desenvolvido no grupo DIA, para obtenção das alturas dos picos (sinais transientes) nos fiagramas da curva de padrão de TDF	53
Figura 13 - Esquema da amostragem analítica com o atuação da válvula solenoide de 3 vias do sistema FIA	54
Figura 14 - Fluxograma do sistema FIA	54
Figura 15 - Sistema FIA completo utilizado no ensaio de dissolução automatizada FIA-UV.....	55
Figura 16 - Espectro de absorção da solução padrão (30,0 µg mL ⁻¹) e placebo em HCl 0,1 mol L ⁻¹ na faixa de 200 a 300 nm para o método de teor.....	56
Figura 17 - Curvas analíticas de calibração (a) e gráfico de resíduos (b) (n=9) para o método de teor.....	57
Figura 18 - Superfícies de contorno para dissolução do TDF nos meios HCl 0,1mol L ⁻¹ (a), Água ultrapura (b) e Tampão fosfato pH 7,4 (c)	61
Figura 19 - Perfil de dissolução do TDF emHCl 0,1 mol L ⁻¹ , Água,e Tampão fosfato pH 7,4.....	64
Figura 20 - Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,1 mol L ⁻¹ e HCl 0,01 mol L ⁻¹	65

Figura 21 - Espectro de absorção da solução padrão (30,0 µg mL ⁻¹) e placebo em HCl 0,1 mol L ⁻¹ na faixa de 200 a 300 nm a 37±0,5 °C com aparato pá à 50 rpm utilizando método da dissolução.....	69
Figura 22 - Curvas analíticas de calibração (a) e gráfico de resíduos (b) (n=9) para o método de dissolução	70
Figura 23 - Curva analítica de calibração (a) e gráfico de resíduos (b) (n=9) para o sistema FIA.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento fatorial para o método de dissolução proposto para o TDF	43
Tabela 2 -	Planejamento fatorial dos ensaios utilizando diferentes tipos de meio – aquoso, ácido e tamponado	43
Tabela 3 -	Avaliação da linearidade das curvas padrão de TDF a partir dos resíduos utilizando o método de teor	57
Tabela 4 -	Valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações de TDF para avaliação da precisão e precisão intermediária do método de teor	58
Tabela 5 -	Valores experimentais do teste de recuperação realizado com adição padrão de TDF na amostra de TDF na proporção de 80% ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100% ($30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 120% ($37,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=3) do método de teor	59
Tabela 6 -	Tratamentos do planejamento fatorial 2^2 e respectivas porcentagens de dissolução do TDF (%) nos três diferentes meios	61
Tabela 7 -	Funções resposta (Y) do TDF nos três meios de dissolução e respectivos coeficientes de determinação	62
Tabela 8 -	Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o meio de dissolução HCl 0,1 mol L ⁻¹	62
Tabela 9 -	Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o meio de dissolução água ultrapura	63
Tabela 10 -	Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o meio de dissolução tampão fosfato pH 7,4	63
Tabela 11 -	Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,1 mol L ⁻¹ , água ultrapura, e tampão fosfato pH 7,4	64
Tabela 12 -	Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,1 mol L ⁻¹ e HCl 0,01 mol L ⁻¹	65
Tabela 13 -	Eficiência de dissolução do TDF para o meio de HCl 0,1 mol L ⁻¹	67
Tabela 14 -	Análise da diferença de eficiência de dissolução dentre os meios	67

Tabela 15 - Avaliação da influência pela filtração dos padrões pelo uso ou não de diferentes tipos de filtros/membranas na absorvância do TDF (n=3)	68
Tabela 16 - Avaliação da linearidade do método de dissolução do TDF a partir dos resíduos utilizando o método de dissolução convencional.....	70
Tabela 17 - Valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações de TDF para avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de dissolução	71
Tabela 18 - Valores experimentais do teste de recuperação realizado com adição de padrão de TDF no placebo na proporção de 80% (25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100% (30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 120% (37,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=3) para o método da dissolução	72
Tabela 19 - Avaliação da linearidade para o sistema FIA das curvas de padrão do TDF a partir dos resíduos	72
Tabela 20 - Valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações de TDF para avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de quantificação utilizando o sistema FIA.....	74
Tabela 21 - Valores experimentais do teste de recuperação realizado com adição de padrão na amostra de TDF na proporção de 80% (20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100% (30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 120% (40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=3) utilizando o sistema FIA.....	74
Tabela 22 - Dissolução do TDF em HCl 0,1 mol L ⁻¹ automatizada utilizando FIA.....	75
Tabela 23 - Comparação do ensaio de dissolução do TDF em HCl 0,1 mol L ⁻¹ realizado utilizando o sistema FIA automatizado desenvolvido com a dissolução convencional (manual).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
ED	Eficiência de Dissolução
FDA	Agência norte-americana que regulamenta medicamentos, alimentos e cosméticos
TDF	Fumarato de Tenofovir Desoproxila
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Difluoreto de Polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
TAR	Terapia Antirretroviral
ART	AntiretroviralTherapy
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	HIV	20
2.2	ANTIRRETROVIRAL.....	23
2.3	TENOFOVIR.....	26
2.4	ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	29
2.4.1	Histórico	29
2.4.2	Fatores que Afetam a Dissolução	31
2.4.2.1	Influência do fármaco e da formulação	31
2.4.2.2	Influências de equipamento e ambiente	32
2.5	ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)	34
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	MATERIAIS	39
4.1.1	Produtos Farmacêuticos, Padrão de Referência e Reagentes	39
4.1.2	Equipamentos e Acessórios.....	39
4.2	MÉTODOS	40
4.2.1	Desenvolvimento e Validação do Método de Teor.....	41
4.2.1.1	Parâmetros de validação do método de Teor de TDF para comprimido e matéria-prima.....	41
4.2.2	Desenvolvimento e Validação de Método Para o Ensaio de Dissolução Convencional de Comprimidos de TDF	42
4.2.2.1	Planejamento fatorial para a dissolução	42
4.2.2.2	Perfil de dissolução	43
4.2.2.3	Eficiência de dissolução.....	44
4.2.2.4	Estabilidade na dissolução.....	44
4.2.2.5	Influência da membrana filtrante na dissolução	44
4.2.2.6	Parâmetros de validação na dissolução	45

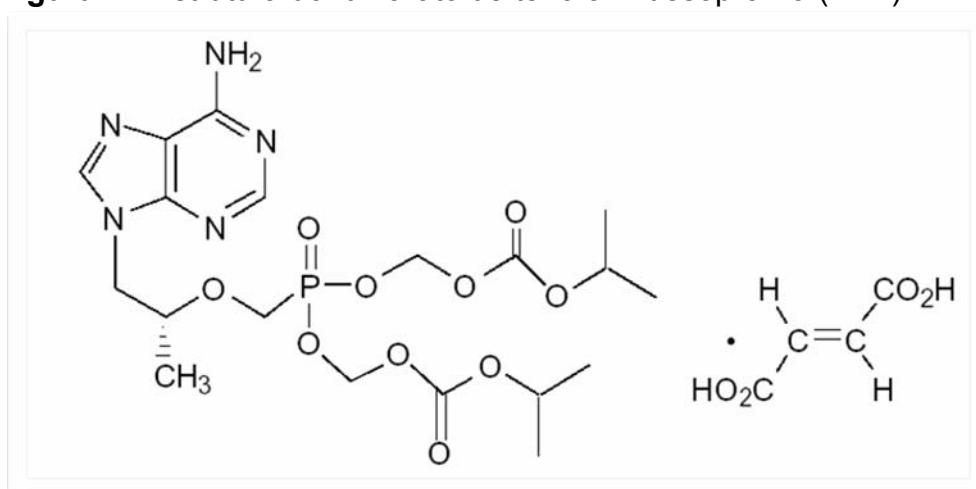
4.2.3	Desenvolvimento e Validação de Método Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	46
4.2.3.1	Parâmetros de validação	46
4.2.4	Aplicação do Método de Dissolução Automatizada por FIA-UV dos Comprimidos de TDF	47
4.2.4.1	Instrumentação e partes integrantes do sistema FIA-UV.....	47
4.2.4.2	Montagem do sistema FIA-UV	53
4.2.4.3	Desempenho do sistema FIA-UV.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE TEOR DE TDF PARA COMPRIMIDO E MATÉRIA-PRIMA.....	56
5.2	CONSIDERAÇÕES PARA O MÉTODO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	59
5.2.1	Planejamento Fatorial	60
5.2.2	Perfil de Dissolução e Escolha do Meio.....	63
5.2.3	Eficiência de Dissolução	66
5.2.4	Influência da Filtração no Ensaio de Dissolução.....	68
5.2.5	Estabilidade	69
5.2.6	Parâmetros de Validação do Método para Ensaio de Dissolução	69
5.3	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO SISTEMA FIA	72
5.4	DESEMPENHO NA APLICAÇÃO DA DISSOLUÇÃO AUTOMATIZADA POR FIA-UV	75
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA ou AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). A AIDS infecta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo o maior número de casos nos países em desenvolvimento (UNAIDS, 2013). Na história da pandemia do HIV, o Brasil foi pioneiro ao criar um Programa Federal com distribuição gratuita da terapia antirretroviral (TAR) (OKIE, 2006). A política brasileira dos antirretrovirais (ARVs) tem apresentado aspectos inovadores, não somente por garantir a distribuição gratuita dos medicamentos, mas também, por estimular sua produção nacional (GALVÃO, 2002). O antirretroviral utilizado no Brasil desde julho de 2003 para o tratamento da AIDS é o fumarato de tenofovir desoproxila (TDF). Esse fármaco apresenta ainda, resposta positiva para supressão do vírus da hepatite B (BERG et al., 2010; GISH et al., 2005; SWEETMAN et al., 2007).

Quimicamente o TDF é o 9-[(R)-2-[bis[(isopropoxicarbonil)oxi]metoxi]fosfonil]metoxi]propil]adenina fumarato com a fórmula molecular $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$ (Fig. 1) e massa molar de 635,52 (BUDAWARI, 2001; USP, 2014), pertencente à classe dos inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo e nucleotídeo (ITRNN) (GARFORTH, PARNIAK and PRASAD, 2008; LAVRA, 2006).

Figura 1 - Estrutura do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)



Fonte: USP (2014)

O FTD é um pró-fármaco, já que sua atividade antiviral necessita que esse seja fosforilado por quinases (SOUZA e ALMEIDA, 2003; BENNETT-HOOD, LONG e ACOSTA, 2007), cujo metabólito trifosfato formado é o responsável por interromper a replicação do DNA (LAVRA, 2006). O medicamento atua através da inibição competitiva com o desoxinucleotídeo trifosfato fisiológico, impedindo a extensão da fita e conseqüentemente a replicação viral (MANENTI, 2008). Os fármacos análogos de nucleosídeos destacam-se como terapêutica de primeira linha contra a infecção pelo HIV-1 (GARFORTH, PARNIAK e PRASAD, 2008; BERG et al., 2010). Existem no mercado no momento, oito medicamentos nucleosídeo-nucleotídeo, capazes de inibir a enzima transcriptase reversa que são: zidovudina (AZT), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), didanosina (ddl), abacavir (ABC), emtricitabina (FTC) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) (SOUZA, ALMEIDA, 2003; DE CLERCQ, 2009).

O TDF por ser considerado estratégico pelo Programa Nacional de DST-AIDS é de interesse para a saúde pública no País, já que corresponde a quase 10% dos gastos do programa. Em 2008, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) negou a concessão da patente, detida pela Indústria Farmacêutica Gilead (EUA) para o Viread® (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Sem o reconhecimento dos direitos da patente, surgiu a oportunidade em 2010, para outras empresas solicitarem registro do TDF como medicamento genérico e similar. Existem quatro registros de medicamentos genéricos do fármaco TDF, em nome das empresas: Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Blanver Farmoquímica, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos.

Entretanto, a produção nacional do medicamento antirretroviral TDF requer o cumprimento da legislação vigente no país para registro de medicamentos genéricos ou similares (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010). Dentre os requisitos exigidos está a realização de testes *in vitro* e *in vivo* para comprovação da qualidade, segurança e eficácia.

Como as formas farmacêuticas sólidas orais têm aumentado de maneira significativa nos últimos anos, devido à ampliação das prescrições médicas, os ensaios de dissolução vêm ganhando considerável importância, já que a absorção do fármaco depende: da liberação da sua forma farmacêutica; da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas; e de sua permeabilidade

através do trato gastrointestinal (MARCOLONGO, 2003). Assim, ensaios de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações (DALMORA et al., 2010; SOARES et al., 2010).

Os resultados obtidos por estes ensaios: auxiliam no desenvolvimento e avaliação de novas formulações; permitem verificar sua estabilidade; possibilitam correlação *in vivo* – *in vitro*; e fazem parte da documentação para registro de novos produtos, junto às autoridades regulatórias. Já, para a área de produção e controle de qualidade, os resultados deles possibilitam: detectar desvios de fabricação; assegurar uniformidade durante a produção de um lote; reprodutibilidade lote a lote; avaliar a qualidade da formulação, em função do tempo e condições de armazenagem, durante o período de validade do produto. Permitem ainda, a avaliação após o registro do produto, e podem auxiliar na decisão quanto à realização de estudos de bioequivalência (NICKERSON, 2001).

A realização de testes para controle de qualidade *in vitro* de produtos farmacêuticos requer a utilização de métodos publicados em farmacopeias reconhecidas pelo órgão regulatório nacional a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Na ausência de monografia oficial com métodos gerais para controle de matéria-prima e formas farmacêuticas correlatas inscritas na farmacopeia brasileira, pode-se adotar a última edição da monografia oficial de um dos seguintes compêndios internacionais das farmacopeias: Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Europeia, Francesa, Internacional (OMS), Japonesa, Mexicana, Portuguesa, e na ausência destes podem ser utilizados métodos devidamente validados (BRASIL, 2009). Apesar de o TDF estar disponível comercialmente, sua monografia não consta em farmacopeias recomendadas pela ANVISA.

O TDF está descrito na lista da “USP Pending Monographs” e embora a publicação na *web* tenha sido autorizada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para comercialização do fármaco em território americano, ainda não faz parte do compêndio oficial e pode sofrer alterações (USP, 2014). Outros compêndios oficiais, inclusive a farmacopeia brasileira 5ª Edição (2010), não apresentam monografia para análise do tenofovir.

Sabe-se que a escolha do método analítico deve ser criteriosa, pois falhas podem comprometer a segurança e eficácia do medicamento. Por isto, a

validação de métodos desenvolvidos deve avaliar parâmetros de adequabilidade quanto à: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, segundo preconizam os principais compêndios oficiais (FDA, 1994; ICH, 1996; USP, 2010; BRASIL, 2003).

Convém ressaltar que, a validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema, consistentemente levam aos resultados esperados (BRASIL, 2010). Portanto, a análise de fármacos é necessária nas diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, desde os estudos de formulação e de estabilidade, até o controle de qualidade com testes farmacológicos e toxicológicos realizados em animais e humanos. A falta de métodos confiáveis de avaliação de qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e de vigilância desses produtos (BAKSHI e SINGH, 2002; TRULLOLS et al., 2004; WHO, 2006).

Pela sua confiabilidade, a maioria das monografias da Farmacopeia Americana empregam métodos cromatográficos (USP, 2011). Entretanto, apesar da eficácia da técnica, deve-se considerar a necessidade de seu uso em um monofármaco, especialmente quanto à quantidade substancial de solventes orgânicos utilizados na fase móvel, por vezes tóxicos. O uso de solventes tem gerado preocupação, e levado à busca por métodos alternativos que minimizem a produção de resíduos. Neste sentido, esforços têm sido feitos, visando reduzir o impacto desses solventes no meio ambiente. Este direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente vem sendo chamado de *greenchemistry*, ou química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química autossustentável (LENARDÃO et al., 2003).

Portanto, a utilização de métodos alternativos a cromatografia que não necessitem de solventes com estimada toxicidade são bem vistos. A espectrofotometria é um método simples sem ser simplista, que pode ser associado com sistemas automatizados, como no caso de sistemas de injeção em fluxo (FIA), constituindo em uma ferramenta alternativa à cromatografia.

Apesar de haver métodos descritos na literatura para determinação do TDF, a maioria aborda a associação de fármacos, se destina a fluidos biológicos, emprega solventes orgânicos e utiliza equipamentos sofisticados, como o HPLC e o LC-MS/MS. Encontrou-se a determinação de TDF em comprimidos por método espectrofotométrico no UV, estudada por Shirkhedkar, Bhirud e Surana (2009).

Shama e Mehta (2010) estudaram a associação de TDF, lamivudina e efavirenz; e Sudha et al. (2010) a determinação em matéria-prima e comprimidos de TDF e emtricitabina. Já, Joshi et al. (2009), Patel et al. (2009) e Sharma, Gupta (2009) utilizaram o método HPTLC para determinar a associação de TDF e emtricitabina em comprimidos.

Métodos de HPLC foram propostos por Mangoankar, Desai (2008) e Appala et al. (2008) para a determinação simultânea de TDF e efavirenz em comprimidos; enquanto Raju & Begun (2008) realizaram sua determinação simultânea de emtricitabina, TDF e efavirenz; Kandagal et al.(2008) quantificaram o TDF em formulações farmacêuticas e plasma humano; Rezk, Crutchley, Kashuba (2005) determinaram simultaneamente emtricitabina e TDF no plasma humano; e King et al.(2006) determinaram o TDF no sangue.

A determinação do TDF no plasma empregando LC-MS/MS, e do TDF associado á emtricitabina foi estudada por Delahunty, Bushman e Fletcher (2006) e por Massaki et al.(2007). Já, Gomes et al.(2008) utilizaram além do HPLC também o detector de massas para a quantificação simultânea do TDF e da emtricitabina em plasma humano, para aplicação no estudo de bioequivalência de ambos os fármacos. Porém, não foram encontrados na literatura, estudos de ensaio de dissolução que utilizassem planejamento experimental e eficiência de dissolução para encontrar as melhores condições analíticas, e que empregassem sistema automatizado com injeção de fluxo para conferir versatilidade, seja na diluição *on-line* com redução no uso de solventes, seja na aquisição da absorvância sequencial de amostragem nas cubas.

Assim, considerando: a importância de se tratar a AIDS e a hepatite B; os custos dos antirretrovirais; a escassez de métodos oficiais farmacopeicos reconhecidos pela ANVISA para o TDF; a demanda por métodos limpos; o valor agregado do ensaio de dissolução; itens imprescindíveis para o controle de qualidade na fabricação nacional, especialmente por ser tratar de um genérico distribuído pela rede pública; este trabalho propõe o desenvolvimento e a validação de métodos de quantificação e dissolução, utilizando planejamento experimental empregando sistemas automatizados por injeção em fluxo e UV, para o controle de comprimidos de TDF.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIV

De acordo com Gilbert(2007) o vírus HIV se iniciou em 1930 na África Subsaariana. A partir do sequenciamento genético foi isolado o vírus HIV-1, grupo M, subtipo B, nos haitianos em 1966. Entretanto, em 1959 foi isolado do sangue de uma mulher da República Democrática do Congo, um vírus muito similar ao HIV-1. Com isso, foi suposto que esse vírus se originou em 1930, e então migrou para o Haiti, quando profissionais voltaram do trabalho no Congo. Supostamente, o vírus migrou dos chimpanzés para os humanos, quando caçadores foram expostos ao sangue contaminado dos animais. Acredita-se que o vírus em questão, era geneticamente igual ao HIV-1, e foi chamado de SIV (vírus da imunodeficiência símia). Após esse fato, o vírus foi se diversificando até chegar em 1969 nos Estados Unidos. Já em 1981, depois do vírus ter continuado a se diversificar, e uma grande parte da população homossexual ter sido contaminada, a AIDS foi então reconhecida.

O HIV pertence ao gênero lentivírus da família Retroviridae. Atualmente são conhecidos dois desses retrovírus, o HIV-1 e o HIV-2. Ambos estão estreitamente relacionados com os lentivírus de primatas, o SIV. Isto fornece base para afirmar que muito provavelmente são resultados de transmissões entre as espécies de primatas africanos (ETIENNE, 2011).

O HIV-1 pode ser dividido em quatro grupos principais (M, N, O e P), sendo que cada um dos grupos podem ainda ser divididos em subtipos, como no caso do grupo M, que compreende dez subtipos diferentes. O grupo M corresponde a 99% das infecções ao HIV-1 no mundo. Esses subtipos estão relacionados a uma determinada área geográfica e de transmissão. Do grupo M, o subtipo B é sobressalente na Austrália, Europa e nas Américas, já o subtipo C predomina no leste e sul da África (PAYDARY, 2013). O HIV-2 inclui oito grupos (grupos A-H) se originou a partir da SIV do primata SootyMangabey, e pode ser encontrado principalmente na África Ocidental (STERLING, 2005; PAYDARY, 2013)

O vírus HIV-1 e HVI-2 diferem em 60% as suas sequências de ácidos nucléicos. Ambos causam infecção das células CD4+ da linhagem dos fagócitos e linfócitos mononucleares e progridem a AIDS. Sendo que o HIV-2 ainda

apresenta cargas virais mais baixas, declínio mais lento de CD4+, menores taxas de transmissão vertical, de 20 a 30% menor chance de progressão a AIDS, e ainda apresenta uma resistência inerente aos inibidores de transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNNs) (LEVER, 2011; STERLING, 2005).

Ainda não se sabe ao certo, quais foram às características virais e moleculares que permitiram aos ancestrais dos HIV-1 e HIV-2 ultrapassarem a barreira entre as espécies, adaptando-se aos seres humanos, já que a maioria dos vírus infectantes de animais selvagens, não tem capacidade para cruzar essa barreira. Como também, se necessita de mais estudos para descobrir por que a SIV de Mangabeys e chimpanzés ou gorilas tem sido transmitida em várias ocasiões, porém não ocorre nos situados no ocidente como os Colobus vermelhos e outros macacos. Ao que tudo indica as transmissões nem sempre são seguidas de eficientes propagações para novas populações, pois dependem não somente do vírus, mas também do hospedeiro e do seu meio ambiente (CHASTEL, 2000; LLOYD-SMITH et al., 2009).

Apenas alguns estudos informaram algum tipo de adaptação viral, como por exemplo, a posição Gag-30 na região p17 do gene *gag*, terá a presença de uma leucina ou metionina SIVcpz/SIVgor. Já nos humanos, todas as linhagens do HIV-1 contém uma arginina nesta posição, o que sugere uma adaptação do vírus ao seu hospedeiro. Estudos realizados por Sauter (2009) demonstraram que a proteína Vpu da pandêmica HIV-1M, tem a capacidade de bloquear a Tetherin (proteína celular humana que impede a difusão do vírus após brotamento das células infectadas), enquanto o HIV-1O, não tem essa capacidade. Pode ser esta a razão da maior replicação e transmissão inter-humana do HIV-1M, permitindo-lhe uma maior propagação desse vírus na população humana (GUPTA et al., 2009).

Embora estudos tenham sugerido que existem diferenças biológicas entre os subtipos de HIV-1, a progressão da doença ainda não havia sido estudada. Essa necessidade levou Tarosso (2014) analisar 83 indivíduos infectados com HIV-1 subtipo B e subtipo BF recombinante. Seus estudos revelaram que o subtipo BF está associado a um declínio mais rápido de células T CD4+. Enquanto o subtipo B apresentou perda de 3,6 células T CD4+/mês, os indivíduos infectados pelo subtipo BF mostrou uma perda de 6,3 células T CD4+/mês. Sugerindo que essa forma de HIV-1 pode ser mais patogênica que o subtipo B.

Pode-se dizer que a cada dia a AIDS vem se tornando a mais devastadora epidemia que o mundo já presenciou. Dados da UnaidS fortalecem esse conceito, estabelecendo uma estimativa com mais de 36 milhões de pessoas vivendo com HIV em todo o mundo, contabilizando ainda mais de 16 milhões de óbitos. Na América Latina e Caribe, tem-se uma estimativa de aproximadamente 1,4 milhões de pessoas infectadas com HIV, e na região os estados-partes do Mercosul, estima-se de 650 a 700 mil pessoas. Entretanto até o momento, na mesma região, mais de 200 mil novos casos de AIDS já foram notificados ao ministério de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE DA NAÇÃO, 2012).

No Brasil, desde 1980 até junho de 2012, foram contabilizados cerca de 650 mil casos de HIV, contabilizando desse total 9,3% de óbitos, sendo que desses óbitos 67,5% do sexo masculino e 32,5% feminino. Contudo, nos últimos dez anos vêm ocorrendo uma redução de óbitos, com uma redução média anual de 3,0% para o sexo masculino e 2,0% para o feminino. Em 2011 foram notificados quase 39 mil casos da doença e uma taxa de incidência de 20,2 casos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2012).

Quando o vírus se encontra no sangue circulante de um ser vivo, se denomina viremia que inicialmente pode ser confundida com uma gripe leve. O vírus age nas células T auxiliares (células brancas do sangue), o organismo responde ao gerar linfócitos T citotóxicos que reconhecem e matam os vírus. Entretanto, as células de defesa que já estão infectadas se multiplicam para combater a infecção, e produzem mais cópias do vírus. Com o enfraquecimento do sistema imune ocorre uma fase de latência clínica, assintomática, podendo durar anos. A AIDS é diagnosticada quando ocorre o aumento da viremia, ou seja, quando as células CD4+ estiverem a abaixo de 200 células/mL (BENTON, 2010).

Ainda não existe uma vacina disponível para infecção pelo HIV. Porém, o uso de terapia antirretroviral tem como objetivo a cessação da replicação do HIV para evitar o surgimento de resistência, promovendo a recuperação imunológica e melhorando a saúde, prolongando a expectativa de vida das pessoas infectadas (TEIXEIRA, 2011).

2.2 ANTIRRETROVIRAL

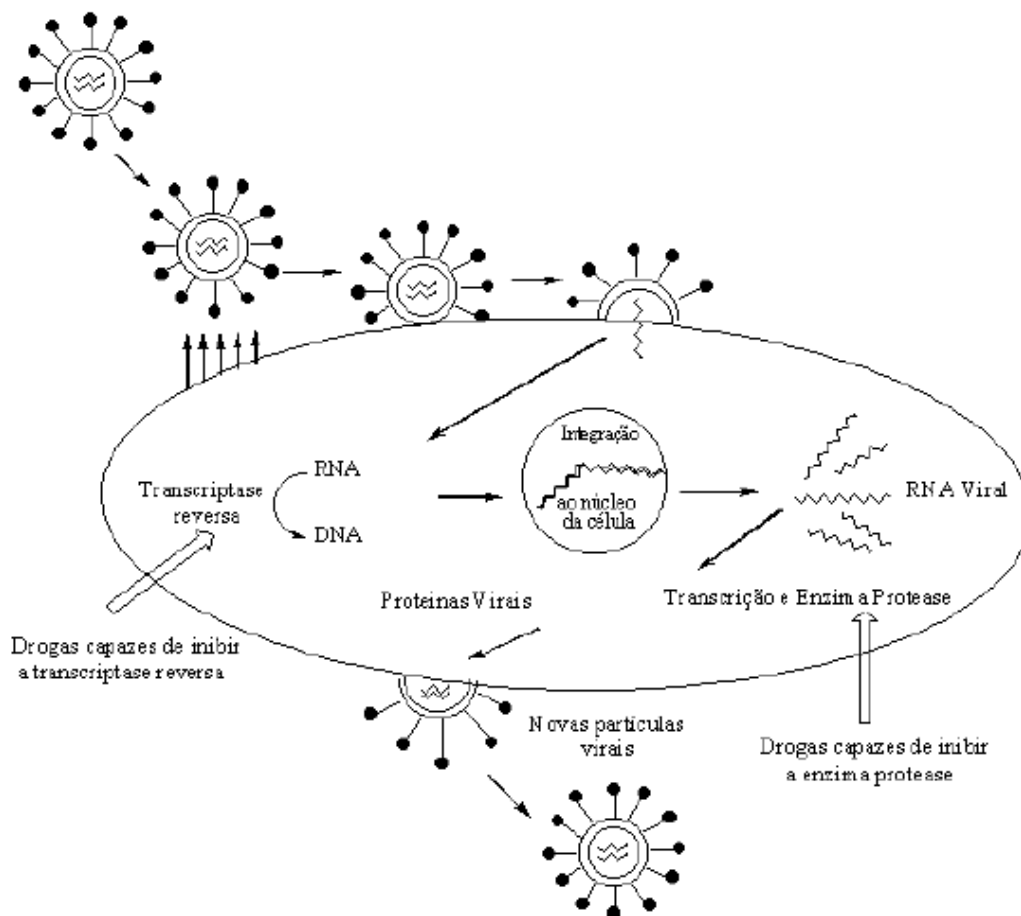
O primeiro medicamento antirretroviral foi aprovado a cerca de 25 anos atrás. Daquela época até hoje, houve uma grande redução no número de mortes e doenças oportunistas, devido à evolução dos medicamentos, como melhorias na potência, tolerância, simplicidade e disponibilidade de terapia antirretroviral (TAR) ou do inglês antiretroviral therapy (ART) (THOMPSON et al., 2012).

Em 2008, o arsenal de fármacos utilizados na terapia anti-HIV cresceu para um total de 25 fármacos licenciados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em um período de 25 anos após a aprovação do primeiro medicamento antirretroviral, indicando um avanço na busca pelo combate ao HIV (DE CLERCQ, 2010).

Antirretrovirais são os medicamentos utilizados no combate ao vírus HIV. Seu mecanismo se baseia na inibição da replicação do HIV, mantendo desse modo a carga viral, mais baixa possível. Na quimioterapia é comumente utilizada uma combinação de medicamentos, visando à diminuição do vírus HIV pela inibição das enzimas (transcriptase reversa e protease) (DE SOUZA, 2004).

O ciclo de replicação do HIV contém diversas etapas que estão relacionadas a componentes virais, podendo assim ser utilizado como alvo para intervenção quimioterápica (Fig. 2).

Figura 2 - Ciclo da replicação viral do HIV



Fonte: DE SOUZA, 2004.

Os Inibidores da Transcriptase Reversa apresentam-se em duas classes: não-nucleosídicos (NNRTIs) e nucleosídicos (NRTIs). Os NNRTIs possuem a capacidade de interação específica com a transcriptase reversa do HIV-1. A principal vantagem dos NNRTI sobre os NRTI é que não necessitam de uma etapa inicial de ativação intracelular (fosforilação). Exemplos: efavirenz, nevirapina, delavirdina, loviride e tivirapina. Já os NRTIs atuam como terminadores de cadeia, pois competem com os substratos alternativos da transcriptase reversa. Se o inibidor for incorporado à cadeia de DNA, torna-se impossível a continuidade do crescimento da mesma. Exemplos: zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina (DE CLERCQ, 2004; DE SOUZA, 2004; PEÇANHA et al., 2002).

Têm-se os inibidores da protease (IP), que geram a incapacidade das partículas virais formadas de se replicarem, produzindo assim, após a etapa de “brotamento”, apenas vírion não infectivo. Exemplos: saquinavir, indinavir, ritonavir,

nelfinavir, amprenavir, lopinavir e atazanavir (DE CLERCQ, 2004; DE SOUZA, 2004; PEÇANHA et al., 2002).

No ciclo de reprodução do HIV, um processo essencial é a integração do DNA viral no cromossomo hospedeiro, desta maneira os inibidores da integrase exibem uma interessante ação antiviral. Exemplos: raltegravir (DE CLERCQ, 2004; PEÇANHA et al., 2002)

Alguns compostos exibem a capacidade de bloquear ou inibir a fusão vírus-célula (Inibidores da Fusão). Exemplos: enfuvirtida (DE CLERCQ, 2004; DE SOUZA, 2004; PEÇANHA et al., 2002).

Estudos recentes relatam os benefícios de uma diminuição no limite de contagem de células CD4, para iniciar o tratamento. Os benefícios de iniciar o tratamento abaixo de 500 células CD4/ μ L são confirmados pelo grupo CASCADE, com mais de 9.000 participantes. O COHERE, com 75.336 indivíduos estudados, afirmam que os riscos de mortalidade diminuem ao iniciar o tratamento com contagem abaixo de 500 células CD4/ μ L comparado a acima de 500 células CD4/ μ L (CAIN et al., 2011; JONSSON et al., 2011; COHERE, 2012).

Outros autores indicam que a terapia antirretroviral (TAR), para os adultos infectados com HIV, deveria ocorrer independente da contagem de células CD4, pois todos esses pacientes poderiam se beneficiar, sendo na redução de doenças oportunistas ou de transmissão do HIV (THOMPSON et al., 2012).

Com o mesmo intuito, outros grupos indicam que quanto maior for o número de células CD4 atingidas depois de iniciar o tratamento TAR, maior serão as chances de sobrevivência, indicando que o quanto antes iniciar o tratamento, maiores serão os benefícios (VAN LELYVELD et al., 2012).

Estudos recentes realizados por Thompson et al.(2012) tem demonstrado que a utilização de ART está sendo eficiente, na diminuição do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tanto em relação a transmissão individual, quanto populacional. O ART pode até mesmo, fornecer uma proteção contra a infecção, ocorrendo um aumento dramático da sobrevivência e redução expressiva dos episódios de doenças oportunistas (HACKER et al., 2007).

2.3 TENOFOVIR

A era dos fosfonatos nucleosídeos acíclicos (ANPs) começou com (S)-HPMPA [(S)-9-(3-hidroxi-2-fosfometoxipropil) adenina], como sendo um novo agente antiviral. Descritos com o mesmo papel os PMEAs [9-(2- fosfometoxietil) adenina] foram testados *in vitro*, demonstrando sua ação pela inibição da transcriptase reversa, como terminadores de cadeia. Com isso, surgiu o desenvolvimento de outros ANPs enantioméricos do PMEAs, como no caso do (R)-PMPA [(R)-9-(2-) fosfometoxipropil)adenina], que mais tarde passou a se chamar tenofovir (DE CLERCQ, 2012).

Quimicamente o tenofovir é um análogo da adenosina 5'-monofosfato, pertencente à classe dos antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa (DELAHUNTY et al., 2006).

Os efeitos colaterais do tenofovir são considerados de leve a moderado, como intolerâncias gastrointestinais, náuseas, vômitos, diarreia e flatulência. Esse antirretroviral é eliminado principalmente através dos rins por filtração glomerular e secreção tubular ativa (LEE, MAROSOK, 2003).

O tenofovir apresenta uma meia-vida intracelular longa, entretanto, possui baixa biodisponibilidade, o que ocasionou limitações no seu desenvolvimento como fármaco. Houve então, a adição de dois ésteres alquil metil carbonato, ocasionando uma melhora na absorção intestinal e na sua biodisponibilidade oral, permitindo assim novas formulações como um comprimido para administração oral (KEARNEY et al., 2004).

O fumarato de tenofovir desoproxila (FTD) é o primeiro análogo de nucleotídeo inibidor da transcriptase reversa, aprovado pelo *Food and Drug Administration* em 2001 para o tratamento do vírus HIV (GALLANT, 2006).

Das suas características físico-químicas, o fumarato de tenofovir desoproxila é um pó cristalino branco a quase branco, sem odor, com massa molar de 635,52 g mol⁻¹. Sua solubilidade é de 13,4 mgmL⁻¹ em água a 25°C e *pKa* de 3,75 (RXLIST, 2014; DECHRISTOFORO e PENZAK, 2004).

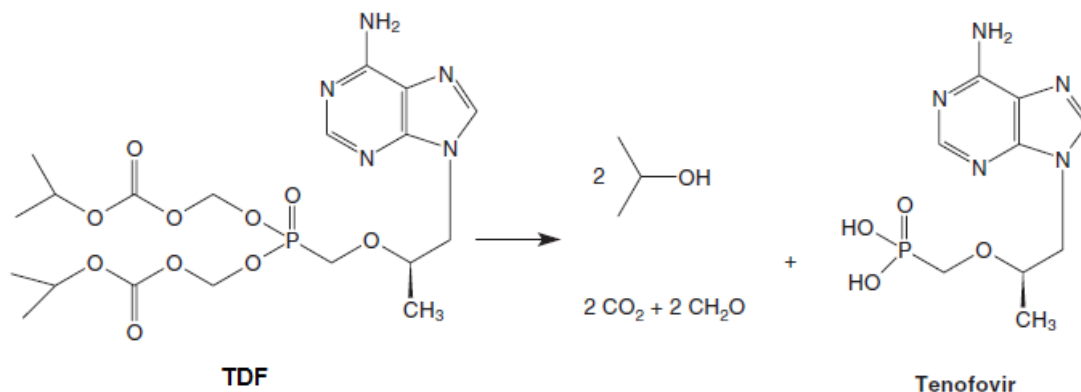
O tenofovir, administrado como fumarato de tenofovir desoproxila, é considerado um pró-fármaco, já que necessita etapas de fosforilação para se tornar ativo, sendo este um limitante dos análogos de nucleosídeos. Diferindo de outros análogos, o TDF necessita de apenas uma ou duas etapas de fosforilação, enquanto

outros inibidores da transcriptase reversa necessitam de três etapas. Essa redução torna o processo de conversão ao metabólito farmacologicamente ativo, mais rápido e mais completo (GOMES et al., 2008; BENNETTO-HOOD et al., 2007).

Estudos realizados por Palombo et al. (2009) demonstram essa melhora com um aumento da lipofilicidade do fármaco de $\log P = -2,5$ para $\log P = 1,3$. Esse aumento está relacionado com a capacidade do fármaco em atravessar a membrana intestinal.

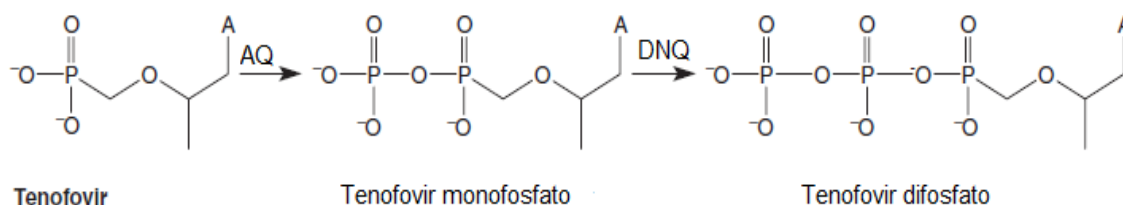
Após a administração oral, o pró-fármaco sofre hidrólise, mediada por esterases, removendo assim os dois grupamentos éster formando o tenofovir (Figura 3). O tenofovir por sua vez, penetra nas células e sofre fosforilação pela adenilato quinase (AQ) formando um intermediário monofosfatado, que é rapidamente convertido pelo difosfato nucleosídeo quinase (DNQ) a sua forma bifosfatada (Fig. 4)(TEIXEIRA, 2011).

Figura 3 - Conversão do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em tenofovir



Fonte: TEIXEIRA, 2011.

Figura 4 - Conversão do tenofovir em tenofovir difosfato



Fonte: TEIXEIRA, 2011.

O tenofovir difosfato compete diretamente com o substrato natural da transcriptase reversa do HIV-1, desoxiadenosina 5'-trifosfato. A ligação do tenofovir difosfato, com o sítio ativo na transcriptase reversa viral (DNA polimerase viral), resulta na terminação da cadeia, já que no tenofovir difosfato falta o grupamento hidroxila na posição 3', que seria o ponto de ligação do próximo desoxiadenosina trifosfato (TEIXEIRA, 2011).

Kearney et al.(2004) relata que as células em repouso podem metabolizar o tenofovir, atingindo assim uma concentração duas vezes maior em monócitos periféricos em repouso em relação aos ativos. Com o acúmulo do fármaco nessas células de repouso, o tenofovir tem a capacidade de inibir o HIV em células latentes, característica ausente nos ITRNs desenvolvidos anteriormente, como a zidovudina ou estavudina (TEIXEIRA, 2011).

Usado para o tratamento da AIDS no Brasil desde julho de 2003, o tenofovir, tem resposta positiva também para supressão do vírus da hepatite B (GISH et al., 2005; SWEETMAN, 2007).

Embora o Brasil já produza o TDF, e este seja amplamente utilizado nas terapias supressoras de AIDS e Hepatite, há poucos métodos descritos na literatura para a determinação do seu teor. A maioria deles aplica HPLC para análise em fluidos biológicos e no medicamento em associação com outros fármacos REZK et al., 2005, KING et al., 2006, MANGOANKAR & DESAI, 2008, APPALA et al., 2008 e RAJU et al., 2008, KANDAGAL et al., 2008, DELAHUNTY et al., 2006 e por MASSAKI et al., 2007, GOMES et al., 2008, JOSHI et al., 2009, PATEL et al., 2009 e SHARMA & GUPTA 2009. Já a determinação do TDF por espectrofotometria foi proposta por SHIRKHEDKAR et al., 2009, SUDHA et al., 2010, SHAMA e MEHTA, 2010.

Para que a produção deste medicamento seja realizada, assegurando o cumprimento de padrões de qualidade, de modo a garantir a eficácia e segurança dos medicamentos, o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos produzidos é imprescindível, sendo necessária a utilização de métodos de análise validados.

2.4 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

2.4.1 Histórico

Para avaliar a liberação de um fármaco de suas formas farmacêuticas sólidas e semissólidas é utilizado o ensaio de dissolução, sendo esse oficial, empregado pelas farmacopeias (AZARMI, ROA e LOBENBERG, 2007). O desenvolvimento do ensaio de dissolução tem o intuito de quantificar e avaliar a extensão da liberação de certo fármaco, sendo imediata ou prolongada, a partir de suas formas farmacêuticas, como sólidas orais, cápsulas e comprimidos (SIEWERT et al., 2003),

As pesquisas voltadas aos ensaios de dissolução começaram a se desenvolver a cerca de 100 anos atrás, sendo um campo da físico-química, no qual tem tido importante progresso (DOKOUMETZIDIS e MARCHERAS, 2006). O primeiro ensaio de dissolução foi conduzido por Noyes e Whitney em 1897, publicado no artigo intitulado “The rate of solution of solid substances in the own solution” (NOYES e WHITNEY, 1897). A partir desse experimento, os autores conseguiram sugerir uma Equação que descrevesse o processo de dissolução.

Brunner e Tolloczko (1900) publicaram um artigo com vários experimentos, ampliando as condições da Equação de Noyes-Whitney, mostrando que a taxa de dissolução é dependente da intensidade da agitação, temperatura, aparato experimental, área e da estrutura da superfície exposta do sólido (DOKOUMETZIDIS e MARCHERAS, 2006; WAGNER, 1971).

Partindo do princípio que: a dissolução acontece normalmente na superfície do sólido; a agitação é homogênea em toda a superfície; não ocorre estagnação do líquido em nenhuma parte; e a partícula sólida permanece intacta durante o processo de dissolução; Hixon e Crowell desenvolveram uma Equação matemática que descreve o modelo de dissolução, a chamada “Lei da raiz cúbica”. Esta lei se limita a processos em que exista agitação (HIXSON e CROWELL, 1931).

Apesar dos avanços nos ensaios de dissolução, o conceito não era amplamente utilizado até 1950. Até então, a disponibilidade *in vivo* da droga era determinada exclusivamente pela desintegração (MORRISON e CAMPBELL 1965).

Em 1934, foi publicado o primeiro ensaio de desintegração para comprimidos na Farmacopeia Helvética, que utilizou água a 37°C como meio, e

agitação periódica, enquanto na Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia – USP) o ensaio de dissolução foi introduzido na 14ª Edição em 1950.

Em 1948, Fileborn tentou reproduzir condições mais realistas para os experimentos de desintegração, com a utilização de fluídos gástricos simulado por um estômago artificial com as condições *in vivo*, incluindo o nível de pH e o peristaltismo, na presença de alimentos.

A partir de 1950 ficou evidente que por si só a desintegração não podia ser responsável pela disponibilidade fisiológica de drogas, sendo a dissolução o passo limitante em alguns casos (DOKOUMETZIDIS e MARCHERAS, 2006).

Em meados dos anos sessenta o termo biodisponibilidade começou a ser cunhado, devido a experimentos de Martin et al. (1968) que relataram diferenças significativas entre marcas de sódio difenilhidantoína, cloranfenicol e sulfisoxazol. Mais tarde, foi verificada uma diferença de 20% na concentração do pico e área da curva de concentração plasmática-tempo para três produtos de ampicilina (MACLEOD et al., 1972). Os casos da fenitoína na Austrália e na Nova Zelândia em 1968, e da digoxina no Reino Unido e nos EUA em 1971, representaram marcos significativos para a biodisponibilidade (DOKOUMETZIDIS e MARCHERAS, 2006). No caso da fenitoína ocorreu à troca do excipiente sulfato de cálcio por lactose, o que ocasionou uma maior biodisponibilidade e conseqüentemente uma maior concentração de fenitoína no plasma (CLOYD et al., 1980). Já, no caso da digoxina as grandes variações de lote-a-lote e de fabricantes, levaram o FDA em colaboração com John Wagner á realizarem estudos detalhados de dissolução (SKELLY, 1988).

Os primeiros aparelhos para os ensaios de dissolução, automáticos ou não, começaram a ser mencionados na década de 60 (WAGNER, 1971). Com essa evolução os métodos começaram a ser oficialmente aceitos. Em 1970 a USP (Edição XVIII) publica o primeiro ensaio de dissolução, e em 1975 (Edição XIX), recomenda dois equipamentos: aparato 1 (cesta) e aparato 2 (pá).

Manadas et al. (2002) relatou problemas quanto aos ensaios de dissolução, pois em diferentes laboratórios estavam apresentando resultados distintos da mesma forma farmacêutica, e o cesto rotativo era inadequado á várias formas farmacêuticas. Com isso, foram estudadas as variáveis independentes

envolvidas nos métodos de dissolução, como a vibração, geometria do sistema, agitação, alinhamento, local de amostragem entre outras.

Inicialmente a USP optou por utilizar valores unitários, como ocorre até hoje na Farmacopéia Britânica (British Pharmacopeia – BP). Já em 1977, foi adotado o método para valores médios, então, o conceito de lote (GRADY, 1996).

No decorrer dos anos 90 o FDA, FIP e EMEA, elaboraram diversos guias abrangendo a maioria dos aspectos dos ensaios de dissolução (MANADAS et al., 2002). Em 1970, a USP apresentava 12 monografias que continham ensaio de dissolução, em 1980 aumentou para 60, em 1990 para 462, e em 2002 para 630 monografias.

2.4.2 Fatores que Afetam a Dissolução

2.4.2.1 Influência do fármaco e da formulação

O conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética deve ser considerado para a definição de especificações de dissolução, visando à aprovação do registro do medicamento. Devido a isso se segue o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que divide em quatro casos tendo como base a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos (BRASIL, 2014).

O fator que mais afeta a dissolução de um fármaco é a solubilidade. Quando falamos de solubilidade, estamos falando sobre a concentração da solução do fármaco em equilíbrio com o soluto, sendo a mesma um parâmetro termodinâmico (ABDOU, 1989; STORPIRTIS, 1999). Podemos determiná-la a partir da adição do fármaco ao meio, com subsequente agitação, filtração e quantificação do fármaco dissolvido (MANADAS et al., 2002).

A superfície exposta ao solvente controla a velocidade de dissolução, logo, o tamanho da partícula é de grande relevância. Quando os fármacos se encontram micronizados, tendem a facilitar a sua dissolução e conseqüentemente sua absorção. Entretanto, quando se observa uma degradação dos fármacos no fluido gástrico, a diminuição da partícula é contra indicada (LEVY, 1963). Além do tamanho da partícula, a sua forma e sua densidade, também têm influência na velocidade de dissolução (ABDOU, 1989).

A forma farmacêutica também influencia na velocidade de dissolução. As cápsulas em geral rompem-se rapidamente. Para que haja a dissolução, é primordial que ocorra antes a desintegração dos comprimidos e dos grânulos. Os que são revestidos, sendo de revestimento entérico ou não, devem romper esse revestimento antes de sofrer a desintegração (GIBALDI, 1991).

Um recurso muito utilizado para aumentar a solubilidade de ácidos fracos é convertê-los em sais, principalmente de sódio e potássio (GIBALDI, 1991). Cerca de 90% dos medicamentos estão nas formas sólidas, logo conhecer a sua estrutura física é de grande importância, pois a forma sólida afeta diretamente a solubilidade do fármaco. Uma substância cristalina apresenta menor solubilidade, enquanto que a mesma na forma amorfa apresenta maior solubilidade e menor estabilidade térmica (JOANA FEITEIRA, 2012).

Segundo Marcolongo (2003) os excipientes também influenciam na velocidade de dissolução, de forma negativa ou positiva. Isto ocorre, devido às características físico-químicas dos diluentes. Polímeros hidrossolúveis e gelatina como ligantes aumentam a taxa de dissolução de fármacos poucos solúveis. Já, com a utilização de goma na granulação úmida, ocorre uma diminuição na taxa de dissolução.

O processo de compressão é outro fator importante, estudos realizados por Chaud (2005) apontam que a diminuição da desagregação do comprimido está relacionada com a sua dureza, devido à força de compressão, o que influenciará na biodisponibilidade. Marcolongo (2003) relata que o tipo do processo de granulação e compressão, utilizando via úmida ou seca, impacta na dissolução. Para os fármacos que apresentam pouca solubilidade a granulação por via úmida é uma boa alternativa, pois conferem características mais hidrofílicas a estes fármacos.

2.4.2.2 Influências de equipamento e ambiente

Algumas variações que ocorrem nos ensaios de dissolução podem estar relacionadas á falhas de equipamentos ou ao meio ambiente em que os mesmos estão localizados.

Os equipamentos utilizados durante o processo de dissolução oferecem condições de trabalho diferentes, de acordo com seu mecanismo. Os

parâmetros como: velocidade de agitação e meio de dissolução, diferem significativamente de aparato para aparato (BANAKAR, 1992).

O elemento de agitação – as hastes devem ter uma variação de no máximo 2 mm do eixo principal de rotação. Essa variação afeta a hidrodinâmica do meio de dissolução na cuba. Dependendo do produto, essa variação pode ser desprezível (FDA, 1997).

Os aparelhos devem ser posicionados em bancadas niveladas livres de vibração, essas vibrações podem afetar o sistema, de um modo a alterar o fluxo laminar e introduzir energia dinâmica indesejável, ocasionando alterações significativas na velocidade de dissolução de alguns produtos (MARCOLONGO, 2003). De um modo geral, a vibração no sistema compromete a hidrodinâmica do meio de dissolução e do líquido dissolutor (DE NOVAIS, 2007).

A amostragem deve ser efetuada em um local específico dentro da cuba de dissolução, pois caso seja feita em outro local os resultados podem variar. A cânula de amostragem deve estar posicionada na metade da distância entre o ápice superior do aparato e a superfície do meio de dissolução. Não podendo amostrar rente à parede da cuba, com uma distância menor que 1,0cm. As cânulas de amostragem não podem permanecer mergulhadas durante o ensaio de dissolução, pois isso implicaria em uma modificação da hidrodinâmica do meio de dissolução (USP, 2006).

A velocidade de agitação afeta diretamente a taxa de dissolução. Cada formulação contém vários fatores e características que podem ser influenciadas pela velocidade de agitação afetando dissolução. As farmacopeias americana e britânica permitem uma variação 4-5% nas velocidades de agitação (MARCOLONGO, 2003).

O meio de dissolução deve estar entre 36,5 e 37,5 °C, deixando o meio de dissolução estabilizar nessa faixa, e sempre mantendo as cubas cobertas, evitando-se assim a evaporação do meio (USP, 2006).

Gases dissolvidos podem alterar o pH e impedir a agitação adequada do meio de dissolução, o que ocasiona numa diminuição de contato entre o sólido e o líquido do meio, devido a mudança no movimento das partículas. Isto pode ser observado pela presença de bolhas na superfície do fármaco (MARCOLONGO, 2003).

A escolha do pH é de grande importância para a dissolução do fármaco, pois deve-se considerar a liberação do mesmo a partir de sua forma farmacêutica (imediate ou prolongada) e o local em que ocorrerá a absorção, já que o pH no trato gastrointestinal (TGI) pode variar de 1,0 a 7,8. É permitida uma variação de 0,05 unidades em relação aos ensaios de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

A viscosidade afeta a taxa de dissolução, de maneira que quanto menos viscoso for o meio, maior será a velocidade de dissolução, pois a viscosidade afeta a difusão das partículas, dificultando a dissolução (BANAKAR, 1992).

Os surfactantes são utilizados pelo fato dos princípios ativos dos fármacos serem hidrofóbicos, possuindo baixa solubilidade gastrointestinal. Sua ação se dá pela redução da tensão superficial no meio de dissolução. Como exemplos de surfactantes mais utilizados se têm o Polissorbato 80 (Tween 80) e o laurilsulfato de sódio (DE NOVAIS, 2007).

Contudo, é importante que as condições de estocagem sigam as informações indicadas pelo fabricante, já que podem ter suas características físico-químicas alteradas, se for feita de maneira errônea. A embalagem constitui outro fator importante, devendo proteger o produto da melhor maneira possível (MARCOLONGO, 2003).

Outro fator a ser observado é quanto à utilização dos filtros de amostragem, pois os mesmos não podem adsorver o fármaco, o que acarretaria na redução da concentração medida. Do mesmo modo, caso se tenha uma forma farmacêutica particulada, pode ocasionar uma obstrução dos poros, causando assim um colapso no coletor do dissolutor. Recomenda-se rinsar os filtros com amostra para saturar evitando-se assim perdas, e também que se faça um estudo detalhado da utilização de cada filtro para um determinado fármaco (FDA, 1997).

Segundo Marcolongo (2003), o método deve estar validado para o procedimento, e a grande maioria das monografias, especifica que se pode utilizar o método espectrofotométrico.

2.5 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

A análise por injeção em fluxo, do inglês "Flow Injection Analysis" é representada pela sigla conhecida internacionalmente como FIA, técnica que vem sendo bastante utilizada para análise de diversas substâncias (DE OLIVEIRA, 2011).

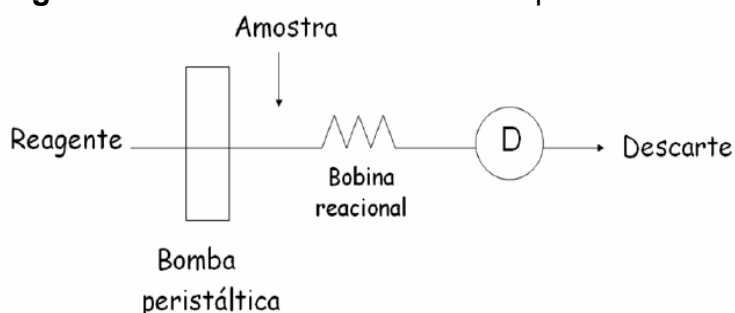
Essa técnica baseia-se na inserção de uma alíquota de amostra ou solução padrão em um fluido carregador, sofrendo dispersão ao ser transportada pelo percurso analítico (tubulação), chegando até a unidade de detecção (DE MIRANDA, 2011).

Esse processo de análise foi proposto pela primeira vez em 1975 por Jaromir Ruzicka, que nesse período era professor na Universidade Técnica da Dinamarca (RUZICKA, 1975). Desde então, em torno de 10.000 artigos científicos relacionados ao tema já foram publicados (DE MIRANDA, 2011; DE OLIVEIRA, 2011).

Pode-se associar esse reconhecimento á grande versatilidade da técnica, que possibilita a execução em linha de etapa de pré-tratamento da amostra como, por exemplo, procedimentos de batelada. Contudo, sendo um sistema fechado, apresenta vantagens como: minimização de contaminações, alta frequência analítica, boa precisão, economia de reagentes e facilidade de associação a diversos detectores (DE MIRANDA, 2011).

O sistema que foi desenvolvido por Ruzicka em 1975 apresentava uma seringa para inserir uma alíquota da amostra no fluido carregador, já os reagentes eram inseridos continuamente por uma bomba peristáltica a vazão constante em pontos de confluência, nos quais ocorria a interação reagente/amostra que, em seguida, era bombeada até o detector permitindo assim a obtenção de um sinal transiente (Figura 5).

Figura 5 - Sistema FIA desenvolvido por Ruzicka



Fonte: DE MIRANDA, 2011.

O sistema de Ruzicka foi utilizado para determinação potenciométrica de amônio e espectrofotométrica de fosfato, seguindo a Equação de Nerst para a potenciometria e a Lei de Lambert Beer para a espectrofotometria. Os sistemas apresentaram adequada linearidade, repetibilidade nas análises e boa

frequência analítica. Por essas qualidades, os sistemas FIA foram caracterizados por sua versatilidade, simplicidade e viabilidade (DE MIRANDA, 2011).

Basicamente, um sistema FIA pode ser dividido em quatro componentes: propulsão do fluido ou do eletrólito carregador, injeção da amostra, reação em linha ou transporte da solução e detecção (RUZICKA, 2008; DE MIRANDA, 2011).

A propulsão dos fluidos pode ser dar, pela vazão utilizando bomba peristáltica ou à pressão constante com dispositivo de ação gravitacional, como propulsores. O injetor é o dispositivo pelo qual a amostra é inserida no percurso analítico. A bobina de reação é o local em que ocorrem às interações necessárias à detecção da espécie de interesse. A unidade de detecção obtém os sinais analíticos por meio de detectores como: espectrofotômetros UV-Vis, espectrofotômetros de absorção e emissão atômica, potenciômetros e condutivímetros (RUZICKA, 2008; FELIX, 2010; DE MIRANDA, 2011).

Os sistemas de dissolução completamente automatizados trazem a vantagem de amostragem automatizada, filtração e análise de amostras através de detectores, como UV, HPLC, entre outros. As amostras podem ser retiradas simultaneamente, filtradas e coletadas em um coletor de fração, retiradas utilizando um braço robótico e analisadas diretamente no UV ou HPLC. Também, pode se realizar a análise *in situ* por fibra ótica, chamado UVFO (DISOTAX, 2014). Outros sistemas possuem seringas de precisão, capacidade de conexão com até três dissolutores, reposição automática de meios de dissolução, auto limpeza, diluição e interfaceamento com o UV (FLOWSCIENCE, 2014).

Na literatura foram encontrados trabalhos relacionados a fármacos com utilização de FIA. Por exemplo, Fatibello (2002) detectou paracetamol a partir de sua oxidação com hipoclorito e posterior reação com salicilato de sódio, produzindo um composto indofenólico. Em outro trabalho Fatibello (2006) desenvolveu um sistema de análise por injeção em fluxo, com zonas coalescentes, para determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas. Schmidt Jr (2011) que desenvolveu um sistema de análise em fluxo polivalente para determinação espectrofotométrica sequencial de fármacos (captopril, paracetamol, dipirona, ácido ascórbico e acetilcisteína), sendo detectados pela redução de Cu(II) na presença dos mesmos.

Entretanto, até o exato momento não foi encontrado na literatura nenhum trabalho associando o ensaio de dissolução com o mecanismo de injeção em fluxo.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que não existem métodos oficiais para dissolução do TDF na literatura e os encontrados abordam de forma convencional o tema, esta dissertação busca fornecer um diferencial, por meio de estudo utilizando planejamento fatorial 2² e eficiência de dissolução, disponibilizando material técnico para o controle de qualidade. Pretende-se que as informações sejam relevantes para os profissionais do setor regulador, indústrias, farmácias de manipulação, servindo como instrumento de referência. Uma vez que, metodologia analítica validada é requisito fundamental no processo de registro de medicamentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, espera-se que os conhecimentos auxiliem os técnicos da ANVISA que trabalham na análise de registro e na inspeção de Boas Práticas de Fabricação de Insumos e Medicamentos.

O ensaio de dissolução é indicado para avaliação da qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral. O TDF, embora disponível comercialmente, não possui monografia farmacopeica. Neste intuito, foi desenvolvido ensaio para avaliar a liberação do TDF nas formas farmacêuticas sólidas, disponíveis no mercado nacional. Visando seguir as tendências de mercado de sustentabilidade e métodos limpos, utilizando um menor volume de reagentes com mínima toxicidade, porém, com máxima eficiência e versatilidade desenvolveu-se e validou-se um sistema automatizado por injeção em fluxo, capaz de efetuar *on-line* a coleta e diluição de dissolução do comprimido de TDF.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Produtos Farmacêuticos, Padrão de Referência e Reagentes

O padrão secundário de fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)(99,9% - lote PD-0217) e a matéria-prima (98,9% - lote 13327/2011) foram cedidos pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, São Paulo, Brasil). O placebo - preparado com as matérias-primas (grau farmacêutico): amido de milho, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, lactose monoidratada, celulose microcristalina, hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, e triacetina foram cedidos pelo LM-UEL. O revestimento Opadry II Y-30-10671-A (composição: FD&C Azul nº2 laca de alumínio) foi retirado dos comprimidos de TDF. Os frascos contendo comprimidos de 300 mg de TDF não comercializados, distribuídos gratuitamente na rede pública do País à aidéticos e portadores de hepatite B, foram cedidos pela Secretaria Municipal de Saúde de Londrina. Os solventes utilizados foram de grau p.a. - ácido clorídrico (Biotec, Brasil), fosfato de sódio monobásico (Nuclear) e água ultrapura (Millipore, MA, EUA).

4.1.2 Equipamentos e Acessórios

- Detector Dual Absorbance Waters2487, utilizado com espectrofotômetro (Waters, Milford, MA, EUA)
- Balança Analítica AX 200(Shimadzu, Quioto; Japão)
- Dissolutor Erweka DT 600 High Head com7 cubas (Fisher Scientific, Shah Alam, Selangor, Malásia)
- Centrífuga Labstore[®](rotor CP-16) (MINI G, Curitiba, PR, Brasil)
- *Softwares*CONTROL-FIA e UTI-FIA(Prof. Carlos A.P. da Camara – Lab DIA, Londrina, Brasil)
- Válvula solenóide de baixa pressão de 3 vias NResearch161T031 (West Caldwell, NJ, EUA)
- Microcomputador Intel core 2 DuoE 4400

- Bomba Peristáltica Gilson MINIPULS® 3 (Gilson Inc., Middleton, WI, EUA)
- Módulo USB-4RL (NSE soluções eletrônicas, Ourinhos, SP, Brasil)
- Válvula seletora de baixa pressão de 10 vias VICIC22Z-3180EH (Valco Instruments Inc., Houston, TX, EUA)
- Cubeta de fluxo de quartzo 283-QS, volume de 85 µL com caminho ótico de 10 mm (Hellma GmbH & Co., Müllheim, Germany)
- Cubeta de quartzo Q4, volume 3,5 mL com caminho ótico de 10 mm – (Syscroma, Saint Vallen Biotecnologia, Santa Maria, RS, Brasil)

4.2 MÉTODOS

Métodos para a determinação do TDF em comprimidos foram feitos visando o desenvolvimento e a validação para: verificar a viabilidade de quantificação confiável por espectrofotometria ultravioleta (UV), ou necessidade de uso de técnicas mais sofisticadas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); planejamento, teste de desempenho e execução de ensaio de dissolução convencional; verificar a viabilidade de realização das análises em sistema de fluxo; e por fim, aplicar estes métodos desenvolvidos e validados, verificando o desempenho do sistema na porcentagem de dissolução automatizada por FIA-UV versus a convencional. Foram avaliados os parâmetros linearidade, precisão, especificidade/seletividade, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão, estabilidade da solução e eficiência do filtro, de acordo com os critérios estabelecidos pela RE nº 899/03 (BRASIL, 2003).

4.2.1 Desenvolvimento e Validação do Método de Teor

4.2.1.1 Parâmetros de validação do método de teor de TDF para comprimido e matéria-prima

Especificidade do método de teor

Para o estudo da interferência dos excipientes (Placebo) da formulação do TDF foram preparadas em HCl 0,1 mol L⁻¹, solução padrão (30,0 µg mL⁻¹) e solução placebo de acordo com sua proporção no peso médio de um comprimido

Linearidade do método de teor

Foram construídas três curvas de calibração analítica em cinco concentrações de padrão (n=3), preparados na faixa dinâmica de trabalho de 4,00 a 38,00 µg mL⁻¹, a partir da solução estoque de 300,00 µg mL⁻¹ de TDF em HCl 0,10 mol L⁻¹. Foram avaliados o coeficiente de correlação linear (r), o desvio da normalidade e homocedasticidade (BRASIL, 2003).

Precisão do método de teor

A precisão intradia (repetitividade) do método de teor foi determinada por meio da análise de seis soluções de mesma concentração (25,00 µg mL⁻¹ em HCl 0,10 mol L⁻¹) pelo mesmo analista, equipamento e dia. Já a precisão inter-dias (intermediária) foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, porém em dias diferentes e com analistas diferentes. Os resultados foram avaliados pelos valores dos desvios padrão relativos (DPR) (BRASIL, 2003).

Exatidão do método de teor

A exatidão do método de teor foi avaliada a partir da recuperação de quantidades conhecidas de soluções de TDF padrão, nos níveis de concentração baixo (25,0 µg mL⁻¹), médio (30,0 µg mL⁻¹) e alto (37,0 µg mL⁻¹) adicionados a

soluções com placebo do comprimido, a fim de avaliar a recuperação do ativo em meio aos excipientes, simulando o comprimido. As quantidades de TDF recuperadas foram calculadas utilizando-se a curva de calibração (BRASIL, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação do método de teor

Limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão do intercepto da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma da ANVISA. A estimativa desses valores pode ser feita conforme as Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{DP_0 \times 3}{IC} \quad \text{Eq. 1}$$

$$LQ = \frac{DP_0 \times 10}{IC} \quad \text{Eq. 2}$$

Na qual:

IC é a inclinação da curva

DP_0 é o desvio padrão do intercepto com eixo y das 3 curvas analíticas construídas em triplicata (BRASIL, 2003).

Aplicação do método de teor

Para matéria-prima foram pesados, em triplicata, 300,0 mg e para o comprimido foram determinados os pesos médios de 20 comprimidos e após triturados, pesou-se o equivalente a 300,0 mg do pó, em triplicata. As amostras pesadas foram diluídas até concentração de 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em HCl 0,1 mol L^{-1} filtradas em papel filtro qualitativo de 1,0 mm e suas concentrações determinadas em espectrofotômetro (Waters 2487) a 260 nm.

4.2.2 Desenvolvimento e Validação de Método Para o Ensaio de Dissolução Convencional de Comprimidos de TDF

4.2.2.1 Planejamento fatorial para a dissolução

Para o desenvolvimento do método de dissolução, utilizou-se planejamento fatorial a fim de analisar a interação entre os diferentes parâmetros. O planejamento fatorial 2^2 foi definido com duas repetições no ponto central. Neste tipo

de planejamento, os efeitos das variáveis independentes foram analisados em dois níveis, um nível alto, codificado pelo sinal positivo (+1), um nível baixo (-1) e para checagem da curvatura do modelo um nível central (Tab. 1).

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento fatorial para o método de dissolução proposto para o TDF

Variáveis Independentes	Níveis de variação		
	-1	0	+1
x_1 = Tempo (min)	30	45	60
x_2 = Velocidade (rpm)	50	75	100

As variáveis independentes analisadas foram tempo de coleta (30, 45 e 60 minutos) e velocidade de agitação (50, 75 e 100 rpm) em 3 meios de dissolução: água ultrapura; solução HCl 0,1 mol L⁻¹ e tampão fosfato pH 7,4 . Foram realizados 18 ensaios do Perfil de Dissolução (Tab. 2), a fim de selecionar as melhores condições.

Tabela 2 -Planejamento fatorial dos ensaios utilizando diferentes tipos de meio – aquoso, ácido e tamponado

Ensaio experimental		
Tempo (min)	Velocidade (rpm)	Meio de dissolução
30	50	Água ultrapura/ HCl 0,1 mol L ⁻¹ / Tampão Fosfato pH 7,4
30	100	
60	50	
60	100	
45	75	
45	75	

*Os ensaios experimentos foram realizados de forma aleatória

4.2.2.2 Perfil de dissolução

Para os ensaios de perfil de dissolução, um comprimido foi transferido para cada cuba contendo 900 mL de meio de dissolução com 50 rpm a 37±0,5°C com aparato pá, coletando-se em seis tempos: 5, 10, 15, 20, 30, 35 e 60 minutos, repondo-se o mesmo volume retirado do meio (37±0,5°C). A cada tempo, as alíquotas de 10 mL eram coletadas e repostas 10 mL do meio de dissolução para cuba. As alíquotas coletadas foram filtradas em papel filtro qualitativo (1 mm), diluídas dez vezes, até concentração de 30,0 µg mL⁻¹ aproximadamente, e a porcentagem dissolvida determinada em espectrofotômetro a 260 nm. As respostas

analíticas expressas em porcentagem de dissolução (%) foram obtidas por comparação entre as absorvâncias de cada amostra e da solução padrão no mesmo solvente (BRASIL, 2003).

4.2.2.3 Eficiência de dissolução

A eficiência de dissolução (ED%) foi calculada a partir das curvas de porcentagem de fármaco dissolvido versus tempo (KHAN e RHODES, 1975). A comparação entre os valores de ED% dos meios avaliados foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey.

4.2.2.4 Estabilidade na dissolução

A estabilidade da solução padrão em HCl 0,1 mol L⁻¹ (30,0 µg mL⁻¹) foi determinada mantendo-se a solução em temperatura ambiente ao abrigo da luz, por 24 horas. Já a estabilidade da amostra foi avaliada pela solução após 2 horas do término do ensaio de dissolução realizado nas condições padronizadas, mantendo-se o meio de dissolução na temperatura de 37,0 ± 0,5 °C. As soluções padrão e amostra foram analisadas, por espectrofotometria no UV a 260 nm antes e depois do tempo de estabilidade (MARQUES e BROWN, 2002; BRASIL, 2003).

4.2.2.5 Influência da membrana filtrante na dissolução

Para avaliar a influência da membrana filtrante foram preparadas soluções de padrão e da amostra na concentração de 30,0 µg mL⁻¹ em HCl 0,1 mol L⁻¹ (n=3). Foram feitos testes: sem filtração; submetidas à filtração utilizando membranas 0,22 µm de Nylon, Celulose, PVDF, PTFE; submetidos à passagem por filtro quantitativo (C41), filtro qualitativo e lã de vidro; e sem filtração com centrifugação (BRASIL, 2003).

4.2.2.6 Parâmetros de validação na dissolução

Especificidade: interferência do placebo na dissolução

Para determinar a especificidade, foi avaliada a interferência do meio de dissolução e do placebo na solução padrão. O padrão de TDF ($30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e placebo (formulação simulada do comprimido com revestimento) foram submetidos às condições pré-definidas para o ensaio de dissolução (volume e aparato) por 60 minutos a 150 rpm ($n=3$). Após o tempo definido, as soluções placebo e solução padrão foram filtradas e a varredura espectral realizada na faixa de 200 a 300 nm (MARQUES e BROWN, 2002; BRASIL, 2003).

Linearidade da dissolução

A linearidade foi verificada através da construção de três curvas de calibração analítica em triplicata ($n=3$), obtida com soluções padrão nas concentrações de 6,0; 12,0; 18,0; 24,0; 30,0 e 36,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TDF, a partir da solução estoque de 300,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em HCl 0,10 mol L^{-1} . Foram avaliados o coeficiente de correlação linear (r), o desvio da normalidade e homocedasticidade (BRASIL, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação na dissolução

O limite de detecção e de quantificação do método de dissolução foi realizado pelas Equações 1 e 2 (BRASIL, 2003).

Precisão da dissolução

Nas condições padronizadas para o ensaio de dissolução, seis comprimidos contendo TDF foram submetidos ao ensaio de dissolução no mesmo dia (precisão intradia) e em um segundo dia (precisão inter-dias). A porcentagem dissolvida de TDF foi determinada por espectrofotometria no UV a 260nm (BRASIL, 2003).

Exatidão da dissolução

O ensaio da exatidão foi realizado em triplicata, pelo método do placebo com adição de padrão. O placebo correspondente ao comprimido de TDF foi submetido às condições padronizadas para o ensaio de dissolução, onde quantidades crescentes de padrão foram adicionadas às cubas para obtenção de três níveis de concentração: 25,0; 30,0 e 37,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (80, 100 e 120% respectivamente). As quantidades de TDF recuperadas foram calculadas utilizando-se a curva de calibração (BRASIL, 2003).

Aplicação do método de dissolução

Para os ensaios de dissolução, um comprimido de TDF 300 mg foi transferido para cada cuba contendo 900 mL de meio de dissolução com aparato pá ajustado para 50 rpm e mantendo-se $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Após os 30 minutos coletou-se uma alíquota de 10 mL de cada cuba, solução que foi filtrada em filtro qualitativo de 1,0 mm, realizando-se a diluição de dez vezes com HCl 0,1 mol L^{-1} para concentração de 33,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após a diluição a amostra foi colocada na cubeta de quartzo e lida no espectrofotômetro (Waters 2487) a 260 nm.

4.2.3 Desenvolvimento e Validação de Método Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

4.2.3.1 Parâmetros de validação

Linearidade FIA

Foram construídas três curvas de calibração analítica em seis concentrações de padrão ($n=3$), preparados na faixa dinâmica de trabalho de 10,00 a 45,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da solução estoque de 300,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TDF em HCl 0,10 mol L^{-1} . Foram avaliados o coeficiente de correlação linear (r), o desvio da normalidade e homocedasticidade (BRASIL, 2003).

Precisão FIA

A precisão intradia (repetitividade) da análise de injeção em fluxo foi determinada por meio da análise de seis soluções de mesma concentração ($30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pelo mesmo analista, equipamento e dia. Já a precisão inter-dias (intermediária) foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, porém em dias diferentes e com analistas diferentes, pelos desvios padrão relativos (DPR) (BRASIL, 2003).

Exatidão FIA

A exatidão da análise de injeção em fluxo foi avaliada a partir da recuperação de quantidades conhecidas de soluções de TDF padrão, nos níveis de concentração baixo ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), médio ($30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alto ($37,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) adicionados a soluções com placebo do comprimido, a fim de avaliar a recuperação do ativo em meio aos excipientes, simulando o comprimido. As quantidades de TDF recuperadas foram calculadas utilizando-se a curva de calibração (BRASIL, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação FIA

Limite de detecção e o limite de quantificação da análise por injeção em fluxo foram calculados pelas Equações 1 e 2 (BRASIL, 2003).

4.2.4 Aplicação do Método de Dissolução Automatizada por FIA-UV dos Comprimidos de TDF

4.2.4.1 Instrumentação e partes integrantes do sistema FIA-UV

Microcomputador

Foi utilizado um microcomputador Intel core 2 Duo E 4400 de 2 GHz com 1 GB de RAM com velocidade de 533 MHz. Disco rígido de 160 MB com 7200 RPM. Placa de vídeo aceleradora AGP Riva TNT2 M64 - 32 MB e um monitor SyncMaster 710N de 15". A configuração da resolução da tela do monitor foi de 1280 por 1024 pixels e a qualidade máxima de cor de 32 bits. Com este computador efetuou-se o controle das válvulas solenoide e sequencial, a aquisição dos dados

experimentais, bem como o tratamento dos dados, de uma forma simples e dinâmica.

Bomba peristáltica

Foi utilizada uma bomba peristáltica MINIPULS[®] 3 com 8 canais da Gilson, padrão com vazão de 0,05 mL min⁻¹ a 40 mL min⁻¹ e pressão máxima de 5 bar. A velocidade do motor ajustável de 0 a 48 rotação por minuto (rpm). Todas as funções - ligar, parar, pausa, alterar velocidade, inverter a direção de rotação e os diferentes modos de operação da bomba peristáltica foram acionados manualmente. Esta bomba está equipada com tubos de propulsão de Tygon[®] (1,52 mm) para proporcionar vazões de até 8,1 mL min⁻¹. As tubulações utilizadas no módulo foram de polietileno e teflon com diâmetros internos de 0,8mm.

Módulo USB-4RL

O Módulo USB (PUSB-4RL) possui quatro relés de saída (contatos elétricos) que permitem o acionamento da válvula rotatóriaseletora de baixa pressão de dez viasVICI e da válvula solenoide de baixa pressão de três vias por meio da porta USB do computador.

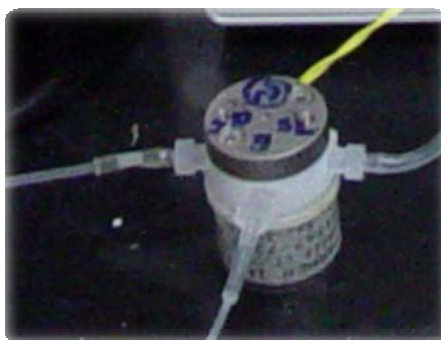
Figura 6 - Módulo USB (PUSB-4RL) utilizado para ligar e desligar os reles



Válvula solenoide de 3 vias

Utilizou-se uma válvula solenoide de baixa pressão de três vias (NResearch161T031) controlada pelo microcomputador. Esta válvula possui um dispositivo que permite a passagem de um fluido. O fechamento da válvula solenoide ocorre quando a bobina perde energia, exercendo uma força pelo peso do pino deslocado por uma mola. A válvula foi utilizada para permitir a passagem das amostras, solução carregadora e de limpeza, ocasionando o desvio do caminho analítico nos módulos de análises. O acionamento da válvula solenoide é realizado através de aplicação de uma voltagem DC nominal de 12 V pelo circuito externo de chaveamento acessório Módulo USB (PUSB-4RL) via computador, controlado pelo programa CONTROL-FIA.

Figura 7 - Válvula solenoide de baixa pressão de três vias (NResearch161T031)



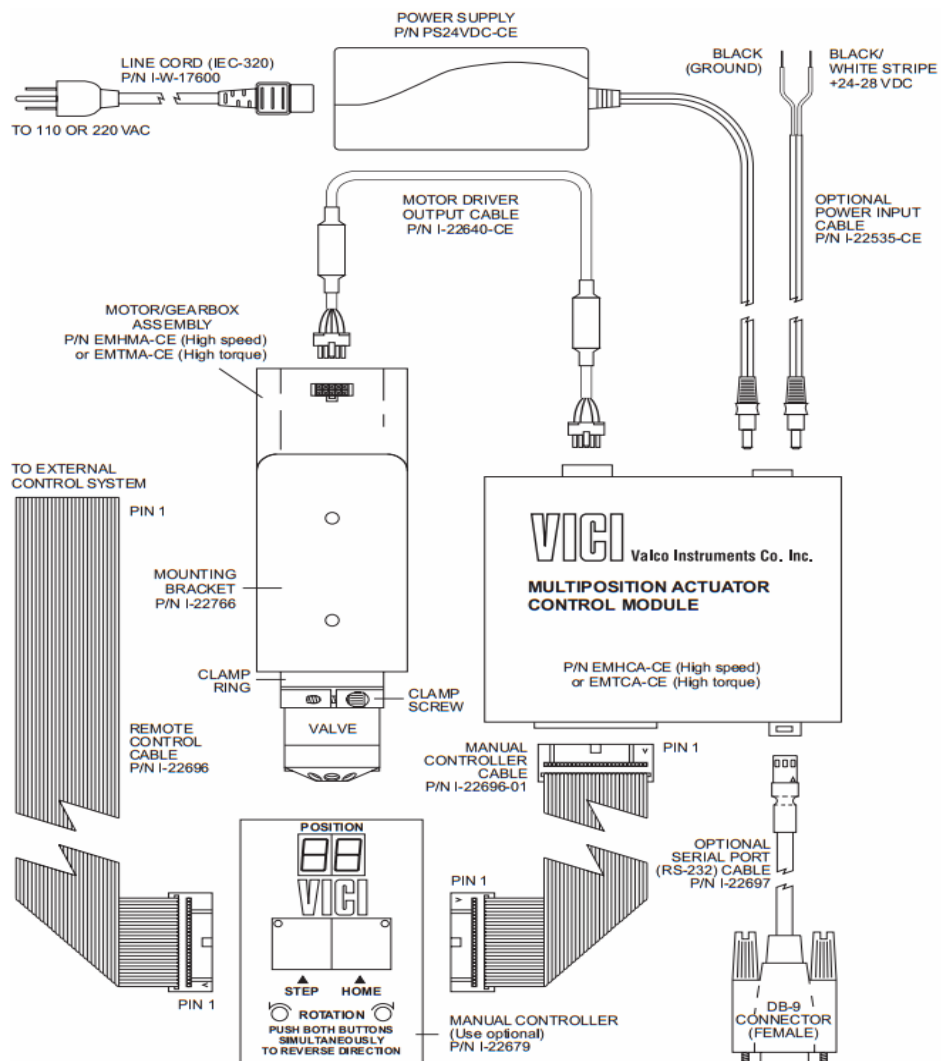
Válvula seletora de baixa pressão de 10 vias

A válvula seletora de 10 vias (C22Z-3186H) (Fig. 8) inclui anilhas/ferrolhos de 1/16" em PEEK, permitindo o acionamento do motor de passo através de atuador elétrico (Fig. 9), acionado pelo Módulo USB-4RL. Foi utilizada para a injeção sequencial da solução retirada de cada uma das cubas do dissolutor.

Figura 8 - Válvula seletora de 10 vias utilizada como injetor



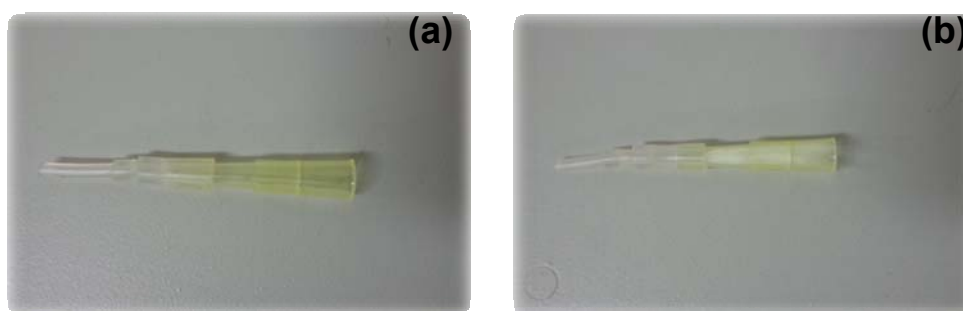
Figura 9 - Modelo esquemático da válvula seletora com seu controlador



Confecção dos filtros de lã de vidro

Os filtros foram feitos com ponteiros de micropipetas de 100 μL , cortadas e encaixados nas tubulações, com o intuito de impedir que particulados provocassem entupimento nos canais e válvulas, e mesmo ocasionem desvios do plano de luz no espectrofotômetro, causando desta forma variações na quantificação. Os filtros são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Filtros não preenchidos (a) e preenchidos com lã de vidro



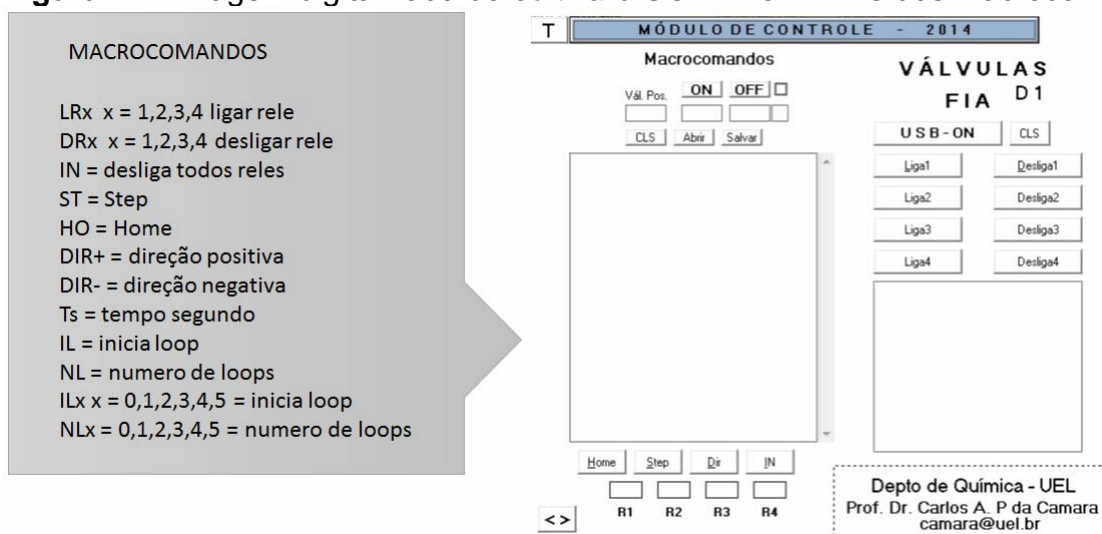
Softwares CONTROL-FIA e UTI-FIA

Os *softwares*: CONTROL-FIA e UTI-FIA foram desenvolvidos pelo prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, do Departamento de Química – UEL (Grupo DIA). Com objetivo de automatizar e facilitar o trabalho, estes programas podem ser utilizados simultaneamente, economizando tempo, desde a aquisição até o tratamento dos dados.

CONTROL-FIA

O CONTROL-FIA é o *software* responsável pelo controle à base de tempo das válvulas solenoides: seletora de 10 vias VICI e de 3 vias NResearch, sendo desenvolvido em linguagem Microsoft Visual Basic 6.0, que trabalha em ambiente multitarefas Windows 9x/Me/XP/VIS - 32 bits. Através deste, é possível disparar o cronômetro para injeção sequencial programada do injetor e subsequente da válvula solenoide, responsável pela diluição da solução por tempo, e pela limpeza da tubulação posterior à leitura (Fig. 11 e 12).

Figura 11 - Imagem digitalizada do *software* CONTROL-FIA e dos macrocomandos

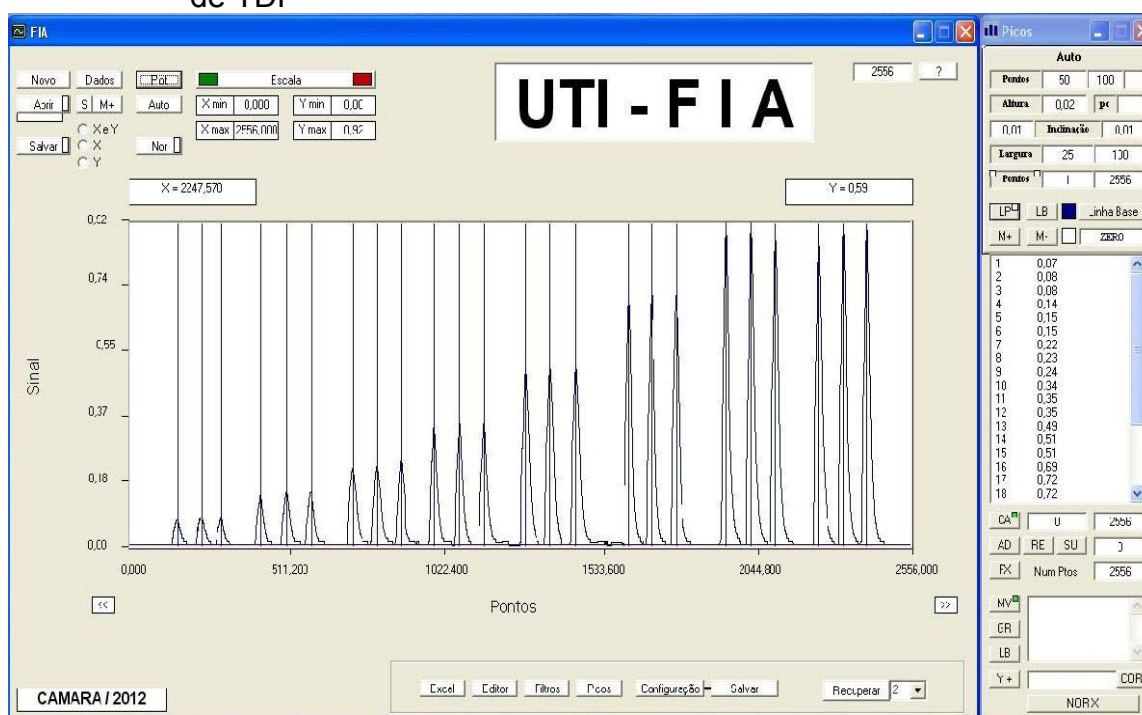


Os macrocomandos são acionados na janela de programação e lidos sequencialmente durante a execução do experimento. A utilização dos macrocomandos permite encadear experimentos em diferentes condições, proporcionando grande versatilidade e uma maior reprodutibilidade para exploração da análise.

UTI-FIA

O programa UTI-FIA foi desenvolvido em linguagem Microsoft Visual Basic 6.0, e contém vários recursos gráficos incorporados para facilitar a visualização de curvas experimentais e seu tratamento (normalização por intercalação ou remoção de pontos; inversão de sinal; subtração do branco; fornecimento das alturas dos picos, que se utiliza para quantificação, por processo manual ou automático). Este programa permite ainda, a utilização de diferentes filtros digitais para: correção do sinal/ruído, alinhamento da linha de base, inversão do gráfico, alteração das escalas e legendas; efeito “zoom”, entre outros. A transferência dos dados experimentais pode ser feita de forma direta para planilha eletrônica do Excel 2007. A Figura 12 mostra um exemplo de tratamento dos dados com o *software* UTI-FIA para obtenção das alturas dos picos (sinais transientes) nos diagramas.

Figura 12 - Imagem do tratamento de dados utilizando o *software* UTI-FIA, desenvolvido no grupo DIA, para obtenção das alturas dos picos (sinais transientes) nos fiagramas utilizados no levantamento das curvas padrão de TDF



4.2.4.2 Montagem do sistema FIA-UV

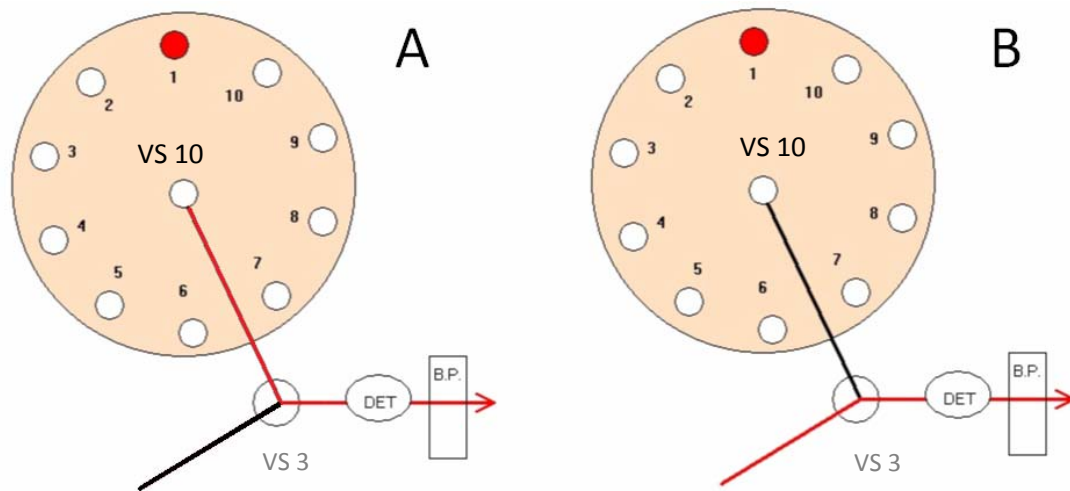
Inicialmente configuraram-se as válvulas de baixa pressão de 10 e 3 vias (Fig. 12) para que pudessem realizar a coleta, diluição, limpeza e quantificação das amostras dos comprimidos de TDF. Então, efetuou-se o acoplamento entre a bomba peristáltica, as válvulas configuradas, o espectrofotômetro com a cubeta de fluxo, através da tubulação de polietileno e Tygon, com o dissolutor contendo as 7 cubas (Fig. 13)

Configuração das válvulas de baixa pressão

O esquema da Figura 13 demonstra como é realizado o acionamento dos canais de 1 a 6 da válvula seletora de 10 vias, correspondendo as 6 cubas do dissolutor. Quando é realizada a coleta do TDF o sistema se encontra na posição mostrada na Figura 13A, e quando estiver realizando a limpeza para trocar o canal de coleta, ficará como na Figura 13B. Para realizar a diluição, a válvula solenoide de 3 vias é acionada e desacionada, alternando entre a posição A e B,

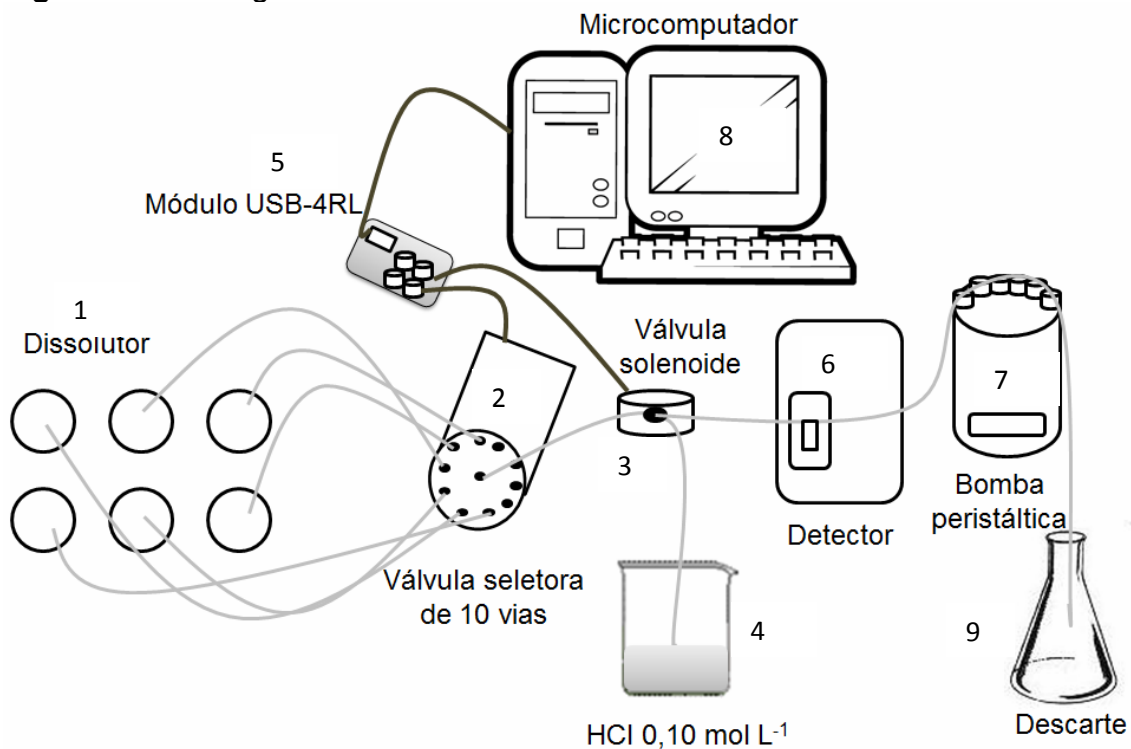
permanecendo 0,04 segundos aberta e 0,25 segundos fechada. Tanto, para realizar a limpeza da tubulação entre as coletas, como para efetuar a diluição do TDF de cada cuba, a solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ é empregada.

Figura 13 - Esquema da amostragem analítica com o atuação da válvula solenoide de 3 vias do sistema FIA



A: Válvula solenoide de 3 vias (VS 3) NRResearch com solução de TDF aberta; **B:** Válvula solenoide de 3 vias (VS 3) com solução de TDF fechada; **DET:** Detector; **B.P.:** Bomba peristáltica; **VS 10:** Válvula seletora de 10 vias VICI.

Figura 14 - Fluxograma do sistema FIA



No Dissolutor (1) ocorre o processo de dissolução do medicamento em 6 cubas. Cada cuba contém uma tubulação de polietileno (0,8 mm) acoplada ao

um filtro (Fig.10b), ligada à válvula seletora de 10 vias (2), a qual está conectada à válvula solenoide de 3 vias de baixa pressão (3), que direciona o caminho analítico pela sua abertura/fechamento. A diluição ocorre pela mistura da amostra proveniente de cada cuba com a solução de HCl 0,10 mol L⁻¹(4). Esse controle é realizado pelo Módulo USB-4RL (5) que também controla a válvula seletora de 10 vias, responsável pela troca da cuba. A solução passa pelo detector (6), impulsionada pela bomba peristáltica (7), em que o sistema todo é controlado pelo microcomputador (8) e pelo *software* CONTROL-FIA até o descarte (9), como mostrado na Figura 14.

Uma foto do sistema completo utilizado na dissolução automatizada dos comprimidos de TDF pode ser visto na Figura 15.

Figura 15 – Sistema FIA completo utilizado no ensaio de dissolução automatizada FIA-UV



Bomba peristáltica MINIPULS® 3 Gilson; válvula seletora de 10 vias (VICI C22Z-3186H); válvula solenoide de 3 vias (NRResearch161T031); Módulo USB (PUSB-4RL); Detector Dual Absorbance Waters2487; Microcomputador Intel core 2 Duo E 4400.

4.2.4.3 Desempenho do sistema FIA-UV

O desempenho do sistema automatizado FIA-UV desenvolvido e validado foi testado, considerando-se o sistema convencional como padrão de referência, comparando-se a porcentagem de dissolução pelo uso dos 2 sistemas.

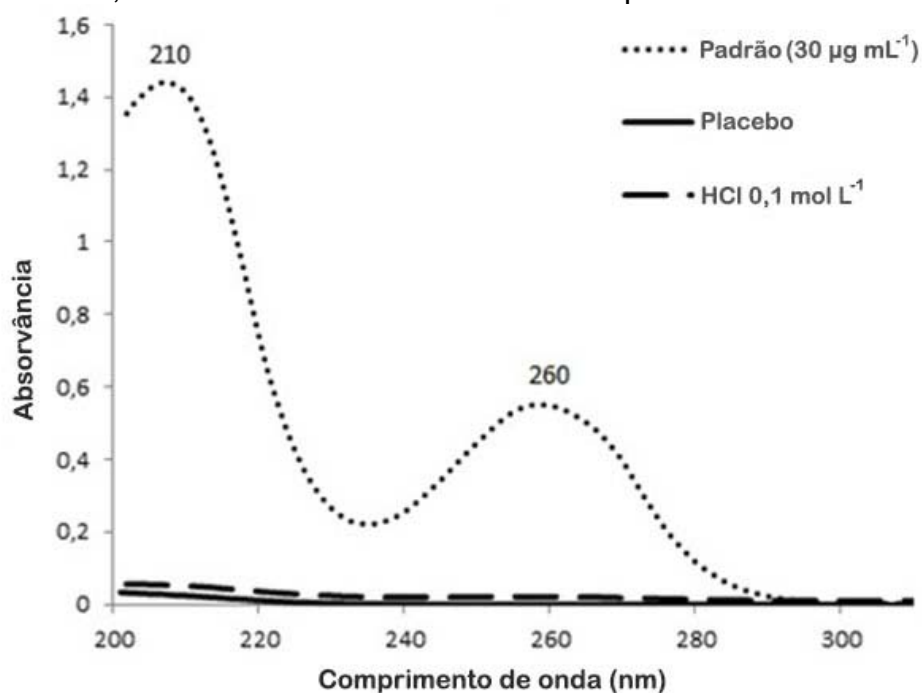
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE TEOR DE TDF PARA COMPRIMIDO E MATÉRIA-PRIMA

Especificidade do método de teor

A varredura espectral apresentou dois picos máximos (210 e 260 nm), sendo o último utilizado para validação do método. Não foram observadas sinais de interferentes do placebo e nem do solvente utilizado ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), conforme observado na Figura 16.

Figura 16 - Espectro de absorção da solução padrão ($30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e placebo em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na faixa de 200 a 300 nm para o método de teor



Linearidade do método de teor

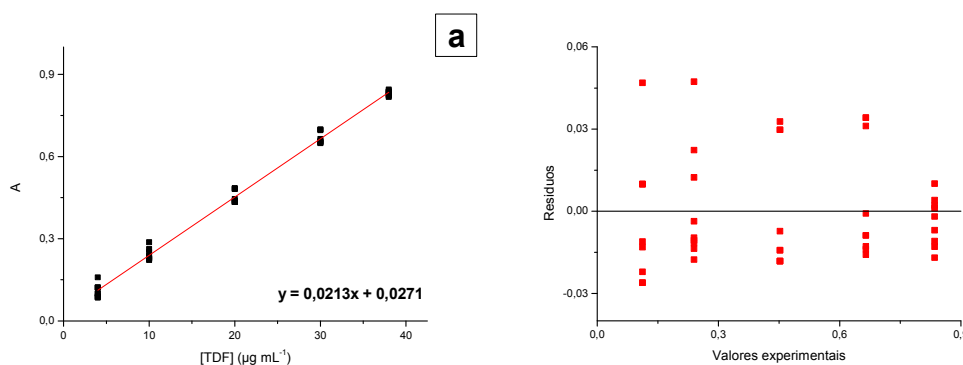
O método de teor mostrou-se linear no intervalo estudado. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores da absorvância da curva de calibração demonstraram regressão linear significativa, sem desvio da linearidade ($p < 0,05$) (Tab.3).

Tabela 3 - Avaliação da linearidade das curvas padrão de TDF a partir dos resíduos utilizando o método de teor

Estadística		Curva 1 (n=3)	Curva 2 (n=3)	Curva 3 (n=3)	Curva Média (n=9)
Normalidade dos resíduos	p-valor	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Homocedasticidade dos resíduos	p-valor	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Regressão das curvas	r	0,999	0,999	0,999	0,999
	p-valor	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

r: coeficiente de correlação. p: nível de significância de 5%

Os resíduos possuem uma distribuição normal, verificada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk, sendo o gráfico linear, comprovado pelo coeficiente de correlação ($r > 0,99$). O gráfico de resíduo (Fig. 17b) demonstrou que os valores residuais estiveram distribuídos aleatoriamente em torno do zero, indicando que são independentes e não apresentam tendências, com baixa dispersão em relação ao valor médio, indicando que são independentes da variância, que foi avaliada pelo teste de Levene, indicando uma variação constante (homocedasticidade).

Figura 17 - Curvas analíticas de calibração (a) e gráfico de resíduos (b) (n=9) para o método de teor

Limite de detecção e quantificação método de teor

O limite de detecção, definido como a menor quantidade que pode ser detectada do ativo presente em uma amostra, porém não necessariamente quantificável; sendo a menor quantidade quantificável do ativo em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão, é dada pelo limite de quantificação.

Portanto, os limites de detecção e quantificação, calculados pelas Equações 1 e 2 a partir das curvas de calibração foram de $0,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Precisão do método de teor

Para precisão intradia foram obtidos os valores de DPR 0,4 e 0,8 %, já a precisão inter-dias foi de 0,6 %, respectivamente (Tab. 4). Esses valores se apresentaram de acordo com o limite estipulado pela ANVISA de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 4 - Valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações de TDF para avaliação da precisão e precisão intermediária do método de teor

Parâmetros de Validação	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm DP	DPR (%)
Repetitividade 1º dia	100,6 ^a \pm 0,4	0,4
Repetitividade 2º dia	101,0 ^a \pm 0,8	0,8
Precisão intermediária 1º e 2º dia	100,8 ^a \pm 0,6	0,6
p-valor	>0,2	

DP: desvio padrão. DPR: desvio padrão relativo. Valor médio para repetitividade (n=6) e para precisão intermediária (n=12). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

Pelo teste de Tukey foi verificado que não há diferença significativa entre o primeiro e segundo dia em nível de 5%. Como *p-valor* foi maior que 0,2 podemos inferir que não há diferença entre os ensaios em nível de 20%, indicando que o método de teor é preciso.

Exatidão do método de teor

A exatidão, definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, está apresentada na Tabela 5. Uma solução de $300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TDF foi diluída nas concentrações de 25,0, 30,0 e $37,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A essas soluções foram adicionadas aos placebos do comprimido, a fim de avaliar a recuperação do ativo juntamente com os excipientes, simulando o comprimido e realizado o teste de exatidão.

Tabela 5 -Valores experimentais do teste de recuperação realizado com adição padrão de TDFna amostra de TDF na proporção de 80% (25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100% (30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 120% (37,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=3) do método de teor

Amostra + Adição de padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
25,0	25,2 \pm 0,03	100,7 \pm 0,1	
30,0	29,9 \pm 0,20	99,6 \pm 0,6	100,0 \pm 0,9
37,0	36,9 \pm 0,40	99,8 \pm 1,3	

Média \pm Desvio Padrão. Leitura por espectrofotometria no UV a 260 nm

O método de teor foi considerado exato, já que as médias das porcentagens de recuperação do padrão de TDF (100,0 \pm 0,9) estão de acordo com os limites especificados (98 a 102 %) (Tab.5) (BRASIL, 2003).

5.2 CONSIDERAÇÕES PARA O MÉTODO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A solubilidade e a permeabilidade do fármaco, bem como a estabilidade deste no meio, são propriedades importantes a serem consideradas durante a elaboração do ensaio de dissolução (KASIN et al., 2004). O volume de meio de dissolução pode variar de 500 a 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado (USP 29, 2006). Deve-se assegurar, no entanto, que as condições *sink* sejam mantidas, para evitar que a taxa de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste.

Enquanto, para comprimidos utiliza-se frequentemente o aparato pá, com velocidades de rotação variando de 50 a 100 rpm (USP, 2006). Ressalta-se que condição *sink* se refere a um excesso de volume de meio, que irá permitir que o ativo dissolva-se continuamente. Isso porque *in vivo* a maioria dos fármacos é absorvida em nível de membrana epitelial intestinal, logo este se dissolve pelo equilíbrio que é estabelecido em pouco tempo, sem efeitos da diminuição do gradiente de concentração cinética de dissolução (ABDOU, 1995; AULTON, 2005; SHARGEL, 1999).

A solubilidade do TDF foi testada em diferentes meios. Verificou-se que volumes de 300 mL de água ultrapura, HCl 0,1 mol L⁻¹ e tampão fosfato pH 7,4 foram suficientes para garantir a solubilidade do fármaco e a condição *sink*.

As especificações para o ensaio de dissolução envolvem uma quantidade mínima dissolvida do fármaco em determinado intervalo de tempo (USP, 2006). Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco devem estar dissolvidos em 45 minutos. A farmacopeia britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003) adota esse critério para a quase totalidade de suas monografias. Para fármacos altamente solúveis, uma especificação de único ponto, com no mínimo 85% de dissolução em 60 minutos ou menos, é suficiente para comprovar a qualidade lote a lote do produto (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2003).

Considerando esses critérios, estabeleceu-se para avaliar a dissolução de TDF um mínimo 85% de dissolução do fármaco em 30 minutos. Assumiu-se que o método de quantificação a ser utilizado na avaliação da porcentagem dissolvida de fármaco deve cumprir os parâmetros de validação: especificados pela especificidade, linearidade, precisão e exatidão, além do emprego da membrana adequada de acordo com o teste de influência, considerando ainda, estabilidade do fármaco no meio de dissolução (USP, 2006; ICH, 1996; MARQUES e BROWN, 2002).

5.2.1 Planejamento Fatorial

A fim de realizar o planejamento fatorial, alguns parâmetros tiveram de serem pré-definidos para iniciar as análises, como no caso do volume da cuba e do aparato utilizado no dissolutor. Para o volume do meio de dissolução definiu-se 900 mL, por assegurar a condição *sink* conforme proposta da Farmacopeia Internacional (WHO, 2010). O aparato pá foi definido pelo fato do comprimido não boiar, conforme recomendações do FDA (FDA, 2014).

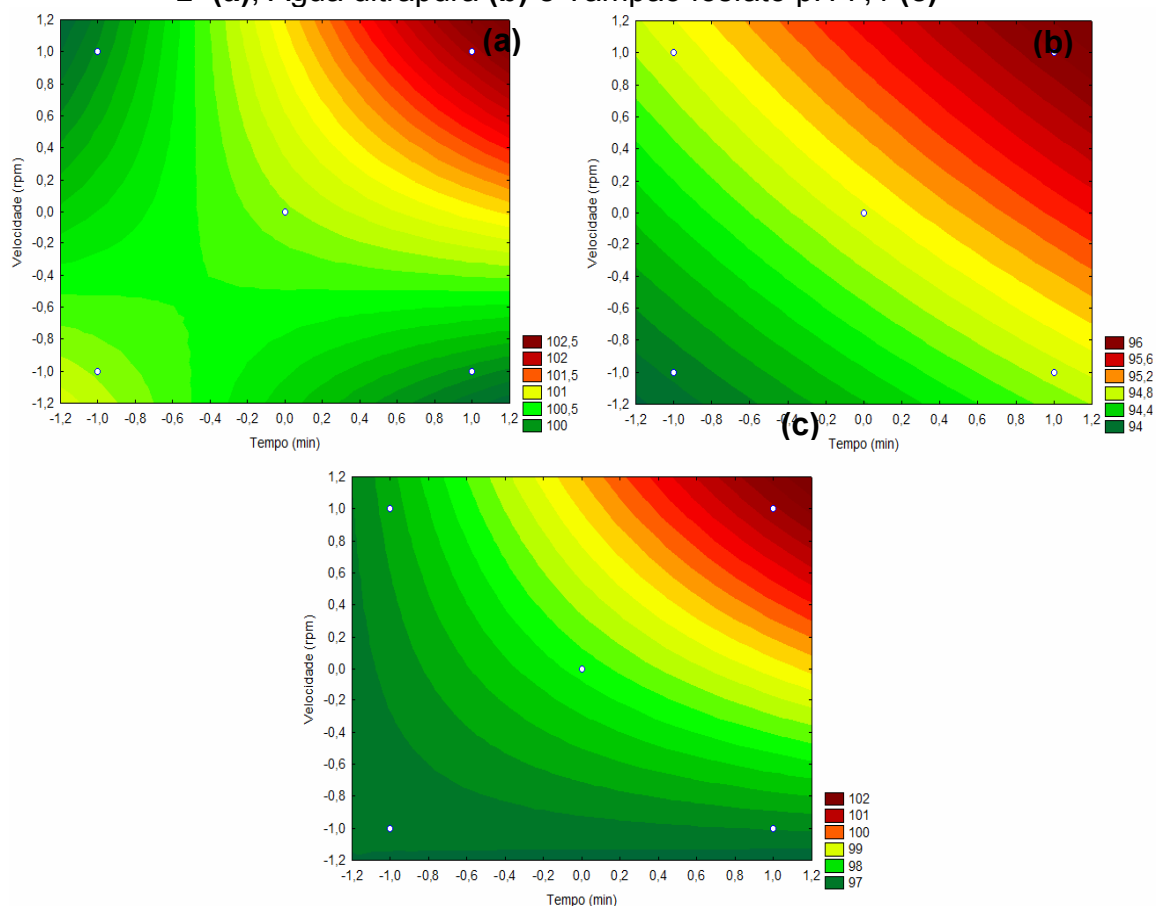
Definindo-se essas condições e as variáveis independentes, tempo de coleta (30, 45 e 60 minutos) e velocidade de agitação (50, 75 e 100 rpm) pôde-se construir o planejamento fatorial 2^2 para os três diferentes meios de dissolução, obtendo-se como resposta a porcentagem de dissolução do TDF (%) nas diferentes condições reacionais testadas (Tab.6).

Tabela 6 - Tratamentos do planejamento fatorial 2^2 e respectivas porcentagens de dissolução do TDF (%) nos três diferentes meios

Variáveis		Meios de dissolução		
Tempo (x_1)	Velocidade (x_2)	HCl 0,10mol L ⁻¹	Água ultrapura	Tampão fosfato pH 7,4
(min)	(rpm)		(%)	
30	50	100,68 ± 1,1	94,02 ± 2,0	96,79 ± 1,1
30	100	99,92 ± 0,8	94,75 ± 2,1	97,03 ± 2,1
60	50	99,95 ± 0,8	94,81 ± 1,5	97,36 ± 1,3
60	100	102,15 ± 0,2	95,89 ± 1,8	101,20 ± 0,6
45	75	101,54 ± 0,9	96,01 ± 0,9	100,45 ± 1,7
45	75	100,26 ± 1,8	96,20 ± 0,7	98,76 ± 1,5

A partir dos dados obtidos pelo planejamento fatorial foi possível gerar superfícies de contorno (Fig. 18) e funções resposta (y) (Tab. 7) referente à dissolução do TDF nos três diferentes meios. A função resposta foi expressa em porcentagem de dissolução do TDF.

Figura 18. Superfícies de contorno para dissolução do TDF nos meios HCl 0,10mol L⁻¹ (a), Água ultrapura (b) e Tampão fosfato pH 7,4 (c)



A Figura 18 refere-se os gráficos das superfícies de contorno de dissolução do TDF nos três diferentes meios. Nota-se que a área vermelha dos gráficos indica a utilização dos maiores tempos e rotações, nos quais se obteve a maior porcentagem de dissolução do TDF. Mesmo com essa indicação de aumento, pelas equações observa-se que as grandes médias já estão todas próximas do máximo de porcentagem de dissolução do medicamento.

Tabela 7 - Funções resposta (y) do TDF nos três meios de dissolução e respectivos coeficientes de determinação

Meio de Dissolução	Função resposta	R ²
HCl 0,10 mol L ⁻¹	$y = 100,68 - 0,38x_1 + 0,36x_2 - 0,74x_1x_2$	0,801
Água ultrapura	$y = 94,87 - 0,45x_1 + 0,48x_2 - 0,09x_1x_2$	0,996
Tampão fosfato pH 7,4	$y = 98,09 - 1,02x_1 - 1,19x_2 + 0,89x_1x_2$	0,918

Os valores de coeficientes de determinação foram obtidos considerando-se a checagem de curvatura dos modelos, que não foi significativa em nível de 5% ($p < 0,05$) para os diferentes meios

Os coeficientes de determinação para os meios foram de 0,801 para o HCl 0,10 mol L⁻¹; 0,996 para a água ultrapura e 0,918 para o tampão fosfato pH 7,4; indicando que 80,1 %, 99,6 % e 91,8 % da variância dos dados puderam ser explicados pelos referidos modelos estatísticos de cada meio, respectivamente.

Pelas funções resposta infere-se que as variáveis independentes x_1 e x_2 não exercem grande influência sobre a dissolução do medicamento, como comentado anteriormente, fato confirmado pela análise de variância.

A análise de variância (ANOVA) dos modelos não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis independentes (tempo de dissolução x_1 e velocidade de agitação x_2) para nenhum dos meios testados: HCl 0,10 mol L⁻¹ (Tab. 8), água ultrapura (Tab. 9) e tampão fosfato pH 7,4 (Tab. 10).

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o meio de dissolução HCl 0,10 mol L⁻¹

SS	df	MS	F	p	
Curvatura	0,067	1	0,067	0,081	0,823
Tempo (L)	0,563	1	0,563	0,682	0,561
Velocidade (L)	0,516	1	0,516	0,625	0,574
Tempo e Velocidade	2,173	1	2,173	2,631	0,352
Erro	0,826	1	0,826		
Total SS	4,145	5			

(L): Efeito linear; **SS**: Soma dos quadrados; **df**: Graus de liberdade; **MS**: Quadrado da média; **F**: Valor calculado; **p**: Nível de significância

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o meio de dissolução água ultrapura

SS		df	MS	F	p
Curvatura	2,030	1	2,030	120,44	0,058
Tempo (L)	0,813	1	0,813	48,25	0,091
Velocidade (L)	0,934	1	0,934	55,43	0,085
Tempo e Velocidade	0,032	1	0,032	1,884	0,401
Erro	0,017	1	0,017		
Total SS	3,826	5			

(L): Efeito linear; **SS**: Soma dos quadrados; **df**: Graus de liberdade; **MS**: Quadrado da média; **F**: Valor calculado; **p**: Nível de significância

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para o meio de dissolução tampão fosfato pH 7,4

SS		df	MS	F	p
Curvatura	3,037	1	3,037	2,113	0,384
Tempo (L)	4,144	1	4,144	2,883	0,339
Velocidade (L)	5,620	1	5,620	3,909	0,298
Tempo e Velocidade	3,234	1	3,234	2,249	0,374
Erro	1,438	1	1,438		
Total SS	17,47	5			

(L): Efeito linear; **SS**: Soma dos quadrados; **df**: Graus de liberdade; **MS**: Quadrado da média; **F**: Valor calculado; **p**: Nível de significância

Esses resultados de análise de variância indicam que o ensaio de dissolução pode ser realizado em qualquer velocidade ou tempo, dentro do intervalo testado, sem que haja interferência no resultado final da dissolução. Logo, dentro o intervalo das variáveis independentes, foi escolhido 50 rpm, seguindo as recomendações do FDA (FDA, 2009) e 30 minutos, adotando-se uma condição mais rigorosa para o ensaio de dissolução, uma vez que, o aumento da velocidade de rotação e do tempo, poderia favorecer a dissolução.

Pela análise do planejamento fatorial não foi possível identificar diferença entre os meios de dissolução. Portanto, avaliou-se a análise dos perfis de dissolução, a fim de escolher o melhor meio a ser utilizado, tendo como enfoque a maior porcentagem de cedência do fármaco.

5.2.2 Perfil de Dissolução e Escolha do Meio

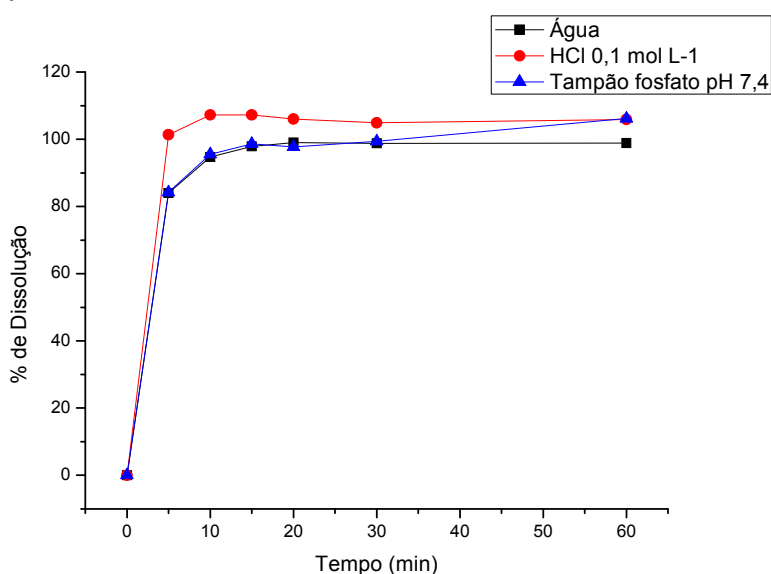
A Tabela 11 apresenta os valores de porcentagem de liberação do TDF nos diferentes meios, avaliados em cada tempo pelo teste de Tukey. Os perfis de dissolução estão representados pela Figura 18.

Tabela 11 - Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,1 mol L⁻¹, água ultrapura, e tampão fosfato pH 7,4

Tempo (min)	% liberada no meio			p-valor
	HCl 0,10 mol L ⁻¹	Água ultrapura	Tampão fosfato pH 7,4	
5	101,35 ^a ± 4,2	83,31 ^b ± 10,0	84,24 ^b ± 9,2	<0,01
10	107,23 ^a ± 1,6	93,92 ^b ± 1,3	95,52 ^b ± 2,4	<0,01
15	107,28 ^a ± 1,2	97,07 ^b ± 1,4	98,62 ^b ± 1,2	<0,01
20	106,08 ^a ± 1,6	98,22 ^b ± 2,0	97,76 ^b ± 1,2	<0,01
30	104,94 ^a ± 1,5	97,98 ^b ± 2,1	99,37 ^b ± 1,6	<0,01
60	105,90 ^a ± 4,8	98,07 ^b ± 1,8	106,17 ^a ± 3,0	<0,01

Valor médio (n=12) para ensaio realizado utilizando 900 mL de meio e velocidade de agitação 50 rpm e aparato pá.*Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey

Verifica-se pela porcentagem de dissolução para os três meios analisados, que o HCl 0,10 mol L⁻¹ a partir do tempo de cinco minutos já apresenta total liberação do fármaco, sendo essa uma condição relevante para comparação entre os meios (Fig. 19).

Figura 19 - Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,10 mol L⁻¹, Água, e Tampão fosfato pH 7,4

Com HCl 0,10 mol L⁻¹ a liberação foi considerada adequada, sendo este o meio escolhido. Contudo, a fim de se utilizar meios menos agressivos e menos custosos, o perfil foi realizado em uma concentração menor. Desta forma, efetuou-se o perfil de dissolução no ácido HCl 0,01 mol L⁻¹ e comparou-se com o HCl 0,10 mol L⁻¹ (Tab. 12). A representação gráfica pode ser visualizada pela Figura 20.

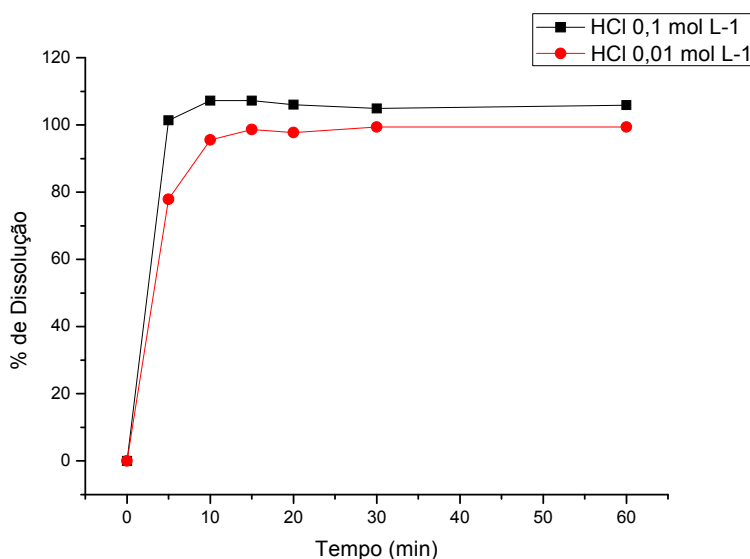
Tabela 12 - Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,10 mol L⁻¹ e HCl 0,01 mol L⁻¹
% liberada no meio

Tempo	HCl 0,10 mol L ⁻¹	HCl 0,01 mol L ⁻¹	p-valor
5	101,35 ^a ± 4,2	80,81 ^b ± 7,2	<0,01
10	107,23 ^a ± 1,6	95,52 ^b ± 2,4	<0,01
15	107,28 ^a ± 1,2	98,62 ^b ± 1,2	<0,01
20	106,08 ^a ± 1,6	97,48 ^b ± 1,4	<0,01
30	104,94 ^a ± 1,5	99,38 ^b ± 1,6	<0,01
60	105,90 ^a ± 4,8	99,41 ^b ± 1,7	<0,01

Valor médio (n=12) para ensaio realizado utilizando 900 mL de meio e velocidade de agitação de 50 rpm com aparato pá.*Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T de Student.

Comparando-se os dois meios ácidos pode-se verificar que o HCl 0,10 mol L⁻¹ se mostra mais efetivo que o HCl 0,01 mol L⁻¹ na liberação do fármaco TDF. Isso pode ser explicado também pelo fato de que o fármaco apresenta um caráter básico ($pK_a = 3,75$), o que lhe confere uma maior solubilidade no meio ácido.

Figura 20 - Perfil de dissolução do TDF em HCl 0,10 mol L⁻¹ e HCl 0,01 mol L⁻¹



Portanto, o HCl 0,10mol L⁻¹ foi escolhido dentre todos os meios analisados, considerando a maior cedência do fármaco TDF. Este também é o meio recomendado pelo FDA para comprimidos contendo este fármaco (FDA, 2014).

Através do teste T de Student foi verificado que para os perfis de dissolução, as porcentagens de dissolução nos tempo de 30 e 60 minutos, não apresentaram diferença significativa em nível de 5 % para os seus respectivos meios, confirmando os resultados obtidos pelo planejamento fatorial.

Esses resultados também estão de acordo com as recomendações disponibilizadas para o ensaio de dissolução pela ANVISA. Que preconiza a realização do ensaio de dissolução em um único ponto, 60 minutos ou menos, para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, que apresentem dissolução mínima de 85% do ativo, enquadrando-se no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (caso I e III), suficiente para controle da uniformidade lote a lote (BRASIL, 2014). Deste modo considerando que a solubilidade do presente fármaco, o mesmo se enquadra no caso III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (TEIXEIRA, 2011).

5.2.3 Eficiência de Dissolução

A eficiência de dissolução é comumente utilizada na avaliação de um fármaco referência em relação ao seu similar, contudo podemos utilizar esses cálculos para avaliar a diferença entre os meios de dissolução de um mesmo fármaco, podendo assim inferir sobre a eficiência de cada diluente (AMIDON, 1995).

Para análise da eficiência de dissolução, utiliza-se o Método Modelo Independente Simples que emprega os fatores de diferença (f_1) e de semelhança (f_2). Entretanto, esses fatores somente não são aplicados quando o fármaco apresenta uma alta porcentagem de solubilidade, pois o fator f_2 perde seu poder discriminativo. Avaliando-se os perfis de dissolução descritos anteriormente, verifica-se que as porcentagens de fármaco dissolvido nos diferentes meios testados foram superiores a 85% já em 10 minutos de ensaio, logo, a comparação dos perfis por este método, não pôde ser aplicada para o TDF (AMIDON, 1995).

Portanto, calculou-se a eficiência de dissolução (ED%) para cada meio, estabelecida de acordo com Khan e Rhodes (1975). A ED% é definida como

área sob a curva de dissolução em um tempo específico, sendo essa área 100% de dissolução nesse tempo. A Tabela 13 exemplifica o cálculo de ED%.

Tabela 13 - Eficiência de dissolução do TDF para o meio de HCl 0,10 mol L⁻¹

% Dissolvida							
Tempo	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6	Média
0	0	0	0	0	0	0	0
5	97,6	101,6	95,6	107,2	102,0	104,1	101,4
10	110,0	106,6	107,5	105,4	106,4	107,4	107,2
15	108,3	105,8	106,9	106,6	107,1	109,0	107,3
20	104,1	104,4	107,5	106,2	106,0	108,2	106,1
30	107,3	103,1	104,7	103,5	105,1	106,0	104,9
60	105,4	102,5	105,1	102,3	104,7	115,4	105,9
0-5	244,1	254,0	239,1	268,0	255,0	260,2	253,4
5-10	519,1	520,5	507,9	531,5	521,1	528,6	521,5
10-15	545,8	531,1	536,0	530,1	533,8	540,9	536,3
15-20	530,9	525,6	536,0	532,1	532,9	542,9	533,4
20-30	1056,6	1037,9	1061,0	1048,5	1055,8	1070,8	1055,1
30-60	3189,8	3085,4	3146,3	3086,9	3147,0	3320,2	3162,6
Soma	6086,3	5954,5	6026,4	5997,1	6045,5	6263,6	6062,2
AUC							
*ED (%)	101,4	99,2	100,4	100,0	100,8	104,4	101,0

*AUC: Área sob a curva da concentração versus tempo *ED: Eficiência de dissolução (n=12)

Foi possível, calcular o parâmetro de eficiência de dissolução (ED%) para os diferentes meios através de ANOVA, indicando diferenças significativas ($p < 0,01$) entre eles. Aplicando o teste de Tukey, verificou-se que houve diferença significativa entre a ED% do HCl 0,10 mol L⁻¹ e dos demais meios de dissolução (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise da diferença de eficiência de dissolução dentre os meios

Eficiência de Dissolução (%)	
Meio	Média ± DP
Água	92,31 ^b ± 1,1
HCl 0,10 mol L ⁻¹	101,04 ^a ± 1,8
HCl 0,01 mol L ⁻¹	92,04 ^b ± 4,4
Tampão fosfato pH 7,4	95,08 ^b ± 0,6
	p < 0,05

Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)(n=12)

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) sugere que fármacos de alta solubilidade e penetrabilidade tem cedência de 85% em HCl 0,10 mol L⁻¹ em 15 minutos, e isto é um forte indicativo de que a biodisponibilidade do fármaco não é afetada pela dissolução (FDA, 1997).

5.2.4 Influência da Filtração no Ensaio de Dissolução

Escolhido os meios a serem estudados, foi realizado o teste da influência dos filtros, a fim de avaliar se houve retenção do analito durante a filtração. A avaliação da influência do filtro no método proposto é muito importante, e foi realizada visando verificar possíveis alterações na concentração do fármaco, seja pela retenção do TDF ou liberação de material da membrana na solução, dependendo dos meios estudados. Os valores de absorvância para cada filtro e seus respectivos desvios padrão estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Avaliação da influência pela filtração dos padrões pelo uso ou não de diferentes tipos de filtros/membranas na absorvância do TDF (n=3)

Tipo		A ± DP
Nylon	Membrana 0,22 µm	0,674 ^b ±0,03
Celulose		0,671 ^b ±0,03
PVDF		0,670 ^b ±0,04
PTFE		0,670 ^b ±0,03
C41	Filtro quantitativo 12 µm e 2 µm	0,710 ^{ab} ±0,01
Papel Qualitativo	Filtro qualitativo 1 mm	0,688 ^{ab} ±0,03
Lã de Vidro	Synth	0,691 ^{ab} ±0,03
Sem Filtração	Sem passar por filtro/membrana	0,673 ^{ab} ±0,02
	Centrifuga (2000 rpm – 10 min)	0,695 ^{ab} ±0,04

A: absorvância. Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, p ≤ 0,05)

Na análise dos resultados obtidos verificou-se que não houve diferença significativa nas leituras de absorvância com e sem filtração ou centrifugação. Os resultados ficaram dentro dos limites de ± 2% de variação do teor do padrão (sem filtração). Logo, optou-se por utilizar o filtro qualitativo, tendo esse menor custo.

5.2.5 Estabilidade

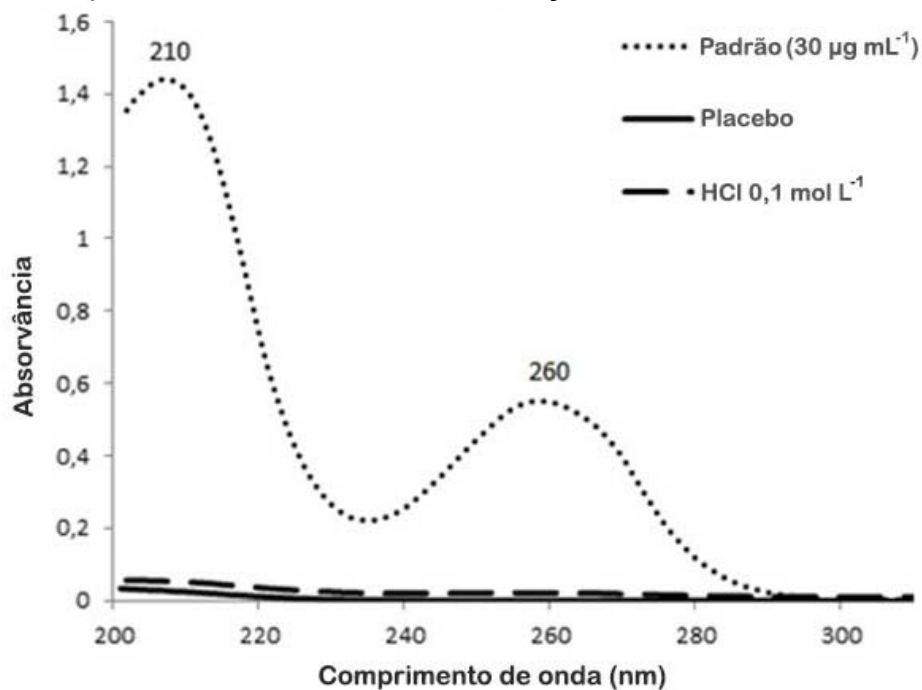
O fármaco mostrou-se estável nas condições avaliadas, em soluções de HCl 0,10 mol L⁻¹. O padrão de 30,0 µg mL⁻¹ apresentou o valor de 101,4 ± 0,2 % mantido a temperatura ambiente 25±0,2 °C por 24 h, já a amostra apresentou valor de 100,7±0,9 %, estando tanto o padrão quanto a amostra, dentro da variação permitida de 98 a 102% (n=3) (MARQUES e BROWN, 2002).

5.2.6 Parâmetros de Validação do Método para Ensaio de Dissolução

Especificidade da dissolução

Assim, a especificidade do método foi confirmada pelo fato de tanto o placebo, como o meio de dissolução não apresentarem bandas de absorção a 260 nm, comprovando-se a ausência de interferência dos excipientes (Fig. 21).

Figura 21 - Espectro de absorção da solução padrão (30,0 µg mL⁻¹) e placebo em HCl 0,1 mol L⁻¹ na faixa de 200 a 300 nm a 37±0,5 °C com aparato pá à 50 rpm utilizando método da dissolução



Linearidade da dissolução

Para avaliar a linearidade do método da dissolução foram construídas três curvas em triplicata para o padrão de TDF. Foram realizados testes estatísticos para comprovar a homocedasticidade (Levene) e distribuição normal (Shapiro-Wilk) dos padrões a partir dos resíduos, apresentados na Tabela 16.

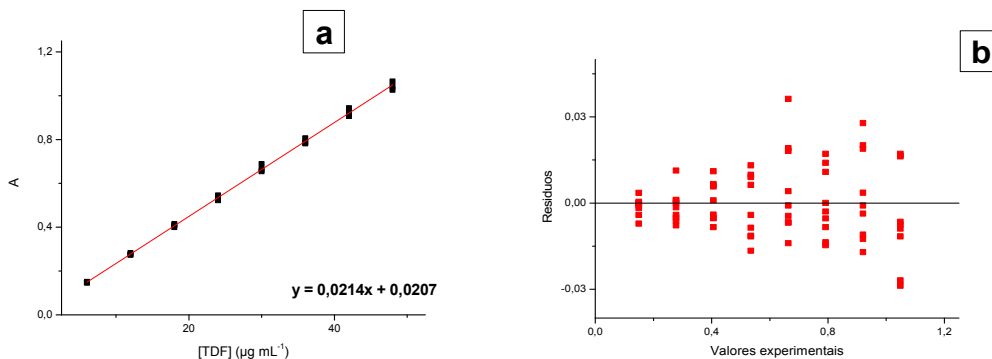
Tabela 16 - Avaliação da linearidade do método de dissolução do TDF a partir dos resíduos utilizando o método de dissolução convencional

Estatística		Curva 1 (n=3)	Curva 2 (n=3)	Curva 3 (n=3)	Curva Média (n=9)
Normalidade dos resíduos	p-valor	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Homocedasticidade dos resíduos	p-valor	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Regressão das curvas	r	0,999	0,999	0,999	0,999
	p-valor	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

r: coeficiente de correlação. p: nível de significância de 5%

Pelos valores de p maior que o nível de significância de 5%, pelo teste de Shapiro-Wilker aceita-se a hipótese de normalidade, e pelo teste de Levene não se rejeita a hipótese de igualdade das variâncias. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores da absorvância da curva de calibração demonstraram regressão linear significativa, sem desvio da linearidade ($p < 0,05$).

Figura 22 - Curvas analíticas de calibração(a) e gráfico de resíduos(b) (n=9) para o método de dissolução



Os resíduos possuem uma distribuição normal que foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo o gráfico linear, comprovado pelo coeficiente de correlação ($r > 0,99$). A variância dos resíduos é indicada pela largura da dispersão dos resíduos ao longo do eixo x e foi avaliada pelo teste de Levene indicando que a variação é constante, ou seja, os resíduos são homocedásticos. Pode observar também que os mesmos se distribuem aleatoriamente em torno do zero, indicando que são independentes e não apresentam tendências (Fig. 22b).

Limite de detecção e limite de quantificação da dissolução

Os limites de detecção e de quantificação, calculados a partir da curva média de calibração do método de dissolução pelas Equações 1 e 2 foram de $0,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Precisão da dissolução

A precisão e precisão intermediária para o método de dissolução estiveram abaixo do valor máximo de 5% preconizado pela ANVISA, apresentando precisão (repetitividade intradia de 0,7 e 1,3 %) e precisão intermediária (inter-dias de 1,0 %)(Tab.17).

Tabela 17 - Valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações de TDF para avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de dissolução

Parâmetros de Validação	Média \pm DP	DPR (%)
Repetitividade 1º dia	101,1 ^a \pm 0,7	0,7
Repetitividade 2º dia	100,4 ^a \pm 1,3	1,3
Precisão intermediária 1º e 2º dia	100,7 ^a \pm 1,0	1,0
p-valor	>0,2	

DP: desvio padrão. DPR: desvio padrão relativo. Valor médio (repetitividade n=6 e precisão intermediária n=12) para ensaios realizados utilizando 900 mL de meio e velocidade de agitação de 50 rpm com aparato pá. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey

Através da análise de variância (ANOVA) foi verificada a significância entre o primeiro e segundo dia. Como o p-valor se apresentou maior que 0,05 podemos inferir que ao nível de 20% não há diferença significativa entre os

dias. Portanto, como as análises apresentam desvios abaixo do limite estipulado de 5% indica que o método de dissolução é preciso.

Exatidão da dissolução

Na avaliação da exatidão, a porcentagem de recuperação foi de $100,1 \pm 0,2$ % para comprimidos (Tab.18). Segundo RE nº 899/03 (BRASIL, 2003), para a média de recuperação o intervalo de confiança deve estar entre 98 a 102%.

Tabela 18 - Valores experimentais do teste de recuperação realizado com adição de padrão de TDF no placebo na proporção de 80% ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100% ($30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 120% ($37,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=3) para o método da dissolução

Adição de padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
25,0	$24,9 \pm 0,1$	$99,6 \pm 0,4$	
30,0	$29,8 \pm 0,3$	$99,2 \pm 1,1$	$100,1 \pm 0,2$
37,0	$37,0 \pm 0,1$	$100,1 \pm 0,2$	

Média \pm Desvio Padrão. Realizada nas condições padronizadas para o ensaio de dissolução e determinados por espectrofotometria no UV a 260nm

5.3 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO SISTEMA FIA

Linearidade FIA

O método de injeção em fluxo mostrou-se linear no intervalo estudado. A análise de variância (ANOVA) com as absorvâncias das curvas de calibração demonstraram regressão linear significativa, sem desvio da linearidade ($p < 0,05$) (Tab.19).

Tabela 19 - Avaliação da linearidade para o sistema FIA das curvas de padrão do TDF a partir dos resíduos

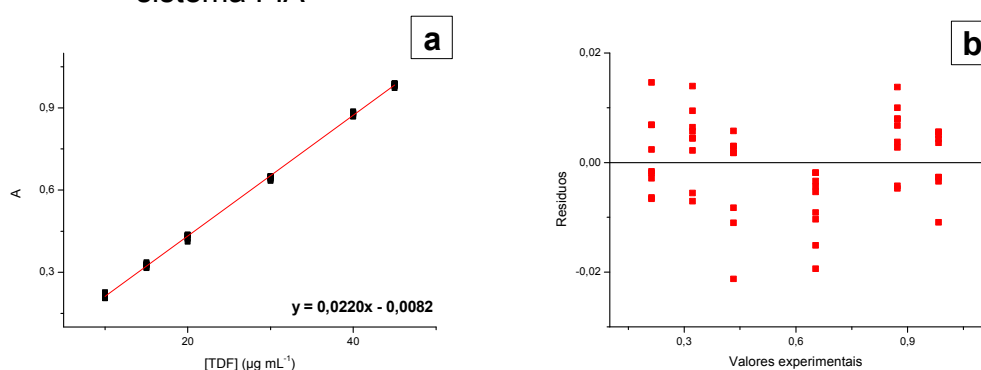
Estadística		Curva 1 (n=3)	Curva 2 (n=3)	Curva 3 (n=3)	Curva Média (n=9)
Normalidade dos resíduos	p-valor	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Homocedasticidade dos resíduos	p-valor	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Regressão das curvas	r	0,999	0,999	0,999	0,999
	p-valor	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

r: coeficiente de correlação. p: nível de significância em 5%

Através do teste de Shapiro-Wilk foi verificada a normalidade dos resíduos, ou seja, estes seguem uma distribuição normal padrão, sendo o gráfico linear comprovado pelo coeficiente de correlação ($r > 0,99$).

Figura 23 - Curva analítica de calibração (a) e gráfico de resíduos (b) (n=9) para o sistema FIA



Pelo gráfico de resíduos (Fig. 23b) observa-se que os valores residuais estão distribuídos aleatoriamente com baixa dispersão (-0,02 a 0,02) em relação ao valor médio, indicando que são independentes da variância que foi avaliada pelo teste de Levene indicando uma variação constante (homocedasticidade).

Limite de detecção e limite de quantificação FIA

O limite de detecção e o limite de quantificação para a análise por injeção em fluxo, calculados a partir das curvas de calibração foram de $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $4,88 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Precisão FIA

Para precisão intradia os DPR foram de 0,6 e 0,3 %, já a precisão inter-dias foi de 0,6 %, respectivamente (Tab. 20). Esses valores se apresentaram de acordo com o limite estipulado de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 20 - Valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações de TDF para avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método de quantificação utilizando o sistema FIA

Parâmetros de Validação	Média (%) \pm DP	DPR (%)
Repetitividade 1º dia	99,2 ^a \pm 0,6	0,6
Repetitividade 2º dia	99,8 ^a \pm 0,3	0,3
Precisão intermediária 1º e 2º dia	99,4 ^a \pm 0,6	0,6
p-valor	>0,05	

DP: desvio padrão. DPR: desvio padrão relativo. Valor médio para repetitividade (n=6) e para precisão intermediária (n=12). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

A precisão que se refere ao grau de concordância mútua entre as medidas individuais, ou seja, a repetitividade da medida. Quanto maior a dispersão dos valores menor a precisão. Pelo teste de Tukey foi verificado que não há diferença significativa entre o primeiro e segundo dia em nível de 5%. Como *p-valor* foi maior que 0,05, não há diferença significativa entre os ensaios em nível de 5%, sendo considerado um método de quantificação preciso.

Exatidão FIA

A exatidão utilizando o sistema FIA pode ser visualizada na Tabela 21. Uma solução estoque de 300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TDF foi diluída nas concentrações de 25,0, 30,0 e 37,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A essas soluções foram adicionadas os placebos do comprimido, a fim de avaliar a recuperação do ativo juntamente com os excipientes, simulando o comprimido.

Tabela 21 - Valores experimentais do teste de recuperação realizado com adição de padrão na amostra de TDF na proporção de 80% (25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100% (30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 120% (37,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=3) utilizando o sistema FIA

Padrão + Excipientes ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
25,0	25,0 \pm 0,2	100,1 \pm 0,7	
30,0	30,0 \pm 0,1	99,9 \pm 0,3	99,8 \pm 0,5
37,0	36,9 \pm 0,4	99,5 \pm 0,3	

Média \pm Desvio Padrão. Leitura por espectrofotometria no UV a 260 nm

O método utilizando injeção em fluxo foi considerado exato tendo em vista que as médias das porcentagens de recuperação do padrão de TDF ($99,8 \pm 0,5$) estão de acordo com os limites especificados (98 a 102 %) (Tab. 21) (BRASIL, 2003).

5.4 DESEMPENHO NA APLICAÇÃO DA DISSOLUÇÃO AUTOMATIZADA POR FIA-UV

O ensaio de dissolução empregando FIA foi realizado com o intuito de se automatizar as coletas, filtração e diluições verificando se o desempenho proporciona redução em relação a erros manuais dos analistas. Neste ensaio utilizou-se a lâ de vidro, considerando que: não apresentou diferença significativa (Tab. 9); a facilidade de construção e reposição manual e de adaptação no sistema FIA; e a disponibilidade aliada ao custo.

Com o *software* CONTROL-FIA foi realizado a coleta e diluição em tempos de 3 minutos de uma cuba para outra, sendo cada coleta em triplicata. As coletas foram realizadas com a diluição simultânea ocorrendo com o fatiamento em “Tandem” por 45 vezes feito pelo acionamento da válvula solenoide de 3 vias em 0,08 segundos para a solução de TDF e 0,02 segundos a solução carregadora ($\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Os resultados das coletas estão expressos na Tabela 22.

Tabela 22 - Dissolução do TDF em $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ automatizada utilizando FIA

Cuba	% liberada no meio
1	$102,3 \pm 1,0$
2	$95,9 \pm 0,9$
3	$101,8 \pm 1,0$
4	$103,2 \pm 1,0$
5	$97,8 \pm 0,9$
6	$98,5 \pm 1,3$

Valor médio (n=6) para ensaio realizado utilizando 900 mL de meio e velocidade de agitação 50 rpm e aparato pá.*Média \pm Desvio Padrão

Efetou-se a coleta e diluição manual, a fim de confrontar o desempenho do sistema automatizado FIA proposto, cujos resultados estão expressos na Tabela 23.

Tabela 23 - Comparação do ensaio de dissolução do TDF em HCl 0,10 mol L⁻¹ realizado utilizando o sistema FIA automatizado desenvolvido com a dissolução convencional (manual)

Tempo	% liberada no meio		
	FIA	Manual	p-valor
1	102,3 ^a ±1,0	101,3 ^a ± 0,4	>0,20
2	95,9 ^a ± 0,9	99,4 ^b ± 0,4	<0,04
3	101,8 ^a ± 1,0	101,4 ^a ± 0,3	>0,30
4	103,2 ^a ± 1,0	101,2 ^a ± 0,7	>0,05
5	97,8 ^a ± 0,9	99,0 ^a ± 0,3	>0,10
6	98,5 ^a ± 1,3	100,1 ^a ± 0,3	>0,10

Valor médio (n=6) para ensaio realizado utilizando 900 mL de meio HCL 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de agitação 50 rpm utilizando aparato pá.*Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T de Student

É possível verificar que em um dos pontos, mais especificamente na cuba 2, houve diferença significativa em nível de 5 % pelo teste T de Student. Esse foi atribuído à dificuldade encontrada na reprodução dos filtros, já que esses por serem produzidos manualmente apresentam imperfeições em sua compactação, hora muito compactado perdendo eficiência da bomba na propulsão da solução, hora pouco compactado, se deslocando e produzindo bolhas, ocasionando variações nas leituras de absorvância. Houve ainda entupimento pelo fato do filtro se saturar rapidamente, já que a solução se encontrava bastante turva. Entretanto, mesmo com essas dificuldades e maior variação, ainda sim o sistema FIA se mostrou efetivo, podendo ser utilizado no ensaio de dissolução.

Espera-se no futuro próximo, com o aperfeiçoamento do sistema de filtração, que este método empregando o sistema automatizado FIA, possa ser utilizado para o acompanhamento do perfil de dissolução, que requer coletas simultâneas em menores tempos, e mesmo para ensaios de outros fármacos com liberação controlada, que requerem longos períodos do ensaio de dissolução.

Outra comparação relevante a ser feita é em relação aos valores econômicos atribuídos aos sistemas de coletas automáticos, enquanto os sistemas automáticos fornecidos por empresas especializadas em equipamentos de dissolução, por exemplo, Flowsience e Erweka, custam em torno de 65 mil dólares, um sistema de análise de injeção em fluxo (FIA) custa cerca de 25 mil dólares,

sendo esse valor menos da metade dos sistemas vendidos pelas referidas empresas.

6 CONCLUSÃO

O planejamento fatorial mostrou que na faixa estudada a velocidade de rotação e o tempo não interferiram de forma significativa ($p > 0,05$) no ensaio de dissolução dos comprimidos de TDF, possibilitando a escolha das melhores condições analíticas. Os diferentes modos de filtração não afetaram as absorvâncias, possibilitando adotar os de menores custos, o qualitativo para a dissolução convencional, e a lã de vidro para a automatizada. O meio de HCl 0,10 mol L⁻¹ foi o que apresentou melhor cedência do fármaco dentre os avaliados pelo perfil de dissolução e pela eficiência de dissolução entre: HCl 0,01 mol L⁻¹, água ultrapura e tampão fosfato pH 7,4. A análise por injeção em fluxo se mostrou eficiente, possibilitando melhora e otimização, com perspectivas para novos trabalhos utilizando essa técnica. Portanto, os métodos desenvolvidos se mostraram válidos para avaliação da dissolução empregando espectrofotometria no UV, já que cumpriram todos os parâmetros de validação, considerando-se seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade. A automação flexibilizou e versatilizou a dissolução dos comprimidos de TDF pelo emprego do sistema *lab-made*, totalmente controlado por computador, desde a coleta sequencial nas várias cubas, com a diluição em linha em tempo real, até o monitoramento e registro das absorvâncias, constituindo ferramenta analítica viável e aplicável pela indústria farmacêutica nacional, considerando desde a formulação até o controle de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, H.M. Dissolution .in: MISCHER, A. (Ed). Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 19th ed. Easton: Mack Publishing, 1995. v. 1. Cap.34, p.593-604.
- ABDOU, H. M. *Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence*. Easton: Mack Publishing Company.1989, 554p.
- AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res*, New York, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- APPALA, N. R., RAO, V. J., VANITHA, P. K., MUKILTEO, K. AND SRINIVASU, K. Simultaneous estimation of tenofovir disoproxil, emtricitabine and efavirenz in tablet dosage form by RP- HPLC. *Oriental Journal of Chemistry*.v.24, n.2, p.1103-1106, 2008.
- AULTON. M.E *Delineamento de formas farmacêuticas*. In: Dissolução e solubilidade. 2.ed. Artmed, p.31-37, 2005.
- AZARMI, S.; ROA, W.; LOBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 328, p. 12-21, 2007.
- BANAKAR, U. V. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. New York, Marcel Dekker Inc., 1992. 437p.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.v.28 p.1011-1040, 2002.
- BENNETTO-HOOD, C.; LONG, M. C.; ACOSTA, E.P. Development of a sensitive and specific liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of tenofovir in human plasma. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 2007, 21, 2087.
- BENTON, T. D. Psychiatric Considerations in Children and Adolescents with HIV/Aids. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America* Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 387-400, 2010.
- BERG, T.; MARCELLIN, P.; ZOULIM, F.; MOLLER, B.; TRINH, H.; CHAN, S.; SUAREZ, E.; LAVOCAT ,F.; SNOW-LAMPART, A.; FREDERICK, D.; SORBEL, J.; BORROTO-ESODA, K.; OLDACH, D.; ROUSSEAU, F. Tenofovir is effective alone or with emtricitabine in adefovir-treated patients with chronic-hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*2010, 139, 1207.
- BRASIL. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, 2 de junho de 2003.

_____. Resolução nº 37, de 6 de julho de 2009, Publicado no DOU nº 128, quarta-feira, 8 de julho de 2009, p. 40. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e9d6f98048e524df8f859f466b74119d/RDC_37_2009_Trata%2Bda%2Badmissibilidade%2Bdas%2BFarmacop%C3%A9ias%2Bestrangeras..pdf?MOD=AJPERES>. Acesso 15 dez 2013.

_____. Resolução - RDC nº 17, 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, seção 1, p. 97, de 19 de abril de 2010.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/recomenda_dissolucao2.pdf>. Acesso 15 abri 2014.

BRITISH Pharmacopeia 1999. London: Her Majesty's Stationery Office, 1999. v. II. p. A198-A203.

BRUNER, L.; TOLLOCZKO, S. Über die Auflosungsgeschwindigkeit Fester Körper. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. v. 35, p. 283-290, 1900.

BUDAWARI, S. *The Merck Index*, 13th ed., Merck and Co. Inc. Whitehouse Station. NJ, p.630,1631-32, 2001.

CAIN LE, LOGAN R, ROBINS JM, et al; HIV-CAUSAL Collaboration. When to initiate combined antiretroviral therapy to reduce mortality and AIDS-defining illness in HIV-infected persons in developed countries: an observational study. *Annals of Internal Medicine*. v. 154, n. 8, p. 509-515, 2011.

CHASTEL, C. Emergential success: a new concept for a better appraisal of viral emergences and reemergences. *Acta virologica*. v. 44, p. 375-376, 2000.

CHAUD, M. V.; LIMA, A. C.; MICHELIN, D. C.; SANTOS, M. R. C.; PAGANELLI, M. O.; IGNÁCIO, R. F. Efeito da Força de Compressão e da Umidade no Perfil de Dissolução de Fármacos. *Saúde em Revista Universidade Metodista de Piracicaba*. v.7, n. 15, p. 39-43, 2005.

CLOYD, J. C.; GUMNIT, R. J.; LESAR, T. S. Reduce seizure control due to spoiled phenytoin capsules. *Annals of Neurology*. v. 7, p. 191-193, 1980.

COHERE. Opportunistic Infections Project Team of the Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research in Europe (COHERE) in EuroCoord. CD4 cell count and the risk of AIDS or death in HIV-Infected adults on combination antiretroviral therapy with a suppressed viral load: a longitudinal cohort study from COHERE. *PLoS Medicine*. v. 9, n. 3, 2012.

DALMORA, S. L., NOGUEIRA, D. R., CALEGARI G. Z., BERGAMO, A. C., STAMM, F. P. Development and validation of a dissolution test with reversed-phase liquid chromatography analysis for rupatadine in tablet dosage forms *Química Nova*, v. 33, p. 1150-54, 2010.

- DECHRISTOFORO, R.; PENZAK, S. R. Tenofovir: A nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection. *American journal of health system pharmacy*, Bethesda, v. 61, n. 1, p. 86-98, 2004.
- DE CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 10, p. 507-515, 2010.
- DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009, 33, 307.
- DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Therapeutic potential of nucleoside/nucleotide analogues against poxvirus infections. *Reviews in Medical Virology*. v. 14, p. 289-300, 2004.
- DE CLERCQ, E. Tenofovir: Quo Vadis Anno 2012 (Where Is It Going in the Year 2012)? *Medicinal Research Reviews*. v.32, n. 4, p. 765-785, 2012.
- DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. *The Journal of Chromatography B*. v.830, p.6-12, 2006.
- DE MIRANDA, J. A. T. Determinação simultânea de aspirina e ácido ascórbico em medicamentos usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. 2011, 88f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia - Programa de Pós-Graduação em Química, Uberlândia, 2011.
- DE NOVAIS, I. C. *Ensaio de dissolução e sua importância no desenvolvimento de novos medicamentos*. 2007. 59f Tese (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Centro Universitário das faculdades metropolitanas unidas, São Paulo. 2007.
- DE OLIVEIRA, L. S. Desenvolvimento de um sistema eletroquímico de análise por injeção em fluxo para detecção de cocaína. 2011, 79f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- DE SOUZA, M. V. N. Entry inhibitors – A New Class of Aids Drugs. *Letters in Drug Design & Discovery*. v.1, p. 184-193, 2004.
- DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P.; A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 321, p. 1-11, 2006.
- ETIENNE, L.; DELAPORTE, E.; PEETERS, M. Origin and emergence of HIV/AIDS. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. 2011.
- FATIBELLO-FILHO, O.; ANICETO, C. Determinação Espectrofotométrica por Injeção em Fluxo de Paracetamol (Acetaminofeno) em Formulações Farmacêuticas. *Química Nova*. v. 25, n. 3, p. 387-391, 2002.
- FATIBELLO-FILHO, O.; CANAES, L. S. Determinação Turbidimétrica de Metilbrometo de Homatropina em Formulações Farmacêuticas Empregando um

Sistema de Análise por Injeção em Fluxo. *Química Nova*. v. 29, n. 6, p. 1237-1240, 2006.

FELIX, F. S.; AGNES, L. Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with Flow Injection Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 99, n. 12, p. 4784, 2010.

FDA. Food and Drug Administration Guidance for industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. *Center for Drug Evaluation and Research*, 1997.

FDA. Food and Drug Administration. Dissolution Methods. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm?PrintAll=1>. Acesso em: 30 maio 2014.

FDA. Food and Drug Administration Reviewer Guidance. Validation of chromatographic method. *Center for Drug Evaluation and Research*, 1994.

FILLEBORN, V. M. A new approach to tablet disintegration testing. *Journal of Pharmaceutical Science*. v. 120, p. 233-255, 1948.

FLOWSCIENCE – Hanson.

Disponível em <http://www.flowscience.com.br/hanson_celula_difusao_vertical.html>. Acesso em 10 fev 2014.

GALLANT, J. E.; DEJESUS, E.; ARRIBAS, J. R.; et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs zidovudine, lamivudine and efavirenz for HIV. *The New England Journal of Medicine*. v. 354, p. 251-260, 2006.

GARFORTH, S. J.; PARNIAK, M. A.; PRASAD, V. R. Utilization of a Deoxynucleoside Diphosphate Substrate by HIV Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 2008, 3, 1.

GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical Pharmacokinetics*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 406p.

GILBERT, M. T. P.; RAMBAUT, A.; WLASIUK, G.; SPIRA, T. J.; PITCHENIK, A. E.; WOROBEY, M. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *PNAS*. v. 104, n. 47, p. 18566-18570, 2007.

GISH, R. G.; TRINH, H.; LEUNG, N.; CHAN, F. K. L.; FRIED, M. L.; WRIGHT, T. L.; WAN, C.; ANDERSON, J.; MONDOU, E.; SNOW, A.; SORBEL, J.; ROUSSEAU, F.; COREY, L. Safety and antiviral activity of emtricitabine (FTC) for the chronic hepatitis B infection: a two-year study. *Journal of Hepatology*. v. 43, n. 1, p. 60-6, 2005.

GOMES, N. A.; VAIDYA, V. V.; PUDAGE, A.; JOSHI, S. S.; PAREKH, S. A. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 48, n. 3, p. 918-26, 2008.

GRADY, L. T. Third generation dissolution testing: dissolution as a batch phenomenon. *Drug Information Journal*. v. 30, p. 1063-70, 1996.

GUPTA, R.K.; JORDAN, M. R.; SULTAN, B. J.; HILL, A.; DAVIS, D. H. J.; GREGSON, J.; et al. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and metaregression analysis. *Lancet*. v. 6, p. 1250-1258, 2012.

HACKER, M. A.; KAIDA, A.; HOGG, R. S.; BASTOS, F. I. The first ten years: achievements and challenges of the Brazilian program of universal access to HIV/AIDS comprehensive management and care, 1996-2006. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 23, 2007.

HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. v. 23, p. 923-931, 1931.

ICH. *Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q 2B*, (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nov, 1996. Geneva, Switzerland).

JOANA FEITEIRA – Estudo Geral – Universidade de Coimbra 2010. Disponível em <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/14359/1/Tese%20-%20Joana%20Feiteira.pdf> > Acesso em 21 nov 2012.

JONSSON M, FUSCO JS, et al; Writing Committee for the CASCADE Collaboration. Timing of HAART initiation and clinical outcomes in human immunodeficiency virus type 1 seroconverters. *Archives of Internal Medicine*. v. 171, n. 17, p. 1560-1569, 2011.

JOSHI, M.; NIKALJE, A. P.; SHAHED, M.; DEHGHAN, M. HPTLC method for the simultaneous estimation of emtricitabine and tenofovir in tablet dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.71, n.1 p.95-97, 2009.

KANDAGAL, P. B.; MANJUNATH, D. H. SEETHARAMAPPA, J. AND KALANUR, S. S. RP-HPLC method for the determination of tenofovir in pharmaceutical formulations and spiked human plasma. *Analytical Letters*. v.41, n.4, p.561-70, 2008.

KASIN, N.A., WHITEHOUSE, M., RAMACHANDRAN, C., BERMEJO, M., LENNERNAS, H., HUSSIAN, A. S., JUNGINGER, H. E., STAVCHANSKY, S. A., MIDHA, K. K., SHAH, V. P., AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO Essentials drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmacology*. v. 1, p. 85-96, 2004.

KEARNEY B. P.; FLAHERTY, J. F.; SHAH, J. Tenofovir Disoproxil Fumarate: Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, New York, v. 43, n. 9, p. 613-622, 2004.

KHAN, K.A; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 27, p. 48-49, 1975.

KING, T.; BUSHMAN, L.; KISER, J.; ANDERSON, P. L.; MICHELLE, R.; DELAHUNTY, T. ; FLETCHER, C. V. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of tenofovir-diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells *The Journal of Chromatography B*. v.843, n.2,7, p.47-56, 2006.

LAVRA, Z. M. M. *Obtenção Tecnológica de antirretroviral dose fixa combinada à base de lamivudina, zidovudina e nevirapina*. Recife, 2006. 63p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green Chemistry" – Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. *Química Nova*, v.26, n.1, p.123-129,2003.

LEE, J. C.; MAROSOK, R. D. Acute tubular necrosis in a patient receiving tenofovir. *Official Journal of the International AIDS Society*.v.17, p. 2543-2544, 2003.

LEVER, R. A.; LEVER, A. M. L. Intracellular defenses against HIV, viral evasion and novel therapeutic approaches. *The Journal of the Formosan Medical Association*. v. 110, n. 6, p. 350-362, 2011.

LEVY, G. Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. *American Journal of Pharmacy*.v.135, n. 3, p. 78-92, 1963.

LOYD-SMITH, J.O.; GEORGE, D.; PEPIN, K. M.; PITZER, V. E.; PULLIAM, J. R.; DOBSON, A. P.; et al. Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science*. v. 326, p. 1362-1367, 2009.

MACLEOD, C.; RABIN, H.; RUEDY, J.; CARON, M.; ZAROWNY, D.; DAVIES, R. Comparative bioavailability of three brands of ampicillin. *Canadian Medical Association Journal*.v. 107, p. 203-209, 1972.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANENTI, S. A. Epidemiologia e caracterização molecular do hiv-1 em gestantes do sul de Santa Catarina no período de janeiro a dezembro de 2007. *Dissertação de Mestrado*, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Brasil, 2008.

MANGOANKAR, K.; DESAI, A. Simultaneous estimation of emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz from tablets by reverse phase high performance liquid chromatography method. *Indian Drugs*.v.45, n.3, p.188-92, 2008.

MARCOLONGO, R. *Dissolução de Medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica*. São Paulo, 2003. 117p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

MARTIN, C. M.; RUBIN, M.; O'MALLEY, W. G.; GARAGUSI, V. F.; MACCAULEY, C. E. Brand, generic drugs differ in man. *JAMA*.v. 23, 1968.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Rev. Analytica* 1.1. 2002.

MASSAKI, T.; YUICHI, K.; NAOYA, O.; ATSUSHI, H.; KAZUhide, B.; TSUGUHIRO, K. Determination of plasma tenofovir concentration using a conventional LC-MS method. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v.30, p.1784-86, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de DST/AIDS. Disponível em <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 29 maio 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DA NAÇÃO. Boletim epidemiológico da comissão intergovernamental de HIV/AIDS da reunião de ministros da saúde do MERCOSUL. n.1, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico – AIDS e DST. ISSN 1517-1159, ano 1, n.1, 2012.

MORRISON, A. B.; CAMPBELL, J. A. Tablet disintegration and physiological availability of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 54, p.1-8, 1965.

NICKERSON, B. Challenges and Trends in Dissolution Testing. *American Pharmaceutical Review*, 2001.

OKIE, S. Fighting HIV — Lessons from Brazil. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 354, n. 19, p. 1977-81, 2006.

PALOMBO, M.S., SINGH, Y., SINKO, P.J. Prodrug and conjugate drug delivery strategies for improving HIV/AIDS therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Paris, v. 19, n. 1, p. 3-14, 2009.

PATEL, S.; BAGHEL, U.S.; RAJESH, P.; PRABHAKAR, D.; ENGLA, G.; NAGAR, P.N. Spectrophotometric method development and validation for simultaneous estimation of Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in bulk drug and tablet dosage form, *International Journal of Clinical Pharmacy*. v.1, n.1, p.28-30, 2009.

PAYDARY, K.; KHAGHANI, P.; EMAMZADEH-FARD, S.; ALINAGHI, S. A. S.; BAESI, K. The emergence of drug resistant HIV variants and novel anti-retroviral therapy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. v. 3, n. 7, p. 515-522, 2013.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*. v. 25, n. 6b, p.1108-1116, 2002.

RAJU, N. A.; BEGUM, S. Simultaneous RP-HPLC Method for the Estimation of the Emtricitabine, Tenofovir Disoproxil fumarate and Efavirenz in Tablet Dosage form. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. v.1, n.4, p.522-25, 2008.

REZK, N. L. ; CRUTCHLEY, R. D. ; KASHUBA, A.D. M. Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir in human plasma using high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *The Journal of Chromatography B*. v.822, p.201-8, 2005.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. New concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*.v. 78, n. 1, p. 145-57, 1975.

RXLIST. The Internet Drug Index. Truvada-Tenofovir Disoproxil Fumarate. Disponível em:<<http://www.rxlist.com/truvada-drug.htm>>. Acesso em: 15 abril 2014.

SANABANI, S. S.; PESSOA, R.; SOARES DE OLIVEIRA, A. C.; et al. Variability of HIV-1 genomes among children and adolescents from São Paulo, Brazil. *PLOS ONE*.v.8, n.5, 2013.

SCHMIDT JR, E.; MELCHERT, W. R.; ROCHA, F. R. P. Sistema de Análises em Fluxo Polivalente para a Determinação Espectrofotométricas de Fármacos. *Química Nova*. v. 34, n. 7, p. 1205-1210, 2011.

SHAMA, R.; MEHTA, K. Simultaneous spectrometric estimation of tenofovir disoproxil fumarate and lamivudina in three component tablet formulation containing efavirez. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*.v.72, n.4, p.527-530, 2010.

SHARGEL, L. & YU, A. B. C. Biopharmaceutical consideration in drug product design. In: *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 4th ed. Stamford: Appleton & Lange. cap.5, p.99-128, 1999.

SHARMA, R. & GUPTA, P. A validated RP HPLC method for simultaneous estimation of emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate in a tablet dosage form. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. v.4, n.3, p.276-284, 2009.

SHIRKHEDKAR, A. A.; BHIRUD, C. H.; SURANA, S. J. Application of UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Tenofovir Disoproxil Fumarate in Tablets. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*.v.22, p.1, p.27-29, 2009.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.; SHAH, V.; WILLIAMS, R. FIP/AAPS guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *Dissolution Technologies*. v. 10, n. 15, p. 10-13, 2003.

SKELLY, J. P. Bioavailability of sustained release dosage forms-relationship with *in-vitro* dissolution. In: Yacobi, A. Holperin-Walega, E. (Eds.), Oral Sustained Release Formulations. Pergamon, New York, p. 57, 1988.

SOARES, M. F. L. R., SOARES SOBRINHO, J. L., GRANJEIRO JUNIOR, S., SILVA, K. E. R., ALVES, L. D. S., ROLIM NETO, P. J. Development of new Dissolution Test and HPLC-RP Method for anti-parasitic Ornidazole Coated Tablets. *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 478-481, 2010.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova*, Vol. 26, No. 3, 366-372, 2003.

STERLING, T.; CHAISSON, R. General clinical manifestations of human immunodeficiency virus infection (including the acute retroviral syndrome and oral, cutaneous, renal, ocular and cardiac diseases). In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 6th edn. Elsevier, Ch 117. 2005.

STORPIRTIS, S. *Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos*. São Paulo: [s.n], 1999. 78p.

SUDHA, T.; SAMINATHAN, J.; HEMALATHA, P.V.; RAVIKUMAR, V.R. Simultaneous ultraviolet spectrophotometric estimation of Tenofovir Disproxil Fumarate and Emtricitabine in Bulk and in Tablet Dosage Form. *International Journal of Biopharmaceutics*.v.1, n.1, p.26-30, 2010.

SWEETMAN, S (ed). *Martindale: the complete drug reference*. 35rd. ed. London: Pharmaceutical Press; 2007: 1030-1

TEIXEIRA, M. O. N. *Desenvolvimento de métodos de determinação de tenofovir para aplicação em controle de qualidade e estudo de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa*. 2011, 196f. Tese (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

THOMPSON, M.A.; ABERG, J. A.; HOY, J.F.; TELENTI, A.; BENSON, C.; CAHN, P.; ERON Jr, J. J.; GUNTARD, H.F.; HAMMER, S. M.; REISS, P.; RICHMAN, D. D.; RIZZARDINI, G.; THOMAS, D. L.; JACOBSEN, D. M.; VOLBERDING, P. A. Antiretroviral treatment of adult HIV infection. *The Journal of the American Medical Association*. v. 308, n. 4, p. 387-402, 2012.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. *Trends in analytical chemistry*.v.23, n.2, p.137-145, 2004.

UNAIDS. Disponível em: <<http://unaidstoday.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2013

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP. Disponível em: <http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/pendingStandards/m3429_authorized.pdf>. Acesso em 29 maio 2014.

USP – *The United States Pharmacopeia*: 34^a ed. Rockville, NF 29, United States Pharmacopeia Convention Inc., 2011.

USP – *The United States Pharmacopeia*, 33^a ed. Rockville, MD20852, United States Pharmacopeia Convention Inc., 2010.

USP – *The United States Pharmacopoeia*, 29^a ed Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WAGNER, J. G. *Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics*. Hamilton: Drug Intelligence Publications, 1971. 375p.

WHO. *Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-fourth report*, 2006, Annex 7 (WHO Technical Report Series, No. 937) and Good Clinical Practices. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_937_eng.pdf>. Acesso em: 30 maio 2014.

WHO. World Health Organization. Tenofovir tablets: final text for addition to *The International Pharmacopoeia*. Geneva, 2010. Disponível em:

<http://www.who.int/hiv/pub/imai/Chronic_HIV_Care7.05.07.pdf?ua=1 >. Acesso em: 30 maio 2014.