

# Desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento da matéria-prima lamivudina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

## Development and analytical method validation in lamivudine raw material for dosages by high efficiency liquid chromatography

Deborah Bezerra Monteiro<sup>1,2</sup>, Jovita Maria de Farias Braga<sup>1,2</sup>, Miracy Muniz de Albuquerque<sup>1</sup>, Ruth Strattmann<sup>1</sup>, Keyla Emanuelle Ramos da Silva<sup>1</sup> & Pedro José Rolim Neto<sup>1</sup>

**RESUMO** – Atualmente, em todo o mundo, 8.000 pessoas morrem diariamente em decorrência da infecção pelo vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e a situação se agrava nas nações mais pobres. A taxa de mortalidade por AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) no Brasil vem mostrando uma tendência de estabilização desde 1999, devido à Política Nacional de Medicamentos implantada pelo governo garantindo o acesso universal e gratuito ao tratamento anti-retroviral. Os laboratórios oficiais como o LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), tem a missão de produzir medicamentos anti-retrovirais com a qualidade exigida pela Resolução 210 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que assegura as Boas Práticas de Fabricação. A validação de métodos analíticos aumenta substancialmente a probabilidade de que a transferência de um método entre laboratórios ocorra da forma mais satisfatória possível. A necessidade da validação é justificada por ser um requisito inerente aos modernos processos de registro de medicamentos, por garantir a qualidade do produto, bem como, para a indústria do ponto de vista econômico e de competitividade no mercado. A metodologia de quantificação da matéria-prima Lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência, foi desenvolvida e validada de acordo com a Resolução 899 da ANVISA, onde foram avaliados os parâmetros de robustez, linearidade e faixa de variação, precisão.

**PALAVRAS-CHAVE** – Validação, anti-retroviral, AIDS, Lamivudina.

**SUMMARY** – Currently, all over the world, 8,000 people die daily due to the infection by HIV (Virus of Human Immunodeficiency) and the situation becomes worse in the poorest nations. The mortality tax for AIDS (Syndrome of Acquired Immunodeficiency) in Brazil showing a tendency of stabilization since 1999, due to National Politics of Medicines implanted by the government guaranteeing the universal and free access to the treatment antiretroviral. The Official Laboratories like LAFEPE (Laboratory Pharmaceutical of the State of Pernambuco), has the mission to produce antiretroviral medicines with the quality demanded by the Resolution 210 of the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) that assures the Good Practices of Production. The analytical methods validation increases substantially probability to transfer the method among laboratories could be possible and satisfactory way. The validation is needed and is justified by being an inherent requirement to the modern registration processes in medicines, as to guarantee the quality product, as well as, to the industry as economical point of view and competitiveness in the market. The quantification of lamivudine raw material methodology for high efficiency liquid chromatography were developed and validated in agreement with the Resolution 899 of ANVISA, where they were appraised the robustness parameters, linearity and variation strip, precision.

**KEYWORDS** – Validation, antiretroviral, AIDS, Lamivudine.

### INTRODUÇÃO

A AIDS foi descrita em 1981, quando foram identificados os primeiros casos em pacientes homossexuais masculinos procedentes das grandes cidades norte-americanas (Toledo, 2004). A característica fundamental da doença é a deterioração gradual dos linfócitos TCD4+, células essenciais para a resposta imunológica, atuando como sinalizadoras de outras célu-

las do sistema imune para o desempenho de suas funções (Merck Sharp & Dohme, 2004).

No mundo, 8.000 pessoas morrem diariamente em decorrência da infecção pelo vírus HIV e a situação se agrava nas nações mais pobres (Campos, 2004). A taxa de mortalidade por AIDS no Brasil vem mostrando uma tendência de estabilização desde 1999, uma vez que, o governo brasileiro introduziu a Política Nacional de Medicamentos para combate a AIDS, garantindo o aces-

Recebido em 09/3/2006

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM - Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE - Av. Prof. Arthur de Sá s/n CDU - Recife-PE - CEP 50740 521

<sup>2</sup>Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE - Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos - Recife-PE - CEP 52171-010

so universal e gratuito ao tratamento anti-retroviral no Sistema Único de Saúde do Ministério da saúde.

A estratégia terapêutica mais utilizada consiste na associação de dois inibidores da transcriptase reversa com um inibidor da protease (Hurwitz & Schinazi, 2002). Os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (abacavir, didanosina, lamivudina, estavudina, zidovudina e zalcitabina) impedem a produção do DNA viral por serem incorporados a cadeia nucleosídica (Ayward *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2003). Os inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (delavirdina, efavirenz, nevirapina) ligam-se diretamente ao sítio alostérico da enzima inibindo o RNA e DNA dependente e a DNA polimerase (Ayward *et al.*, 2000; Granjeiro, 2001).

A Lamivudina (3TC) é um anti-retroviral análogo de nucleosídeo de peso molecular de 229,26 e fórmula molecular  $C_8H_{11}N_3O_3S$  (Lafepe, 2000, F. Bras. 4ed, 2002; Martindale, 2005).

A Lamivudina, aprovada em 1995 pelo FDA (*Food and Drug Administration* – agência americana que regulamenta drogas e alimentos), é atualmente utilizada no tratamento da AIDS combinada com a Zidovudina (AZT) e/ou um inibidor de protease, com o objetivo de conter o aparecimento de efeitos tóxicos, resistência à droga e falha terapêutica causados pelo uso prolongado do AZT, primeira droga anti-retroviral aprovada pelo FDA em 1987. Encontra-se disponível para uso oral nas formas de comprimidos de 150mg e solução oral 10mg/mL.

A necessidade da validação é justificada por ser um requisito inerente aos modernos processos de registro de medicamentos, para garantir a qualidade do produto, bem como, para a indústria do ponto de vista econômico e de competitividade no mercado. Durante o processo de desenvolvimento de um fármaco, a validação de um método analítico é realizada para garantir que o mesmo seja exato, específico, reprodutível e confiável dentro da variação especificada, na qual a substância em exame será analisada (Swartz & Krull, 1998).

Segundo a Farmacopéia Americana, USP 28, validação é o processo que é estabelecido por estudos de laboratório, onde as características de desempenho ou parâmetros analíticos do método alcançam os requisitos para as aplicações analíticas pretendidas.

No processo de validação de uma metodologia analítica é necessário avaliar alguns parâmetros: exatidão, especificidade, faixa de variação, limites de detecção e de quantificação, linearidade, precisão e robustez.

## METODOLOGIA

Durante o trabalho foram usadas vidrarias selecionadas de um único fabricante e restrito uso para este estudo. Foi utilizada as matérias-primas: substância química de referência secundária de Lamivudina do fornecedor Hetero Drug, os reagentes: acetato de amônio P.A (Merck), ácido acético glacial P.A (Merck), água deionizada qualidade Milli-Q, hidróxido de amônio P.A (Merck), metanol grau CLAE (Merck). Os equipamentos para o laboratório I: agitador magnético, balança analítica, marca Mettler, modelo AE 260, coluna C-18 fase reversa (Shimadzu), cromatógrafo a líquido de alta eficiência, marca Shimadzu com injetor automático (20 $\mu$ L) e software Class-VP potenciô-

metro, marca Corning, modelo pH meter 430, sistema Milli-Q (Millipore Corporation), sistema de filtração a vácuo e para o laboratório II: agitador magnético, balança analítica mettler H20T, coluna C-18 (12,5 cm) fase reversa (Merck), cromatógrafo a líquido de alta eficiência (*Thermo Separation*) alça dosadora de 20 $\mu$ L com integrador (*Thermo Separation*) acoplado, potenciômetro Meter E520-Metrohm Hersau, sistema Milli-Q, sistema de filtração a vácuo.

Foi utilizada a metodologia de análise de CLAE pelo método isocrático com coluna de fase reversa  $C_{18}$ , fase móvel o sistema tampão acetato de amônio e metanol (440:60), fluxo de 1mL/min e detector UV num comprimento de onda de 270nm e volume de injeção 20 $\mu$ L (Morris & Selinger, 1994, Hsyu & Lloyd 1994, Zhoy & Sommadossi, 1997, Cavalcanti, 1999). O protocolo de validação foi elaborado contemplando parâmetros de robustez, linearidade e faixa de variação e precisão. As amostras referentes a matéria-prima foram analisadas em triplicata para os parâmetros acima citados (ICH, 1995; USP 28, 2005).

### a) Robustez

A determinação da robustez do método foi realizada contemplando variações na composição e pH da fase móvel, fluxo e temperatura (Resolução 899, 2003).

### b) Linearidade e Faixa de Variação

A faixa de variação estudada definiu o limite de 50 a 150%.

O ensaio de linearidade foi realizado com a análise de regressão linear da média de três curvas com o intervalo de 20 a 60 $\mu$ g/mL. As soluções padrões de concentrações: 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu$ g/mL, foram obtidas a partir de diluições de uma solução-mãe de 1mg/mL. As curvas foram realizadas no mesmo dia a partir de diluições autênticas da solução acima descrita.

### c) Precisão

O ensaio de precisão foi avaliado em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade foi determinada pela análise consecutiva de seis amostras individuais de concentração de 40 $\mu$ g/mL, referente a 100% da concentração teste e ponto médio do intervalo estudado para a linearidade (20 a 60 $\mu$ g/mL). A precisão intermediária corresponde a variações dentro do laboratório tais como: dias diferentes e analistas diferentes e foi determinada a partir da concentração de 40 $\mu$ g/mL por dois analistas, em dois dias diferentes. A reprodutibilidade foi realizada por comparação dos resultados entre laboratórios na mesma concentração dos níveis acima citados (Swartz & Krull, 1998, Resolução 899, 2003). A cooperação entre laboratórios foi realizada entre o LAFEPE (Laboratório I) e o Núcleo de Controle de Medicamentos e Correlatos-NCQMC (Laboratório II).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### a) Robustez

Os resultados da análise do ensaio de robustez estão descritos na **Tabela I**, onde os parâmetros de análise foram escolhidos em função da sensibilidade do método e custo de análise (menor tempo de retenção), sendo o primeiro determinante sobre o segundo.

No intervalo de pH de 5 a 6, a sensibilidade do

TABELA I

Resultados do ensaio de robustez do método de análise da Lamivudina em área média, tempo de retenção e seus respectivos coeficientes de variação (CV%)

Parâmetros	Área	Tempo de Retenção
pH		
5,0±0,1	3211663±0,70	3,90±0,33
5,5±0,1	3242173±0,82	5,10±0,15
6,0±0,1	3200844±0,48	6,30±0,34
Composição da fase móvel		
Tampão: Metanol 480:20	3156344±0,29	3,77±0,80
Tampão: Metanol 440:60	3242173±0,82	5,10±0,31
Tampão: Metanol 400:100	3136457±0,16	3,29±0,42
Fluxo (mL/min)		
0,90	3535164±0,88	5,88±0,65
0,95	3251131±0,46	5,57±0,62
1,00	3242173±0,82	5,10±0,37
1,05	3005926±0,35	5,03±0,25
Temperatura		
35°C	3242173±0,42	5,10±0,37
38°C	3198393±0,48	4,72±0,72

TABELA II

Concentrações e áreas correspondentes a linearidade do método de análise da Lamivudina

Concentrações (µg/mL)	Áreas (Repetições)					
	1	2	3	X	s	CV (%)
20	988344	982904	994007	988418,33	5551,87	0,56
30	1534096	1535588	1535730	1535138	5830,04	0,38
40	1987149	2000114	1992389	1993217,3	1646,95	0,33
50	2505601	2519531	2525634	2516922	10268,18	0,41
60	3083689	3062750	3103932	3083457	20591,98	0,67

TABELA III

Resultados do ensaio de precisão do método de análise referente a matéria-prima Lamivudina expressos em concentração média(µg/mL) e coeficiente de variação(%)

Parâmetros	Matéria-Prima			
Repe.	48,79µg/mL ±0,38			
P.I.	Dia-1		Dia-2	
Analista A	40,05 ± 1,21		40,72 ± 1,23	
Analista B	40,78 ± 1,35		41,11 ± 0,98	
Repro.	Lab-1		Lab-2	
	Dia-1	Dia-2	Dia-3	Dia-4
Analista A	40,05 ± 1,21	40,72 ± 1,23	41,73 ± 1,13	41,08 ± 1,07
Analista B	40,78 ± 1,35	41,11 ± 0,98	41,11 ± 1,23	41,14 ± 1,17

Repe.- Repetitividade; P.I. - Precisão Intermediária; Repro - Reprodutibilidade

método não foi alterada, pois verificou-se através do teste t-Student que não havia diferença significativa com 95% de confiança, entre as médias das áreas correspondentes aos respectivos valores de pH, no entanto ocorreu mudança no tempo de retenção.

Dentro da variação da composição de fase móvel estudada não há diferença significativa entre a média das áreas ao aplicar o teste acima referido, contudo a proporção 440:60 (tampão/metanol) apresenta tempo de retenção intermediário e pico melhor definido.

Os parâmetros fluxo e temperatura estão relacio-

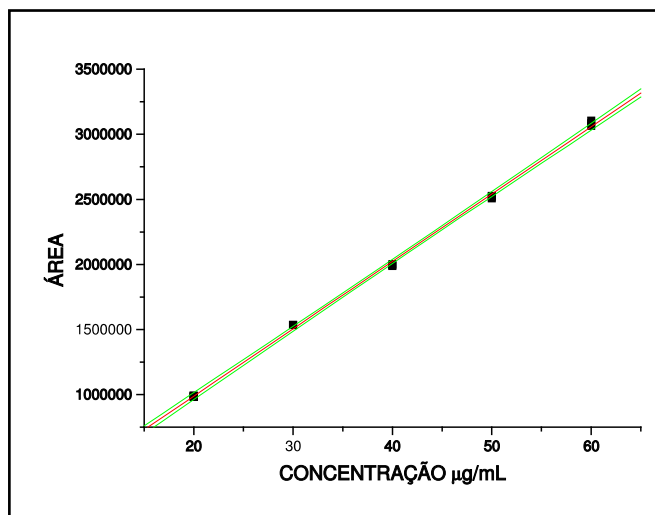


FIG. 1 - Curva-Padrão média da Lamivudina.

nados com a calibração do equipamento, uma vez que, são programados pelo mesmo, contudo não houve diferença significativa entre as médias estudadas quando aplicou-se o test t de Student.

O método manteve-se robusto isento de diferença significativa entre a média das áreas para as alterações estudadas.

#### b) Linearidade

Foi observada a relação entre as áreas e suas respectivas concentrações, os resultados da média das áreas (X), desvio(s)-padrão e coeficiente de variação (CV%) estão descritos na Tabela II.

A linearidade do método em estudo foi avaliada a partir da regressão linear dos pontos de três curvas pelo método dos mínimos quadrados ordinários e plotados no gráfico concentração versus área (Figura 1).

A reta de regressão explica 99,87% da variação dos dados, quando a porcentagem de variância máxima explicável é 99,98%. O coeficiente de correlação  $R=0,9994$  indica que o método é linear dentro dos limites de concentrações estudados.

A equação da reta de regressão pode ser descrita como  $Y = -45314 \pm (21601) + 51719 \pm (509)X$  ( $Y = A \pm Sa_0 + B \pm Sb_0$ ), onde  $Sa_0$  e  $Sb_0$  são os respectivos valores da estimativa dos desvios padrões dos coeficientes da reta. O teste t-Student verifica-se que o termo de "A" não é estatisticamente diferente de zero (com limite de confiança de 95%).

#### c) Precisão

Os resultados dos três níveis do ensaio de precisão da metodologia analítica para matéria-prima está na Tabela III.

A repetitividade avaliada para a matéria-prima, ensaio que determina a variação dos resultados das análises individuais, através de diversas aplicações de uma amostra homogênea nas mesmas condições de teste em pequeno intervalo de tempo (Swartz & Krull, 1998), foi expressa em termos de coeficiente de variação (%) em torno da média de seis amostras autênticas.

As determinações do estudo de precisão intermediária e reprodutibilidade mostrados na Tabela III, apresentaram coeficiente de variação em torno de 1%. O tratamento estatístico de análise de variância ao nível

de significância de 1%, demonstrou  $F_{\text{calculado}}$  no valor de 3,85. O valor de  $F_{\text{tabelado}}$  em 4,02 no intervalo de confiança de 99% demonstrou que as médias estudadas são significativamente iguais.

## CONCLUSÕES

A metodologia analítica desenvolvida e validada para a quantificação de matéria-prima Lamivudina, demonstrou atender às exigências especificadas pela *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceutical for Human Use – ICH* preconizadas nas recomendações da ANVISA; para a robustez, linearidade e faixa de variação, precisão, exatidão e especificidade.

## REFERÊNCIAS

1. Ayward, G. *et al.* Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 2000(744):227-40.
2. Campos, R. Brasil é modelo no combate à AIDS. *Revista Indústria Farmacêutica*. 2004(04): 08-13.
3. Cavalcanti, R. M. Estudos de Bioequivalência de comprimidos de Lamivudina. 1999, 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco.
4. Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.2000.
5. Granjeiro Júnior, S. Desenvolvimento Farmacotécnico, Validação da Metodologia, Estudo de Estabilidade e Equivalência Farmacêutica da Nevirapina. 2001, 100f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco.
6. Hsyu, P.H., Lloyd, Y.L. Automated high-performance liquid chromatographic analysis of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (Lamivudina) in plasma, saliva and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatography. Biomed. Sci. Appl.* 1998 (25): 378-94.
7. Hurwitz, S. J.; Schinazi, R. F. Development of a pharmacodynamic model for HIV treatment with nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitors. *Antiviral Research*, v. 2002 (56):115-27.
8. ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A. 'Text on Validation of Analytical Procedures'. March 1995, Geneva.
9. LAFEPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco. *Manual de Terapêutico 2000*, Recife: LAFEPE, 2000. p.224.
10. Leite, F., *Validação em Análise Química*. 3 ed. São Paulo: Átomo, 1998, p.24 e 224.
11. Martindale, *Guia Completa de Consulta Farmacoterapêutica*, 1 ed, Pharma Editores, 2005. p.841.
12. Merck Index: *Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals*, 12 ed New Jersey: Merck, 1995, p.914.
13. Merck Sharp & Dohme. HIV e AIDS: Fatos clínicos e epidemiologia. Capturado em 15 jul.2004, Online. Disponível em: <http://www.msd-brazil.com/content/patients/suasaude/aids/informacao/doenca/aids11.html>.
14. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST-AIDS. Brasília, 2004, BRASIL.
15. Morris, D. M., Selinger, K. Determination of 2'-deoxy-3'-thiacytidine(3TC) in human urine by liquid chromatography: direct injection with column switching. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, 1994 (12):255-64.
16. Swartz, M. R.; Krull, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*. 1998(2):12-20.
17. The United States Pharmacopeia. 23. ed. Rockville: The United Pharmacopeial Convention, 1995. p. 2569.
18. The United States Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: The United Pharmacopeial Convention, 2000. p.2149
19. The United States Pharmacopeia. 28. ed. Rockville: The United Pharmacopeial Convention, 2005. p.1106
20. Toledo, L. Histórico da AIDS. Capturado em 10 out. 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.gapasjc.org.br/didatica/aids/tratamento.htm>.
21. RDC nº 210 Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. DOU, 04 de agosto de 2003 Brasil, Ministério da Saúde.
22. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (DOU 02/06/2003) – Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil.
23. Zhoy, X. J., Sommadossi, J.P. Rapid quantitative of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatography. Biomed. Sci. Appl.* 1997.(11):417-24.