

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LAMIVUDINA, ZIDOVUDINA E NEVIRAPINA EM COMPRIMIDOS DOSE-FIXA COMBINADA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Zênia Maria Maciel Lavra e Pedro José Rolim Neto*

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521 Recife – PE, Brasil

Rosali Maria Ferreira da Silva e Flávia Patrícia Moraes de Medeiros

Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, Largo de Dois Irmãos, 1117, 52171-010 Recife – PE, Brasil

Recebido em 8/12/06; aceito em 11/10/07; publicado na web em 9/4/08

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FIXED-DOSE COMBINATION TABLETS OF LAMIVUDINE, ZIDOVUDINE AND NEVIRAPINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. An analytical method has been developed and validated for the quantitation of lamivudine, zidovudine and nevirapine in the fixed-dose combination film-coated tablet by high performance liquid chromatography, in accordance with RE No. 899/2003, National Sanitary Surveillance Agency. It was based on an isocratic elution system with a potassium phosphate buffer pH 3.0: acetonitrile (60:40 v/v) mobile phase, C18, 250 x 46 mm column, 10µm particle size, λ 270 nm. The statistically evaluated results have shown that the method is specific, precise, accurate, and robust, ensuring the analytical safety of 3TC, AZT and NVP determination, which emerges as a new therapeutic alternative for antiretroviral treatment.

Keywords: fixed-dose combination; validation; HPLC.

INTRODUÇÃO

A introdução da terapia combinada tem reduzido a morbidade e mortalidade de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Fármacos de várias classes farmacológicas e com mecanismos de ação em diferentes etapas da replicação viral têm sido associados na forma de dose-fixa-combinada (DFC). Um dos mais potentes regimes terapêuticos inclui dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), a lamivudina (3TC) e a zidovudina (AZT) e um não análogo (ITRNN), a nevirapina (NVP).¹

A produção de comprimidos revestidos DFC, como nova alternativa terapêutica, exige o desenvolvimento e a validação de um método analítico que atenda às especificações dos órgãos reguladores, haja vista a ausência de métodos publicados em compêndios oficiais para quantificação destes fármacos associados.

A validação de um método assegura a especificidade, exatidão e precisão de um ensaio analítico e estima a estabilidade do analito durante a estocagem e manipulação,² tendo como objetivo garantir que o procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado.³

Técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), destacam-se na química analítica pela capacidade de realizar análises quali-quantitativas em amostras farmacêuticas,⁴ sendo freqüentemente utilizadas para determinação de fármacos em formulações farmacêuticas, especialmente nas que contêm mais de um constituinte ativo.¹

Métodos publicados em artigos científicos e compêndios oficiais foram tomados como referência no desenvolvimento deste aqui descrito. Keneey *et al.*⁵ publicaram um método cromatográfico para quantificação de AZT + 3TC em plasma humano, tendo como

fase estacionária uma coluna C₁₈ e como eluente uma mistura de água e acetonitrila. Rodriguez *et al.*,⁶ também utilizaram uma coluna C₁₈ e como eluente, acetonitrila e metanol. Doerge *et al.*,⁷ por sua vez, variaram apenas a fase móvel para acetonitrila e ácido fosfórico, sendo considerado, portanto que estes dois últimos métodos apresentaram maior custo que o descrito por Kenney.⁵ Pesquisas na literatura revelaram a determinação individual da nevirapina em fluidos biológicos por cromatografia gasosa, CLAE associada a detector ultravioleta, CLAE com extração de fase sólida ou associada à espectrofotometria de massa. Mahadik *et al.*,⁸ publicaram um método por HTPLC (cromatografia em camada delgada de alta performance) no qual foi utilizado um sistema solvente constituído por tolueno, tetracloreto de carbono, metanol, acetona e amônia. Este mesmo fármaco também tem sua análise isolada publicada na Farmacopéia Brasileira, utilizando uma fase móvel constituída de tampão fosfato e acetonitrila, apresentando assim um método mais simples e de custo mais acessível.

Este estudo descreve o desenvolvimento e a validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para detecção e quantificação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos revestidos DFC, atendendo às exigências do guia para validação de métodos analíticos publicado na Resolução RE nº 899/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.⁹

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Medicamento

Comprimidos revestidos desenvolvidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE, contendo 150 mg de lamivudina, 300 mg de zidovudina e 200 mg de nevirapina.

*e-mail: pedro.rolim@pesquisador.cnpq.br

Padrões de trabalho

Para o desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento do comprimido revestido foram utilizados padrões de trabalho de lamivudina (Northeast® lote 00019 – teor 100,47%), zidovudina (Ítaca® lote HVZ0210304 – teor 100,0%) e nevirapina (Xiamem Mchem® lote 050501 – teor 98,32%).

Excipientes

Celulose microcristalina 101 (Valdequímica®), amido de milho (Cargill®), glicolato de amido sódico (Blanver®), dióxido de silício coloidal (Degussa®), polivinilpirrolidona (Forlab®), estearato de magnésio (Labsynth®) e constituintes do revestimento: polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), talco e dióxido de titânio (Colorcon®).

Reagentes

Acetonitrila (J. T. Baker®), fosfato de potássio monobásico (Nuclear®), ácido fosfórico 85% (Merck®) e água ultra-pura obtida por sistema Milli-q-Plus (Millipore Corporation®).

Equipamentos e condições cromatográficas

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® equipado com bomba binária LC – 10 ADVP, auto-injetor SIL – 10 ADVP, detector UV SPD – 10 AVP, controlador de sistema SCL – 10 AVP e forno para coluna CTO – 10 ASVP. As colunas utilizadas neste estudo foram: coluna C₈ (Waters®), 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm e C₁₈ (Phenomenex®), 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm, mantidas a 30 °C. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila grau HPLC.

Foram utilizadas vidrarias (Pyrex®) certificadas por lote e equipamentos previamente qualificados e certificados: sistema de purificação de água Milli-q-Plus (Millipore Corporation®), aparelho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique®), balança analítica (Mettler®), unidades filtrantes de 0,45 µm (Millex Millipore®), papel de filtro faixa preta (Schleicher & Scheuell®) e espectrofotômetro UV (Cary 50 Varian®).

Método

Desenvolvimento do método analítico

Tendo em vista que os três fármacos isolados já apresentam monografias descritas na Farmacopéia Brasileira,¹⁰ foram quantificados por seus métodos cromatográficos específicos nos comprimentos de onda de 254 nm para AZT, 277 nm para 3TC e 237 nm para NVP. O desenvolvimento do método teve início com a realização de uma varredura espectrofotométrica na região do UV visível, numa faixa de 200 a 800 nm, do padrão misto contendo os três fármacos, objetivando-se identificar em qual comprimento de onda os três fármacos associados apresentavam valores de absorvâncias máximos.

Após realização de pesquisas referente a métodos de análises para quantificação de antiretrovirais, já descritos em farmacopéias^{10,11} e em artigos científicos publicados,^{2,5-8} foram testadas variações, avaliando-se os seguintes parâmetros: fase estacionária (C₈ e C₁₈); fase móvel, modificando-se as proporções do tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,0 (K₂HPO₄) e acetonitrila (ACN); vazão (1,0 e 1,5 mL/min) e volume de injeção (10,0 e 20,0 µL).

A partir dos cromatogramas obtidos, avaliou-se a adequação do sistema cromatográfico através dos parâmetros: fator de capacidade, número de pratos, fator de assimetria e resolução entre os picos.

Preparação da solução tampão fosfato 0,05 M pH 3,0

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se 7,09 g de fosfato de potássio monobásico em água ultrapura em 1000 mL. O ajuste do pH foi realizado com ácido fosfórico 85%.

Preparação das amostras

Os comprimidos revestidos DFC foram pesados, triturados e pulverizados. O equivalente a 37,5 mg de 3TC, 75 mg de AZT e 50 mg de NVP foi pesado analiticamente, transferido para balão volumétrico de 100 mL, diluído em fase móvel e sonificado por 20 minutos. As amostras foram aferidas e filtradas em papel de filtro faixa-preta. Do filtrado, retirou-se alíquota volumétrica e diluiu-se com fase móvel até obtenção da concentração final de 45, 90 e 60 µg/mL de 3TC, AZT e NVP, respectivamente. As soluções obtidas foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45 µm e analisadas por CLAE. Foram preparadas amostras em quintuplicatas.

Preparação da curva controle

As curvas controle foram preparadas diariamente a partir de diluições de uma solução estoque do padrão misto em fase móvel (375 µg/mL de 3TC, 750 µg/mL de AZT e 500 µg/mL de NVP), obtendo-se concentrações de 30, 45 e 75 µg/mL para 3TC, 60, 90 e 150 µg/mL para AZT e 40, 60 e 100 µg/mL para NVP, referentes às concentrações mínima, média e máxima.

Validação do método analítico

Condições cromatográficas

O método de separação cromatográfica desenvolvido capaz de quantificar os três fármacos presentes nos comprimidos revestidos foi alcançado com sistema de eluição isocrático, em coluna de fase reversa C₁₈, 250 x 4,6 mm, partícula 10 µm, a temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída de 60% de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 3,0 e 40% de acetonitrila, com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O comprimento de onda selecionado foi 270 nm.

Parâmetros avaliados

O método proposto foi validado seguindo os parâmetros de linearidade, robustez, faixa de variação, precisão, exatidão, especificidade e limites de detecção e quantificação de cada princípio ativo, especificados na Resolução RE n° 899/2003.⁹

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas do padrão misto nas concentrações de 30; 37,5; 45; 60 e 75 µg/mL para 3TC; 60; 75; 90; 120 e 150 µg/mL para AZT e 40; 50; 60; 80 e 100 µg/mL para NVP. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, por cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O intervalo de variação testado foi entre 66 e 166% da concentração média dos três fármacos.

No parâmetro robustez foi analisada a possível influência de pequenas variações ocasionadas pela alteração na proporção da composição da fase móvel, na vazão, na temperatura do forno, no tempo de sonicação para preparação das amostras e em diferentes lotes da coluna utilizada como fase estacionária. Na variação da proporção da fase móvel, foram realizadas análises com tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,0:acetonitrila nas proporções de 62:38 (v/v); 60:40 (v/v); e 58:42 (v/v). Em relação à vazão, a variação analisada foi de 0,99; 1,00 e 1,01 mL/min. A variação do tempo de sonicação para preparação das amostras foi de 15, 20 e 25 min. Para a temperatura do forno, foram avaliadas as variações de 28, 30 e 32 °C.

A especificidade e seletividade do método foi determinada pela

análise do placebo dos comprimidos revestidos contendo amido, celulose microcristalina 101, polivinilpirrolidona, glicolato de amido sódico, dióxido de silício coloidal e estearato de magnésio, componentes do núcleo, PEG, álcool polivinílico, talco e dióxido de titânio, componentes do revestimento.

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). Para a repetitividade, replicatas de 6 determinações a 100% da concentração teste dos fármacos associados foram analisadas. Já para precisão intermediária, 5 replicatas foram analisadas em dias diferentes e por analistas diferentes.

Para avaliar a exatidão do método, amostras em concentrações conhecidas equivalentes a 66, 100 e 166% da concentração teórica analisada para cada fármaco foram testadas, as quais correspondem às concentrações mínima, média e máxima, respectivamente.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $LD = DP \times 3/IC$ e $LQ = DP \times 10/IC$, onde DP é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtido com as três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas, segundo a RE 899/2003 (ANVISA).⁹

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método analítico

As condições para o método cromatográfico foram primeiramente estabelecidas com o padrão misto de 3TC, AZT e NVP e, após otimização dos parâmetros, foram aplicadas para o doseamento do comprimido revestido DFC.

A varredura espectrofotométrica (Figura 1) realizada para verificação do comprimento de onda adequado demonstrou que a associação de fármacos apresentava absorvância adequada em 270 nm, sendo confirmado por análise cromatográfica em detector de varredura por fotiodo e pela quantificação comparativa dos fármacos isolados nos métodos farmacopêicos.

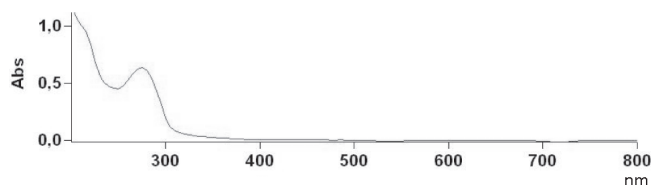


Figura 1. Varredura espectrofotométrica no UV-visível do padrão misto contendo 3TC, AZT e NVP

Por apresentar os três picos simétricos, com boa resolução entre eles e áreas bem definidas, a fase estacionária escolhida para o doseamento foi a coluna C₁₈ (Phenomenex®).

Sob as condições experimentais verificadas (Tabela 1) o método 2 foi o escolhido por apresentar melhor resolução entre os picos, condições ideais para conservação da coluna e tempos de retenção de 2,4 min para 3TC; 3,4 min para AZT e 4,8 min para NVP, adequado a rotina de análise para aprovação ou liberação do produto na indústria farmacêutica. A temperatura selecionada foi de 30 °C por ser percebida durante as análises como a que apresenta maior facilidade de estabilização para o forno do cromatógrafo. O volume de injeção e a vazão selecionados foram 20 µL e 1,0 mL/min, respectivamente. O cromatograma é apresentado na Figura 2.

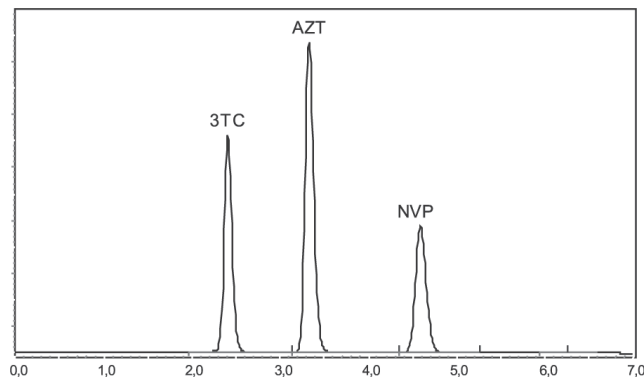


Figura 2. Cromatograma referente ao método analítico para quantificação de lamivudina (45 µg/mL), zidovudina (90 µg/mL) e nevirapina (60 µg/mL) em comprimido revestido dose-fixa-combinada, utilizando coluna C₁₈, fase móvel tampão fosfato pH 3,0: acetonitrila (60:40), fluxo 1,0 mL/min e volume de injeção 20 µL

A performance do sistema cromatográfico escolhido foi avaliada de acordo com os parâmetros: fator de capacidade, resolução entre os picos, fator de assimetria e número de pratos. A resolução entre os picos mede a qualidade da separação entre eles: quanto mais distantes, melhor a separação e mais segura é a quantificação. Os valores da resolução entre os picos 3TC e AZT foi de 5,46 e entre AZT e NVP 6,70 sendo superiores a 2,00, indicando separação eficaz entre os mesmos. O fator de assimetria obtido foi de 1,30 para 3TC; 1,24 para AZT e 1,19 para NVP, apresentando, portanto, valores inferiores a 1,5, descrito na literatura como aceitável para amostras de interesse.¹² O número de pratos diz respeito à eficiência da coluna, devendo ser superior a 2000.^{4,13} Neste método, os resultados foram 3330,56; 4927,21; 5828,60 para 3TC, AZT e NVP, respectivamente.

Tabela 1. Resultados dos testes realizados durante o desenvolvimento do método analítico proposto para quantificação de 3TC, AZT e NVP

Parâmetros	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
Fase móvel	60:40	60:40	25:75	75:25	60:40	60:40
Fase estacionária	C8	C18	C18	C18	C18	C18
Fluxo (mL/min)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5
Tempo de retenção (min)						
3TC	2,4	2,4	2,4	2,8	2,3	1,6
AZT	3,4	3,4	2,7	5,0	2,9	1,9
NVP	4,6	4,8	3,1	10,1	3,4	2,3
Volume de injeção (µL)	20	20	20	20	10	20
Resultado	Picos com assimetria caudal	Boa resolução entre os pico e áreas reprodutíveis	Não houve separação dos picos	Tempo de retenção alto para rotina de análise	Áreas não reprodutíveis	Picos muito próximos

Validação do método analítico

Os resultados obtidos da avaliação dos parâmetros foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* e teste *t* de Student,¹³ com nível de significância de 95%.

Robustez

Um método robusto tem a habilidade de fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças.¹⁴ Para todas as modificações analisadas na robustez, proporção da fase móvel, variação da vazão, tempo de sonicação da amostra, variação da temperatura do forno e número de lote da fabricação da coluna, os resultados obtidos apresentaram desvio padrão relativo inferior a 2,0%, a partir de amostras analisadas em quintuplicata. Pela análise estatística dos resultados, foi verificado que os valores obtidos para os *F* calculados foram inferiores ao *F* tabelado, determinando com 95% de confiança que o método é robusto para estas variáveis testadas (Tabela 2).

Linearidade e intervalo de variação

A linearidade de um método demonstra que os resultados obti-

dos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo especificado.⁹ As áreas obtidas no intervalo de variação analisado demonstraram que não há falta de ajuste no modelo proposto, visto que os resíduos não apresentaram anormalidade na sua distribuição, considerando os três parâmetros em estudo. Os coeficientes de determinação obtidos para 3TC, AZT e NVP (Tabela 3), respectivamente, sugerem que 99,68; 99,78 e 99,78% da variação total em torno das médias são explicadas pela regressão, restando 0,32; 0,22 e 0,22% explicados pelos resíduos. Portanto, o método é linear nas concentrações propostas.

Precisão e exatidão

O método apresentou-se preciso nos dois níveis analisados. Na repetitividade, as seis amostras autênticas com concentração de 100% (Tabela 4), apresentaram desvio padrão relativo (RSD) para 3TC, AZT e NVP inferiores a 2%. Para a precisão intermediária (Tabela 5), os resultados entre dias e analistas diferentes não evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre analistas e dias, empregando-se o teste *t* de Student. Como resultados para o *t* calculado, têm-se no 1º dia e para analistas diferentes 0,911; 1,697 e 1,277; já no 2º dia, os valores foram de 0,040; 0,437 e 1,373 para

Tabela 2. Análise estatística das variações testadas para verificação da robustez do método analítico validado para doseamento simultâneo de 3TC, AZT e NVP

Análise estatística	lamivudina (45 µg/mL)			zidovudina (90 µg/mL)			nevirapina (150 µg/mL)		
	Proporção de fase móvel (%)								
	58:42	60:40	62:38	58:42	60:40	62:38	58:42	60:40	62:38
Média	46,83	46,59	46,74	93,17	93,13	93,14	63,48	62,66	63,29
RSD (%)	1,56	1,29	1,59	0,50	1,24	0,44	1,62	0,94	1,01
F cal		0,137			0,003			1,503	
F tab					3,885				
	Fluxo de fase móvel (mL/min)								
	0,99	1,00	1,01	0,99	1,00	1,01	0,99	1,00	1,01
Média	44,77	44,04	44,18	89,50	89,30	88,41	59,72	58,97	59,10
RSD (%)	1,69	0,56	0,73	1,11	0,49	1,00	0,52	1,10	1,49
F cal		3,041			3,347			1,837	
F tab					3,885				
	Temperatura do forno da coluna (°C)								
	28	30	32	28	30	32	28	30	32
Média	45,04	44,53	44,97	90,48	90,21	90,83	61,09	60,66	61,18
RSD (%)	1,10	0,85	1,61	0,61	0,62	0,64	1,10	0,47	0,90
F cal		1,229			1,554			1,388	
F tab					3,885				
	Tempo de sonicação da amostra (min)								
	15	20	25	15	20	25	15	20	25
Média	44,25	44,04	44,20	89,24	87,83	88,20	59,46	59,02	59,39
RSD (%)	1,19	0,56	1,08	1,13	1,28	1,17	0,84	1,01	0,85
F cal		0,312			2,321			0,978	
F tab					3,885				
	Diferentes lotes da coluna cromatográfica								
	2289547	160140	3307383	2289547	160140	3307383	2289547	160140	3307383
Média	44,02	44,36	44,29	89,23	89,52	88,81	60,25	59,97	60,06
RSD (%)	1,48	1,55	0,74	0,85	0,82	0,70	1,10	1,01	0,84
F cal		0,461			2,818			0,284	
F tab					3,885				

Tabela 3. Resultados da linearidade obtidos a partir de três curvas autênticas dos fármacos associados (lamivudina, zidovudina e nevirapina) nas condições do método validado

	lamivudina	zidovudina	nevirapina
IC (\pm DP)	52812,31 (\pm 2205,36)	42449,57 (\pm 1470,17)	32655,38 (\pm 1117,99)
Coefficiente linear (\pm DP)	119560,00 (\pm 114832,30)	164932,90 (\pm 153102,60)	47994,81 (\pm 77617,68)
R ²	0,9968	0,9978	0,9978
Intervalo	30 – 75 $\mu\text{g/mL}$	60 – 150 $\mu\text{g/mL}$	40 – 100 $\mu\text{g/mL}$
LD	1,11 $\mu\text{g/mL}$	1,54 $\mu\text{g/mL}$	2,00 $\mu\text{g/mL}$
LQ	1,69 $\mu\text{g/mL}$	2,33 $\mu\text{g/mL}$	3,03 $\mu\text{g/mL}$
F calculado	3,705	4,277	2,919
F tabelado	5,218	5,218	5,128

Tabela 4. Resultados analíticos da repetitividade (precisão intradia) do método validado

	Concentração						Média	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
3TC	44,79	44,81	43,95	43,36	44,28	44,79	44,33	1,33
AZT	90,18	90,02	89,68	89,07	90,00	91,15	90,02	0,76
NVP	61,44	60,48	60,30	60,73	60,75	61,04	60,79	0,67

3TC, AZT e NVP, respectivamente. Todos os resultados se mostraram inferiores ao *t* tabelado de 2,306; confirmando com 95% de confiança que o método é preciso, por não apresentar diferenças estatisticamente significativas entre analistas e entre dias.

Na exatidão, os resultados para o *t* calculado referente à concentração mínima considerada de 66% para a concentração média de 100%, e para a concentração máxima referente a 166% estão descritos na Tabela 6. Estes resultados quando comparados com o *t* tabelado de 2,776 com 95% de confiança se apresentaram inferiores, demonstrando que o método desenvolvido é exato, já que não

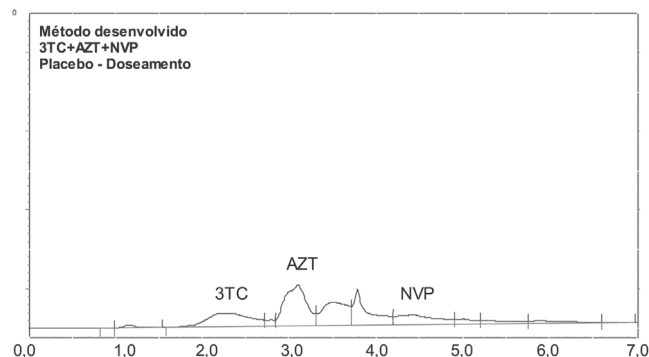
Tabela 6. Resultados do tratamento estatístico por teste *t de Student* para verificação da exatidão do método

Concentração	t calculado	t tabelado	
66%	3TC	0,449	
	AZT	0,175	
	NVP	0,815	
100%	3TC	0,908	
	AZT	0,850	2,776
	NVP	1,771	
166%	3TC	1,353	
	AZT	1,554	
	NVP	2,115	

foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos e os esperados.

Especificidade

O método proposto demonstrou ser seletivo e específico, não sendo afetado pelos excipientes utilizados no processo de fabricação do comprimido revestido, o que pôde ser confirmado pela ausência de absorvâncias nos tempos de retenção dos picos referentes aos três fármacos (Figura 3).

**Figura 3.** Cromatograma da especificidade do método com comprimido revestido placebo**Tabela 5.** Resultados do tratamento estatístico por teste *t de Student* para verificação da precisão do método validado entre analistas e dias diferentes

	3TC	Dia I		3TC	Dia II		t calculado	Analista I – Dia I e II		
		AZT	NVP		AZT	NVP		3TC	AZT	NVP
Média	44,07	90,21	60,58	44,29	90,13	60,41	0,799	0,169	0,431	
RSD %	1,18	0,62	0,93	0,74	1,00	1,12	t tabelado	2,306		
Analista II										
Média	40,30	90,84	61,09	40,28	90,35	60,86	t calculado	0,088	1,199	0,688
RSD %	0,49	0,68	1,13	1,03	0,75	0,46	t tabelado	2,306		
Analistas I e II										
t calculado	0,911	1,697	1,277	0,040	0,437	1,373				
t tabelado	2,306									

CONCLUSÃO

O método descrito neste trabalho foi desenvolvido a fim de se disponibilizar um procedimento analítico para quantificação desta associação de fármacos antiretrovirais em comprimidos revestidos dose-fixa-combinada, haja vista a inexistência de métodos oficiais destinados a este doseamento. É um método simples, apresentando confiabilidade e segurança necessárias em procedimentos analíticos. Os parâmetros verificados garantiram que ele é robusto, exato, preciso e específico para a quantificação da forma farmacêutica contendo a associação de lamivudina, zidovudina e nevirapina, apresentando-se, portanto, validado conforme a RE 899/2003 (ANVISA) e sendo recomendado para a rotina de análises de controle de qualidade na indústria farmacêutica, atendendo às Boas Práticas de Laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Panchagnula, R.; Khandavilli, S.; Kapoor, N.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 41.
2. Tidwell, R. R.; Pereira, A. S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *764*, 327.
3. Matioli, G.; Sommer, W. A.; Valentini, S. R.; *Acta Scientiarum. Health Sci.* **2004**, *16*, 357.
4. Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Bottoli, C. B. G.; Ribani, M.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
5. Kenney, K. B.; Wring, S. A.; Carr, R. M.; Wells, G. N.; Dunn, J. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 967.
6. Rodriguez, J. F.; Rodriguez, J. L.; Santana, J.; Garcia, H.; Rosário, O.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3097.
7. Doerge, D. R.; Beland, F. A.; von Tungeln, L. S.; Williams, L. D.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *798*, 55.
8. Mahadik, K. R.; Paradkar, A. R.; Agrawal, H.; Kaul, M.; *Talanta* **2004**, *62*, 843.
9. Brasil. Resolução RE nº899 de 29/5/2003; *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
10. *Farmacopéia Brasileira*, IV ed., Atheneu: São Paulo, 2003.
11. *United States Pharmacopoeia*, 29th ed., United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2006.
12. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1997.
13. Kedor-Hackmann, E. R. M.; Prado, M. S. A.; Steppe, M.; Santoro, M. I. R. M.; *Rev. Bras. de Farmácia* **2002**, *83*, 69.
14. Cass, Q. B.; Degani, A. L.; *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*, UFSCAR: São Carlos, 2001.