



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

AMANDA QUEIROZ SOARES

**Desenvolvimento e validação de metodologia por HPLC-PDA para
monitoração terapêutica dos níveis plasmáticos de zidovudina e
efavirenz**

**Goiânia
2009**

AMANDA QUEIROZ SOARES

**Desenvolvimento e validação de metodologia por HPLC-PDA para
monitoração terapêutica dos níveis plasmáticos de zidovudina e
efavirenz**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Kênnia Rocha Rezende

**Goiânia
2009**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Amanda Queiroz Soares

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Co-Orientadora: Profª Drª Kênnia Rocha Rezende

Membros:

1. Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

2. Profª Drª Clévia Ferreira Duarte Garrote

3. Profª Drª Maria Teresa Freitas Bara

Suplentes:

4. Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa

5. Prof. Dr. Ricardo Menegatti

Data: 01/10/2009

Dedico este trabalho à minha família: Mário, Ailda, Francielle, Luanna e Ana pelo companheirismo, paciência, compreensão, estímulo, amor, carinho e força para enfrentar todos os desafios da vida em busca da vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Luiz Carlos da Cunha, sinceros agradecimentos pela orientação, compreensão, disponibilidade e constante incentivo durante todas as etapas deste trabalho.

À Professora Dr^a Kênnia Rocha Rezende, pelo convívio e sugestões no transcorrer do trabalho.

Aos Professores Dr^a Rita Goreti Amaral, Dr^a Clévia Ferreira Duarte Garrote, Dr^a Maria Teresa Freitas Bara e Dr Sérgio Henrique Nascente Costa, pela atenção e presteza na revisão deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Carlos Silva Souza, infectologista do Hospital das Clínicas, pelo convívio no transcorrer do trabalho.

Às servidoras Divina e Joana do Laboratório de Análises Clínicas Rômulo Rocha da FF/UFG, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, em especial a Caroline, Leandro, Daniela, Fernando, Fernanda, Ana Flávia, Fabiana, Raphael, Ricardo e Iram pelo convívio e cooperação.

Aos meus pais Mário e Ailda, pela compreensão, apoio e estímulo durante todo este tempo.

Às minhas queridas irmãs Francielle e Luanna, pelo apoio, amizade e carinho ao longo desta jornada.

Ao Renato, que sempre me incentivou e me apoiou nos meus projetos e sonhos.

À Regiane, Camile, Renata, Ana Carolina e Panmella pela amizade sincera, apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Hospital das Clínicas e da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia pela compreensão e apoio durante todo o período de mestrado.

Às servidoras Jackeline e Vilma da Secretaria Estadual de Saúde, pela presteza e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, pela concessão de minha licença para conclusão deste estudo.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a concretização deste sonho.

E finalmente, a Deus, acima de tudo, que me proporcionou e continuará proporcionando grandes vitórias.

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|-------|
| | LISTA DE FIGURAS | ix |
| | LISTA DE TABELAS | xiii |
| | LISTA DE QUADROS | xiv |
| | LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS | xv |
| | RESUMO | xviii |
| | ABSTRACT | xix |
| 1 | INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 | A infecção pelo HIV | 01 |
| 1.2 | Os antirretrovirais | 05 |
| 1.3 | Monitoração terapêutica de fármacos | 12 |
| 1.4 | Análises Cromatográficas | 14 |
| 1.5 | Parâmetros de validação da metodologia analítica | 22 |
| 2 | OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 | Objetivo geral | 29 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 29 |
| 3 | METODOLOGIA | 30 |
| 3.1 | Materiais | 30 |
| 3.2 | Sujeitos | 32 |
| 3.3 | Coleta de dados clínicos e terapêuticos | 33 |
| 3.4 | Preparo das soluções | 33 |
| 3.5 | Obtenção, processamento e conservação das amostras | 35 |
| 3.6 | Desenvolvimento da técnica de extração | 35 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.7 | Desenvolvimento da técnica analítica | 36 |
| 3.8 | Validação da metodologia analítica | 37 |
| 4 | RESULTADOS | 39 |
| 4.1 | Desenvolvimento da técnica cromatográfica | 39 |
| 4.2 | Validação da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de zidovudina e efavirenz em plasma | 43 |
| 4.3 | Perfil clínico e quantificação dos fármacos efavirenz e zidovudina no plasma dos sujeitos em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina | 49 |
| 5 | DISCUSSÃO | 52 |
| 5.1 | Desenvolvimento da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de zidovudina e efavirenz em plasma | 52 |
| 5.2 | Validação da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de zidovudina e efavirenz em plasma | 56 |
| 5.3 | Perfil clínico e quantificação de zidovudina e efavirenz no plasma dos sujeitos | 59 |
| 6 | CONCLUSÕES | 63 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 64 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 65 |
| 9 | ANEXOS | 69 |
| 9.1 | Parecer do Comitê de Ética | 69 |
| 9.2 | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) | 70 |
| 9.3 | Cromatogramas para verificação da linearidade da técnica | 74 |
| 9.4 | Perfil sócio-econômico dos sujeitos da pesquisa | 79 |
| 9.5 | Artigo original | 81 |
| 9.6 | Normas da revista | 95 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Fórmula estrutural da zidovudina e efavirenz | 06 |
| Figura 2 | Fluxograma do desenvolvimento, validação e quantificação plasmática de zidovudina e efavirenz em amostras de sujeitos | 38 |
| Figura 3 | Espectro UV da zidovudina | 41 |
| Figura 4 | Espectro UV do efavirenz | 41 |
| Figura 5 | Cromatograma referente à análise da solução padrão dos fármacos: 1- zidovudina (3000 ng/mL); 2- MPPH (4000 ng/mL); 3- efavirenz (3000 ng/mL). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina pH 7,83; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (vermelho) e 267 nm (rosa) | 42 |
| Figura 6 | Cromatograma referente à análise de plasma branco. Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (vermelho) e 267 nm (rosa) | 44 |
| Figura 7 | Cromatograma referente à análise da amostra zero, com o padrão interno MPPH (4000 ng/mL). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (vermelho) e 267 nm (rosa) | 44 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 8 | Curva de calibração obtida para zidovudina referente ao lote 1. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 5000 ng/mL | 46 |
| Figura 9 | Curva de calibração obtida para efavirenz referente ao lote 1. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 5000 ng/mL | 46 |
| Figura 10 | Cromatograma referente à análise da amostra LIQ (50 ng/mL) de zidovudina e efavirenz. Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 47 |
| Figura 11 | Cromatograma referente à análise de amostra de plasma de sujeito em terapia antirretroviral. Concentrações determinadas: 1 - 80,83 ng/mL de zidovudina; 2 - 972,53 ng/mL efavirenz. Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 51 |
| Figura 12 | Cromatograma referente à análise de sulfametoxazol (tR = 4,08 min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 74 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 13 | Cromatograma referente à análise de omeprazol (tR = 16,16 min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 74 |
| Figura 14 | Cromatograma referente à análise de fluconazol (tR = 12,30 min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 75 |
| Figura 15 | Cromatograma referente à análise de ácido ascórbico (tR = 1,80 min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 75 |
| Figura 16 | Cromatograma referente à análise de paracetamol (tR = 4,18 min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 76 |
| Figura 17 | Cromatograma referente à análise de atenolol (tR = 9,35 min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho) | 76 |

- Figura 18 Cromatograma referente à análise de alopurinol 77
($t_R = 2,35$ e $3,11$ min). Coluna ACE 5 C18
(100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente
acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase
móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L.
Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)
- Figura 19 Cromatograma referente à análise de quinidina 77
($t_R = 17,42$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm).
Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em
água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min.
Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa)
e 267 nm (vermelho)
- Figura 20 Cromatograma referente à análise de dipirona 78
($t_R = 2,25, 2,86$ e $13,80$ min). Coluna ACE 5 C18
(100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente
acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase
móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L.
Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)
- Figura 21 Cromatograma referente à análise de diclofenaco 78
($t_R = 15,34$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm).
Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em
água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min.
Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa)
e 267 nm (vermelho)

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Parâmetros farmacocinéticos da zidovudina e efavirenz, segundo Hardman & Limbird (2003) | 08 |
| Tabela 2 | Ordem de eluição da zidovudina, 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína e efavirenz com seus respectivos tempos de retenção | 42 |
| Tabela 3 | Parâmetros de linearidade obtidos na validação da técnica desenvolvida para quantificar zidovudina e efavirenz | 45 |
| Tabela 4 | Valores de recuperação, precisão e exatidão obtidos para zidovudina e efavirenz utilizando a técnica desenvolvida em HPLC-PDA | 48 |
| Tabela 5 | Tempo de terapia antirretroviral, carga viral, contagem de linfócitos TCD4 e concentrações plasmáticas de zidovudina e efavirenz obtidos dos 12 sujeitos participantes deste estudo | 50 |
| Tabela 6 | Infecções oportunistas diagnosticadas nos sujeitos participantes deste estudo fazendo uso do protocolo terapêutico antirretroviral AZT/3TC/EFZ com acompanhamento clínico no SAE do HC/UFG | 51 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | Principais reações adversas provocadas pela zidovudina e efavirenz (BRASIL, 2007; HARDMAN & LIMBIRD, 2003) | 09 |
| Quadro 2 | Fármacos que afetam a farmacocinética da zidovudina e efavirenz (BRASIL, 2007; HARDMAN & LIMBIRD, 2003) | 10 |
| Quadro 3 | Sumário da técnica de extração em fase sólida desenvolvida para quantificação de zidovudina e efavirenz | 39 |
| Quadro 4 | Sumário da técnica analítica por HPLC-PDA desenvolvida para quantificação de zidovudina e efavirenz | 40 |

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| 3TC | Lamivudina |
| AIDS | Acquired Immunodeficiency Syndrome |
| APV | Amprenavir |
| ARV | Antirretroviral |
| AZT | Zidovudina |
| CD4 | Linfócitos T CD4 |
| CEPMHA | Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal |
| C _{max} | Concentração máxima |
| CMD | Concentração média determinada |
| CQ | Controle de qualidade |
| CQA | Controle de qualidade de alta concentração |
| CQB | Controle de qualidade de baixa concentração |
| CQM | Controle de qualidade de média concentração |
| CRF-GO | Conselho Regional de Farmácia do Estado de Goiás |
| CV | Carga viral |
| d4T | Estavudina |
| ddl | Didanosina |
| DP | Desvio-padrão |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| EFZ | Efavirenz |
| FDA | Food and Drugs Administration |
| HAART | Highly active antirretroviral therapy |
| HC/UFG | Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás |
| HIV | Human Immunodeficiency Vírus |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IDV | Indinavir |

| | |
|-------|---|
| IF | Inibidores de fusão |
| II | Inibidor da integrase |
| INGOH | Instituto Goiano de Hemoterapia |
| IP | Inibidores da protease |
| ITRN | Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos |
| ITRNN | Inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos |
| ITRNt | Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LD | Limite de detecção |
| LIQ | Limite inferior de quantificação |
| LLE | Liquid-liquid extraction |
| LPV | Lopinavir |
| MS | Detecção por espectrofotometria de massas - Mass spectra |
| MPPH | 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína |
| MTF | Monitoração terapêutica de fármacos - Therapeutic drug monitoring |
| NEPET | Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG |
| NFV | Nelfinavir |
| NVP | Nevirapina |
| ODS | Coluna cromatográfica com octadecilsilano - C18 |
| OMS | Organização Mundial de Saúde - World Health Organization |
| PA | Pró-análise |
| PDA | Photo diode array detector - detector por arranjo de diodos |
| RTV | Ritonavir |
| SAE | Serviço de atendimento especializado |
| SPE | Solid Phase Extraction |
| SQV | Saquinavir |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TARV | Terapia Antirretroviral |
| TDF | Tenofovir |

| | |
|------------|--------------------------------------|
| t_{\max} | Tempo para obter concentração máxima |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta-visível |

RESUMO

A monitoração terapêutica de fármacos é uma importante ferramenta para prever a eficácia terapêutica e a possível toxicidade dos agentes antirretrovirais utilizados no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os objetivos deste estudo foram desenvolver e validar uma técnica de análise e extração para quantificar os antirretrovirais efavirenz e zidovudina no plasma humano, conhecer o perfil clínico e quantificar os fármacos efavirenz e zidovudina no plasma dos sujeitos da pesquisa em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina. Amostras de sangue, coletadas aproximadamente 8 h após administração do AZT e 20 h do EFZ, foram obtidas de sujeitos adultos com diagnóstico HIV positivo em acompanhamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás com protocolo terapêutico EFZ 600 mg uma vez ao dia e lamivudina 150 mg + zidovudina 300 mg duas vezes ao dia. Após extração em fase sólida utilizando cartucho Strata C 18E 500mg, 3mL de capacidade, os fármacos e padrão interno (5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína – MPPH) foram separados em coluna fase reversa ACE 5, C18 100 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e dietanolamina em água (pH 7,8), vazão de 0,5 a 2,0 mL/min e detecção no comprimento de onda 249 nm (EFZ), 267 nm (AZT) e 240 nm (MPPH). A técnica apresentou linearidade no intervalo de 50 a 5000 ng/mL para ambos os compostos, com recuperação média de 84 e 92% para a AZT e EFZ, respectivamente. O limite de quantificação (50 ng/mL), precisão (coeficiente de variação < 15%) e exatidão (erros relativos < 15%) estão de acordo com exigências da ANVISA. Para avaliar a aplicabilidade da técnica, analisou-se amostras de plasma de sujeitos (n = 12), obtendo uma concentração plasmática média de 1960 ± 766 ng/mL para EFZ e 62,12 ± 16,21 ng/mL para o AZT. A técnica apresentou parâmetros analíticos adequados à sua utilização em monitoração terapêutica de pacientes em uso de AZT e EFZ.

ABSTRACT

The therapeutic drug monitoring is an important tool to predict the therapeutic efficacy and possible toxicity of antirretroviral agents used to treat infection by human immunodeficiency virus (HIV). The goals of this study was to develop and validate a method of analysis and extraction to quantify the antirretrovirals efavirenz and zidovudine in human plasma, to know the clinical profile and quantify the drugs efavirenz and zidovudine in plasma of volunteers using treatment regimen efavirenz / lamivudine / zidovudine. Blood samples were collected approximately 8 h after administration of AZT and 20 h of the EFZ, were obtained from adult volunteers HIV positive in clinic monitoring at Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás and therapeutic protocol EFZ 600 mg once daily and lamivudine 150 mg + zidovudine 300 mg twice a day. After solid phase extraction using cartridge Strata 18E C 500mg, 3 mL capacity, the drugs and internal standard (5 - (4-methylphenyl)-5-fenilidantoína - MPPH) were separated by reversed-phase column ACE 5 C18 100 x 4 6 mm. The mobile phase consisted of acetonitrile and diethanolamine in water (pH 7.8), flow rate 0.5 to 2.0 mL/min and detection at wavelength of 249 nm (EFZ), 267 nm (AZT) and 240 nm (MPPH). The method showed linearity at concentration range of 50 to 5000 ng/mL for both drugs, with recovery of 84 and 92% for EFZ and AZT, respectively. The limit of quantification (50 ng/mL), precision (coefficient of variation <15%) and accuracy (relative errors <15%) are in accordance with requirements of ANVISA. To evaluate the applicability of the method, we analyzed plasma of volunteers (n = 12) with mean plasma concentration of 1960 ± 766 ng/ mL to EFZ and 62.12 ± 16.21 ng/mL to AZT. The method agree analytical parameters suitable for use in therapeutic monitoring of patients using AZT and EFZ.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A infecção pelo HIV

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome* - AIDS) é uma doença cuja história é um exemplo não só de investigação epidemiológica, mas também da preocupação político social, pois atinge milhares de pessoas em todo o mundo (WHO, 2009).

A epidemia da AIDS configura um dos mais sérios problemas contemporâneos de saúde pública, apresentando alto grau de morbimortalidade e perspectivas de um contínuo crescimento e propagação em todos os continentes. Apesar dos avanços, as possibilidades de controle e cura dessa doença ainda parecem remotas, apesar do desenvolvimento de novas terapias (WHO, 2009).

O vírus da imunodeficiência humana (VIH, do inglês *Human Immunodeficiency Virus* - HIV) é o agente causador da AIDS, e pode ser dividido em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o mais predominante no Ocidente e o tipo HIV-2 ocorre primariamente na África. A evolução natural da doença caracteriza-se por intensa e contínua replicação viral em diversos compartimentos celulares e anatômicos, que resulta, principalmente, na destruição e disfunção de linfócitos T que expressam o antígeno de membrana CD4 (linfócitos T-CD4+ ou T-auxiliadores) e de outras células do sistema imune. A depleção progressiva dos linfócitos T-CD4+ leva à imunodeficiência, que em sua forma mais grave manifesta-se pelo surgimento de infecções oportunistas e neoplasias que caracterizam a AIDS (BRASIL, 2007; SOUZA & ALMEIDA, 2003; SILVA, 2002).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2007 haviam 33 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS no mundo, com

aproximadamente 2,1 milhões de mortes causadas pela AIDS. O número de novas infecções foi de 2,7 milhões em todo o mundo no ano de 2007 (WHO, 2009).

No Brasil, o número de pessoas vivendo com HIV foi estimado em 730 mil em 2007, representando 1/3 do número das pessoas que vivem com AIDS na América Latina. O Brasil já conseguiu estabilizar a epidemia da AIDS com uma taxa de prevalência menor que 1% em 2007. Entre 1990 e 2007, estima-se que tenham ocorrido aproximadamente 200 mil mortes causadas pelo HIV no Brasil, sendo 15 mil só em 2007, número menor encontrado apenas no ano de 1996, que foi de 16 mil pessoas. A partir de 1997 os pacientes tiveram um aumento de sobrevivência em virtude do acesso a terapia antirretroviral, através do programa de distribuição gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil (WHO, 2009).

O tratamento da infecção pelo HIV-1 foi iniciado em 1987, com o lançamento da zidovudina (AZT). Em 1964, o AZT foi sintetizado pela primeira vez por Horwitz da Fundação contra o Câncer em Michigan, apresentando atividade anticancerígena. No início da década de 70 sua atividade foi descrita pela primeira vez sendo, em 1985, o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV. Em 1986, o AZT foi aprovado pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos FDA (Food and Drugs Administration), sendo comercializado em 1987 pelos laboratórios Burroughs-Wellcome. Com o advento deste e outros antirretrovirais, observou-se uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes. Com isto, a infecção pelo HIV passa a ter características de uma doença crônica (SOUZA & ALMEIDA, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

No Brasil, a distribuição universal de medicamentos antirretrovirais foi iniciada em 1991 no estado de São Paulo com a zidovudina. Com a aprovação da Lei 9.313 de 1996, garantiu-se a obrigatoriedade de aquisição de novos fármacos antirretrovirais disponíveis. O Brasil foi o primeiro país da América Latina a adotar esta política para a população afetada pelo HIV. A cobertura

estimada do tratamento antirretroviral entre os brasileiros foi de 80% em 2007 (WHO, 2009; BRASIL, 2007).

O principal objetivo da terapia antirretroviral (TARV) é inibir a replicação viral, para evitar e, possivelmente, reverter a deterioração imunológica, evitando infecções oportunistas e outras morbidades relacionadas à AIDS. Desta forma, a TARV visa prolongar a sobrevivência e a qualidade de vida da pessoa que vive com HIV (BRASIL, 2007; SILVA, 2002).

O tratamento da infecção pelo HIV depende basicamente dos seguintes fatores: compreensão da replicação viral, potência antiviral, farmacocinética, toxicidade dos fármacos e interações dos fármacos usados nas associações (BRASIL, 2007; RANG *et al.*, 2003; SILVA, 2002).

O início da terapia é recomendado, em síntese, em dois casos: pacientes com manifestações clínicas associadas ao HIV, independente da contagem de linfócitos T-CD4+ e da carga viral plasmática; e pacientes com contagem de linfócitos T-CD4+ abaixo de 200 células/mm³, independente da presença de sintomas ou da magnitude da carga viral (BRASIL, 2007).

Como o vírus HIV compartilha muito dos processos metabólicos da célula hospedeira, é difícil encontrar fármacos que sejam seletivos para o patógeno. Todavia, existem algumas enzimas que são específicas do vírus e que podem constituir alvos potenciais para fármacos. Os agentes antivirais disponíveis são em sua maioria eficazes apenas durante a replicação do vírus (RANG *et al.*, 2003).

Os fármacos antirretrovirais atualmente em uso terapêutico pertencem aos seguintes grupos: (a) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN): abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina e zidovudina; (b) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (ITRNt): tenofovir; (c) inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN): efavirenz e nevirapina; (d) inibidores da protease (IP): amprenavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, ritonavir e saquinavir; (e) inibidor de fusão: enfuvirtida; (f) inibidor da integrase: raltegravir (BRASIL, 2008; BRASIL, 2007; RENTSCH, 2003; AYMARD *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de novos agentes antirretrovirais e o aumento da resistência do HIV levaram a mudanças no tratamento desta infecção. O desenvolvimento de uma terapia antirretroviral altamente ativa (do inglês *Highly active antirretroviral therapy* - HAART) aperfeiçoou o tratamento da infecção pelo HIV. Este tratamento inclui pelo menos três fármacos de duas diferentes classes: dois ITRN associado a um ITRNN ou IP (BRASIL, 2007; ROUZES *et al.*, 2004; RENTSCH, 2003; PROUST *et al.*, 2000).

A associação zidovudina/lamivudina é considerada a dupla de ITRN de primeira escolha para compor o esquema triplo inicial. O perfil favorável de toxicidade, a facilidade de adesão ao tratamento, a larga experiência com uso destes fármacos e o baixo custo justificam esta opção. Para compor o esquema, entre os ITRNN e IP, as taxas de sucesso virológico e imunológico nos dois grupos são, na maioria, equivalentes, porém a posologia nos esquemas contendo ITRNN é mais simples, o que, provavelmente, facilita a adesão ao tratamento. Além disso, os eventos adversos metabólicos, como dislipidemias e resistência à insulina parecem ser menos freqüentes com o uso de esquemas contendo ITRNN em relação à maioria dos IP. Quanto aos ITRNN, exceto em gestantes, o efavirenz é preferencial em relação à nevirapina devido à elevada potência, comprovada eficácia em longo prazo e ao menor risco de efeitos adversos (BRASIL, 2007).

A avaliação da resposta ao tratamento tem como parâmetros a redução da carga viral e o aumento (ou, pelo menos, a interrupção da queda) do número de linfócitos T-CD4+. Embora um dos principais objetivos da terapia antirretroviral seja obtenção de carga viral indetectável dentro de um período de seis meses, deve-se considerar como resultado positivo uma grande redução nos seus valores (maior que 90% da carga viral inicial nas primeiras quatro a seis semanas). A recuperação da contagem de linfócitos T-CD4+ geralmente ocorre de modo mais lento que a redução da carga viral (BRASIL, 2007).

Fatores como a quantidade de medicamentos diários, as reações adversas imediatas e a longo prazo, a adesão, a resistência viral prévia, a necessidade de períodos de jejum, a interação fármaco-fármaco, a dificuldade

na compreensão das metas da terapia, da implicação do seu uso inadequado, e outros fatores como co-morbidades contribuem para dificultar o processo terapêutico, levando à falha terapêutica. Em casos de falha terapêutica, em geral, ocorre primeiro falha virológica, seguida de imunológica e, por último clínica (BRASIL, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

1.2 Os antirretrovirais

1.2.1 Aspectos físico-químicos

A zidovudina, também conhecida como Retrovir, azidotimidina, AZT, ZDV ou 3'-azido-3'-desoxitimidina, tem nome IUPAC 1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-5-metilpirimidino-2,4-diona. É um análogo da timidina que possui um grupamento 3'-azido em lugar de 3'-hidroxila, ativa contra HIV-1 e 2. A fórmula molecular deste fármaco é $C_{10}H_{13}N_5O_4$, com massa molecular de 267,2 g/mol. A zidovudina é um sólido cristalino que se funde a 106-112°C, com pKa de 9,8, sendo solúvel em água na concentração de 20 mg/mL (DRUGBANK, 2009; HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

O efavirenz corresponde à 1,4-diidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona, com o nome IUPAC (4S)-6-chloro-4-(2-ciclopropiletinil)-4-(trifluorometil)-1H-3,1-benzoxazino-2-ona. Este fármaco é ativo contra o HIV-1, não apresentando atividade significativa contra o HIV-2. Sua fórmula molecular é $C_{14}H_9ClF_3NO_2$, com massa molecular de 315,7 g/mol. O efavirenz é um sólido que se funde a 139-141°C, com pKa de 10,2, e praticamente insolúvel em água, com solubilidade de $8,55 \times 10^{-3}$ mg/mL (DRUGBANK, 2009; HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

As fórmulas estruturais da zidovudina e efavirenz estão ilustradas na Figura 1.

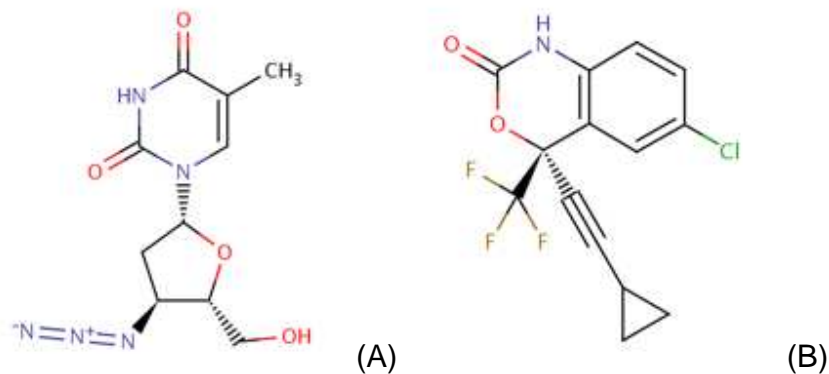


Figura 1 - Fórmula estrutural da zidovudina (A) e efavirenz (B)

1.2.2 Farmacodinâmica

Após entrar na célula do hospedeiro, a zidovudina é fosforilada pela timidina cinase em monofosfato; em seguida pela timidilato cinase em difosfato; e, por fim, pelo nucleosídeo difosfato cinase em 5-trifosfato de zidovudina ativo. O trifosfato de zidovudina inibe a transcriptase reversa em competição com o trifosfato de timidina, interrompendo o alongamento da cadeia de DNA. O 5-trifosfato de zidovudina também inibe fracamente a DNA polimerase- α celular e a polimerase-mitocondrial, enquanto o monofosfato inibe competitivamente a timidilato cinase celular, provocando a redução do trifosfato de timidina intracelular. Esses últimos efeitos podem contribuir para a citotoxicidade e os efeitos adversos do fármaco (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

O efavirenz é um inibidor da transcriptase reversa não competitivo, provocando inibição alostérica da função enzimática, através da ligação em sítios específicos. Portanto, este fármaco não necessita de fosforilação ou processamento intracelular para se tornar ativo (SILVA, 2002).

1.2.3 Farmacocinética

A zidovudina é rapidamente absorvida por via oral com biodisponibilidade variando de 60 a 70%, obtendo concentração plasmática máxima de

aproximadamente 1,6 µg/mL dentro de 0,5 a 1 h. A concentração no líquor é muito variável, mas, em média, se aproxima de 53% da concentração plasmática em adultos e de 24% em crianças. As concentrações sanguíneas são semelhantes às da saliva, porém levemente mais altas que as do sêmem. Nos recém-nascidos, as concentrações sanguíneas são levemente mais elevadas que as do sangue materno. Já no fluido amniótico, as concentrações são diversas vezes mais elevadas que as plasmáticas maternas (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

A meia-vida plasmática de eliminação da zidovudina é de aproximadamente 0,9 a 1,5 h. A zidovudina sofre metabolismo hepático de pré-sistêmico e é rapidamente transformada no metabólito 5'-O-glicuronídeo, que possui a mesma meia-vida de eliminação, mas é destituído de atividade anti-HIV. Um outro metabólito, o 3'-desoxitimidina, pode contribuir para a mielotoxicidade. A meia-vida do 5-trifosfato de zidovudina ativo é de aproximadamente 4 h. Na cirrose, aumentam a meia-vida de eliminação e as concentrações plasmáticas de duas a três vezes (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

Após administração oral, recuperam-se zidovudina e seu glicuronídeo na urina, na porcentagem de 14 a 18 e 75%, respectivamente. A excreção renal é feita por filtração glomerular e por secreção tubular. A depuração da zidovudina é de aproximadamente 26 mL/min.kg (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

A ligação às proteínas plasmáticas da zidovudina é menor que 25% (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

O volume de distribuição da zidovudina é de aproximadamente 1,4 L/kg. Como este fármaco atravessa a barreira hematoencefálica, este fato facilita o tratamento em casos de lesão neurológica associada à AIDS (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda a dose de 300 mg de zidovudina duas vezes ao dia. Nos casos de insuficiência hepática, avalia-se o ajuste posológico de 600 mg para 400 mg por dia. As apresentações

farmacêuticas disponíveis são comprimido de 300 mg ou solução oral 10 mg/mL, além da associação fixa zidovudina+lamivudina 300+150 mg (BRASIL, 2007).

O efavirenz é bem absorvido por via oral, atingindo concentração plasmática máxima de 4,0 µg/mL em cerca de 4,1 h. Sua meia-vida é de mais de 24 h, o que permite a administração de apenas uma dose por dia (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

O efavirenz tem elevada ligação protéica, de aproximadamente 99,5% (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002). Ele é metabolizado primariamente pelo complexo enzimático hepático do citocromo P-450, em particular pelas isoformas CYP3A4 e CYP2B6. Aproximadamente 60% do fármaco é excretado na urina sob a forma de seu conjugado glicuronídeo. O efavirenz altera o metabolismo de diversos fármacos, reduzindo os níveis plasmáticos de alguns deles (HARDMAN & LIMBIRD; SILVA, 2002).

Os principais parâmetros farmacocinéticos referentes à zidovudina e efavirenz estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros farmacocinéticos da zidovudina e efavirenz, segundo Hardman & Limbird (2003)

| Parâmetro | Zidovudina | Efavirenz |
|---|-------------------|------------------|
| Biodisponibilidade (%) | 60 | 80 |
| T _{1/2} β plasmática (h) | 0,8-1,9 | 5-7 |
| T _{1/2} β intracelular do trifosfato (h) | 3-4 | |
| Ligação às proteínas plasmáticas (%) | 20-38 | < 35 |
| Metabolismo (%) | 60-80 | 20-30 |
| Excreção renal do fármaco original (%) | 15 | 70 |
| Depuração (mL/min.kg) | 26 | 4,95 |
| Volume de distribuição (L/kg) | 1,4 | 1,3 |
| Meia-vida de eliminação (h) | 1,1 | 9,11 |
| t _{max} (h) | 0,5-1 | 0,5-1,5 |
| C _{max} (µg/mL) | 1,6 | 1,0 (0,86-1,2) |

1.2.4 Aspectos toxicológicos

Destacam-se, no Quadro 1, as reações adversas aos antirretrovirais em estudo como sendo os aspectos toxicológicos mais importantes para a monitoração terapêutica (BRASIL, 2007).

Quadro 1 - Principais reações adversas provocadas pela zidovudina e efavirenz (BRASIL, 2007; HARDMAN & LIMBIRD, 2003)

Fármaco Principais efeitos adversos

| | |
|-----|---|
| AZT | Mielossupressão, particularmente anemia e neutropenia. Elevação dos níveis séricos de eritropoetina, folato e vitamina B12. Náusea e vômito. Astenia, mal estar geral, cefaléia, insônia. Anorexia, fadiga, mialgia. Hiperpigmentação cutânea, ungueal e de mucosas. Miopatia, lesão muscular. Hepatotxicidade com ou sem acidose láctica e esteatose hepática grave (pode ser fatal) |
| EFZ | Exantema. Síndrome de Stevens-Johnson. Distúrbios do sono (sono agitado, insônia, sonolência, pesadelos, sonhos vívidos). Tonturas, vertigem. Irritabilidade, agitação, depressão, euforia, dificuldade de concentração, sensação de estranhamento, alterações de pensamento, amnésia, alucinações. Elevação das enzimas hepáticas. Dislipidemia. Teratogenicidade |

Alguns medicamentos, quando co-administrados com zidovudina e efavirenz, aumentam as chances de alteração das concentrações plasmáticas dos fármacos, devido à interferência na cinética dos mesmos. As interações mais importantes estão relacionadas no Quadro 2 (BRASIL, 2007).

Quadro 2 - Fármacos que afetam a farmacocinética da zidovudina e efavirenz (BRASIL, 2007; HARDMAN & LIMBIRD, 2003)

| Fármacos | Agente | Mecanismo | Comentário |
|-----------------|---|---|--|
| AZT | Estavudina | | Contra-indicado uso concomitante |
| | Paracetamol | Aumenta risco de neutropenia e hepatotoxicidade | Evitar |
| | Ácido valpróico | Aumenta níveis séricos de AZT | Monitorizar |
| | Anfotericina B | Aumenta risco de mielotoxicidade | Monitorizar |
| | Claritromicina | Diminui níveis séricos de AZT | Considerar intervalo mínimo de 2 h |
| | Doxorrubicina | Diminui eficácia e aumenta mielotoxicidade | Evitar |
| | Fenitoína | Pode haver diminuição dos níveis séricos dos 2 fármacos | |
| | Fluconazol | Aumenta toxicidade dos 2 fármacos | |
| | Ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, pirimetamina, citostáticos, sulfadiazina, clotrimoxazol, dapsona, flucitosina, vincristina, vimblastina | Aumenta mielotoxicidade | Monitorizar |
| | Interferon α | Aumenta mielotoxicidade | Monitorizar ou reduzir dose do AZT em pelo menos 50% |
| | Metadona | Aumenta níveis séricos de AZT | |
| | Probenecida | Aumenta níveis séricos de AZT | Monitorizar e avaliar redução de dose do AZT |
| | Ribavirina | Inibe a fosforilação do AZT | Não co-administrar |
| | EFZ | Tenofovir / didanosina (TDF/ddI) | Elevado risco de falha precoce com a associação TDF/ddI/EFZ ou NVP em pacientes virgens de terapia |

Continuação do Quadro 2...

| | | |
|--|--|---------------------------------------|
| Nevirapina (NVP) | | Contra-indicada a associação |
| Amprenavir (APV) | Diminui APV | |
| Indinavir (IDV) | Diminui IDV | Aumentar a dose de IDV |
| Lopinavir / Ritonavir (LPV/r) | Diminui LPV | Aumentar a dose de LPV |
| Saquinavir (SQV) | Diminui SQV e EFZ | Administrar somente associado com RTV |
| Ritonavir (RTV) | Aumenta RTV | |
| Nelfinavir (NFV) | Aumenta NFV | |
| Alimentos | Aumenta a biodisponibilidade em até 50% do EFZ, aumentando seus efeitos adversos | |
| Astemizol, Terfenadina | | Não co-administrar |
| Atorvastatina, Lovastatina, Sinvastatina | Diminui a concentração sérica dos hipolipemiantes | Monitorizar níveis séricos |
| Bupropiona | Diminui cerca de 50% da concentração sérica de bupropiona | |
| Carbamazepina, Fenobarbital, Fenitoína, Metadona | Potencial risco de redução dos níveis séricos de EFZ e dos anticonvulsivantes | Considerar alternativas terapêuticas |
| Cetoconazol e Itraconazol | Diminui os níveis séricos dos antifúngicos | Não co-administrar |
| Cisaprida | | Não co-administrar |
| Claritromicina | Diminui níveis séricos de claritramicina em cerca de 40% | Evitar |
| <i>Ecstasy</i> | Aumenta níveis séricos do <i>ecstasy</i> e risco de overdose | |
| Ergotamina e outros derivados do ergot | | Não co-administrar |

Continuação do Quadro 2...

| | | |
|----------------------|--|--|
| Etinilestradiol | Aumenta níveis séricos do hormônio | Considerar método alternativo |
| Metadona | Diminui metadona | Ajustar dose da metadona |
| Midazolam, Triazolam | | Não co-administrar |
| Rifabutina | Diminui rifabutina | Ajustar dose de rifabutina |
| Rifampicina | Diminui níveis de EFZ em 26% | |
| Warfarin | Aumenta toxicidade | Monitorizar níveis séricos do anticoagulante |
| Voriconazol | Diminui cerca de 77% dos níveis séricos do voriconazol e perda da eficácia | Não co-administrar |

1.3 Monitoração terapêutica de fármacos

A monitoração terapêutica de fármacos (MTF, do inglês Therapeutic drug Monitoring - TDM) tem sido usada há décadas em uma grande variedade de cenários clínicos. O interesse na monitoração terapêutica de medicamentos antirretrovirais tem crescido significativamente desde que terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) foi adotada na prática clínica (RAKHMANNINA *et al.*, 2004).

O alvo da MTF consiste em individualizar a posologia para obter uma máxima eficácia do tratamento enquanto minimiza a toxicidade do mesmo (NOTARI *et al.*, 2006; PROUST *et al.*, 2000).

A principal característica da MTF de antirretrovirais é que múltiplos medicamentos são usados concomitantemente em regimes HAART. Concentrações inadequadas dos fármacos podem levar à evolução da resistência medicamentosa e colocar em perigo atuais e futuras opções de tratamento. Desta forma, a monitoração terapêutica de antirretrovirais tem sido recomendada quando há interações medicamentosas significantes, resposta virológica não observada ou toxicidade dose-dependente e outros fatores em

virtude de uma ampla variabilidade entre os pacientes em uso desses fármacos (DONNERER *et al.*, 2008; NOTARI *et al.*, 2006; RAKHMANINA *et al.*, 2004; PROUST *at al.*, 2000).

A MTF de antirretrovirais ITRNN e IP tem se mostrado simples e reprodutível utilizando diferentes técnicas de análise. Estudos realizados têm determinado a concentração adequada para a supressão viral, evitando os efeitos tóxicos dos fármacos. Destes, pode-se citar o efavirenz, que teve sua faixa terapêutica definida entre 1,0 e 4,0 µg/mL (DONNERER *et al.*, 2008).

Os dois principais fatores que têm justificado a necessidade da MTF da classe dos ITRN, principalmente zidovudina, lamivudina e abacavir, são: a importância do perfil farmacocinético adequado e a utilidade de uma terapia com concentração controlada destes fármacos. Vale ressaltar que a relação entre a concentração destes fármacos e o efeito terapêutico ainda não foi claramente definida. Além disso, os fármacos desta classe necessitam ser fosforilados para se tornarem ativos no interior da célula. Portanto, a MTF desta classe de ARV tem auxiliado, principalmente, em estudos de adesão terapêutica e reações adversas a medicamentos (DONNERER *et al.*, 2008; HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

Há uma grande necessidade da MTF, uma vez que 25% dos pacientes fazem uso inadequado dos medicamentos antirretrovirais, sendo que destes, 24,5% acreditam estar tomando corretamente os medicamentos, quando na verdade sua prática era diferente da recomendada na prescrição. Estes achados reafirmam a existência de falhas no seguimento à terapêutica proposta aos pacientes, assim como uma necessidade de fazer uma MTF que realmente forneça aos profissionais informações seguras para interferirem no tratamento (BRASIL, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

O monitoramento terapêutico desses fármacos é recomendado para evitar e retardar a resistência do vírus, evitar a não adesão usualmente subestimada e avaliar interações farmacológicas (NOTARI *et al.*, 2006; PROUST *at al.*, 2000).

Muitos trabalhos publicados apoiam o conceito de MTF em pacientes infectados com o HIV, mas é importante que ela seja realizada concomitantemente com outras intervenções, tais como testes de resistência, acompanhamento de adesão e aconselhamento ao paciente para que a MTF seja uma ferramenta eficaz na prática clínica (RAKHMANINA *et al.*, 2004).

1.4 Análises Cromatográficas

1.4.1 Princípio da Cromatografia

O princípio da cromatografia foi inicialmente desenvolvido pelo químico David Talbot Day em 1897. Em seus resultados, Day e colaboradores observaram a separação de frações do petróleo ao longo de uma coluna empacotada com sólidos (tais como terra ou argila), publicando este trabalho em 1900 (AQUINO NETO & NUNES, 2003; CIOLA, 2003; SKOOG *et al.*, 2002). Paralelamente aos estudos de Day, o botânico russo Michael Semenovich Tswett estudava um método para separar pigmentos de plantas, passando soluções destes componentes através de coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio. Em 1903, Tswett criou o termo cromatografia, não se sabe se por ter separado pigmentos de colorações (em grego *chroma* significa cor e *graphein* significa escrever) ou porque Tswett significa "cor" em russo, e, em outras palavras, cromatografia seria a "técnica de Tswett" (AQUINO NETO & NUNES, 2003; CIOLA, 2003; SKOOG *et al.*, 2002).

Vários outros trabalhos foram publicados posteriormente sobre o método, merecendo destaque os de A. J. P. Martin e R. L. M. Synge, que lhes valeram o prêmio Nobel de 1952 (AQUINO NETO & NUNES, 2003; CIOLA, 2003; SKOOG *et al.*, 2002).

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes semelhantes de misturas complexas. Desta forma, esta técnica pode ser considerada um método físico-químico de separação, onde a amostra é transportada por uma fase móvel e

forçada a passar através de uma fase estacionária. A fase móvel é um fluido insolúvel na fase estacionária, podendo ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico, que percola através da fase estacionária. Esta, por sua vez, é geralmente de grande área, podendo ser um sólido ou um líquido imiscível e fixa em uma coluna ou superfície sólida (AQUINO NETO & NUNES, 2003; CIOLA, 2003; SKOOG *et al.*, 2002).

A escolha das duas fases baseia-se no grau de distribuição dos componentes da amostra entre as fases. Os componentes que tiverem mais afinidade pela fase móvel serão arrastados pela mesma primeiramente. Os componentes com maior afinidade pela fase estacionária ficarão mais retidos, movendo-se lentamente. Desta forma, os componentes sairão em momentos diferentes de acordo com a afinidade pelas fases móvel e estacionária (AQUINO NETO & NUNES, 2003; CIOLA, 2003; SKOOG *et al.*, 2002).

De acordo com o meio físico no qual as fases estacionária e móvel entram em contato, a cromatografia pode ser classificada em coluna ou planar. Na cromatografia em coluna, a fase estacionária é mantida dentro de um tubo estreito, através do qual a fase móvel é forçada a passar. Na cromatografia planar, a fase estacionária é suportada sobre uma superfície plana ou nos interstícios de um papel, movendo-se por capilaridade ou por gravidade. Outra forma de classificar as cromatografias é de acordo com o tipo de fase móvel empregada, podendo ser dividida em três categorias gerais: cromatografia líquida, gasosa e com fluido supercrítico (SKOOG *et al.*, 2002).

1.4.2 Cromatografia líquida

A cromatografia líquida era, no princípio, uma técnica demorada, no qual a fase móvel passava pela fase estacionária por gravidade ou, no máximo, com pequena pressão de um gás inerte sobre o solvente. A monitoração era visual ou pela análise química das frações coletadas. Com os resultados analíticos, construía-se um cromatograma através de um gráfico em colunas. Até 1966, a cromatografia líquida permaneceu desta forma, sendo que, a partir de trabalhos

de Piel e colaboradores, as separações cromatográficas passaram a ser rápidas e com grande eficiência. Da cromatografia líquida clássica chegou-se, então, à cromatografia moderna, ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem esta denominação em virtude de algumas características peculiares, podendo-se citar: maior poder de separação cromatográfica, maior velocidade de separação, monitoração contínua do efluente da coluna, medição quantitativa exata, análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna e automação do procedimento analítico e do tratamento dos dados. Esta técnica tem se tornado cada vez mais usada devido a sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas e sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público (AQUINO NETO & NUNES, 2003; SKOOG *et al.*, 2002).

Os detectores utilizados em cromatografia líquida podem ser de dois tipos básicos: detectores de propriedades universais, que respondem a propriedades da fase móvel como em todo; e detectores de propriedades do soluto, que respondem a algumas propriedades do soluto. Os detectores mais comumente utilizados em HPLC disponíveis comercialmente são: absorvância, fluorescência, eletroquímico, índice de refração, condutividade, espectrometria de massa, IVTF/FTIR e espalhamento de luz. Sabe-se que, aproximadamente 70% dos métodos publicados com cromatografia líquida, utiliza detectores baseados em absorção no UV. (SKOOG *et al.*, 2002).

O detector UV de varredura, ou detector fotodiodo (PDA), tem sido cada vez mais utilizado por suas vantagens em relação ao detector UV (monocanal). Uma destas vantagens que podem ser obtidas com instrumentos multicanais (PDA) está diretamente relacionada com o tempo de análise e com o ruído associado ao sinal medido. A simultaneidade na aquisição de dados pode resultar, em comparação com um instrumento monocanal, em uma análise mais rápida se a razão sinal/ruído for mantida constante ou em um aumento na razão

sinal/ruído se o tempo de análise for fixado. Portanto, por estes aspectos, a aplicação de um espectrofotômetro multicanal com um arranjo de fotodiodos é particularmente recomendada no estudo com HPLC e na diferenciação de compostos que absorvem em comprimentos de onda bastante próximos (RAIMUNDO JR & PASQUINI, 1997).

Os detectores PDA possibilitam o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e seletivos, sendo amplamente aplicados às áreas industrial, farmacêutica e clínica. A obtenção de um espectro para cada tempo de retenção permite não só uma verificação mais completa a respeito da pureza do pico cromatográfico e conseqüentemente da eficiência da separação, como também uma análise mais rápida, pois em uma única eluição todos os cromóforos podem, em tese, ser observados. Além disto, espécies mal separadas cromatograficamente podem ser eventualmente determinadas caso não exista uma grande sobreposição espectral (RAIMUNDO JR & PASQUINI, 1997).

1.4.3 Extração

Todo método de determinação quantitativa de fármacos (individual ou simultâneo) envolve o preparo da amostra, que é de fundamental importância na análise. A preparação da amostra pode ocorrer através de métodos mecânicos, como filtração e centrifugação, e métodos termodinâmicos, como cristalização e destilação. Na cromatografia moderna, tem-se usado a precipitação protéica, a extração líquido-líquido ou fase sólida, além das extrações que utilizam fluidos supercríticos (CIOLA, 2003).

Uma das condições exigidas para a amostra a ser injetada no cromatógrafo é que a mesma não possua interferentes que saiam no mesmo tempo de retenção do fármaco em estudo (CIOLA, 2003).

A aplicação da extração fase sólida (EFS - *Solid Phase Extraction, SPE*) do analito de uma matriz biológica tem sido cada vez mais aceita, permitindo não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilitando também sua

concentração e pré-purificação, aumentando tanto a recuperação, quanto a eliminação de alguns interferentes provenientes de co-administração de fármacos (NOTARI *et al.*, 2006; AQUINO NETO & NUNES, 2003).

As principais etapas envolvidas na extração fase sólida são: a) Ativação do sorvente pela passagem de solvente apropriado para condicionar a superfície do sólido; remoção do solvente de ativação por um líquido de composição similar a amostra. b) Aplicação da amostra; idealmente os analitos são retidos pelo sorvente. c) Remoção de interferentes e parte da matriz com um solvente que não remova os analitos. d) Eluição dos analitos do sorvente com um solvente apropriado, de preferência que não desloque componentes da matriz que ainda estejam associados ao sorvente, coletando o eluato para eventual concentração e posterior análise (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

As vantagens da extração fase sólida frente à extração líquida-líquida (ELL – *Liquid-liquid extraction, LLE*), além de extrair, concentrar e purificar os analitos incluem menor uso de solventes, não formar emulsão, fácil automação e geralmente maior rapidez, com redução do tempo gasto em até um quinto do despendido na ELL (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

A seleção criteriosa do par fase móvel/fase estacionária é determinante para a eficiência do processo de separação, seja ele uma simples extração de um grupo de substâncias ou a separação de analitos presentes num determinado material (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

1.4.4 Análise cromatográfica de antirretrovirais

A determinação de antirretrovirais em matrizes biológicas tem sido feita por métodos cromatográficos, sendo um dos mais utilizados a cromatografia líquida de alta eficiência que, além das vantagens de eficiência na separação, rapidez e simplicidade, permite a separação e quantificação de diferentes fármacos em uma única análise (CIOLA, 2003; AYMARD *et al.*, 2000).

A seguir será feita uma breve revisão das principais metodologias em cromatografia líquida utilizadas na análise de antirretrovirais, destacando as análises de zidovudina e efavirenz.

Há várias publicações que discorrem sobre técnicas cromatográficas para análise da zidovudina e efavirenz em matrizes biológicas. Verweij-Van Wissen *et al.* (2005) validaram uma técnica de quantificação de ITRN, incluindo zidovudina no plasma, sem adição de padrão interno. A técnica extrativa escolhida foi extração fase sólida utilizando metanol e água, seguido da separação e quantificação por HPLC-UV a 260 nm. A coluna e pré-coluna utilizadas foram: C18, com 150 x 4,6 mm e C18, 20 x 3,9 mm, com partículas de 3,5 µm, respectivamente. Dois tipos de fases móvel foram utilizadas: tampão acetato (acetato de potássio 20 mM, pH 4,6 ajustado com ácido acético) – acetonitrila 95:5 e 76:24 v/v. Os resultados foram lineares no intervalo de 15 a 5000 ng/L.

Rezk *et al.* (2003) validaram uma técnica cromatográfica para quantificar antirretrovirais, dentre eles zidovudina, utilizando extração fase sólida dos fármacos com adição do padrão interno hexobarbital, tampão acetato de amônio 100 mM pH 7,0 e eluição com metanol. A análise cromatográfica consistiu de HPLC com detector UV, e coluna e pré-coluna: C18, com 150 x 3,9 mm e C18, 20 x 3,9 mm, com partículas de 5 µm, respectivamente. Foram utilizadas como fases móvel: tampão acetato de amônio 10 mM (pH 6,5 ajustado com ácido acético), acetonitrila e metanol. Este estudo foi avaliado no intervalo de 10 ng/mL a 10 000 ng/mL. A técnica mostrou-se exata e precisa, com recuperação maior que 90,0% para zidovudina.

Fan & Stewart (2002) determinaram zidovudina proveniente de plasma humana usando aprobarbital como padrão interno. A extração fase sólida foi realizada utilizando metanol, água, tampão acetato de amônio 25 mM pH 7,0 e água-acetonitrila 70:30 v/v como eluente. A separação e quantificação foram realizadas por HPLC íon-par e detecção UV a 265 nm com eluição isocrática. A fase móvel utilizada foi composta de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 3,2 – acetonitrila 86:14 v/v. O sistema cromatográfico consistiu de coluna e pré-

coluna C8 150 x 3,9 mm com partículas de 5 µm. Esta técnica mostrou-se exata e precisa, com recuperação maior que 92% e linear no intervalo de 57,6 ng/mL a 2.880,0 ng/mL de zidovudina.

Proust *et al.* (2000) desenvolveram e validaram uma técnica de análise de fármacos antirretrovirais por HPLC-UV, que determina quantitativamente seis fármacos antirretrovirais em plasma humano em uma única corrida. Dentre os fármacos está o efavirenz, utilizando 6,7-dimetil-2,3-di-(2-piridil)quinoxina como padrão interno. As amostras de plasma foram tratadas por extração líquido-líquido com hidróxido de sódio, ácido clorídrico e metil-terc-butil-éter. A mistura foi separada por HPLC em coluna e pré-coluna C18 com partículas 5 µm e detecção a 260 nm. A fase móvel utilizada consiste de fosfato de sódio 25 mM – acetonitrila 55,2:44,8 v/v, modificado com dietilamina 0,9% e tetrahydroflurano 1%, com pH 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico. Os autores avaliaram a seletividade da técnica na presença de 33 fármacos comumente usados por pacientes em uso de antirretrovirais, dentre eles antirretrovirais da classe dos ITRN, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatórios não-esteroidais e benzodiazepínicos, observando que os mesmos não interferiram na determinação dos antirretrovirais. A técnica mostrou-se linear, exata e precisa, com recuperação de 83,8%.

Rentsch (2003) desenvolveu uma técnica capaz de quantificar diferentes IP e o efavirenz, usando o A-86093 (ácido (5S,8S,10S,11S)-9-hidróxi-2-ciclopropil-5-1-metiletil)-1-[(2-1-metiletil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11-bis(fenilmetil)-2,4,7,12-tetraaza tridecano-13-óico, 5-tiazolilmetil éster) como padrão interno. Os antirretrovirais foram extraídos em fase sólida com metanol e tampão ácido fosfórico 0,1% (pH 7,0 ajustado com hidróxido de sódio). A separação e quantificação foi realizada por LC-MS e ionização química com pressão atmosférica, com coluna C18 12,5 cm x 2 mm e partículas 5 µm e pré-coluna 8 x 2 mm. A técnica mostrou-se altamente específica, sem interferência de 37 fármacos comumente co-administrados com os antirretrovirais avaliados. A técnica mostrou-se linear, exata e precisa com recuperação do efavirenz de 80% e limite de quantificação de 10 ng/mL.

Dailly *et al.* (2004) desenvolveram e validaram uma técnica de determinação simultânea de antirretrovirais, incluindo o efavirenz, por HPLC-UV usando A-86093 ({{ácido (5S,8S,10S,11S)-9-hidróxi-2-ciclopropil-5-1-metiletil)-1-[(2-1-metiletil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11-bis(fenilmetil)-2,4,7,12-tetraazatridecano-13-ico, 5-tiazolilmetil éster}}) como padrão interno. As amostras foram extraídas por extração líquido-líquido usando carbonato de sódio decahidratado 0,5 M, pH 11,7 e acetato de etila/hexano 9:1 v/v. Na análise cromatográfica, utilizou-se coluna C18 250 x 4,6 mm e pré-coluna C18 20 x 3,9 mm, com partículas de 5 µm. Dois tipos de fase móvel foram usadas: acetonitrila – perclorato tetrametilamônio 0,025 M em ácido trifluoroacético aquoso 0,2% (55:45 v/v) e metanol - perclorato tetrametilamônio 0,025 M em ácido trifluoroacético aquoso 0,2% (55:45 v/v). A técnica mostrou-se específica, exata e precisa, com limite de quantificação de 100 ng/mL para o efavirenz.

Aymard *et al.* (2000) desenvolveram e validaram uma técnica em HPLC com detecção UV, usando extração sólido-líquido sem padrão interno adaptado aos antirretrovirais em estudo, incluindo zidovudina e efavirenz. Os autores avaliaram a especificidade da técnica frente a 112 fármacos de diferentes classes usados amplamente por pacientes com infecção por HIV em tratamento com antirretrovirais. A técnica mostrou-se precisa, exata, específica e linear, com recuperação maior que 70%, com limite de quantificação de 5 ng/mL para zidovudina e 50 ng/mL para efavirenz.

Também baseado em extração sólido-líquido e HPLC-UV-Vis, Notari *et al* (2006) conseguiram separar e quantificar simultaneamente 16 fármacos antirretrovirais incluindo zidovudina e efavirenz. Os fármacos foram extraídos por processo de extração fase sólida com metanol, água e fosfato ácido de potássio 0,01 M. A coluna e pré-coluna utilizadas foram: C18 250 x 4,6 mm com partículas de 5 µm e 20 x 3,9 mm, respectivamente. A fase móvel foi composta de acetonitrila e fosfato ácido de potássio 0,01 M. A recuperação observada foi entre 88% e 120%. O limite de quantificação foi de 25 ng/mL para zidovudina e 100 ng/mL para efavirenz.

1.5 Parâmetros de validação da metodologia analítica

A validação de um método analítico é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. A validação de uma técnica cromatográfica consiste em uma série de experimentos comprovando que esta atende todas às exigências de aplicações analíticas, produzindo resultados confiáveis e apresentando reprodutibilidade comprovada (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

Para uma técnica de análise utilizando matriz biológica ser considerada validada segundo a ANVISA, a mesma deve atender uma série de parâmetros como precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade e recuperação, sendo que esses parâmetros devem obedecer a um limite de variação dentro das normas aceitas por órgãos oficiais de regulação. Segue, a seguir, a descrição destes parâmetros (BRASIL, 2003).

1.5.1 Especificidade (Seletividade)

Define-se especificidade ou seletividade como a habilidade de um método bioanalítico em diferenciar o analito de outros componentes que possam estar presentes nas amostras a serem analisadas, tais como metabólitos, impurezas, excipientes, compostos de degradação ou componentes da matriz, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

1.5.2 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

A curva de calibração é utilizada para prever a linearidade da técnica, fornecendo uma equação matemática representativa da relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Para métodos analíticos em quantificação simultânea de mais de um fármaco em uma mesma análise, deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo (BRASIL, 2003).

De acordo com normas da ANVISA, a curva de calibração deve incluir a análise de amostra branco (matriz biológica isenta do fármaco e do padrão interno), amostra zero (matriz biológica mais padrão interno) e de, no mínimo, seis amostras contendo padrão interno e fármaco, contemplando a faixa de aplicação esperada, do LIQ até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar (BRASIL, 2003).

A curva deverá cumprir os seguintes critérios de aceitação: desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ, e menor ou igual a 15% para as outras concentrações. Para que a curva seja aceita, no mínimo quatro das seis concentrações devem estar dentro dos parâmetros de aceitação, incluindo o LIQ e a maior concentração, além de apresentar um coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

1.5.3 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas previamente. Deve ser avaliada em dois níveis: a) repetibilidade, ou precisão intra-ensaio, que representa a concordância entre os resultados de medições

sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições; b) precisão intermediária, ou precisão inter-ensaio, indica o efeito das medições sob condições variadas (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

Para avaliar a precisão da técnica é necessário analisar, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento e realizar no mínimo, cinco determinações por concentração.

A precisão da técnica pode ser expressa como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas realizadas em dias distintos, de acordo com a seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100$$

onde, DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

O desvio padrão relativo deve ser menor ou igual a 20% para o LIQ e menor ou igual a 15% para as demais concentrações para que o mesmo seja considerado preciso (BRASIL, 2003).

1.5.4 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pela técnica em estudo em relação ao valor verdadeiro do analito presente na amostra, devendo ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade da técnica. Para avaliar este parâmetro, no mínimo nove determinações de soluções dos analitos devem ser feitas em 3 níveis diferentes (alto, médio e baixo) preparadas a partir de plasma branco e analisadas 3 alíquotas de cada solução no mesmo dia (exatidão intra-ensaio) e em dias diferentes (exatidão inter-ensaio) (BRASIL, 2003).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, como mostra a equação seguinte (BRASIL, 2003):

$$Exatidão = \frac{CME}{CT} \cdot 100$$

onde, CME = concentração média experimental e CT = concentração teórica.

O coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 15% para que o mesmo seja considerado exato, exceto para o LIQ, para o qual se admite desvios de até 20% (BRASIL, 2003).

1.5.5 Limite de Detecção

É um parâmetro de capacidade de detecção da técnica analítica e corresponde à menor concentração do fármaco presente em uma amostra, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Deve ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003).

Recomenda-se que o limite de detecção seja de duas a três vezes superior ao ruído da linha de base, como mostra a equação seguinte (BRASIL, 2003):

$$LD = \frac{DP \cdot 3}{IC}$$

onde LD é o limite de detecção, DP o desvio padrão e IC a inclinação da curva de calibração.

1.5.6 Limite Inferior de Quantificação

É o parâmetro que corresponde à menor concentração analisada do fármaco, com precisão e exatidão aceitáveis sob condições estabelecidas. Deve ser estabelecido por meio da análise de soluções com concentrações

conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível determinável com precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

Recomenda-se que o limite inferior de quantificação seja dez vezes superior ao ruído da linha de base, como mostra a seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$LIQ = \frac{DP \cdot 10}{IC}$$

onde LIQ é o limite inferior de quantificação, DP o desvio padrão e IC a inclinação da curva de calibração.

1.5.7 Recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

A recuperação absoluta corresponde à percentagem de extração do fármaco adicionado à matriz biológica, em 3 níveis de concentração (alta, média e baixa) diferentes (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003; VANBEL *et al.*, 1995; PENG & CHIOU, 1990).

O cálculo da recuperação absoluta deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente (BRASIL, 2003).

$$Recuperação\ Absoluta = \frac{C_{Ext}}{C_{Não-Ext}} \cdot 100$$

onde C_{ext} é a concentração do analito extraído e $C_{Não-Ext}$, a concentração do analito não extraído.

1.5.8 Controle de Qualidade

As amostras de controle de qualidade são utilizadas em três níveis de concentração, devendo-se estabelecer as concentrações dentro do intervalo de linearidade do método, seguindo a seguinte recomendação (BRASIL, 2003):

- a) Controle de qualidade de baixa concentração: concentração menor ou igual a três vezes o LIQ;
- b) Controle de qualidade de média concentração: concentração de aproximadamente a média entre CQB e CQA;
- c) Controle de qualidade de alta concentração: de 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

1.5.9 Estudo de Estabilidade

O estudo de estabilidade visa determinar se o analito permanece quimicamente inalterado em uma determinada matriz, sob condições específicas por determinado intervalo de tempo. Desta forma, a estabilidade depende das propriedades químicas dos fármacos, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado (BRASIL, 2003).

A estabilidade deve ser avaliada nos seguintes momentos: durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenamento de longa (congelamento) e curta duração (temperatura ambiente), após três ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (BRASIL, 2003).

Para realizar o teste de estabilidade, deve-se utilizar um conjunto de amostras preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência (BRASIL, 2003). A avaliação da estabilidade deve ser realizada analisando, no mínimo, em triplicata das concentrações baixa e alta, determinadas na validação (BRASIL, 2003).

Diante do exposto, pensamos em desenvolver uma técnica de análise cromatográfica utilizando detector PDA para quantificar no plasma de pacientes

os principais fármacos utilizados no esquema terapêutico antirretroviral triplo inicial. Com base nesta pesquisa inicial, espera-se obter dados suficientes para subsidiar estudos de adesão terapêutica e reações adversas a medicamentos e assim, possibilitar, em um futuro próximo, a implantação do serviço de monitoração terapêutica de antirretrovirais no Serviço de Atendimento Especializado do HC/UFG.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar uma técnica capaz de quantificar os níveis de fármacos antirretrovirais zidovudina e efavirenz presentes no plasma dos sujeitos portadores de HIV, em acompanhamento da terapia antirretroviral (TARV) no Serviço de Atendimento Especializado (SAE) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma técnica de análise e extração para quantificar os antirretrovirais efavirenz e zidovudina no plasma dos sujeitos;
- Validar a técnica desenvolvida para quantificar os antirretrovirais efavirenz e zidovudina segundo os parâmetros da Resolução Específica número 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- Conhecer o perfil clínico dos sujeitos em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina;
- Quantificar os fármacos efavirenz e zidovudina no plasma dos sujeitos em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina.

3 METODOLOGIA

O estudo realizado é classificado como analítico, descritivo e documental desenvolvido na Central Analítica do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG (NEPET).

3.1 Materiais

3.1.1 Substâncias químicas

- Efavirenz 99,8% (padrão USP)
- Zidovudina 99,0% (padrão USP)
- 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína – MPPH - 99,0% (padrão Sigma)
- Ácido ascórbico (amostra comercial)
- Alopurinol (amostra comercial)
- Atenolol (amostra comercial)
- Diclofenaco (amostra comercial)
- Dipirona (amostra comercial)
- Fluconazol (amostra comercial)
- Lamivudina (padrão USP)
- Omeprazol (amostra comercial)
- Paracetamol (amostra comercial)
- Quinidina (amostra comercial)
- Sulfametoxazol (amostra comercial)

3.1.2 Reagentes

- Acetonitrila grau HPLC (Honeywell);
- Água Ultrapura (Milli-Q);
- Dietilamina – (Cromatografo Produtos Químicos Ltda);
- Metanol – grau HPLC (J. T. Baker).

3.1.3 Outros materiais

- Sistema de coleta de sangue a vácuo (BD-Vacutainer®);
- Plasma humano livre de antirretrovirais (Instituto Goiano de Hemoterapia – INGOH);
- Coluna cromatográfica ACE 5 C18 100 x 4,6 mm;
- Membrana 0,45 µm de diâmetro de poro, 47 mm de diâmetro branca e lisa (Millipore);
- Cartucho de extração em fase sólida Strata C-18E 500mg, 3mL – (Phenomenex).

3.1.4 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (Nova Técnica);
- Balança Analítica modelo FA2104N (Celtac);
- Centrifuga modelo Excelsa 2 (Fanem Ltda);
- Compressor aspirador modelo 089-CAL (Fanem);
- Concentrador modelo TE-019 (Tecnal);
- Estufa de esterilização universal modelo 219 (Fabbe-Primar);
- Lavadora ultrassônica modelo USC 1400 (Unique);
- Purificador de água modelo Simplicity 185 (Waters Millipore);
- Refrigerador freezer -20°C 300L (Cônsul);
- Refrigerador modelo DC 360L (Eletrolux);
- Vórtex modelo AP-56 (Phoenix).

- Sistema HPLC: HPLC Shimadzu – LC - 20AT Prominence; Auto-injetor Shimadzu – SIL - 20A Prominence; Detector PDA Shimadzu – SPD - M20A Prominence; Degaseificador Shimadzu – DGU - 20A₅ Prominence; Forno de Coluna Shimadzu – CTO - 20A Prominence; Módulo Controlador Shimadzu – CBM - 20A Prominence; Computador com software LC Solution para aquisição dos dados.

3.2 Sujeitos

3.2.1 Critérios de inclusão

Sujeitos com diagnóstico HIV positivo, maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, em acompanhamento clínico no Serviço de Atendimento Especializado (SAE) do HC/UFG fazendo uso do protocolo terapêutico antirretroviral efavirenz 600 mg uma vez ao dia e lamivudina 150 mg/zidovudina 300 mg duas vezes ao dia.

3.2.2 Critérios de exclusão

Sujeitos em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina com tempo de tratamento inferior a três meses foram excluídos do estudo, assim como aqueles que, apesar do consentimento, não tiveram disponibilidade de comparecer para a coleta de sangue.

3.2.3 Amostra

De todos os pacientes HIV positivo em acompanhamento clínico no (SAE) do HC/UFG, 120 faziam uso de antirretrovirais em outubro de 2008 quando começou a coleta de informações. Naquela época, dos 120 pacientes em TARV, 85 estavam em uso do protocolo terapêutico estudado. Todos estes 85 pacientes foram convidados a participar do estudo, de acordo com critérios

de inclusão e exclusão adotados. Após todos os esclarecimentos, 30 sujeitos consentiram em participar da pesquisa, recebendo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e assinando-o em duas vias na presença de duas testemunhas. Destes sujeitos, foi possível coletar sangue de apenas 19, por indisponibilidade dos demais. A amostra para quantificação dos fármacos consistiu de plasma de 12 sujeitos, uma vez que por problemas técnicos houve necessidade de desprezar 07 amostras de plasma. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do HC/UFG, sob o número do protocolo: CEPMHA/HC/UFG 179/2007, datado de 10/04/2008.

3.3 Coleta de dados clínicos e terapêuticos

Os dados relativos à dispensação de antirretrovirais nos últimos 12 meses foram coletados das fichas de dispensação de antirretrovirais da Seção de Farmácia do HC/UFG. Os dados clínicos, como data do início da terapia antirretroviral, carga viral, contagem de linfócitos T-CD4 e presença de infecções oportunistas foram coletados dos prontuários dos sujeitos.

3.4. Preparo das soluções

3.4.1 Preparo das soluções contendo padrão primário

As soluções de trabalho utilizadas durante o estudo foram obtidas a partir de soluções estoque de cada substância: zidovudina e efavirenz. Preparou-se, para cada substância, uma solução padrão estoque na concentração de 1mg/mL, pesando-se 10 mg de padrão primário e solubilizando em 10 mL de metanol, armazenando-as em *freezer* à -20°C .

O padrão interno utilizado foi a 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína (MPPH). Foi realizada a pesagem de 10 mg do padrão primário de MPPH, solubilizando-o em 10 mL de metanol e posteriormente armazenando a solução em *freezer* à -20°C .

3.4.2 Preparo das soluções contendo padrão secundário

As soluções contendo padrão secundário e as obtidas a partir de medicamentos foram preparadas usando metanol 50% em água ultrapura e posteriormente utilizadas para avaliar a especificidade da técnica cromatográfica desenvolvida.

3.4.3 Preparo das soluções para curva de calibração e controle de qualidade

Soluções intermediárias contendo zidovudina e efavirenz foram obtidas a partir das soluções estoque para a obtenção da curva de calibração. As soluções intermediárias foram preparadas 10 vezes mais concentradas que as concentrações utilizadas na curva de calibração: 500, 2.000, 5.000, 10.000, 30.000 e 50.000 ng/mL de cada substância em solução de metanol 50% em água ultrapura. A curva de calibração foi construída com oito pontos, a saber: branco, zero, 50, 200, 500, 1.000, 3.000 e 5.000 ng/mL de zidovudina e efavirenz.

As soluções de controle de qualidade correspondem a 100, 2.000 e 4.000 ng/mL dos antirretrovirais para os controles de concentração baixa, média e alta, respectivamente.

A solução estoque contendo padrão primário do MPPH foi diluída para concentração intermediária de 40.000 ng/mL, e esta para 4.000 ng/mL, sendo a última adotada como solução de trabalho para todas as amostras.

Para a preparação da curva de calibração e controles de qualidade utilizou-se em cada ponto, 500 µL de plasma humano branco previamente centrifugado, sendo adicionados 50 µL de padrão interno MPPH e 50 µL de solução de trabalho contendo zidovudina e efavirenz. As razões área da solução de trabalho dos fármacos/área da solução do padrão interno constituíram os pontos da curva de calibração. Além dos pontos da curva de calibração e controles, foram preparados mais dois pontos: o branco, contendo

500 µL de plasma humano livre de fármacos, acrescido de 100 µL de metanol 50% em água ultrapura; e o ponto zero, constituído de 500 µL de plasma humano branco, adicionado de 50 µL de padrão interno e 50 µL de metanol 50% em água ultrapura.

3.5 Obtenção, processamento e conservação das amostras

As amostras de sangue venoso foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da UFG utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo contendo anticoagulante EDTA. O plasma foi separado imediatamente após a coleta por centrifugação a 3.500 rpm por 5 min e em seguida armazenado a -20°C para posterior análise na Central Analítica do NEPET.

No dia da análise por HPLC-PDA das amostras, o plasma foi descongelado e aquecido a 56° C por 1 h para inativação de possíveis partículas do HIV presentes. Em seguida, as amostras foram extraídas e submetidas à análise cromatográfica.

3.6 Desenvolvimento da técnica de extração

Para a técnica extrativa, testou-se primeiramente a precipitação protéica e a extração líquida-líquida, por serem técnicas consideradas com custo reduzido, quando comparado com a extração fase sólida. Testaram-se estas extrações em diferentes faixas de pH e utilizando diferentes solventes. Avaliou-se, ainda a eficiência da extração fase sólida das amostras.

As amostras foram preparadas em tubos de ensaio adicionando 500 µL de plasma, 50 µL do padrão interno e 50 µL de metanol 50% em água ultrapura, homogeneizando-se em vórtex durante 10 segundos.

Paralelamente ao preparo das amostras, procedeu-se o condicionamento dos cartuchos de extração. O cartucho foi adaptado em um tubo de ensaio, e o conjunto colocado na centrífuga. Para condicionar o cartucho utilizou-se 3 mL

de metanol, seguido de centrifugação a 3500 rpm durante 3 minutos, com posterior adição de 3 mL de água ultrapura, e centrifugação a 3500 rpm durante 6 minutos.

Posteriormente, os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos para os cartuchos de extração em fase sólida, procedendo a nova centrifugação a 3500 rpm durante 3 min, lavagem com 1 mL de água ultrapura e centrifugação novamente a 3500 rpm durante 3 min.

Os tubos de ensaio conectados aos cartuchos foram substituídos por novos tubos limpos. As substâncias foram eluídas com 2 mL de metanol e centrifugadas a 3500 rpm por 3 min. O conteúdo do tubo de ensaio foi totalmente evaporado a 50°C com auxílio de um concentrador de amostras acoplado a uma bomba a vácuo e posteriormente ressuspensão com 200 µL de metanol a 50% em água ultrapura. Esta solução foi transferida para um *vial*, consistindo na alíquota a ser injetada no cromatógrafo.

3.7 Desenvolvimento da técnica analítica

Vários estudos preliminares foram realizados para desenvolver e estabelecer as condições cromatográficas ideais de quantificação da zidovudina e efavirenz. Os principais parâmetros avaliados nesta etapa foram: modelo de coluna cromatográfica, composição da fase móvel, tempo de análise, fluxo da fase móvel, volume de injeção da amostra, comprimento de onda para a detecção das substâncias e padrão interno.

Utilizou-se a coluna cromatográfica fase reversa (C18) (100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno) da marca ACE®.

Utilizaram-se duas fases móveis, assim subdivididas: fase móvel A (acetonitrila), e fase móvel B (dietanolamina: água ultrapura, com pH ajustado em aproximadamente 7,8). Para a técnica desenvolvida utilizou-se gradiente de concentração das fases móveis A e B e do fluxo. O volume de amostra injetada foi de 30 µL, tanto para os padrões quanto para as amostras extraídas dos sujeitos.

O detector utilizado foi o UV-Visível de varredura (PDA), sendo estabelecido um comprimento de onda específico para cada substância analisada.

3.8 Validação da metodologia analítica

Para a definição da especificidade da técnica analítica dos antirretrovirais em estudo, realizou-se um estudo de compostos que pudessem interferir na análise. Os pacientes em terapia antirretroviral fazem uso de diversos fármacos concomitantemente, tanto para doenças oportunistas como para indicações diversas. Realizou-se um levantamento, através de consulta aos prontuários médicos e bibliografia especializada dos fármacos mais comumente usados por este grupo de indivíduos. Dos fármacos comumente prescritos a pacientes em uso da terapia antirretroviral, os selecionados para análise foram: ácido ascórbico, alopurinol, atenolol, diclofenaco de sódio, dipirona, fluconazol, omeprazol, paracetamol, quinidina e sulfametoxazol.

Preparou-se soluções destes fármacos nas concentrações de 1 mg/mL em metanol 50% em água ultra pura. Posteriormente, injetou-se 30 µL da solução no HPLC em concentrações decrescentes, partindo da solução de trabalho. O tempo de corrida foi estendido de 25 para 60 min, para confirmar a possível interferência dos fármacos.

As amostras da curva de calibração e controles de qualidade preparadas foram utilizadas para avaliação da linearidade, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação e recuperação absoluta. Para a precisão e exatidão, realizou-se a análise em três dias distintos preparando, para cada dia, uma curva de calibração.

Todos os testes de validação foram realizados conforme exigências da RE nº 899/2003 da ANVISA. A figura 2 ilustra o fluxograma geral do trabalho desenvolvido.

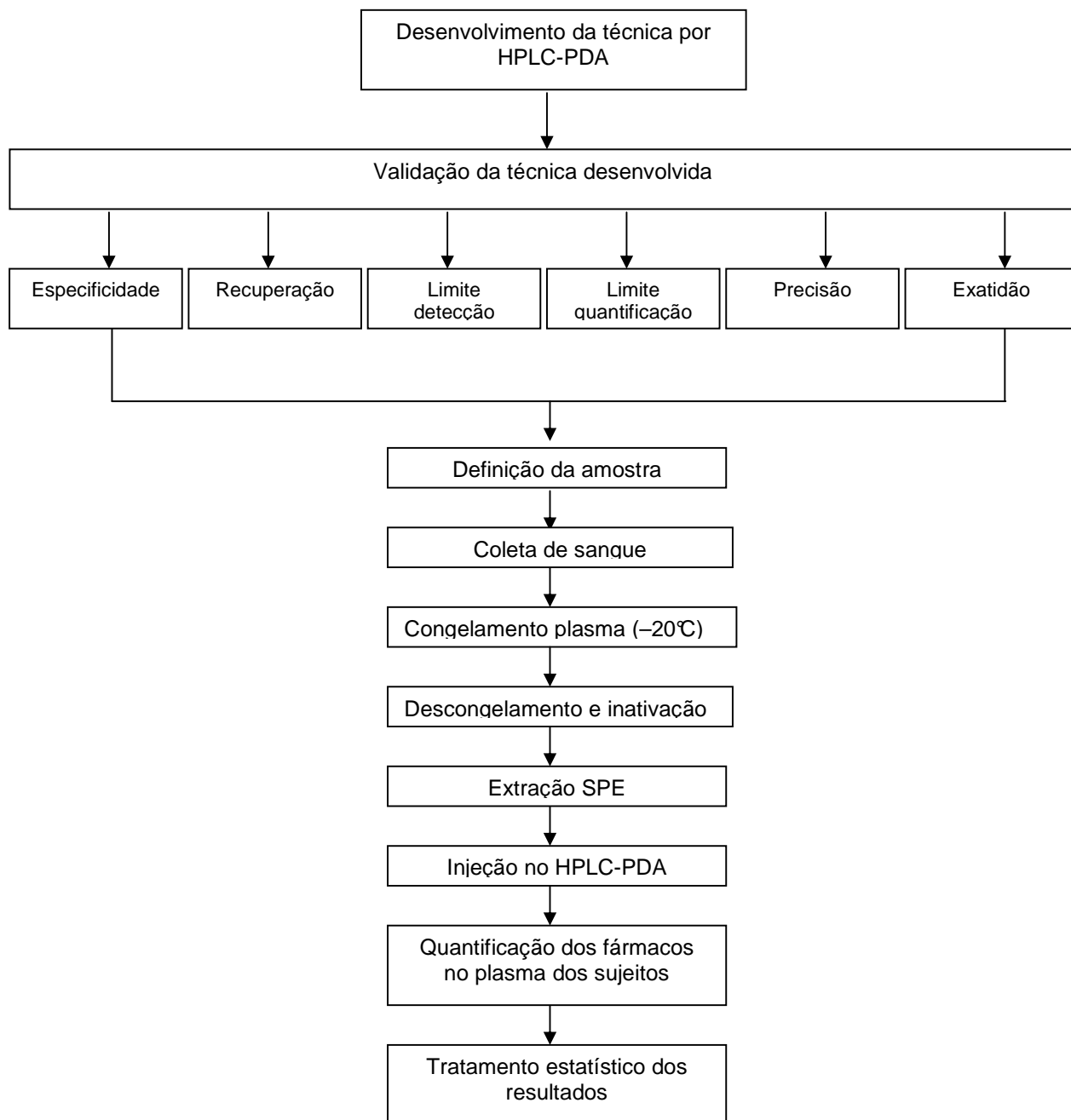


Figura 2 - Fluxograma do desenvolvimento, validação e quantificação plasmática de zidovudina e efavirenz em amostras de sujeito.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento da técnica cromatográfica

Para proceder à identificação e quantificação da zidovudina e efavirenz em plasma humano, vários testes consecutivos foram realizados, alternando as condições cromatográficas consideradas ideais para a extração e quantificação. As condições consideradas satisfatórias estão apresentadas nos Quadros 3 e 4.

Quadro 3 Sumário da técnica de extração em fase sólida desenvolvida para quantificação de zidovudina e efavirenz

| | |
|-------------------|---|
| Cartucho | Strata C-18E 500mg, 3mL |
| Condicionamento | 3 mL de metanol, centrifuga \pm 3500 rpm, 3 min 3 mL de água, centrifuga \pm 3500 rpm, 8 min |
| Adição da amostra | 500 μ L de plasma, centrifuga \pm 3500 rpm, 3 min |
| Lavagem | 1 mL de água, centrifuga \pm 3500 rpm, 3 min |
| Eluição | 2 mL de metanol, centrifuga \pm 3500 rpm, 3 min |
| Secagem | 50°C sob pressão, \pm 100 min |
| Ressuspensão | 200 μ L de metanol 50% em água ultrapura |

Quadro 4 - Sumário da técnica analítica por HPLC-PDA desenvolvida para quantificação de zidovudina e efavirenz

| | | | |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------|----|
| Coluna | ACE 5 C18, 100 x 4,6 mm, 5 μ m | | |
| Fase móvel A | Acetonitrila | | |
| Fase móvel B | Dietanolamina: água ultrapura pH 7,8 | | |
| Gradiente de FM | Tempo (min) | %A | %B |
| | 0,0 | 14 | 86 |
| | 10,0 | 14 | 86 |
| | 13,5 | 30 | 70 |
| | 14,5 | 60 | 40 |
| | 19,0 | 60 | 40 |
| | 20,0 | 14 | 86 |
| | 25,0 | 14 | 86 |
| Fluxo | Tempo (min) | mL/min | |
| | 0,0 | 0,5 | |
| | 9,5 | 0,5 | |
| | 14,5 | 2,0 | |
| | 19,5 | 2,0 | |
| | 23,0 | 0,5 | |
| | 25,0 | 0,5 | |
| Detector PDA | AZT | $\lambda = 267$ nm | |
| | EFZ | $\lambda = 249$ nm | |
| | MPPH | $\lambda = 240$ nm | |
| Volume de injeção | 30 μ L | | |
| Temperatura | ambiente | | |
| Tempo de corrida | 25 min | | |

Legenda: FM = fase móvel; AZT = zidovudina; EFZ = efavirenz; MPPH = 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína

A definição dos comprimentos de onda de absorção para cada fármaco foi estabelecida após revisão bibliográfica e realização de testes analíticos do espectro de absorbância na faixa do ultravioleta e nos tempos de retenção dos analitos utilizando o HPLC, escolhendo-se aqueles que apresentassem área

satisfatória com menor interferência de outros picos. Os espectros UV estão ilustrados nas Figuras 3 e 4.

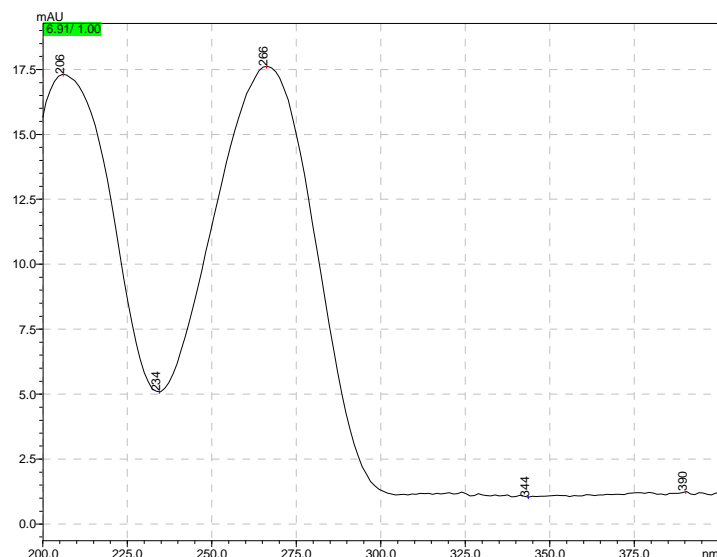


Figura 3 - Espectro UV da zidovudina

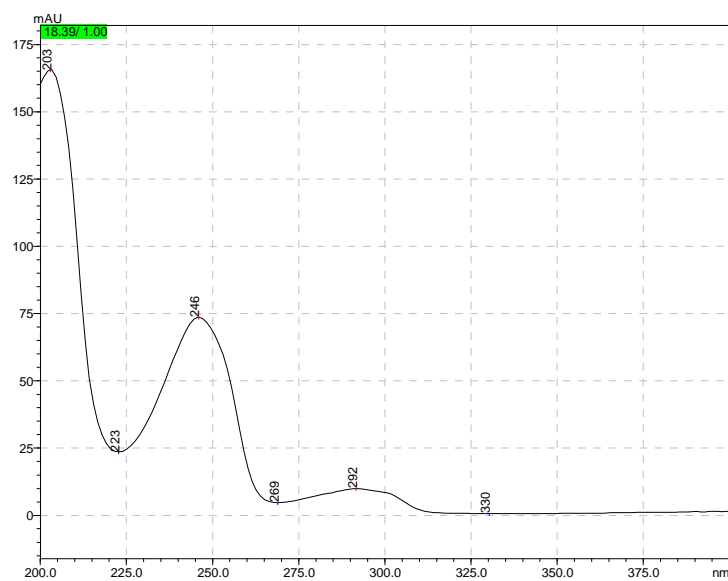


Figura 4 - Espectro UV do efavirenz

A ordem de eluição dos fármacos foi obtida por meio de injeções individuais dos padrões, conforme os respectivos tempos de retenção representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Ordem de eluição da zidovudina, 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína e efavirenz com seus respectivos tempos de retenção

| Fármaco | tR (min) |
|---------|----------|
| AZT | 6,5 |
| MPPH | 16,6 |
| EFZ | 18,2 |

Legenda: tR = tempo de retenção em minutos; AZT = zidovudina; EFZ = efavirenz; MPPH = 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína

A separação cromatográfica dos picos de zidovudina, MPPH e efavirenz está ilustrada na Figura 5.

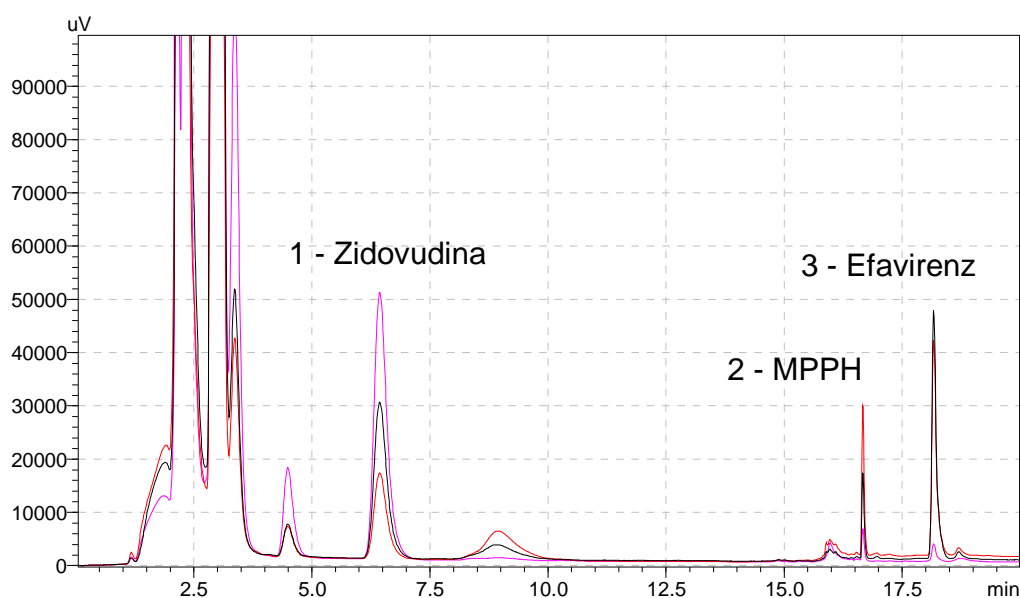


Figura 5 - Cromatograma referente à análise da solução padrão dos fármacos: 1- zidovudina (3000 ng/mL); 2- MPPH (4000 ng/mL); 3- efavirenz (3000 ng/mL). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetoneitrila:dietanolamina em água pH 7,83; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 µL. Detecção 240 (preto), 249 (vermelho) e 267 nm (rosa)

4.2 Validação da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de zidovudina e efavirenz em plasma

A seguir, estão descritos os resultados da validação obtidos segundo parâmetros da RE nº 899/2003 da ANVISA.

4.2.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada mediante análise de plasma branco de diferentes indivíduos e de plasma contaminado com o padrão interno (Figuras 6 e 7). Observa-se que não houve interferência dos componentes do plasma na amostra. Além disso, analisou-se a possível intervenção de onze fármacos (ácido ascórbico, alopurinol, atenolol, diclofenaco de sódio, dipirona, fluconazol, lamivudina, omeprazol, paracetamol, quinidina e sulfametoxazol) previamente selecionados. Destas análises foram obtidos os cromatogramas representados nas Figuras de 13 a 22 (Anexo 3). Observou-se que nenhum dos fármacos avaliados apresentou o mesmo tempo de retenção dos fármacos estudados, fornecendo separação cromatográfica satisfatória.

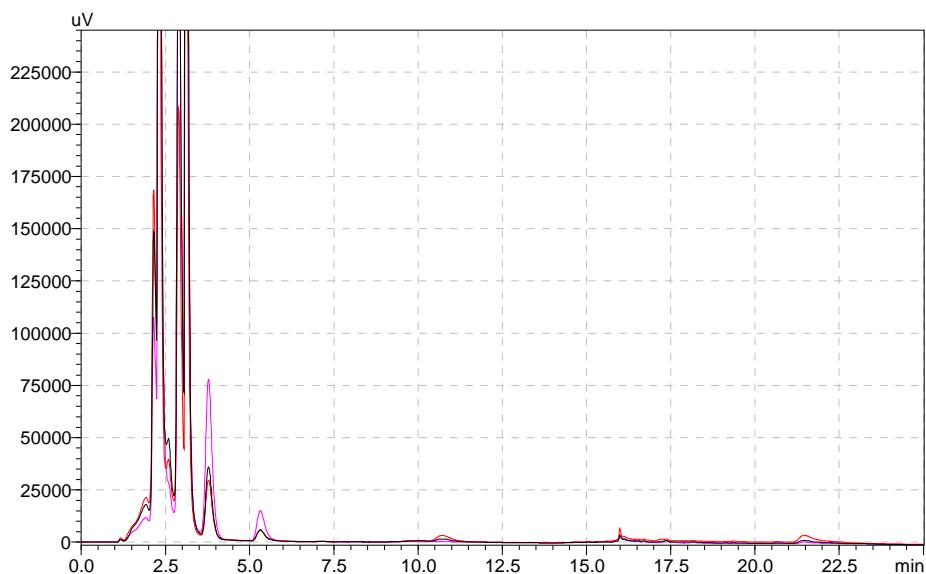


Figura 6 - Cromatograma referente à análise de plasma branco. Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (vermelho) e 267 nm (rosa)

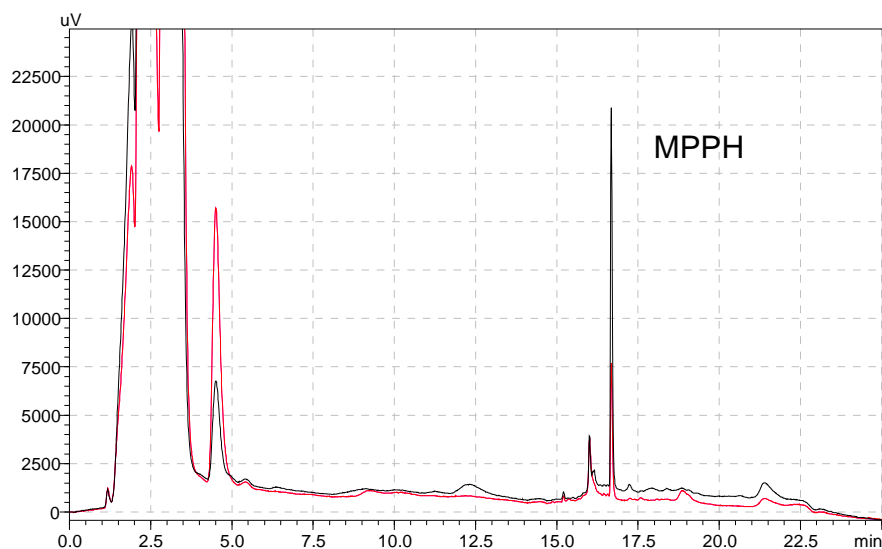


Figura 7 - Cromatograma referente à análise da amostra zero, com o padrão interno MPPH (4000 ng/mL). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (vermelho) e 267 nm (rosa)

4.2.2 Linearidade e Curva de calibração

A linearidade da técnica foi avaliada utilizando amostras de plasma branco enriquecidas com padrões de zidovudina e efavirenz em seis diferentes concentrações (50, 200, 500, 1000, 3000 e 5000 ng/mL). As equações da reta e os respectivos coeficientes de regressão linear estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de linearidade obtidos na validação da técnica desenvolvida para quantificar zidovudina e efavirenz

| | Lote | Equação da reta | r |
|------------|------|-------------------------------|---------|
| Zidovudina | 1 | $y = 0,002396 x \pm 0,01456$ | 0,99991 |
| | 2 | $y = 0,0023717 x \pm 0,0283$ | 0,99978 |
| | 3 | $y = 0,0023474 x \pm 0,07091$ | 0,99916 |
| Efavirenz | 1 | $y = 0,0007755 x \pm 0,01641$ | 0,99914 |
| | 2 | $y = 0,0006519 x \pm 0,01817$ | 0,99278 |
| | 3 | $y = 0,0006681 x \pm 0,01486$ | 0,99473 |

Legenda: y = concentração do analito; x = razão da área do analito/padrão interno; r = coeficiente de correlação

As Figuras 8 e 9 ilustram as curvas de calibração utilizadas nas análises quantitativas de zidovudina e efavirenz.

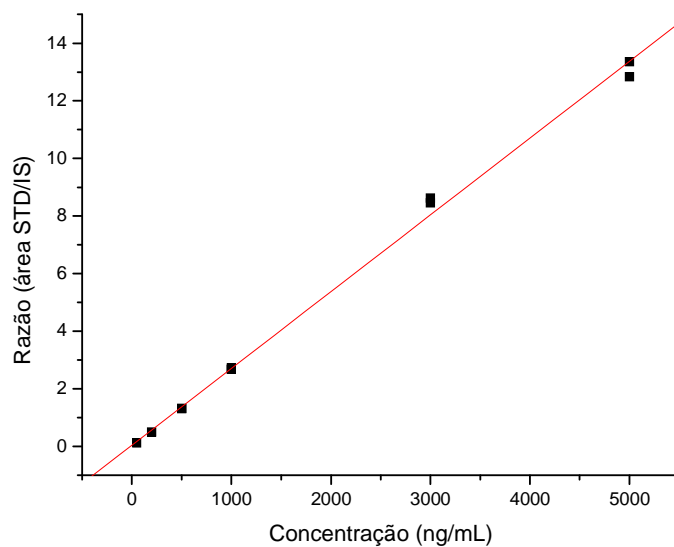


Figura 8 - Curva de calibração obtida para zidovudina referente ao lote 1. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 5000 ng/mL

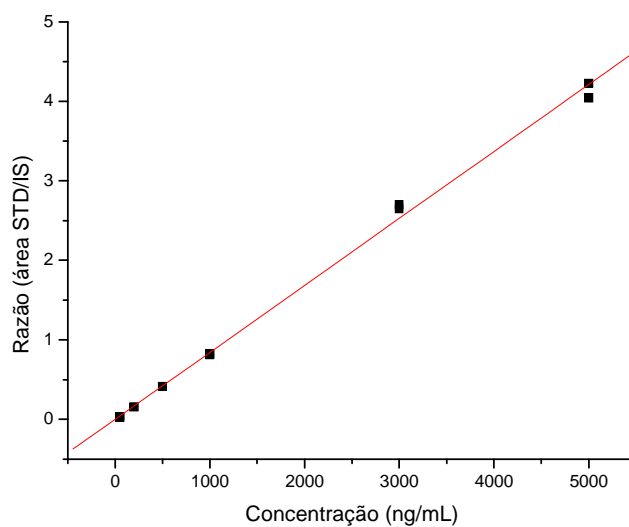


Figura 9 - Curva de calibração obtida para efavirenz referente ao lote 1. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 5000 ng/mL

4.2.3 Limite inferior de quantificação

A figura 10 ilustra um cromatograma obtido da amostra do limite inferior de concentração de zidovudina e efavirenz a 50 ng/mL e padrão interno a 4000 ng/mL.

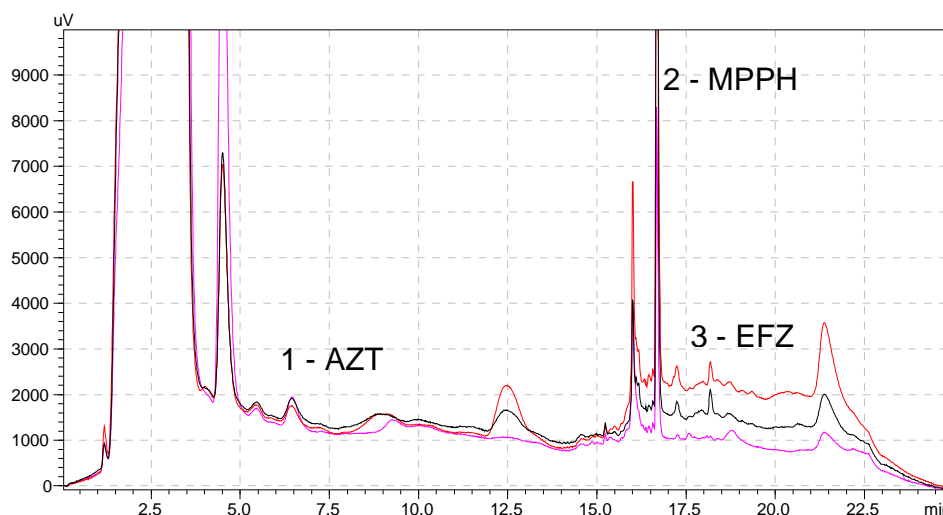


Figura 10 - Cromatograma referente à análise da amostra LIQ (50 ng/mL) de zidovudina e efavirenz. Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

4.2.4 Recuperação, Precisão e Exatidão

A Tabela 4 apresenta os valores de recuperação e precisão (coeficiente de variação) e exatidão (erro relativo) intra e inter-dia, em diferentes concentrações de zidovudina e efavirenz, obtidos pela técnica desenvolvida.

Tabela 4 - Valores de recuperação, precisão e exatidão obtidos para zidovudina e efavirenz utilizando a técnica desenvolvida em HPLC-PDA

| | Conc. nominal ng/mL | Lotes | Conc. obtida (ng/mL) | Recup absol. (%) | Precisão (CV)% | | Exatidão (ER)% | |
|-----|------------------------|-------|-------------------------|---------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | | | | | Intra-ensaio | Inter-ensaio | Intra-ensaio | Inter-ensaio |
| | | | | | | | | |
| AZT | LIQ (50) | 1 | 43,36 | ... | 1,41 | 9,86 | 13,27 | 8,20 |
| | | 2 | 43,21 | | 1,17 | | 13,57 | |
| | | 3 | 51,13 | | 4,09 | | 2,25 | |
| | CQB (100) | 1 | 91,33 | 88 | 8,30 | 4,83 | 8,67 | 3,29 |
| | | 2 | 99,66 | | 5,36 | | 0,34 | |
| | | 3 | 99,15 | | 5,49 | | 0,85 | |
| | CQM (2000) | 1 | 1924,92 | 84 | 4,29 | 6,15 | 3,75 | 9,64 |
| | | 2 | 1703,83 | | 0,70 | | 14,81 | |
| | | 3 | 1793,05 | | 2,02 | | 10,35 | |
| | CQA (4000) | 1 | 4012,10 | 79 | 1,42 | 3,66 | 0,30 | 1,12 |
| | | 2 | 3916,09 | | 3,34 | | 2,10 | |
| | | 3 | 4206,29 | | 6,24 | | 5,16 | |
| EFZ | LIQ (50) | 1 | 42,35 | ... | 5,54 | 17,79 | 15,30 | 15,37 |
| | | 2 | 42,47 | | 1,09 | | 15,07 | |
| | | 3 | 42,12 | | 4,60 | | 15,76 | |
| | CQB (100) | 1 | 88,01 | 98 | 7,75 | 0,73 | 11,99 | 12,72 |
| | | 2 | 86,88 | | 3,13 | | 13,12 | |
| | | 3 | 86,94 | | 1,36 | | 13,06 | |
| | CQM (2000) | 1 | 1980,72 | 92 | 4,01 | 7,44 | 0,96 | 8,72 |
| | | 2 | 1728,34 | | 2,02 | | 13,58 | |
| | | 3 | 1767,76 | | 1,93 | | 11,61 | |
| | CQA (4000) | 1 | 3989,60 | 87 | 0,98 | 3,45 | 0,26 | 3,47 |
| | | 2 | 4151,87 | | 1,36 | | 3,80 | |
| | | 3 | 4274,60 | | 1,45 | | 6,86 | |

Legenda: Conc = concentração; CV = coeficiente de variação; Recup absol = recuperação absoluta; ER = erro relativo; AZT = zidovudina; EFZ = efavirenz; LIQ = limite inferior de quantificação; CQB = amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM = amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA = amostra de controle de qualidade de alta concentração.

As amostras de plasma para o teste de recuperação foram enriquecidas com três diferentes concentrações dos analitos, sendo que, para cada concentração, os testes foram realizados em quintuplicata. Os valores médios da recuperação absoluta para os analitos estão representados na Tabela 4, sendo a recuperação média do MPPH de 89%.

4.3 Perfil clínico e quantificação dos fármacos efavirenz e zidovudina no plasma dos sujeitos em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina

Para avaliar a aplicabilidade da técnica, foram analisadas amostras de plasma de sujeitos em tratamento com zidovudina e efavirenz. As concentrações obtidas destes fármacos e o perfil clínico dos sujeitos da pesquisa estão apresentadas na Tabela 5. Um cromatograma representativo da análise destas amostras está ilustrado na Figura 11.

Tabela 5 - Tempo de terapia antirretroviral, carga viral, contagem de linfócitos TCD4 e concentrações plasmáticas de zidovudina e efavirenz obtidos dos 12 sujeitos participantes deste estudo

| Sujeito | Tempo TARV (meses) | Carga Viral (cópias/mL) | | LTCD4 (células/mm ³) | | Concentração plasmática obtida | |
|------------|--------------------|-------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------------|-------------|
| | | antes TARV | última com TARV | Antes TARV | último com TARV | AZT (ng/mL) | EFZ (ng/mL) |
| 1 | 52 | >500000 | < 50 | 343 | 460 | < LIQ | 1059,87 |
| 2 | 70 | 270000 | < 50 | 331 | 822 | < LIQ | 1860,39 |
| 3 | 13 | 23464 | 277 | 207 | 128 | < LIQ | 1868,21 |
| 4 | 08 | 24117 | NC | 344 | NC | 52,30 | 3599,16 |
| 5 | 42 | 68368 | < 50 | 224 | 461 | < LIQ | 2177,53 |
| 6 | 19 | 149804 | < 50 | 251 | 348 | < LIQ | 2476,73 |
| 7 | 70 | 138159 | < 50 | 158 | 309 | < LIQ | 2940,64 |
| 8 | 05 | 7979 | < 50 | 284 | 439 | < LIQ | 1288,49 |
| 9 | 30 | 18442 | < 50 | 199 | 807 | 53,22 | 2025,44 |
| 10 | 53 | 112613 | < 50 | 46 | 243 | < LIQ | 1677,50 |
| 11 | 19 | 193034 | < 50 | 122 | 268 | 80,83 | 972,53 |
| 12 | 11 | 224080 | < 50 | 270 | 558 | < LIQ | 1569,84 |
| Média ± DP | 33 ± 24 | 144172 ± 141861 | < 50 | 231 ± 92 | 440 ± 220 | 62 ± 16 | 1960 ± 766 |

Legenda: TARV = terapia antirretroviral; NC = não consta a informação no prontuário; LTCD4 = contagem de linfócitos TCD4; AZT = zidovudina; EFZ = efavirenz; DP = desvio padrão; LIQ = limite inferior de quantificação

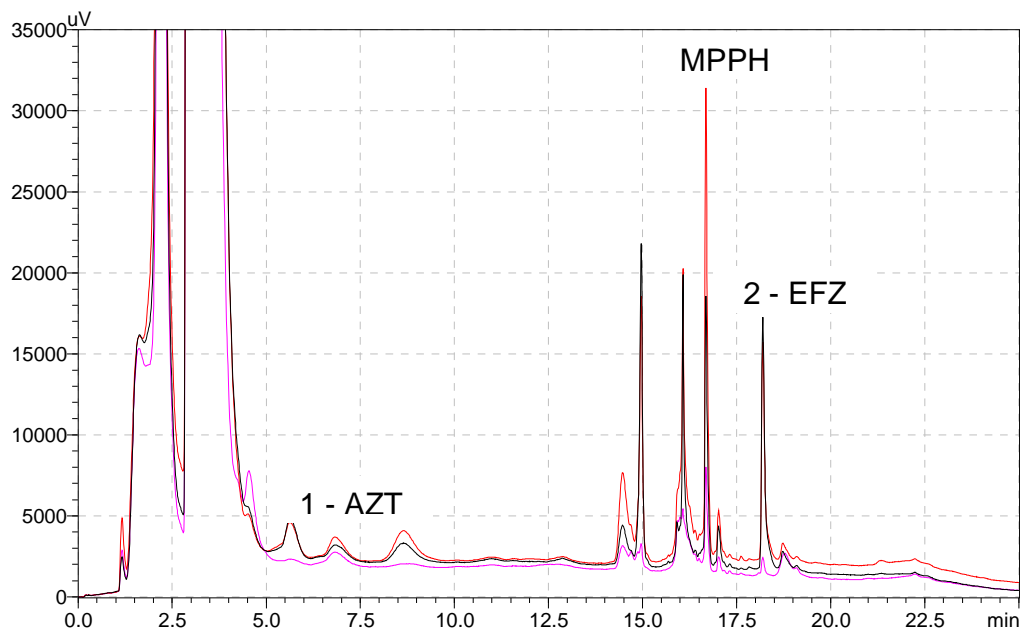


Figura 11 - Cromatograma referente à análise de amostra de plasma de sujeito em terapia antirretroviral. Concentrações determinadas: 1 - 80,83 ng/mL de zidovudina; 2 - 972,53 ng/mL efavirenz. Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

As infecções oportunistas registradas nos prontuários dos sujeitos estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Infecções oportunistas diagnosticadas nos sujeitos participantes deste estudo fazendo uso do protocolo terapêutico antirretroviral AZT/3TC/EFZ com acompanhamento clínico no SAE do HC/UFG

| Infecções oportunistas | (n = 12) |
|-------------------------------|-----------------|
| Citomegalovírus | 83,33% (10) |
| Toxoplasmose | 41,67% (5) |
| Herpes zoster | 8,33% (1) |
| Hepatite C | 8,33% (1) |

5 DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de zidovudina e efavirenz em plasma

No desenvolvimento desta técnica analítica várias condições cromatográficas foram testadas para obter satisfatória separação cromatográfica em um menor intervalo de tempo de corrida. Para a escolha dos solventes foram consideradas as seguintes características: tempo de corrida, separação cromatográfica, custo, compatibilidade com a coluna de fase reversa e toxicidade dos mesmos.

Duas colunas de diferentes tamanhos foram testadas, uma com 250 mm e outra com 100 mm de comprimento. Ambas apresentaram separação cromatográfica entre os picos e LIQ satisfatórios, diferindo apenas quanto ao tempo de corrida. A menor coluna foi escolhida por apresentar praticamente a metade do tempo de corrida, quando comparado à de 250 mm, sendo este o critério adotado para escolha. Esta coluna escolhida proporciona resultados mais rápidos, possibilitando intervenções terapêuticas em tempo hábil.

As fases móveis testadas foram constituídas de água, metanol, dietanolamina, acetonitrila, ácido acético, ácido fórmico e de tampões fosfato (sódio e potássio), acetato (sódio, potássio e amônio) e carbonato de sódio, em diferentes molaridades, faixas de pH, proporções e combinações entre os constituintes das mesmas.

O uso de tampões, embora muito citado na literatura como fases móveis para separação de AZT e EFZ, proporcionou uma linha de base insatisfatória, não permitindo a obtenção de um LIQ de 50 ng/mL. A redução do pH, utilizando soluções de ácidos em água, ou tampões de baixo pH reduziram o tempo de retenção do EFZ, porém reduziu também o do AZT. Desta forma, o AZT

acabava saindo precocemente, de forma que havia interferentes do plasma em tempos de retenção muito próximos ao do analito, excluindo-se estas soluções como fases móveis (VERWEIJ-VAN WISSEN *et al.*, 2005; AYMARD *et al.*, 2003; REZK *et al.*, 2003; RENTSCH, 2003; FAN & STEWART, 2002; PROUST *et al.*, 2000; TAN & BOUDINOLT, 2000).

O conhecimento do pKa dos compostos (zidovudina, pKa = 9,8 e efavirenz, pKa = 10,2) permitiu prever o comportamento dos mesmos na fase móvel e estacionária, contribuindo na escolha do melhor pH para a fase móvel (DRUGBANK, 2009).

Das fases móveis avaliadas, a acetonitrila: dietanolamina (pH 7,83) foi a que apresentou os melhores resultados, proporcionando completa separação entre os dois antirretrovirais analisados, e destes com o padrão interno MPPH, empregado para a análise quantitativa.

A interação entre a coluna cromatográfica em fase reversa, a fase móvel e os analitos contribuíram para a definição da ordem de eluição dos mesmos. Desta forma, observa-se que o AZT possui menor afinidade pela fase estacionária que o EFZ, fazendo com que o EFZ fique mais tempo retido na coluna, necessitando maior quantidade de solvente menos polar (ACN) para ser eluído. Por outro lado, o AZT, por ser uma molécula mais polar, é arrastado mais facilmente pela fase móvel, fazendo com que seu tempo de retenção seja menor que do EFZ.

A escolha do padrão interno deve ser baseada na garantia da ausência desta substância na matriz biológica analisada. Foram testados outros antirretrovirais (estavudina, nevirapina, atazanavir e didanosina) na certeza de que eles não estariam presentes nas amostras coletadas, já que não constavam no protocolo terapêutico em estudo. Destes, a estavudina apresentou melhores resultados, porém, devido sua alta polaridade, obteve-se baixo tempo de retenção, fazendo com que esta fosse eluída junto com os interferentes do plasma, proporcionando pouca separação cromatográfica. Como os pacientes em TARV fazem uso de medicamentos de outras classes terapêuticas, optou-se por testar uma substância exógena não dotada de

atividade farmacológica, garantindo a inexistência da substância na matriz biológica. A substância testada, MPPH, foi escolhida por apresentar boa resolução cromatográfica (BRASIL, 2003).

Em cromatografia líquida, podem ser utilizados os sistemas de bombeamento isocrático ou por gradiente. O sistema isocrático possibilita uma maior estabilidade do equipamento, todavia, nas condições estudadas, tornou-se conveniente alterar a composição e o fluxo da fase móvel durante a análise cromatográfica. Este sistema melhorou a resolução entre os interferentes do plasma e o AZT, além de reduzir o tempo de retenção do efavirenz, evitando um longo tempo de corrida analítica (CIOLA, 2003).

Em técnicas cromatográficas, é desejável pequeno volume de injeção para evitar alargamento dos picos e saturação do detector, além de permitir coleta de menor volume de sangue do paciente. Foram testados volumes de injeção de 20 a 80 μL . O volume de 20 μL não forneceu o LIQ desejado de 50 ng/mL, e com volumes acima de 40 μL observou-se um alargamento do pico devido à saturação do detector. Desta forma, foi escolhido o volume de injeção de 30 μL , proporcionando separação cromatográfica e LIQ adequados (CIOLA, 2003).

Paralelo a estes testes realizados otimizou-se a resposta do detector PDA, estabelecendo os comprimentos de onda específicos para cada fármaco. O detector UV de varredura utilizado proporciona análises em diferentes comprimentos de onda em uma mesma corrida. Foram escolhidos os comprimentos de onda de 267 nm para o AZT e 249 nm para o EFZ, que proporcionaram uma menor interferência dos componentes do plasma.

Durante o desenvolvimento da técnica analítica, estudou-se o processo de extração dos analitos da matriz biológica. Três tipos de métodos extrativos foram testados: precipitação protéica, extração líquida-líquida e extração em fase sólida.

Primeiramente, tentou-se extrair os fármacos por precipitação protéica utilizando metanol e/ou acetonitrila. Foram feitos testes em meios neutro, básico e ácido para avaliar a recuperação frente ao diferentes pH. Não foi possível

observar influência do pH na extração, uma vez que os produtos da extração não apresentaram aspecto límpido, o que poderia comprometer o bom funcionamento do equipamento, além de haver muito interferente do plasma no cromatograma, reduzindo drasticamente a resolução dos picos.

Posteriormente, testou-se extrair os analitos pelo método extrativo líquida-líquida. Como solventes, foram utilizados metil-terc-butil-éter (MTBE) e/ou mistura MTBE:diclorometano:acetato de etila (30:30:40) em diferentes faixas de pH. Foi realizado, então, a secagem do extrato, seguida da ressuspensão com metanol, água ou acetonitrila em diferentes proporções e combinações. Observou-se, ao final deste método, presença considerável de interferentes, impedindo a obtenção de um LIQ de 50 ng/mL como desejado. Além disso, este método utiliza solventes tóxicos, o que não é desejável.

Devido o insucesso dos dois métodos citados anteriormente, testou-se assim, o método SPE. A eficiência dos seguintes cartuchos foi avaliada: Bond elution C18 Varian, Supelco e Strata C-18E Phenomenex, todos de 500 mg de fase estacionária e 3 mL de capacidade. Como critérios de escolha avaliou-se a separação dos picos, resolução entre os mesmos, menor efeito dos interferentes do plasma e custo dos cartuchos. Assim, o cartucho Strata da Phenomenex foi o escolhido para extrair os analitos deste estudo.

Para acondicionamento dos cartuchos, testou-se metanol, água e diferentes soluções aquosas em diferentes concentrações e faixas de pH. Metanol seguido da água é indicado no condicionamento dos cartuchos, sendo esta a técnica definida uma vez apresentou melhores resultados em termos de extração (CIOLA, 2003).

Foi verificada a importância da lavagem do cartucho após a adição do plasma. Utilizaram-se diferentes solventes e soluções aquosas em diferentes concentrações e faixas de pH durante este processo. A lavagem dos cartuchos com água diminuiu a presença de interferentes do plasma sem, contudo, reduzir a extração dos analitos. Este fato foi comprovado analisando-se as frações de lavagem e observando que não havia analitos presentes nas mesmas.

Para proceder a eluição dos fármacos, foram testados metanol, água e acetonitrila em diferentes proporções e combinações. O eluente definido foi o metanol por ser um bom solvente dos analitos. Estes tiveram maior afinidade pelo metanol que pela fase estacionária, sendo mais facilmente arrastados pelo solvente escolhido. A escolha do eluente metanol pautou-se na observação de maior recuperação dos analitos, priorizando um solvente mais fácil para evaporar, contribuindo para a redução do tempo total da análise, além do custo do solvente.

Na ressuspensão avaliou-se metanol, água e acetonitrila em diferentes proporções e combinações. O solvente que proporcionou melhor resultado para solubilizar os fármacos após a secagem do eluato foi o metanol 50% em água ultra pura.

A partir dos critérios anteriormente discutidos, definiu-se a técnica citada na Metodologia, considerada satisfatória para extração e análise dos fármacos estudados. Com o uso da técnica desenvolvida, observou-se que a zidovudina eluiu antes do efavirenz, requerendo menos solvente orgânico na fase móvel, já que aquela é uma substância mais polar que o efavirenz.

Para a obtenção de soluções de trabalho dos antirretrovirais foi necessário o preparo de soluções estoque dos padrões de zidovudina e efavirenz, em virtude da dificuldade de preparar soluções pouco concentradas, de reduzir erro operacional e de economizar o uso dos padrões primários. As soluções estoque foram preparadas analiticamente a uma concentração de 1,0 mg/mL, utilizando metanol como solvente e armazenadas em *freezer* a -20 °C. Segundo estudos realizados por Aymard et al. (2000), nestas condições, as soluções são estáveis, por pelo menos 1 ano.

5.2 Validação da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de zidovudina e efavirenz em plasma

A fim de garantir que a técnica desenvolvida forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos

analíticos, foram avaliados neste trabalho sete parâmetros da validação para o método cromatográfico de acordo com a RE nº 899/2003 da ANVISA: linearidade, especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e recuperação. Porém, fazer a validação de uma técnica analítica não implica que ela esteja isenta de erros e que possa ser usada indiscriminadamente, mas permite a obtenção de informações estatisticamente confiáveis, confirmando a adequação da técnica para o uso proposto (BRASIL, 2003).

O parâmetro linearidade denota a capacidade da técnica em fornecer resultados quantitativos diretamente proporcionais à quantidade de analito presente na amostra. A técnica mostrou-se linear no intervalo de 50 a 5000 ng/mL tanto para zidovudina quanto efavirenz, obtendo resultados de regressão linear (r) maiores que 0,99. Tais valores estão de acordo com o preconizado pela ANVISA, que estabelece um valor mínimo de 0,98 para validação de metodologias analíticas que utilizam matrizes biológicas (BRASIL, 2003).

A avaliação da especificidade da técnica investigou a interferência de 11 fármacos: ácido ascórbico, alopurinol, atenolol, diclofenaco de sódio, dipirona, fluconazol, lamivudina, omeprazol, paracetamol, quinidina e sulfametoxazol. Nenhuma interferência foi verificada, o que demonstra a capacidade da técnica em quantificar, sem equívoco, os fármacos na presença destas 11 substâncias. Além disso, amostras de plasma de diferentes indivíduos foram testadas, para avaliar interferência de substâncias endógenas. Nenhuma variação considerada dos tempos de retenção foi observada.

A menor concentração avaliada no estudo corresponde ao limite inferior de quantificação, o qual apresentou variação menor que 20%. Desta forma, o LIQ da técnica validada foi de 50 ng/mL para zidovudina e para o efavirenz. O coeficiente de variação obtido foi de 9,86% e 17,79% para zidovudina e efavirenz, respectivamente, em concordância com as normas da ANVISA que estabelece variação máxima de 20%. Alguns estudos com estes fármacos conseguiram LIQ inferior a 50 ng/mL, sendo que alguns deles utilizaram como

detector a espectrometria de massa, que consegue detectar concentrações bem inferiores a esta, na faixa de 10 ng/mL (JUNG *et al.*, 2007; BRASIL, 2003; FAN & STEWART, 2002; PROUST *et al.*, 2000).

Uma das formas de calcular o limite de detecção é dividir o LIQ por 5. Na técnica desenvolvida, o limite de detecção calculado por esta fórmula é 10 ng/mL. Observou-se, com esta concentração, a detecção dos picos, confirmando o valor teórico (BRASIL, 2003).

A precisão intra e inter-ensaio apresentou variação menor que 8,30% e 7,75% para controles de qualidade de zidovudina e efavirenz, respectivamente. Estes resultados estão satisfatórios segundo a ANVISA, que preconiza valores inferiores a 15% para coeficiente de variação, assim como os dados da literatura, que variam de 0,4 a 14% (VERWEIJ-VAN WISSEN *et al.*, 2005; DAILLY *et al.*, 2004; BRASIL, 2003; REZK *et al.*, 2003; RENTSCH, 2003; FAN & STEWART, 2002; PROUST *et al.*, 2000; TAN & BOUDINOLT, 2000). De acordo com as Tabelas 5 e 6 percebe-se que a técnica utilizada fornece resultados semelhantes nas três concentrações avaliadas de cada fármaco. Portanto, a técnica mostra-se precisa dentro do intervalo de concentração avaliado para quantificação de zidovudina e efavirenz em plasma humano.

A exatidão intra e inter-ensaio da zidovudina apresentou variações de 14,81% a 5,60% e 8,20% a 1,12%, respectivamente. Para efavirenz, a exatidão intra e inter-ensaio foi de 15,76% a 6,86% e 15,37% a 3,47%, respectivamente. Estes resultados são satisfatórios segundo a ANVISA, que preconiza variações inferiores a 15% para as amostras de controle de qualidade e 20% para o LIQ, assim como os dados da literatura, que variam de 11,70% a 1,00% (VERWEIJ VAN WISSEN *et al.*, 2005; BRASIL, 2003; REZK *et al.*, 2003; FAN & STEWART, 2002; PROUST *et al.*, 2000; TAN & BOUDINOLT, 2000).

A recuperação absoluta é obtida pelo quociente das áreas de amostras extraídas e amostras não submetidas ao processo de extração. Os valores médios de recuperação para zidovudina e efavirenz foram de 84% e 92%, respectivamente. Estes dados condizem com os achados da literatura, que variam geralmente de 69 a 102% para o AZT (JUNG *et al.*, 2007; VERWEIJ-

VAN WISSEN *et al.*, 2005; REZK *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2002; SIMON *et al.*, 2001; AYMARD *et al.*, 2000; TAN *et al.*, 2000) e 80 a 97,2 % para o EFZ (JUNG *et al.*, 2007; ROUZES *et al.*, 2004; RENTSCH *et al.*, 2003; AYMARD *et al.*, 2000; PROUST *et al.*, 2000).

5.3 Perfil clínico e quantificação de zidovudina e efavirenz no plasma dos sujeitos

A amostra consistiu de 12 sujeitos, representando 15% dos pacientes em uso deste protocolo terapêutico no período de coleta das amostras. O tempo médio de terapia antirretroviral dos sujeitos até a data da coleta de sangue foi de 33 ± 24 meses, não havendo nenhuma queixa de reação adversa relatada nos prontuários neste período.

A supressão viral é essencial para a efetividade do tratamento antirretroviral, sendo que na supressão parcial ocorre falha virológica mais precoce e emergente resistência viral. Portanto, com a potência atual da TARV, a adesão torna-se uma das mais importantes variáveis que interferem na efetividade do primeiro esquema antirretroviral, sendo o protocolo de primeira escolha a associação AZT/3TC+EFZ (BRASIL, 2009; BRASIL, 2008).

Foi avaliado o perfil de dispensação de ARV aos sujeitos desta pesquisa, nos 12 meses anteriores à coleta (ressalta-se que nem todos os sujeitos estavam em TARV há 12 meses). Observou-se que foram dispensados aos sujeitos avaliados medicamentos suficientes para 298 ± 80 dias, que foram consumidos em 312 ± 88 dias. Com estes dados, observa-se uma omissão de 15 ± 27 % das doses. Há relatos de pacientes que compartilham medicamentos com o parceiro, quando fazem uso do mesmo protocolo terapêutico, o que pode influenciar nestes números. Conforme dados do Programa Nacional DST/AIDS, para garantir a supressão viral sustentada é necessário que o paciente utilize mais de 95% das doses prescritas. Desta forma, há necessidade de um estudo mais detalhado para acompanhar a adesão dos sujeitos ao tratamento,

podendo-se aplicar a monitoração terapêutica aos pacientes considerados de baixa adesão (BRASIL, 2009).

Os principais parâmetros para estimar o prognóstico da infecção pelo HIV são: quantificar a concentração plasmática da carga viral do HIV e monitorar a evolução da contagem de linfócitos T-CD4+, sendo esta última utilizada internacionalmente como marcador do estado imunológico dos indivíduos (BRASIL, 2008).

Todas as coletas de sangue dos sujeitos da pesquisa foram realizadas no período vespertino, correspondendo, em média, a 8 h após a administração do AZT e 20 h do EFZ. As quantidades de zidovudina encontradas na maioria das amostras de plasma dos sujeitos estavam em concentrações abaixo do LIQ, ou seja, menores que 50 ng/mL. Este fato pode ser facilmente justificado pela meia vida de eliminação do AZT, que fica em torno de 1 hora, assim como pelo fato do AZT ser um pró-fármaco. Como a coleta de sangue foi realizada com grande intervalo de tempo após a administração da zidovudina, pode-se sugerir que praticamente todo o AZT foi metabolizado à sua forma ativa 5-trifosfato de zidovudina. Desta forma, a pequena fração de zidovudina não metabolizada permitiu a detecção do AZT em todas as amostras, porém, devido à fosforilação, quantificou-se o AZT em apenas três delas. A baixa concentração plasmática não foi observada com o efavirenz, uma vez que sua meia-vida de eliminação plasmática é muito superior à da zidovudina, estando em torno de 9 h, além deste fármaco não ser metabolizado para se tornar ativo (HARDMAN & LIMBIRD, 2003; SILVA, 2002).

Outro fator indicador da adesão à terapia antirretroviral destes pacientes, em particular ao AZT, é o fato de ter observado concentrações plasmáticas do efavirenz dentro da faixa terapêutica. Sabe-se que, no protocolo terapêutico estudado, a adesão ao efavirenz é muito menor que ao AZT/3TC, devido aos eventos adversos relacionados com o efavirenz, em especial os distúrbios do sono. Desta forma, ao observar uma boa adesão ao efavirenz, a chance da adesão à zidovudina ser maior é muito grande, corroborando com os achados

nos exames analíticos, onde foi detectado AZT em todas as amostras (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

Para evitar que a concentração de AZT no plasma estivesse muito baixa, houve várias tentativas de coletar o sangue dos sujeitos poucas horas após a administração da zidovudina, todavia, a indisponibilidade dos sujeitos e também da sala de coleta das amostras impediu que esta alteração fosse realizada.

A zidovudina foi quantificada no plasma de 3 sujeitos. A média das concentrações foi de $62,12 \pm 16,21$ ng/mL. O efavirenz foi quantificado em todas as amostras, obtendo concentração plasmática média de 1960 ± 766 ng/mL, com uma variação inter-individual de 41,09%. Nenhum sujeito estava com concentrações de efavirenz acima da faixa terapêutica (1000 - 4000 ng/mL) e apenas 1 sujeito estava com concentração ligeiramente abaixo desta (970 ng/mL). Estes dados podem ser relacionados com os de dispensação dos antirretrovirais aos sujeitos, que observou uma adesão maior que 85%. Conclui-se que, embora estes sujeitos possam estar omitindo algumas doses, eles estão fazendo uso dos fármacos prescritos.

Pelos dados clínicos dos sujeitos em estudo observou-se que ocorreu uma redução de 99% da carga viral desde o início do tratamento, sendo que 83,33% (10) dos sujeitos apresentaram carga viral indetectável nos últimos exames laboratoriais, ou seja, menor que 50 cópias/mL.

A contagem de linfócitos TCD4 aumentou em média 127% com a TARV, sendo que houve diminuição em apenas um sujeito. No início da TARV a contagem de LTCD4 foi de 231 ± 92 células/mm³ aumentando para 440 ± 220 células/mm³ no último exame, o que reflete melhora da resposta imunológica dos indivíduos.

O único sujeito com concentração plasmática do EFZ abaixo da janela terapêutica apresentou carga viral controlada (< 50 cópias/mL) e aumento de 119,67% no número de linfócitos TCD4 durante a TARV. Observou-se que a maior diminuição de carga viral (99,99%) foi para o sujeito com concentração plasmática de 1,06 µg/mL. O único sujeito com carga viral acima de 50 cópias/mL (277 cópias/mL) e com piora na contagem de linfócitos TCD4

apresentou concentração plasmática (1,87 µg/mL) dentro da faixa terapêutica. Vale ressaltar que, a coleta de sangue para a última carga viral e contagem de linfócitos TCD4 foi, em média, 6 meses antes da quantificação do EFZ. Desta forma, a concentração plasmática do efavirenz dentro da faixa terapêutica pode refletir uma melhora da adesão ao tratamento e, possivelmente, uma redução na carga viral e aumento da contagem de linfócitos TCD4 no último exame. Lembrando que, devido às reações adversas ao efavirenz serem mais freqüentes em relação à zidovudina, espera-se maior adesão ao uso deste que do efavirenz. Portanto, como a concentração do efavirenz obtida está dentro da faixa terapêutica para a maioria dos sujeitos, espera-se o mesmo perfil para a zidovudina.

O aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias é um dos parâmetros para definir a AIDS em pessoas vivendo com HIV. Entre as infecções oportunistas mais comumente presentes nestes indivíduos destacam-se: pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (antigamente *P. carinii*), toxoplasmose do sistema nervoso central, tuberculose pulmonar atípica ou disseminada, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus. Conforme observado nos sujeitos do estudo, as infecções oportunistas mais relatadas nos prontuários foram citomegalovírus (83%) e toxoplasmose (46%). Desta forma, observa-se que os dados encontrados dos sujeitos da pesquisa estão de acordo com os citados no guia de recomendações para tratamento de adultos infectados pelo HIV (BRASIL, 2007).

6 CONCLUSÕES

A técnica validada permite analisar amostras de plasma humano contendo zidovudina e efavirenz para finalidade de monitoração terapêutica.

A técnica desenvolvida e validada mostrou-se satisfatória de acordo com os parâmetros de validação analítica preconizadas pela ANVISA para validação de técnica analítica utilizando matriz biológica.

Observou-se que a carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ estão satisfatórios para os sujeitos em terapia antirretroviral, conforme recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.

As concentrações plasmáticas média de zidovudina e efavirenz obtidas com a técnica desenvolvida e validada estão dentro da faixa terapêutica destes fármacos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para complementar e reforçar os resultados obtidos há necessidade de estudar as causas da perda das amostras dos pacientes.

Para que a técnica ofereça melhores subsídios para decisões clínicas é necessário enriquecer os estudos sobre a forma ativa da zidovudina, o 5-trifosfato de zidovudina. É importante também relacionar a resposta clínica com as concentrações plasmática encontradas para zidovudina e trifosfato de zidovudina.

Além disso, o desenvolvimento de uma técnica que possibilite a quantificação simultânea de outros fármacos antirretrovirais utilizados nos demais protocolos terapêuticos amplia sua utilização na prática clínica, assim como sua aplicação em estudos de reações adversas a medicamentos e adesão terapêutica.

8 REFERÊNCIAS

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia**: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

AYMARD, G., LEGRAND, M., TRICHEREAU, N., DIQUET, B. Determination of twelve antirretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 744, p. 227-240, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST e Aids. **Portal informativo sobre AIDS e outras doenças sexualmente transmissíveis**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS80FC39FBPTBRIE.htm>>. Acesso em: 02 set. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV: 2008**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 6. ed. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm>>. Acesso em: 01 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV: 2005/2006**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 6ª ed. Brasília: 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 22 nov. 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**. São Paulo:Edgard Blucher, 2003.179p

DAILLY, E., RAFFIB, F., JOLLIETA, P. Determination of atazanavir and other antirretroviral drugs (indinavir, amprenavir, nelfinavir and its active metabolite M8, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nevirapine and efavirenz) plasma levels by high performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 353–358, 2004.

DONNERER, J.; HAAS, B. J.; KESSLER, H. H. Single-measurement therapeutic drug monitoring of the hiv/aids drugs abacavir, zidovudine, lamivudine, efavirenz, nevirapine, lopinavir and nelfinavir. **Pharmacology**, v. 82, p. 287–292, 2008.

DRUGBANK. **Drugbank Database**. Disponível em: < <http://www.drugbank.ca/> >. Acesso em: 31 mar. 2009.

FAN, B., STEWART, J T. Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 903–908, 2002.

FIGUEIREDO, R M, SINKOC, V M, TOMAZIM, C C, GALLANI, M C B J, COLOMBRINI, M R C. Adesão de pacientes com AIDS ao tratamento com antirretrovirais: dificuldades relatadas e proposição de medidas atenuantes em um hospital escola. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v. 9, n. 4, p. 50-5, julho, 2001.

HARDMAN & LIMBIRD. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Tradução por Carla de Mello Vorsatz. 10^a ed. Rio de Janeiro: 2003.

JUNG, B H.; REZK, N L.; BRIDGES, A S.; CORBETT, A H.; KASHUBA, A D M. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 1095-1104, 2007.

NOTARI, S., BOCEDI, A., IPPOLITO, G., NARCISO, P., PUCILLO, L P., TOSSINI, G., DONNORSO, R P, GASPARRINI, F., ASCENZI, P. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 831, p. 258–266, 2006.

PENG, G.W., CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography**, v. 531, p. 3-50, 1990.

PROUST, V., TOTH, K., HULIN, A., TABURET, A M., GIMENEZ, F., SINGLAS, E. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of the antirretroviral agents amprenavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, delavirdine and afavirens in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 453-458, 2000.

RAIMUNDO JR., I M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83-88, 1997.

RAKHMANNINA, N. Y.; VAN DEN ANKER, J. N.; SOLDIN, S. J. Therapeutic Drug Monitoring of Antirretroviral Therapy. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 18, n. 1, 2004.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 904 p.

RENTSCH, K M. Sensitive and specific determination of eight antirretroviral agents in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 339-350, 2003.

ROUZES, A., BERTHOIN, K., XUEREB, F., DJABAROUTI, S., PELLEGRIN, I., PELLEGRIN, J L., COUPET, A C., AUGAGNEUR, S., BUDZINSKI, H., SAUX, M C., BREILH, D. Simultaneous determination of antirretroviral agents: amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 209-216, 2004.

REZK, N L., TIDWELL, R R., KASHUBA, A D M. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 137-147, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 781, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p.

SIMON, V A.; THIAM, M D.; LIPFORD, L C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-suppressing drugs by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 447-453, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução por CARACELLI, I.; ISOLANI, C.; SANTOS, R. H. A.; FRANCISCO, R. H. P. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SOUZA, M. V. N., ALMEIDA, M. V. Drogas anti-HIV: Passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.

TAN, X.; BOUDINOT, F. D. Simultaneous determination of zidovudine and monophosphate in mouse plasma and peripheral red blood cells by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 740, p. 281-287, 2000.

VANBEL, P., TILQUIN, B.L., SCHOENMAKERS, P.J. Criteria for developing rugged high-performance liquid chromatographic methods. **Journal of Chromatography**, v. 697, p. 3-16, 1995.

VERWEIJ-VAN WISSEN, C P W G M., AARNOUTSE, R E., BURGER, D M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 121–129, 2005.

WHO, World Health Organization. **Dados UNAIDS**: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Disponível em: <[http:// www.unaids.org](http://www.unaids.org)>. Acesso em: 17 jan. 2009.

Referências de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - **NBR 6023**: informação e Documentação. Rio de Janeiro, 2002.

9 ANEXOS

9.1 Parecer do Comitê de Ética

9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Amanda Queiroz Soares, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é Farmácia Hospitalar. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, Farmacêutica Amanda Queiroz Soares, nos telefones (62) 3269-8249 e 8438-3496, Profº Drº Luiz Carlos da Cunha, no telefone (62) 3209-6044 ramal 227 ou Profª Drª Kênnia Rocha Rezende, no telefone (62) 3209-6044 ramal 227. Em casos de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG), nos telefones (62) 3269-8338 e 3269-8426.

Informações importantes sobre a pesquisa

Título: Monitoração dos níveis plasmáticos de fármacos antirretrovirais por CLAE-UV como ferramenta para controlar a adesão e reações adversas em pacientes sob tratamento antirretroviral.

Informações sobre quem está aplicando o termo de consentimento: esta pesquisa será desenvolvida por mim, Amanda Queiroz Soares, farmacêutica graduada pela UFG, CRF-GO 5231, área de atuação em Farmácia Hospitalar e aluna do Mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFG. Estarei sob a coordenação do Profº Drº Luiz Carlos da Cunha e Profª Drª Kênnia Rocha Rezende, professores e pesquisadores da Faculdade de Farmácia da UFG.

Objetivos da pesquisa: Desenvolver um método capaz de quantificar e monitorar os níveis de fármacos (atazanavir, efavirenz, lamivudina, nevirapina, ritonavir, tenofovir e zidovudina) presentes no sangue dos pacientes com acompanhamento no ambulatório de doenças infecto-parasitárias (DIP) do HC/UFG, como ferramenta para avaliar a adesão ao tratamento antirretroviral.

Detalhamento do procedimento: coleta de sangue no ambulatório de DIP do HC/UFG.

Especificação dos riscos, prejuízos, desconfortos, lesões que podem ser provocados pela pesquisa: poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue e/ou nos minutos seguintes. Além disso, poderá ocorrer aparecimento de manchas escuras no local onde foi coletado o sangue.

Informação sobre o direito de pleitear indenização em casos de danos decorrentes de sua participação na pesquisa: o paciente não terá direito de indenização, visto que os riscos não são graves.

Informação sobre o direito de ressarcimento de despesas pela sua participação: o paciente não será ressarcido pelos gastos que tiver durante a pesquisa.

Esclarecimento sobre pagamento ou gratificação financeira pela sua participação: não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação ao paciente. Participarão da pesquisa aqueles que se apresentarem de forma espontânea e voluntária.

Tratamento: O tratamento atual não será mudado, não sofrendo influência dos resultados da pesquisa.

Período de participação: coleta de sangue durante junho de 2007 e setembro de 2008, com datas previamente agendadas.

Garantia de sigilo: o sigilo da sua participação será garantido, somente os pesquisadores terão acesso ao termo de consentimento e aos dados das análises.

Garantia da liberdade na participação: é garantida a liberdade de não aceitação deste convite, bem como abandonar o projeto a qualquer momento durante a pesquisa, sem qualquer prejuízo da continuidade do tratamento atual.

Dados coletados: os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.

Farm^a Amanda Q. Soares

Prof^o Dr^o Luiz Carlos da Cunha

Prof^a Dr^a Kênnia R. Rezende

Consentimento da participação da pessoa como sujeito da pesquisa

Eu, _____, RG _____,

CPF _____, número de prontuário _____

abaixo assinado, concordo em participar do estudo "*Monitoração dos níveis plasmáticos de fármacos antirretrovirais por CLAE-UV como ferramenta para controlar a adesão e reações adversas em pacientes sob tratamento antirretroviral*", sob a responsabilidade da Farm. Amanda Queiroz Soares e dos professores Dr^o Luiz Carlos da Cunha e Dr^a Kênnia Rocha Rezende como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora

Amanda Queiroz Soares sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu tratamento.

Goiânia, ____/_____/200__

Assinatura do participante

Farm^a Amanda Queiroz Soares

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Assinatura da 1^a testemunha

Assinatura da 2^a testemunha

9.3 Cromatogramas para verificação da linearidade da técnica

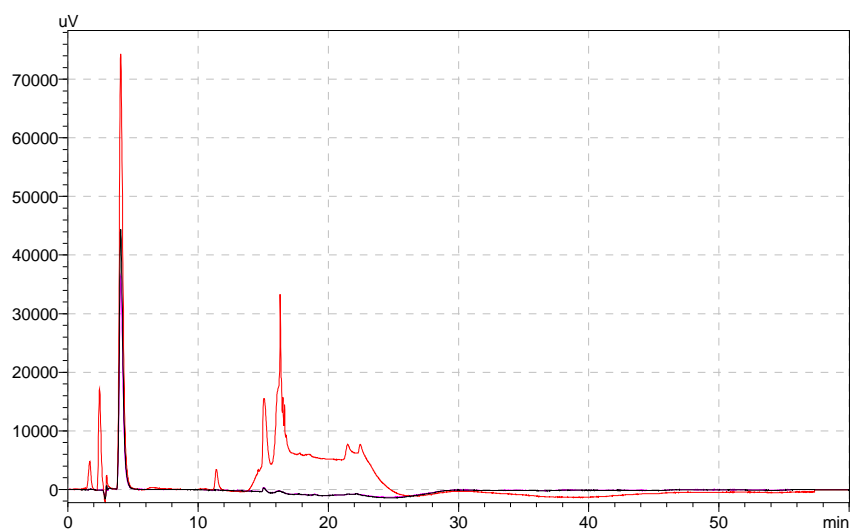


Figura 12 - Cromatograma referente à análise de sulfametoxazol ($t_R = 4,08$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

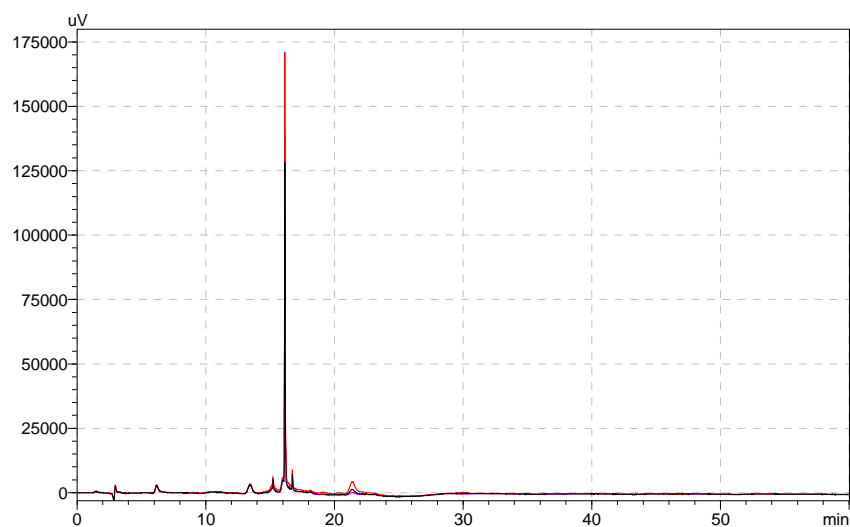


Figura 13 - Cromatograma referente à análise de omeprazol ($t_R = 16,16$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

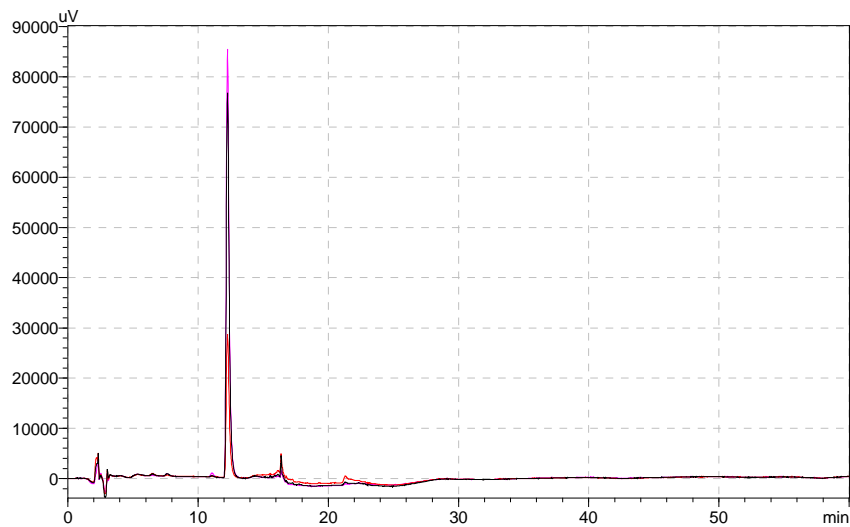


Figura 14 - Cromatograma referente à análise de fluconazol ($t_R = 12,30$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

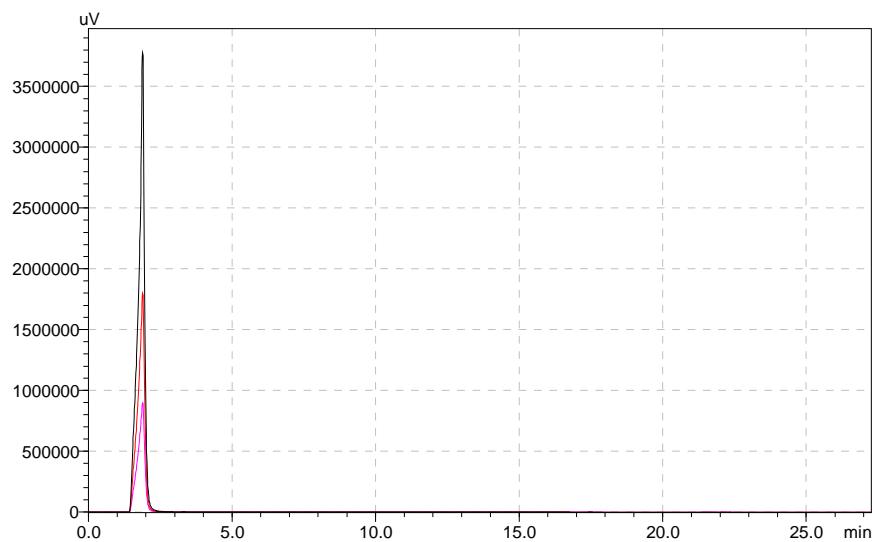


Figura 15 - Cromatograma referente à análise de ácido ascórbico ($t_R = 1,80$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

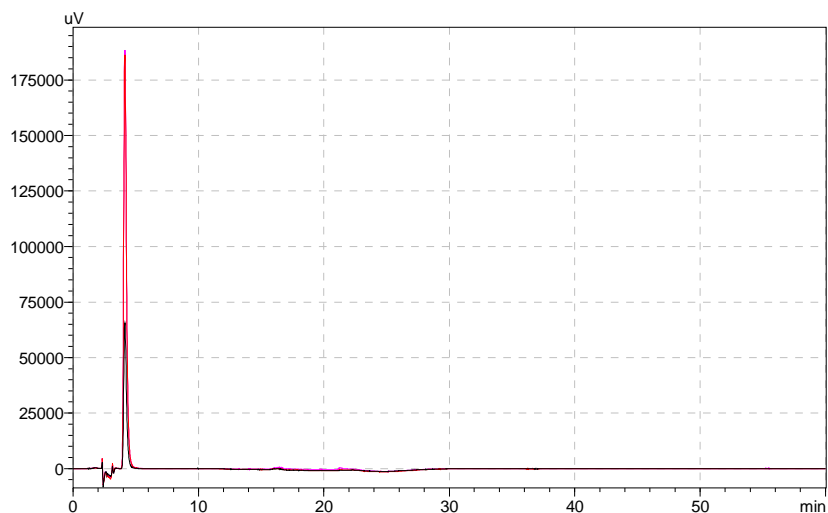


Figura 16 - Cromatograma referente à análise de paracetamol ($t_R = 4,18$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

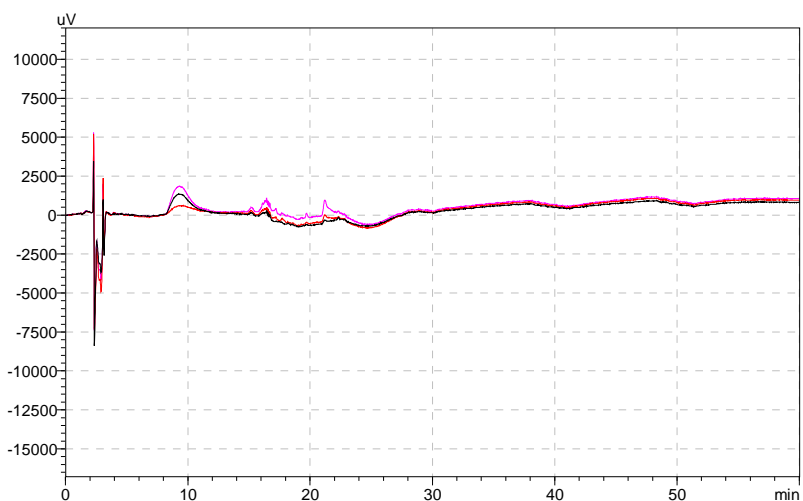


Figura 17 - Cromatograma referente à análise de atenolol ($t_R = 9,35$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

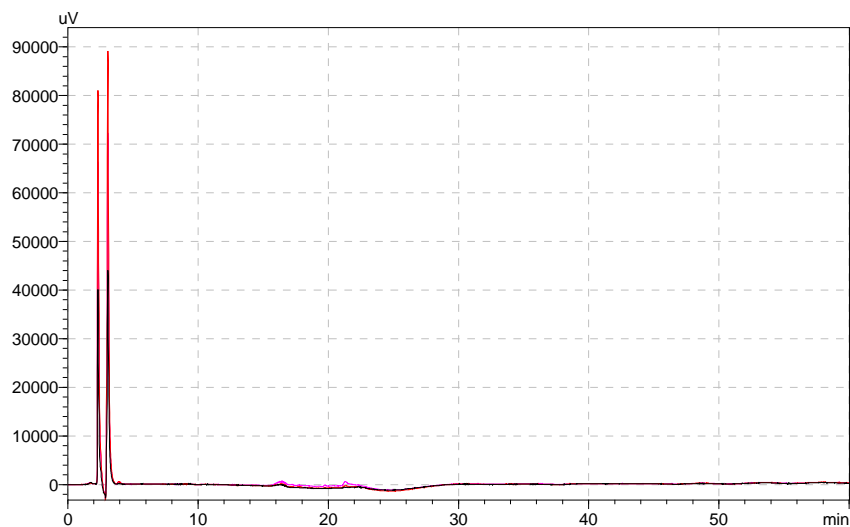


Figura 18 - Cromatograma referente à análise de alopurinol ($t_R = 2,35$ e $3,11$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

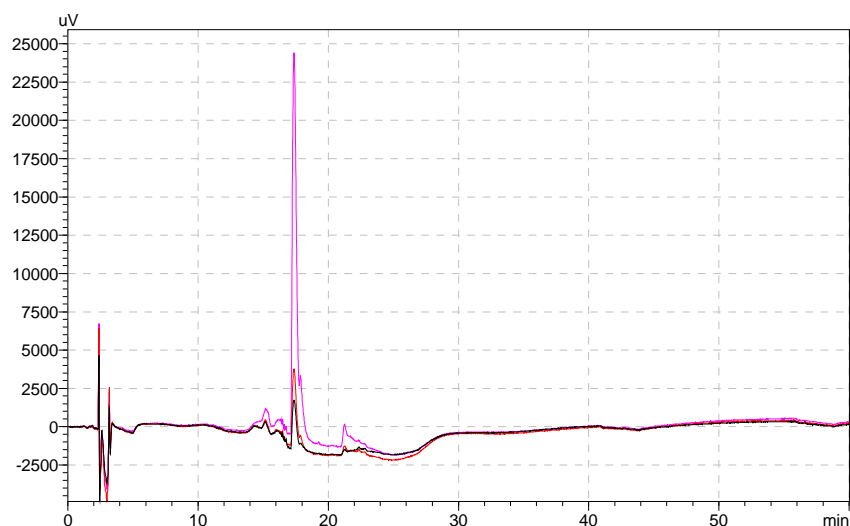


Figura 19 - Cromatograma referente à análise de quinidina ($t_R = 17,42$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

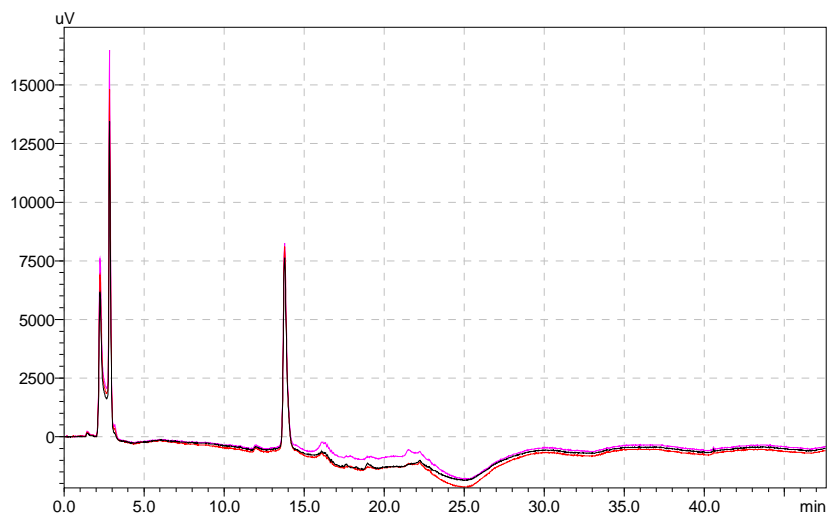


Figura 20 - Cromatograma referente à análise de dipirona ($t_R = 2,25, 2,86$ e $13,80$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

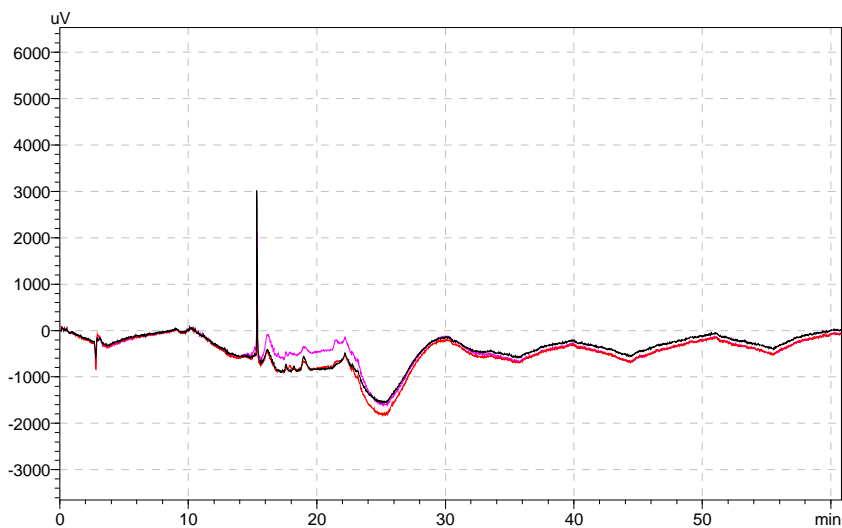


Figura 21 - Cromatograma referente à análise de diclofenaco ($t_R = 15,34$ min). Coluna ACE 5 C18 (100 x 4,6 mm). Fase móvel: gradiente acetonitrila:dietanolamina em água pH 7,8; vazão de fase móvel: 0,5 a 2,0 mL/min. Volume injetado: 30 μ L. Detecção 240 (preto), 249 (rosa) e 267 nm (vermelho)

9.4 Perfil sócio-econômico dos sujeitos da pesquisa

| Dados | (n = 12) |
|---------------------|--------------|
| Gênero | |
| Masculino | 83,33% (10) |
| Feminino | 16,67% (2) |
| Orientação sexual | |
| Heterossexual | 50,00% (6) |
| Homossexual | 41,67% (5) |
| Não declarado | 8,33% (1) |
| Idade (média ± DP) | 42 ± 10 anos |
| Estado civil (%) | |
| Solteiro | 75,00% (9) |
| Casado | 16,67% (2) |
| Divorciado | 8,33% (1) |
| Escolaridade (anos) | |
| ≤ 5 | 41,67% (5) |
| 6 a 9 | 33,33% (4) |
| > 9 | 16,67% (2) |
| Não declarado | 8,33% (1) |
| Raça | |
| Branco | 41,67% (5) |
| Pardo | 41,67% (5) |
| Negro | 8,33% (1) |
| Não declarado | 8,33% (1) |

Continuação do Anexo 9.4

Renda familiar (média \pm DP)

Total R\$ 1000,00 \pm 760,00

Participação do sujeito R\$ 514,00 \pm 580,00

9.5 Artigo

ARTIGO ORIGINAL

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR HPLC-PDA PARA MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA DE ZIDOVUDINA E EFAVIRENZ

Amanda Queiroz Soares a,b, Caroline Nayanna Rodrigues Santos a, Leandro Rocha Silva a, Kênnia Rocha Rezende a, Luiz Carlos da Cunha a

a Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

b Seção de Farmácia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

Correspondência: Dr. Luiz Carlos da Cunha. Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

Fone/Fax: (62)3209-6329

e-mail: lucacunha@gmail.com

Resumo

Objetivo: Desenvolver e validar uma técnica analítica para quantificar efavirenz e zidovudina, conhecer o perfil clínico e quantificar estes fármacos no plasma de sujeitos. **Método:** O sangue foi coletado de sujeitos adultos com diagnóstico HIV positivo em acompanhamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás com protocolo efavirenz/lamivudina/zidovudina. Após extração em fase sólida (cartucho Strata C 18E 500mg), os fármacos e padrão interno (5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína – MPPH) foram quantificados por HPLC-PDA utilizando coluna fase reversa (ACE 5, C18 100 x 4,6 mm) com detecção em 249 nm (efavirenz), 267 nm (zidovudina) e 240 nm (MPPH). A fase móvel foi composta por acetonitrila e dietanolamina em água (pH 7,8). **Resultados:** A técnica mostrou-se linear (50 a 5000 ng/mL), com recuperação de 84% (zidovudina) e 92% (efavirenz). O limite de quantificação (50 ng/mL), precisão (coeficiente de variação < 15%) e exatidão (erros relativos < 15%) estão de acordo com exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil. Para avaliar a aplicabilidade da técnica, analisou-se plasma de sujeitos (n = 12) em terapia antirretroviral há 33 ± 24 meses. A concentração plasmática do efavirenz (1960 ± 766 ng/mL) e zidovudina (62,12 ± 16,21 ng/mL) estavam dentro da faixa terapêutica. Observou-se uma redução da carga viral (99%) e aumentou dos linfócitos TCD4 (127%). **Conclusões:** A técnica desenvolvida e validada mostrou-se satisfatória para análise de amostras de plasma contendo zidovudina e efavirenz para finalidade de monitoração terapêutica. Os parâmetros clínicos avaliados estão de acordo com recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.

Palavras-chave: Validação, HPLC, zidovudina, efavirenz, monitoração terapêutica

Abstract

Keywords:

Introdução

A terapia antirretroviral (TARV) tem como objetivo inibir a replicação do HIV, para evitar e, possivelmente, reverter a deterioração imunológica, evitando infecções oportunistas e outras morbidades relacionadas à AIDS. Desta forma, a TARV visa prolongar a sobrevivência e melhorar qualidade de vida da pessoa que vive com HIV^{1,2}.

Os fármacos antirretrovirais atualmente em uso terapêutico pertencem às seguintes classes: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos, inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos, inibidores da protease, inibidor de fusão e inibidor da integrase^{3,4,5}.

O desenvolvimento de uma terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) aperfeiçoou o tratamento da infecção pelo HIV. Este tratamento inclui pelo menos três fármacos de duas diferentes classes: dois ITRN associado a um ITRNN ou IP. O protocolo de primeira escolha para o esquema tríplice inicial é Efavirenz/Zidovudina/Lamivudina. A Figura 1 ilustra a fórmula estrutural da zidovudina (ITRN) e efavirenz (ITRNN), fármacos estudados neste trabalho^{1,4,6,7}.

O interesse na monitoração terapêutica de medicamentos antirretrovirais tem crescido significativamente desde que terapia antirretroviral altamente ativa foi adotada na prática clínica, tendo como alvo a individualização a posologia para obtenção da máxima eficácia do tratamento enquanto minimiza a toxicidade do mesmo^{7,8,9}.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar uma técnica de análise e extração para quantificar os antirretrovirais efavirenz e zidovudina no plasma humano, conhecer o perfil clínico dos sujeitos da pesquisa e quantificar os fármacos efavirenz e zidovudina no plasma dos sujeitos em uso do esquema terapêutico efavirenz/lamivudina/zidovudina.

Material e Métodos

Solventes e reagentes

Utilizaram-se padrões primários de zidovudina (99,0% - USP), efavirenz (99,8% - USP) e padrão interno 5-(4-metilfenil)-5-fenilidantoína – MPPH – (99,0% - Sigma). Os

solventes utilizados Acetonitrila (Honeywell) e Metanol (J. T. Baker) foram grau HPLC e a dietanolamina (Cromatografo Produtos Químicos Ltda) grau PA. A água ultra-pura foi obtida em equipamento Milli-Q (Millipore) e o plasma branco de referência foi doado pelo Instituto Goiano de Hemoterapia (INGOH).

Equipamento

A análise cromatográfica foi executada em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu composto por bomba modelo LC - 20AT, auto-injetor modelo SIL - 20A, detector PDA - M20A, degaseificador DGU - 20A₅, módulo controlador CBM - 20A e computador com software LC Solution para aquisição dos dados. Foram utilizados coluna de separação cromatográfica (C18, fase reversa, ACE® 5, 100 x 4,6 mm), membrana filtrante 0,45 mm (Millipore®) e cartucho de extração em fase sólida (Strata C-18E 500mg, 3mL, Phenomenex®).

Soluções estoque, intermediárias e de controle de qualidade

As soluções padrão de AZT, EFZ e MPPH, foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol. As amostras de plasma padrão nas concentrações de 50, 200, 500, 1000, 3000 e 5000 ng/mL utilizadas na curva de calibração e 100, 2000 e 400 ng/mL para controle de qualidade foram obtidas por meio das soluções intermediárias de 500 a 50000 ng/mL adicionadas ao plasma branco. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C. As soluções dos fármacos avaliados como padrão interno (MPPH) e interferentes da técnica também foram preparadas em metanol.

Preparação das amostras

Alíquotas de 500 µL de plasma foram adicionadas de 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL de metanol 50% em água ultra-pura e posteriormente extraídas em cartucho Strata C18. Para o condicionamento utilizou metanol e água, com posterior lavagem com água. Em seguida, procedeu-se à eluição dos analitos utilizando de metanol. O eluato foi evaporado e o resíduo redissolvido em metanol 50% em água ultra-pura. A solução foi transferida para vials e injetado no HPLC-PDA.

Desenvolvimento da técnica analítica

Estudos preliminares foram realizados para estabelecer as condições cromatográficas ideais de quantificação da zidovudina e efavirenz. Os principais parâmetros avaliados nesta fase foram: modelo de coluna cromatográfica, composição da fase móvel, tempo de análise, fluxo da fase móvel, volume de injeção da amostra, comprimento de onda para a detecção das substâncias e padrão interno. As condições cromatográficas satisfatórias incluem a coluna cromatográfica fase reversa e duas fases móveis, assim subdivididas: fase móvel A, (acetonitrila), e fase móvel B (dietanolamina: água ultrapura, com pH ajustado em aproximadamente 7,8). A técnica utilizou gradiente das fases móveis e do fluxo. O volume de amostra injetada foi de 30 µL, tanto para os padrões quanto para as amostras extraídas de pacientes. Foi estabelecido um comprimento de onda específico para cada substância.

Validação da técnica analítica

Para uma técnica ser considerada validada deve atender uma série de parâmetros como precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade e recuperação, sendo que esses parâmetros devem obedecer a um limite de variação dentro das normas aceitas por órgãos oficiais de regulação, sendo adotado neste estudo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA).

Para avaliação da linearidade, 50 µL das soluções padrão de AZT e EFZ foram adicionadas a 500 µL de plasma de modo a obter concentrações de 50, 200, 500, 1000, 3000 e 5000 ng/mL de plasma (n = 3 para cada concentração). Em seguida, as amostras de plasma foram adicionadas de 50 µL de solução do padrão interno na concentração de 4000 ng/mL e submetidas ao procedimento de extração e análise. A linha de regressão foi obtida plotando as concentrações no eixo das abcissas e a razão das áreas dos picos (pico do fármaco/pico do PI) no eixo das ordenadas.

Para avaliar a recuperação absoluta, amostras de plasma enriquecidas com AZT e EFZ nas concentrações de 100, 2000 e 5000 ng/mL (n = 3 para cada concentração) foram submetidas ao processo de extração em fase sólida. As concentrações dessas amostras foram calculadas empregando uma curva analítica, obtida pela análise direta dos fármacos e padrão interno na fase móvel.

A exatidão e precisão foram verificadas através de estudos inter e intra-ensaio. Foram preparadas amostras de plasma contendo concentrações conhecidas de AZT e

EFZ (100, 2000 e 4000 ng/mL). Na avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio, replicatas (n = 5) das amostras de plasma adicionadas dos fármacos foram analisadas em um mesmo dia. Para a precisão e exatidão inter-ensaio, foram considerados os resultados das análises realizadas em três dias consecutivos. As concentrações de AZT e EFZ nessas amostras foram determinadas empregando curvas analíticas preparadas diariamente.

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras de plasma (n = 5) contendo concentrações decrescentes de AZT e EFZ até o menor nível quantificável, com coeficientes de variação e erro relativo menores que 20%.

A especificidade da técnica foi avaliada através da análise de 30 µL de soluções-padrão de 11 fármacos (ácido ascórbico, alopurinol, atenolol, diclofenaco de sódio, dipirona, fluconazol, lamivudina, omeprazol, paracetamol, quinidina e sulfametoxazol). Análises de amostras de plasma branco também foram feitas para verificar a interferência de compostos endógenos.

Aplicação da técnica

Para verificar a eficácia e aplicabilidade da técnica desenvolvida, foi realizada a análise de amostras obtida de 12 sujeitos em tratamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) com protocolo efavirenz 600 mg uma vez ao dia/lamivudina 150 mg/zidovudina 300 mg duas vezes ao dia, maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, que consentiram em participar voluntariamente da pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do HC/UFG, sob o número do protocolo: CEPMHA/HC/UFG 179/2007, datado de 10/04/2008. Aproximadamente 8 h após a administração do AZT e 20 h após administração do EFZ foi efetuada a coleta de 5 mL de sangue, em tubo contendo EDTA. Após centrifugação a 3500 rpm, durante 5 minutos, o plasma foi separado e estocado a -20 °C, até o momento da análise.

Resultados

Desenvolvimento da técnica

Para proceder à quantificação da zidovudina e efavirenz vários testes consecutivos foram realizados, alternando as condições cromatográficas consideradas

ideais para a extração e análise. As condições consideradas satisfatórias estão apresentadas nos Quadros 1 e 2.

A ordem de eluição dos fármacos foi obtida por meio de injeções individuais dos padrões, obtendo os tempos de retenção de 6,5 min para AZT, 16,6 min para MPPH e 18,2 min para EFZ, conforme ilustrado na Figura 2.

Validação da técnica

Os parâmetros de linearidade obtidos durante a validação estão representados na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta os valores de precisão (coeficiente de variação) e exatidão (erro relativo) intra e inter-ensaio, em diferentes concentrações de zidovudina e efavirenz, obtidos pela técnica desenvolvida, assim como de recuperação. A recuperação do padrão interno MPPH foi de 89%.

Quanto à especificidade, observa-se que não houve interferência dos componentes do plasma na amostra. Além disso, nenhum dos 11 fármacos (ácido ascórbico, alopurinol, atenolol, diclofenaco de sódio, dipirona, fluconazol, lamivudina, omeprazol, paracetamol, quinidina e sulfametoxazol) avaliados interferiu na análise.

Aplicação da técnica

Os dados clínicos e as concentrações plasmáticas de zidovudina e efavirenz obtidos das amostras dos sujeitos da pesquisa estão apresentadas na Tabela 3. Um cromatograma representativo da análise destas amostras está ilustrado na Figura 3.

Discussão

Desenvolvimento da técnica

No desenvolvimento desta técnica analítica várias condições cromatográficas foram testadas para obter satisfatória separação cromatográfica em um menor intervalo de tempo de corrida.

Duas colunas C18 foram testadas, de 250 mm e 100 mm de comprimento. Ambas apresentaram separação cromatográfica e LIQ satisfatórios, diferindo apenas quanto ao tempo de corrida. A menor coluna foi escolhida por apresentar praticamente a metade do tempo de corrida, sendo este o critério adotado para escolha, uma vez

que esta proporciona resultados mais rápidos, possibilitando intervenções terapêuticas em tempo hábil.

Várias fases móveis foram testadas. O uso de tampões, embora muito citado na literatura como fases móveis para separação de AZT e EFZ, proporcionou uma linha de base insatisfatória, não permitindo a obtenção do LIQ de 50 ng/mL. A redução do pH reduziu o tempo de retenção analitos, causando a eluição precoce do AZT sem separação cromatográfica deste com os interferentes do plasma. O conhecimento do pKa dos compostos (zidovudina, pKa = 9,8 e efavirenz, pKa = 10,2) permitiu prever o comportamento dos mesmos na fase móvel e estacionária, contribuindo na escolha do melhor pH para a fase móvel. Das fases móveis avaliadas, a acetonitrila: dietanolamina (pH 7,83) foi a que apresentou os melhores resultados, proporcionando completa separação entre os dois antirretrovirais analisados, e destes com o padrão interno MPPH.

A interação entre a coluna cromatográfica, a fase móvel e os analitos contribuiu para a definição da ordem de eluição dos mesmos. Desta forma, observa-se que o AZT possui menor afinidade pela fase estacionária que o EFZ, fazendo com que este fique mais tempo retido na coluna, necessitando maior quantidade de solvente menos polar (ACN) para ser eluído.

Para a escolha do padrão interno foram testados antirretrovirais que não fazem parte do protocolo terapêutico estudado, além de substância exógena não dotada de atividade farmacológica, garantindo a inexistência da substância na matriz biológica. A substância MPPH foi escolhida por apresentar boa resolução cromatográfica e não interferir no tempo total de análise.

Apesar do sistema de bombeamento isocrático possibilitar uma maior estabilidade do equipamento, tornou-se conveniente neste estudo fazer gradiente de fluxo e fase móvel durante a análise. Este sistema melhorou a resolução entre os interferentes do plasma e o AZT, além de reduzir o tempo de retenção do efavirenz.

Foram testados volumes de injeção de 20 a 80 µL, sendo que valores inferiores a 30 µL não forneceu o LIQ de 50 ng/mL, e volumes acima de 40 µL ocorreu alargamento do pico devido à saturação do detector. Desta forma, foi escolhido o volume de injeção de 30 µL, proporcionando separação cromatográfica e LIQ adequados.

O detector UV de varredura (PDA) utilizado proporciona análises em diferentes comprimentos de onda em uma mesma corrida. Foram escolhidos os comprimentos de onda que proporcionaram uma menor interferência dos componentes do plasma.

Após insucesso com as técnicas extrativas por precipitação protéica e líquida-líquida, testou-se o método SPE. A eficiência dos seguintes cartuchos foi avaliada: Bond elution C18 Varian, Supelco e Strata C-18E Phenomenex, todos de 500 mg de fase estacionária. Como critérios de escolha avaliou-se a recuperação, separação dos picos, resolução entre os mesmos, menor efeito dos interferentes do plasma e custo dos cartuchos, optando-se pelo cartucho Strata da Phenomenex.

Validação da técnica

O principal objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado aos seus propósitos. Para tanto, foram adotados os critérios da Resolução Específica nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Para avaliar a linearidade, foi utilizado o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As curvas analíticas obtidas no estudo apresentaram coeficiente de correlação maiores que 0,992. Estes valores estão satisfatórios, uma vez que é aceito coeficientes maiores que 0,98 e desvio do valor nominal menor ou igual a 15%, exceto para o LIQ que é aceito 20%¹⁰.

Quanto à especificidade da técnica, nenhuma interferência foi verificada, o que demonstra a capacidade da técnica em quantificar, sem equívoco, os fármacos na presença das 11 substâncias estudadas.

A recuperação absoluta foi obtida pelo quociente das áreas de amostras extraídas e amostras não submetidas ao processo de extração. Os valores médios de recuperação para zidovudina e efavirenz foram superiores a 84%. Estes dados condizem com os achados da literatura, que variam geralmente de 69 a 102% para o AZT^{5,11,12,13,14,15,16} e 80 a 97,2 % para o EFZ^{4,5,6,7,11}.

A precisão intra e inter-ensaio apresentaram resultados satisfatórios segundo a ANVISA, que preconiza valores inferiores a 15% para amostras de controle de qualidade e 20% para o LIQ. Os achados estão também de acordo com a literatura, que variam a precisão de 0,4 a 14,0 % e exatidão de 1,0 a 11,7%^{4,7,10,12,13,14,16,17}.

Aplicação da técnica

A amostra consistiu de 12 sujeitos em terapia antirretroviral há pelo menos 5 meses. Todas as coletas de sangue dos sujeitos da pesquisa foram realizadas no período vespertino, correspondendo, em média, a 8 h após a administração do AZT e 20 h do EFZ. As quantidades de zidovudina encontradas na maioria das amostras de plasma dos sujeitos estavam em concentrações abaixo do LIQ, ou seja, menores que 50 ng/mL. Este fato pode ser facilmente justificado pela meia vida de eliminação do AZT, que fica em torno de 1 hora, assim como pelo fato do AZT ser um pró-fármaco. Como a coleta de sangue foi realizada com grande intervalo de tempo após a administração da zidovudina, pode-se sugerir que praticamente todo o AZT foi metabolizado à sua forma ativa 5-trifosfato de zidovudina. Desta forma, a pequena fração de zidovudina não metabolizada permitiu a detecção do AZT em todas as amostras, porém, devido à fosforilação, quantificou-se o AZT em apenas três delas. A baixa concentração plasmática não foi observada com o efavirenz, uma vez que sua meia-vida de eliminação plasmática é muito superior à da zidovudina, estando em torno de 9 h.

Outro fator indicador da adesão à terapia antirretroviral destes pacientes, em particular ao AZT, é o fato de ter observado concentrações plasmáticas do efavirenz dentro da faixa terapêutica. Sabe-se que, no protocolo terapêutico estudado, a adesão ao efavirenz é muito menor que ao Zidovudina/Lamivudina, devido aos eventos adversos relacionados com o efavirenz, em especial os distúrbios do sono. Desta forma, ao observar uma boa adesão ao efavirenz, a chance da adesão à zidovudina ser maior é muito grande, corroborando com os achados nos exames analíticos, onde foi detectado AZT em todas as amostras.

A zidovudina foi quantificada no plasma de 3 sujeitos, com concentração média de $62,12 \pm 16,21$ ng/mL. O efavirenz foi quantificado em todas as amostras, obtendo concentração plasmática média de 1960 ± 766 ng/mL, com uma variação inter-individual de 41,09%. Nenhum sujeito estava com concentrações de efavirenz acima da faixa terapêutica (1000 - 4000 ng/mL) e apenas 1 sujeito estava com concentração ligeiramente abaixo desta (970 ng/mL). Conclui-se que, estes sujeitos estão fazendo uso dos fármacos prescritos.

Pelos dados clínicos dos sujeitos em estudo observou-se que ocorreu uma redução de 99% da carga viral desde o início do tratamento, sendo que 83,33% (10) deles apresentaram carga viral indetectável nos últimos exames laboratoriais, ou seja,

menor que 50 cópias/mL. A contagem de linfócitos TCD4 aumentou em média 127% com a TARV, sendo que houve diminuição em apenas um sujeito, o que reflete melhora da resposta imunológica dos indivíduos.

O único sujeito com concentração plasmática do EFZ abaixo da janela terapêutica apresentou carga viral controlada (< 50 cópias/mL) e aumento de 119,67% no número de linfócitos TCD4 durante a TARV. O único sujeito com carga viral acima de 50 cópias/mL (277 cópias/mL) e com piora na contagem de linfócitos TCD4 apresentou concentração plasmática do EFZ (1,87 µg/mL) dentro da faixa terapêutica. Vale ressaltar que a coleta de sangue para a última carga viral e contagem de linfócitos TCD4 foi, em média, 6 meses antes da quantificação do EFZ. Desta forma, a concentração plasmática do efavirenz dentro da faixa terapêutica pode refletir uma melhora da adesão ao tratamento e, possivelmente, uma redução na carga viral e aumento da contagem de linfócitos TCD4 no último exame. Como a concentração do efavirenz obtida está dentro da faixa terapêutica para a maioria dos sujeitos, espera-se o mesmo perfil para a zidovudina, uma que a adesão ao uso do EFZ é menor devido às reações adversas associadas a estes fármacos.

Conclusões

A técnica desenvolvida e validada mostrou-se satisfatória de acordo com os parâmetros de validação analítica preconizadas pela ANVISA, permitindo analisar amostras de plasma humano contendo zidovudina e efavirenz para finalidade de monitoração terapêutica.

Observou-se que a concentração plasmática média de AZT e EFZ estão dentro da faixa terapêutica e que carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ estão satisfatórios para os sujeitos em terapia antirretroviral, conforme recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.

Referências bibliográficas

1. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**: 2005/2006/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 6ª ed. Brasília: 2007.
2. SILVA, P. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV**: 2008/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 6. ed. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm>>. Acesso em: 01 jul. 2009.5.
4. RENTSCH, K M. Sensitive and specific determination of eight antirretroviral agents in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 339-350, 2003.
5. AYMARD, G., LEGRAND, M., TRICHEREAU, N., DIQUET, B. Determination of twelve antirretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 744, p. 227-240, 2000.
6. ROUZES, A., BERTHOIN, K., XUEREBO, F., DJABAROUTI, S., PELLEGRIN, I., PELLEGRIN, J L., COUPET, A C., AUGAGNEUR, S., BUDZINSKI, H., SAUX, M C., BREILH, D. Simultaneous determination of antirretroviral agents: amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 209-216, 2004.

7. PROUST, V., TOTH, K., HULIN, A., TABURET, A M., GIMENEZ, F., SINGLAS, E. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of the antiretroviral agents amprenavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, delavirdine and afavirens in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 453-458, 2000.
8. NOTARI, S., BOCEDI, A., IPPOLITO, G., NARCISO, P., PUCILLO, L P., TOSSINI, G., DONNORSO, R P, GASPARRINI, F., ASCENZI, P. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 831, p. 258–266, 2006.
9. RAKHMANINA, N. Y.; VAN DEN ANKER, J. N.; SOLDIN, S. J. Therapeutic Drug Monitoring of Antiretroviral Therapy. **AIDS PATIENT CARE and STDs**, v. 18, n. 1, 2004.
10. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 22 nov. 2006.
11. JUNG, B H.; REZK, N L.; BRIDGES, A S.; CORBETT, A H.; KASHUBA, A D M. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 1095-1104, 2007.
12. VERWEIJ-VAN WISSEN, C P W G M., AARNOUTSE, R E., BURGER, D M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 121–129, 2005.

13. REZK, N L., TIDWELL, R R., KASHUBA, A D M. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 137–147, 2003.

14. FAN, B., STEWART, J T. Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 903–908, 2002.

15. SIMON, V A.; THIAM, M D.; LIPFORD, L C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-seppressing drugs by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 447-453, 2001.

16. TAN, X.; BOUDINOT, F D. Simultaneous determination of zidovudine and monophosphate in mouse plasma and peripheral red blood cells by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 740, p. 281-287, 2000.

17. DAILLY, E., RAFFIB, F., JOLLIETA, P. Determination of atazanavir and other antirretroviral drugs (indinavir, amprenavir, nelfinavir and its active metabolite M8, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nevirapine and efavirenz) plasma levels by high performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 353–358, 2004.

9.6 Normas da revista

A revista Farmacia Hospitalaria é o órgão de expressão científica da Sociedade Espanhola de Farmácia Hospitalar (SEFH). Publica artigos pertinentes a algum aspecto da farmacoterapia ou de desenvolvimento e experiência profissional, podendo ser apresentados em idioma espanhol ou Inglês.

Os autores que considerarem muito importante a rápida publicação dos seus trabalhos devem indicar na carta, justificando corretamente o motivo.

Todos os manuscritos aceitos passam a ser propriedade da Farmacia Hospitalaria e, portanto, da SEFH, e não pode ser reproduzido em parte ou totalmente sem permissão. Os autores dão, no caso de publicação, exclusivamente os direitos de reprodução, distribuição, tradução e comunicação público (por qualquer meio ou gravação de som, audiovisual ou e-mail) para o seu trabalho. Para tanto, o autor deverá assinar uma carta de transferência de direitos no momento do envio do trabalho através do sistema online de gestão.

Responsabilidade ética

Originalidade do trabalho: Não será aceito trabalho publicado anteriormente ou submetidos simultaneamente a outra revista. Serão aceitos como apresentados anteriormente comunicação em Congresso, desde que tenha sido parte com finalidade de trabalhar para desenvolver ou ampliar o objeto da investigação.

A adesão a recomendações internacionais de ética: Quando for apresentado estudo realizado em humanos, deve estar indicado que os mesmos tenham sido submetidos à fiscalização do Comitê de Ética Clínica. Em particular deverá informar que os dados do paciente foram obtidos a partir da assinatura de um consentimento informado, sempre que necessário. Da mesma forma, os autores devem declarar que os protocolos estabelecidos pelos respectivos centros de saúde foram seguidos de acesso registros de dados

para poder realizar esse tipo de publicação fins de pesquisa/extensão comunitária e científica.

Conflito de interesses: Se, para a realização do trabalho para publicação, que recebeu uma bolsa ou outra forma de assistência de uma fundação, sociedade, organismo ou empresa, ou quando os autores de qualquer ligação com qualquer entidade pública ou privada, que podem conduzir a um conflito de interesses, deverão ser comunicadas em detalhe neste parágrafo para o efeito de submissão on-line de manuscritos. Da mesma forma, deverá comunicar expressamente a ausência de conflito, se for esse o caso.

Autoria: Apenas as pessoas que realmente tenham contribuído significativamente para o desenvolvimento intelectual do trabalho devem ser listadas como autores.

Seções da revista

Farmacia Hospitalaria publica os seguintes tipos de itens: editorial, breve, original, revisão, artigo de fundo e uma carta ao editor.

Originais. Os originais são trabalhos de pesquisa que verificam hipóteses, comparam alternativas ou chegam a algum resultado que aumentam os conhecimentos científicos ou opções farmacoterapêuticas ou qualquer outro aspecto da prática da farmácia hospitalar. A tamanho máximo recomendado é de 3.000 palavras, sendo admitido até 10 tabelas ou figuras. É aconselhável que o número dos autores não seja superior a 6. Incluir no máximo 30 referências.

APRESENTAÇÃO

1 .- Procedimento para apresentação dos manuscritos

Os manuscritos devem ser submetidos eletronicamente através do URL <http://ees.elsevier.com/fh> site preenchendo todas as informações necessárias para o envio.

Os artigos devem ser inseridos no sistema em vários arquivos correspondentes a: primeira página, o corpo do trabalho (incluindo o resumo e palavras-chave, resumo e palavras-chave, introdução, métodos, resultados, discussão, bibliografia, tabelas e figuras) e figuras.

Os autores encaminhar, juntamente com o manuscrito, uma carta que deve indicar:

- O tipo de artigo e seção do jornal em que você deseja publicar o trabalho, sujeita a decisão final do diretor da revista.
- Que o trabalho não tenha sido publicada anteriormente, que foi publicado parcialmente ou que tenha sido comunicada a um Congresso.
- Em casos recentes, deverá anexar referência completa local de residência. Uma breve declaração para o efeito será também será incluído na página do título.
- Que o trabalho não está a ser revisto em qualquer outro revista.
- Para ter obtido as autorizações necessárias para a reprodução de material já publicado (se houver) e para ser entregue ao sempre que o trabalho editorial foi aceito para publicação.
- Indicação e justificativa da necessidade de um rápido processo de publicação a especial relevância da pesquisa ou da rápida obsolescência de dados.

Os autores devem preencher o sistema on-line para submissão de manuscritos questionário sobre possíveis conflitos de interesse, ou não-existência deles.

Os autores receberão uma declaração de reconhecimento do trabalho submetido.

2 .- Resumo do manuscrito

Os manuscritos devem ser escritos em espanhol ou Inglês, preferencialmente no Microsoft Word, formato de papel tamanho A4, com margens de 2,5 centímetros de cada lado. As páginas devem ser numeradas no canto superior direito, começando com a página título. O manuscrito deverá ser escrito com espaçamento duplo e fonte 11. Não é permitido usar programas de gerenciamento de bibliografia.

As abreviaturas são introduzidas após o termo representando no primeiro uso da abreviatura no artigo. Evite abreviações no título e resumo.

Para nomear as drogas, usar o nome genérico ou DCI (Denominação Comum Internacional). Para citar os processos da doença, usar a Classificação Internacional Doença em sua versão mais recente.

Recomendamos a redação do artigo estilo impessoal na língua clara e precisa, ordenação de idéias ou declarações em uma lógica e movendo-se de mais geral para mais específica.

Não duplicar os dados das tabelas no texto e não repetir os resultados na discussão.

É obrigatório para o trabalho claramente dividido em seções. Farmacia Hospitalaria aprovou o seguinte esquema:

- Original: método, resultados, discussão. Cada uma das seções deve começar em nova página: página de título, resumo e palavras-chave, texto do artigo, agradecimentos, bibliografia, tabelas, figuras, tabelas.

3 .- A página de título

Conter o título do trabalho, autores e filiação, o autor responsável do manuscrito e sua orientação, o reconhecimento de qualquer bolsa de estudos ou apoio econômico, e os conflitos de interesse e gratidão, se houver. O título deve ser escrito em letras maiúsculas, descrever adequadamente o conteúdo do trabalho e ser o mais conciso possível, em uma frase (em geral, não mais de 15 palavras). Evite siglas, códigos e símbolos que não são mais usados. Os autores podem aparecer com um ou dois sobrenomes.

Posteriormente, na linha de fundo, é o indicado (n) a (o serviço) (s) a que pertencem e (s instituição) (s) para o (s).

O autor responsável pela correspondência deve ser claramente indicado, com o seu endereço particular ou completo, incluindo telefone e e-mail. Os endereços postais e eletrônicos devem aparecer no artigo na primeira página, se publicada.

Quando considerado necessário será citado em uma seção de agradecimentos os indivíduos, instituições ou entidades que tenham trabalhado ou apoiado a execução do trabalho.

4 .- A página de resumo/Abstract.

Os trabalhos originais devem ser acompanhados de um resumo estruturado na mesma língua que é enviada o resto do trabalho, não excedendo 250 palavras. Seções: objetivo, método, resultados, conclusões.

O resumo deve ser caracterizado por: 1) para atuar como substituto do texto se ele não estiver disponível, 2) ser desenvolvido em termos concretos, indicando os pontos essenciais do artigo; 3) não inclui citações dados bibliográficos ou materiais não mencionados no texto, 4) no resumo não deve ser utilizado abreviaturas.

Na publicação final, o artigo terá uma tradução exata do resumo em Inglês ou Espanhol. O autor pode escolher entre enviar a tradução ou delegar para a redação da revista.

Palavras-chave. Abaixo do resumo deve incluir três a dez palavras identificar o conteúdo do trabalho essencial para a inclusão em índices e bases de dados. Recomendamos a utilização de termos da Medicina Subject Headings (MeSH) do Index Medicus disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh>

5 .- O texto

a) Introdução. Mais curta possível, tentando justificar a necessidade do trabalho apresentado. Deve centrar-se sobre o problema e dados atuais. Deve incluir

apenas a literatura essencial. Não incluir dados ou conclusões do trabalho publicado. O último parágrafo da introdução descreve a meta (ou metas) de trabalho.

b) Métodos. Abordará a área onde a pesquisa foi conduzida, o período ou a duração, as características da série estudada, o critério seleção dos sujeitos, descrevendo precisamente como eles conduziram o estudo, o tipo de desenho utilizado, os critérios inclusão e exclusão, as diretrizes de tratamento, análise estatística, etc, fornecendo detalhes suficientes para que a experiência possa ser repetida, com base em informações fornecidas. Devem ser identificados drogas ou produtos químicos que têm sido utilizados, a dose (s) e via (s) de administração.

c) Resultados. Eles descrevem os resultados obtidos com os materiais e métodos referidos, especificando os resultados positivos e negativos. Os dados podem ser mencionados no texto ou em tabelas ou figuras. Não devem ser repetidos nas tabelas os dados de texto ou figuras. Destacar no resumo apenas observações importantes.

d) Discussão. Deve interpretar os resultados, com ênfase nos pontos importantes do estudo e as conclusões deles decorrentes. Deve relacionar as observações descritas com outros estudos. Os autores podem apresentar as suas próprias opiniões sobre o assunto. Ele deve discutir: 1) o significado e aplicação prática dos resultados; 2) a consideração de uma possível inconsistência da metodologia e as razões pelas quais os resultados possam ser válidos, 3) a relação e comparação com publicações similares nas áreas de concordância e discordância, e 4) as indicações e orientações para pesquisas futuras. Além disso, a discussão deve ser impedida de se tornar uma revisão o item e repetir os conceitos que têm surgido na introdução. Também não deve repetir os resultados do trabalho. Deve evitar afirmações e declarações sem suporte de dados.

6 .- As tabelas e figuras

As tabelas são apresentadas em folhas separadas, que incluem:

- a) numeração da tabela com numerais arábicos, que será citado no texto, na seqüência;
- b) Título no topo da tabela e abreviaturas ou siglas no fundo,
- c) uma tabela por folha. Cada coluna deverá proceder a um título. Se uma tabela abrange mais de uma folha, será repetida rubrica nas folhas seguintes. O conteúdo deve ser auto-explicativo e os dados não podem ser repetidos, quer no texto ou outras tabelas ou figuras. Quando você tiver feito um estudo estatístico, indicam uma tabela de rodapé técnica utilizada e o nível de significância, se ele não tiver incluído no texto da tabela. Os números incluem todos os tipos de não-material tabular (morfologia, algoritmos histogramas, etc.) e serão citados no texto em ordem seqüencial.

7.- A literatura

Evitar se possível, a inclusão de referências a livros texto e as atas das reuniões. Apenas os documentos consultados devem ser incididos. A autenticidade das citações é da responsabilidade autores. Comunicações pessoais e dados não publicados não são citados, mas será referenciado no texto. Manuscritos aceitos, mas ainda não publicados, estão incluídos nas referências, especificando o nome da revista, seguido de "in press".

Formato. O formato e estilo de citação deve seguir rigorosamente as Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas: escrita e edição biomédica para publicação em sua edição atual Outubro de 2005, cujo texto oficial está disponível em: <http://www.icmje.org/>.

Este documento se refere, por sua vez, o estilo padrão ANSI aprovado pela Biblioteca Nacional de Medicina (National Library of Medicine) dos Estados Unidos para as bases dados. Os autores devem consultar o seguinte endereço web: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. A adequação desses requisitos não é uma rejeição do trabalho para publicação. A bibliografia é apresentada em ordem de aparecimento no texto, tabelas ou números com os correspondentes numerados consecutivamente em algarismos arábicos. Nos casos em que a nomeação for colocada próximo a um sinal de pontuação, o

preceder as aspas. No texto, os números vão no formato sobrescrito. A bibliografia será enviada como texto padrão, não como notas de rodapé ou notas de fim. Nós não vamos aceitar o programa-códigos específicos gerenciamento bibliográfico.

Exemplos de requisitos de citação bibliográfica:

1. Standard artigo original publicado em uma revista:

- No caso de revistas com a publicação de casal (Espanhol e Inglês, por exemplo), a nomeação será eleito em espanhol: Alfonso F, Bermejo J, Segovia J. Orientações europeias para a prática clínica em Espanhol Journal of Cardiology. Rumo a uma globalização "completo" assistência cardiovascular? Rev Esp Cardiol 2004; 57:1000-2.
- autores espanhóis serão citados com um ou 2 nomes como a designação original. Se os autores exceder 6 lista apenas os 6 primeiros, seguidos de "et al. (Nota: MedLine todos os autores estão listados): Pinteño White M, Delgado Sánchez O, Escrivá Torralva A, Crespi Monjo M, Ventayol P Bosch, Puigventós Latorre F, et al. Prospectiva e estudo comparativo para avaliar o impacto da intervenção promoção farmacêutica da terapia seqüencial com fluoroquinolonas. Farm Hosp. 2004; 28:419-25.
- Se a autoria é atribuída a uma instituição ou um trabalho de grupo, coloque o nome da instituição ou grupo: GAUME Group. Análise de anti-prescrição de medicamentos úlcera hospitalais do Serviço de Saúde da Andaluzia. Farm Hosp. 1995; 19:205-14.
- Se há autores, mas estão em nome de uma instituição, colocados em ambos: Jané Codina C, Tuset Creus M, Ibarra Barrueta O, Delgado Sánchez Ou, Morancho Echevarria W, Garcia Diaz B, representando o HIV do grupo SEFH. Avaliação de um programa de assistência farmacêutica dirigida para melhorar a adesão à terapia anti-retroviral. Farm Hosp. 2004, 28 Suppl 1:19-26.
- O nome da revista será adaptado para as abreviaturas definido NLM no MedLine thesaurus revistas. Para revistas que não tem um número correspondente de páginas em cada volume deve ser especificado a edição da

revista entre parênteses. A primeira página é completo eo segundo indicará apenas o dígito alterado de ao primeiro: Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-transplante de órgãos na HIVinfected pacientes. N Engl J Med 2002; 347:284-7.

- Quando o item pertence a um suplemento será colocado o número após completar o volume: Barrueta Ibarra O, Martinez Bengoechea MJ, Illar Uranga A, Lertxundi Etxebarria U, Iglesias Lambarri A, Santos Ibañez A. Simplificação lamivudina, zidovudina e abacavir: impacto sobre a adesão, resultados clínicos e impacto econômico. Farm Hosp. 2004; 28 Suppl 1:27-33.

2. Livros e outras monografias:

- Se for um coletivo, será encaminhado aos editores ou compiladores como se fossem autores, mas editores seguido da palavra: Santos B, Guerrero MD, editores. Administração de Medicamentos: teoria e prática. Madrid: Díaz de Santos, 1992.

- Se o autor for uma organização, vamos proceder como nos artigos de revistas. No caso em que a cidade existe em vários países, indicando a país em parênteses. Por exemplo: Córdoba (Argentina): Royal Adelaide Hospital, University of Adelaide, Department of Clinical Enfermagem. Compêndio de Enfermagem de investigação e desenvolvimento da prática, 1999-2000. Adelaide (Austrália): Adelaide University, 2001.

3. Comunicações ao Congresso:

- Se a comunicação é publicado em um jornal resumo é citado como um artigo.
- Se a comunicação é publicado em um livro de resumos, será citado semelhante ao formato de um capítulo de um livro.

4. Documentos ou relatórios:

- Quando são publicadas por uma instituição ou organismo: Yen GG (Oklahoma State University, School of Electrical and Computer Engineering, Stillwater, OK). Vigilância da saúde em vibração assinaturas. Relatório Final. Arlington (VA): Air Force Office of Scientific Investigaçãõ (E.U.), Air Force Research Laboratory, 2002 fevereiro Relatório No.: AFRLSRBLTR020123. Contrato No.: F496209810049.

- Consultas de leis: Direito Público: Veterans Hearing Loss Compensation Act of 2002, Pub. L. N ° 107-9, 115 Stat. 11 (24 de maio, 2001). Bill Unenacted: Saudável Children Learn Act, S. 1012, 107 Cong., 1st Sess. (2001). Código de Federal Regulations: Circulação Extracorpórea Intracardiac Ventosa Control, 21 C.F.R. Sect 870.4430 (2002). Audiência: arsênico na Beber Água: Uma atualização sobre a Ciência, Benefícios e Custos: Audição Antes da Subcomm. do Meio Ambiente, Tecnologia e Padrões da Casa Comm. on Science, 107th Cong., 1st Sess. (4 de outubro, 2001).

5. As publicações eletrônicas:

- Artigo na Internet. Essas revistas publicadas na Internet. Citado como um artigo normal. Pode ou não pode ter páginas (no exemplo não páginas): Abood S. Iniciativa de melhoria de qualidade nos lares de idosos: a ANA atua em um papel consultivo. Am J Nurs. 2002, 102 (6) [citado 12/09 -- 2002]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>
- Documentar e comunicar na Internet: Foley KM, Gelband H, eds. Melhorar os cuidados paliativos para o câncer [monografia na Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 09/07/2022]. Disponível em: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>
- página da Web ou uma parte dela: American Medical Association. Chicago: The Association, 1995 -- 2002 [cited 12/08/2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>
- Banco de dados na Internet: Open database: Who's Certified banco de dados online []. Evanston (IL): A Câmara Americana de Médicos Especialistas [cited 08/03/2001]. Disponível em: <http://www.abms.org/newsearch.asp>