

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO
CURSO DE FARMÁCIA

ANA CAROLINA AZEVEDO DE OLIVEIRA
CAMILA FRANÇA DA SILVA
JOQUEBEDE ABIA BARBOSA BATISTA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DO TESTE DE IMPUREZAS DO
FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA 300
MG + LAMIVUDINA 300 MG COMPRIMIDO
REVESTIDO**

RECIFE/2024

ANA CAROLINA AZEVEDO DE OLIVEIRA
CAMILA FRANÇA DA SILVA
JOQUEBEDE ABIA BARBOSA BATISTA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DO TESTE DE IMPUREZAS DO
FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA 300
MG + LAMIVUDINA 300 MG COMPRIMIDO
REVESTIDO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Disciplina TCC do Curso de farmácia do Centro
Universitário Brasileiro - UNIBRA, como parte dos
requisitos para conclusão do curso.

Professor Orientador: Dr. Caio César da Silva
Guedes

RECIFE/2024

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Laís Cardoso, CRB-4/PE-1753/P.

O48v Oliveira, Ana Carolina Azevedo de.

Validação de método analítico para determinação do teste de impurezas do fumarato de tenofovir desoproxila 300 mg + lamivudina 300 mg comprimido revestido / Ana Carolina Azevedo de Oliveira, Camila França da Silva, Joquebede Abia Barbosa Batista. - Recife: Edição do Autor, 2024.

53 p. : il. color.

Orientador(a): Dr. Caio César da Silva Guedes.

Trabalho de conclusão de curso - Centro Universitário Brasileiro – Unibra. Bacharelado em Farmácia, 2024.

Inclui Referências.

1. Antirretroviral. 2. CLAE. 3. Lamivudina. 4. Validação. 5. Tenofovir. I. Silva, Camila França da. II. Batista, Joquebede Abia Barbosa. III. Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 615

LISTA DE ABREVIACES

3TC - Lamivudina

AN - Análogo de Nucleotídeo

ANP - Fosfonato de nucleosídeo acíclico, em inglês

ARV - Medicamentos antirretrovirais

Ceis - Complexo Econmico Industrial da Saúde

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

COP&D - Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento

DPR – Desvio Padrão Relativo

FDA - Vigilância Sanitária Americana, do inglês “Food and Drug Administration”

HBV - Vírus da Hepatite B, em inglês

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana, em inglês

ITRN - Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo

ITRNN - Inibidor de transcriptase reversa não nucleosídeo

NRTI - inibidores da transcriptase reversa semelhantes a nucleosídeos

OMS - Organizao Mundial da Saúde

PDP - Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo

pH - Potencial Hidrogeniônico

RDC - Resoluo da Diretoria Colegiada

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SQR - Substância química de referência

SRC - Substância relacionada conhecida

SRD - Substância relacionada desconhecida

SUS - Sistema nico de Saúde

TEN - Tenofovir

TDF - fumarato de tenofovir desoproxila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1. O HIV no Brasil e no mundo.....	12
3.2. Ação do HIV no organismo.....	13
3.3. Terapia antirretroviral.....	15
3.3.1. Tenofovir + Lamivudina.....	17
3.4. Impurezas em medicamentos.....	18
3.4.1. Tipos de impurezas.....	18
3.4.2. Importância da análise de impurezas.....	19
3.5. Sobre as Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo.....	19
3.6. Validação de método analítico.....	20
3.6.1. Introdução.....	20
3.6.1.1 Validação analítica completa.....	20
3.6.1.2. Validação parcial.....	21
3.6.3. Parâmetros avaliados na validação parcial.....	22
3.6.3.1. Precisão.....	22
3.6.3.2. Seletividade.....	22
3.6.3.3. Exatidão.....	22
3.6.3.4. Limite de quantificação.....	22
3.6.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	23
4. DELINEAMENTO METODOLÓGICO.....	26
4.1. Materiais e reagentes.....	26
4.1.1. Substâncias Químicas de Referência:.....	26
4.1.2. Produtos:.....	26
4.1.3. Reagentes:.....	27
4.2. Equipamentos e Materiais: detalhes e especificações.....	27
4.2.1. Instrumentos e Equipamentos.....	27
4.2.2. Materiais.....	27
4.3. Condições cromatográficas.....	27
4.4. Especificações técnicas.....	28
4.4.1. Impurezas relacionadas ao Tenofovir Desoproxila:.....	28
4.4.2. Impurezas relacionadas à Lamivudina:.....	29
4.4.3. Impurezas desconhecidas:.....	29
4.5. Preparo das soluções.....	33
4.5.1. Solução tampão acetato pH 5,4.....	33
4.5.2. Fase móvel A.....	34

4.5.3. Fase móvel B.....	34
4.5.4. Solução padrão.....	34
4.5.5. Solução padrão diluída.....	34
4.5.6. Solução de adequabilidade do sistema.....	35
4.5.7. Solução amostra.....	35
4.5.8. Placebo.....	35
4.5.9. Solução de ácido fumárico.....	35
4.5.10. Solução estoque Fumarato de Tenofovir Desoproxila (SE1).....	36
4.5.11. Solução estoque Lamivudina (SE2).....	36
4.5.12. Solução amostra sintética para repetibilidade (para substâncias relacionadas desconhecidas - SRD).....	36
4.5.13. Solução amostra sintética para repetibilidade (para substância relacionada conhecida - SRC).....	36
4.5.14. Solução amostra sintética para limite quantificação.....	37
4.5.15. Solução de Amostra Sintética para seletividade.....	37
4.6. Parâmetros avaliados para validação da metodologia.....	37
4.6.1. Precisão.....	38
4.6.2. Seletividade.....	38
4.6.3. Exatidão.....	38
4.6.4. Solução amostra sintética para exatidão (para substâncias relacionadas desconhecidas).....	39
4.6.5. Solução amostra sintética para exatidão (para substâncias relacionadas conhecida).....	39
4.6.6. Limite de quantificação.....	40
4.7. Processamento de dados.....	40
4.7.1. Precisão.....	40
4.7.2. Limite de quantificação.....	41
4.7.3. Seletividade.....	41
4.7.4. Exatidão.....	41
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Seletividade.....	42
5.2. Precisão.....	46
5.2.1. Repetibilidade.....	46
5.2.2. Precisão intermediária.....	48
5.3. Exatidão.....	52
5.4. Limite de quantificação.....	54
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57
8. ANEXOS.....	63

RESUMO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é responsável pelo desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em que o vírus estabelece conexão com células que apresentam a expressão do receptor CD4. A combinação de Tenofovir e Lamivudina é crucial para maximizar a eficácia do tratamento contra o HIV-1. Este trabalho teve como objetivo validar, de forma parcial, a metodologia para quantificação de impurezas em um medicamento que combina fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) 300 mg e lamivudina (3TC) 300 mg, utilizado no tratamento do HIV. A validação foi conduzida no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) e seguiu as diretrizes da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O estudo utilizou a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a análise das impurezas, e os parâmetros de validação avaliados foram: precisão, exatidão, seletividade e limite de quantificação. Os resultados demonstraram que o método atendeu aos critérios estabelecidos pela Anvisa, comprovando sua adequação para o controle de qualidade do medicamento em questão. A validação do método analítico é essencial para garantir a qualidade, segurança e eficácia do medicamento, assegurando que ele esteja livre de impurezas em níveis que possam comprometer a saúde dos pacientes. Além disso, o estudo contribui para o fortalecimento do Complexo Econômico Industrial da Saúde (Ceis) no Brasil, por meio das Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP), que visam ampliar o acesso da população a medicamentos essenciais.

Palavras-chave: Antiretroviral. CLAE. Lamivudina. Validação. Tenofovir.

ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is responsible for the development of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), in which the virus establishes a connection with cells that express the CD4 receptor. The combination of Tenofovir and Lamivudine is crucial to maximize the effectiveness of treatment against HIV-1. This study aimed to partially validate the methodology for quantifying impurities in a drug that combines tenofovir disoproxil fumarate (TDF) 300 mg and lamivudine (3TC) 300 mg, used in the treatment of HIV. The validation was conducted at the Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) and followed the guidelines of Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) No. 166/2017 of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). The study used the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique for the analysis of impurities, and the validation parameters evaluated were: precision, accuracy, selectivity and limit of quantification. The results showed that the method met the criteria established by Anvisa, proving its suitability for quality control of the drug in question. The validation of the analytical method is essential to guarantee the quality, safety and efficacy of the drug, ensuring that it is free of impurities at levels that could compromise the health of patients. In addition, the study contributes to strengthening the Complexo Econômico Industrial da Saúde (Ceis) in Brazil, through Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP), which aim to expand the population's access to essential medicines.

Keywords: Antiretroviral. CLAE. Lamivudine. Validation. Tenofovir.

1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é responsável pelo desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), uma condição que debilita significativamente o sistema imunológico (MOTA, 2019).

O HIV estabelece conexão com células que apresentam a expressão do receptor CD4 por meio de sua glicoproteína de superfície, denominada gp120. Em seguida, ocorre a fusão com essas células através da glicoproteína transmembranar, conhecida como gp41 (MOTA, 2019).

Ao compreender esse processo, torna-se possível identificar estratégias eficazes para interrompê-lo. De acordo com Leite et al (2015), o Tenofovir (TEN), um fosfonato de aciclonucleosídeo (ANP), teve sua atividade antirretroviral descrita em 1993 por Balzarini e seus colaboradores, mas apenas em 2001 foi aprovado pela Vigilância Sanitária Americana (FDA) na forma de fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) para o tratamento do HIV. O TDF, atualmente, é utilizado no tratamento da hepatite B, sendo preferencial em situações de resistência à lamivudina e em casos de coinfeção HIV-HBV (Vírus da Hepatite B, em inglês). Este medicamento é administrado por via oral, apresentando notável eficácia na redução da carga viral quando comparado a outros fármacos da mesma classe (FERREIRA et al, 2017).

O TDF é classificado como um medicamento inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (ITRN) para o HIV-1, além de atuar como um inibidor da polimerase para o HBV. Já a Lamivudina faz parte da categoria dos inibidores da transcriptase reversa semelhantes a nucleosídeos (NRTIs) (FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA, 2018; EPIVIR®, 2023).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 658, de março de 2022, trata das diretrizes gerais para as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF), estabelecendo padrões de qualidade que as empresas farmacêuticas precisam adotar. Ela define os requisitos mínimos estipulados pelos órgãos de fiscalização sanitária, exigindo a implementação de um sistema de qualidade documentado e a realização de ensaios analíticos para a avaliação do produto pelo controle de qualidade. Isso visa garantir a segurança e eficácia do fármaco (ANVISA, 2022).

Com esse propósito, as Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) são estabelecidas entre entidades governamentais e setor privado, com o objetivo de fortalecer o complexo econômico-industrial do país. Essa iniciativa busca reduzir os custos governamentais e fortalecer o Sistema Único de Saúde (SUS), resultando em impactos positivos, como o aumento do acesso da população a medicamentos, a distribuição eficaz no mercado e a promoção da adesão à terapia antirretroviral (SILVA, 2017).

Por isso, para que a transferência de tecnologia entre laboratórios seja realizada através das PDP, é necessário que haja a validação do método analítico a ser implementado na rotina laboratorial ou na produção em grande escala. Esse processo requer a realização de ensaios experimentais estatisticamente comparativos, visando comprovar que todos os procedimentos e processos produtivos conduzem aos resultados esperados (LIMA, 2019).

Segundo Santana (2020), é necessário realizar a validação parcial do método analítico, incluindo, no mínimo, os parâmetros de seletividade, precisão e exatidão. Esses parâmetros são preconizados pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que oferece orientações específicas sobre a validação de métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Dessa forma, a validação é fundamental para tornar o método apto ao uso pretendido na rotina laboratorial.

O artigo 8 da RDC nº 166 de 2017 estabelece que a validação parcial de métodos analíticos deve considerar precisão, exatidão e seletividade, incluindo o limite de quantificação no caso de métodos analíticos destinados à quantificação de impurezas. Já o artigo 9 trata da transferência de método entre laboratórios, que se refere ao processo documentado que qualifica um laboratório a usar o método analítico de outro laboratório (ANVISA, 2017).

Diante desse cenário, a validação e transferência de métodos analíticos são passos cruciais para garantir a qualidade e eficácia dos medicamentos, fortalecendo o sistema de saúde e promovendo benefícios significativos para a população (LIMA, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Validar o método analítico parcial por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a determinação de impurezas orgânicas no medicamento Fumarato de Tenofovir Desoproxila 300 mg + Lamivudina 300 mg comprimido revestido, conforme os critérios estabelecidos na RDC 166/2017.

2.2. Objetivos específicos

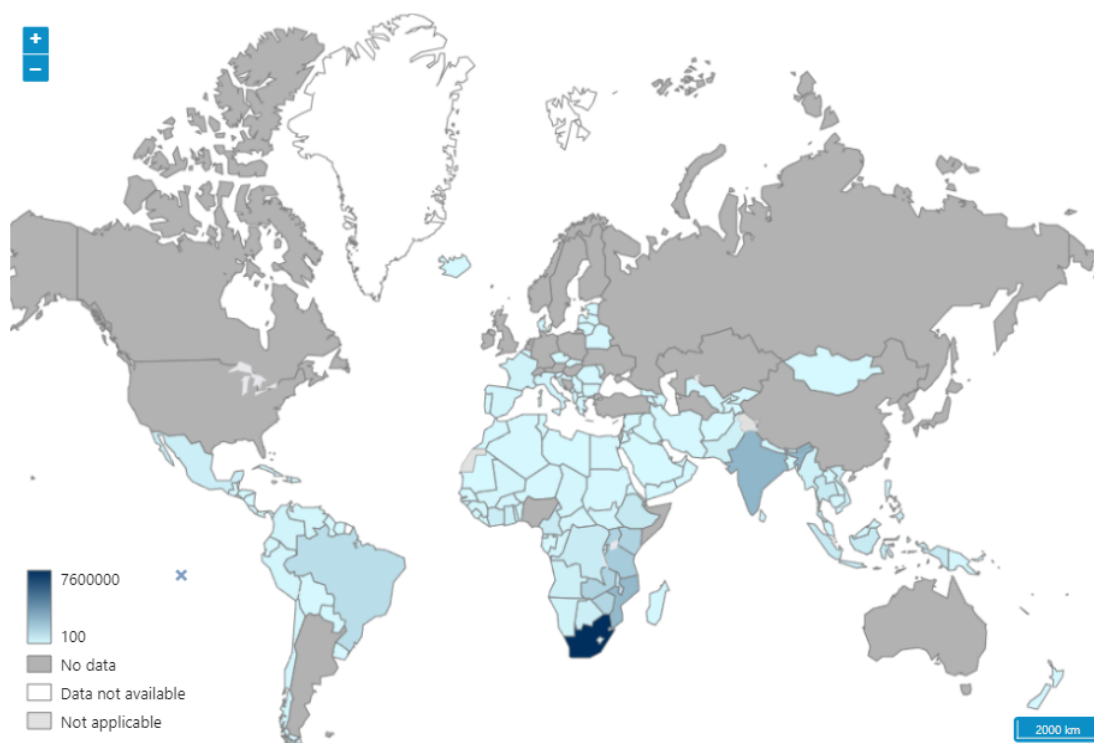
- Avaliar a exatidão do método, verificando a concordância entre os resultados obtidos e os valores de referência.
- Determinar a seletividade do método, garantindo que as impurezas orgânicas alvo sejam identificadas e quantificadas sem interferência de outros componentes da amostra.
- Estabelecer o limite de quantificação (LQ) para as impurezas orgânicas de interesse, ou seja, a menor quantidade que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.
- Avaliar a precisão do método, determinando a repetibilidade e a precisão intermediária dos resultados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O HIV no Brasil e no mundo

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2023), desde o início da epidemia, aproximadamente 85,6 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus HIV, resultando em cerca de 40,4 milhões de mortes relacionadas à doença. Em termos globais, estima-se que 39,0 milhões de pessoas estivessem vivendo com HIV até o final de 2022, com uma prevalência de aproximadamente 0,7% da população adulta entre 15 e 49 anos. No entanto, a distribuição da carga da epidemia varia consideravelmente entre países e regiões, sendo a Região Africana, de acordo com a OMS, a mais afetada, com quase 1 em cada 25 adultos vivendo com HIV, representando mais de dois terços do total de casos em todo o mundo (**Figura 1**).

Figura 1: Quantidade aproximada de pessoas vivendo com HIV no mundo.



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2023.

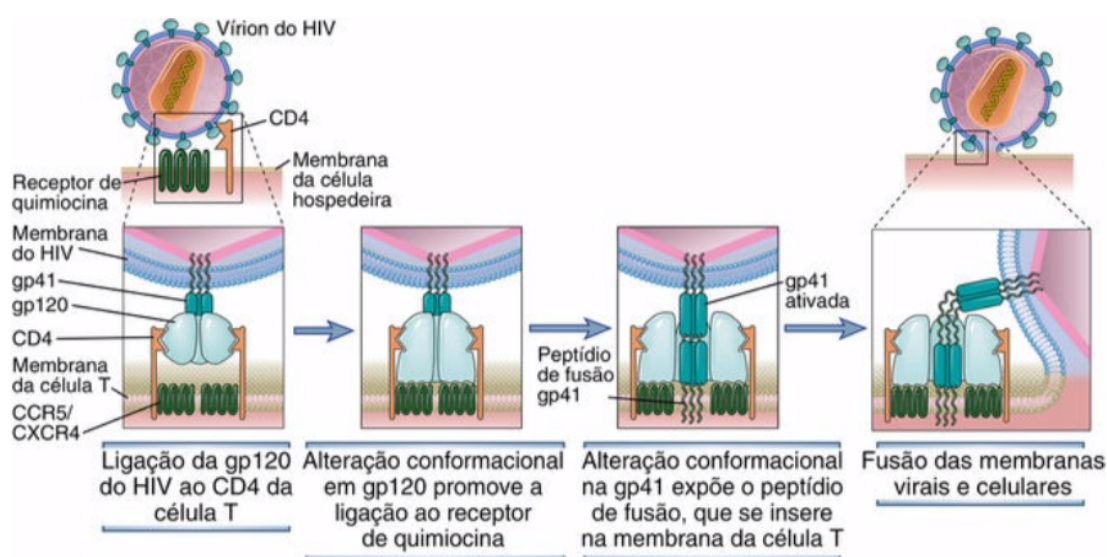
Em 2000, o número de casos era de cerca de 26,6 milhões, refletindo uma tendência de contínua transmissão do vírus HIV, apesar das reduções na incidência. Isso ocorre em meio aos benefícios da ampliação significativa do

acesso aos antirretrovirais, que contribuíram para a redução do número de mortes relacionadas ao HIV, especialmente após 2004, quando a mortalidade atingiu seu pico. Só no Brasil, o número de casos foi de aproximadamente 1 milhão em 2022 (OMS, 2023).

3.2. Ação do HIV no organismo

O HIV, ou Vírus da Imunodeficiência Humana, age atacando o sistema imunológico do corpo humano, especialmente as células CD4, que desempenham um papel central na defesa contra infecções. O vírus invade essas células CD4 e as utiliza para se replicar, produzindo cópias de si mesmo e espalhando-se pelo organismo (**Figura 2**). Como resultado, o sistema imunológico é enfraquecido, tornando o corpo mais suscetível a infecções oportunistas e doenças graves (MOTA, 2019).

Figura 2: Mecanismo de entrada do HIV na célula alvo.



Fonte: ALVES, Maria, 2023.

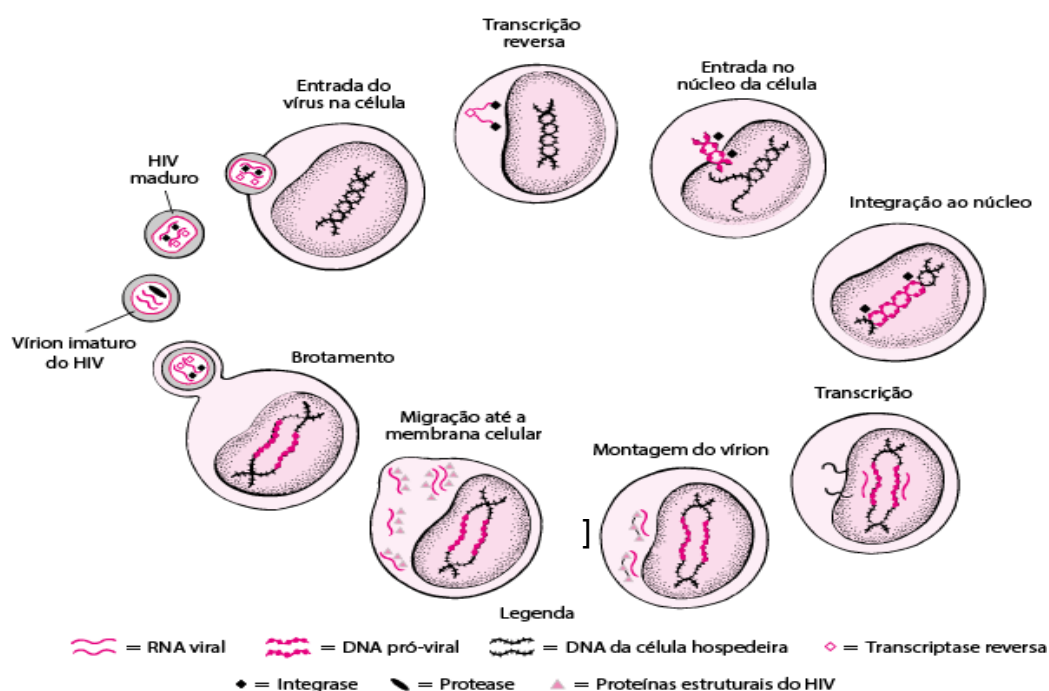
De acordo com Cribbs (2020), o HIV possui uma série de fases em seu ciclo de vida:

1. Anexação: O vírus se liga às células CD4 por meio de proteínas específicas em sua superfície, como a gp120.

2. Entrada: Após a ligação, o HIV funde sua membrana com a membrana da célula CD4, permitindo que seu material genético, composto por RNA viral, seja liberado no interior da célula.
3. Transcrição reversa: Uma vez dentro da célula CD4, o RNA viral é convertido em DNA viral pela enzima transcriptase reversa.
4. Integração: O DNA viral recém-formado é então integrado ao DNA do hospedeiro, tornando-se parte do genoma da célula infectada.
5. Replicação: O DNA viral integrado dirige a célula infectada a produzir RNA viral e proteínas virais. Esses componentes virais são então montados em novas partículas virais, que saem da célula infectada para infectar outras células CD4.

A **Figura 3** mostra o como ocorre a entrada do vírus na célula.

Figura 3: Ciclo de vida do HIV.



Fonte: Manual MSD Versão Saúde para a Família - Seção Profissional, 2024.

Ao longo do tempo, a progressão da infecção por HIV pode levar à imunodeficiência progressiva, onde o sistema imunológico torna-se cada vez mais debilitado. Isso pode resultar em uma série de complicações médicas

graves, incluindo infecções oportunistas e doenças relacionadas ao HIV, como a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (CRIBBS , 2020).

3.3. Terapia antirretroviral

A terapia antirretroviral (TARV) tem a intenção de diminuir a morbidade e a mortalidade das pessoas infectadas pelo HIV, e não a de erradicar o vírus. Mas o uso de antirretroviral está ligado a uma forte intervenção para prevenção da transmissão do HIV (ZUGE, 2020).

O início da TARV é aconselhado apenas quando a pessoa que vive com HIV está plenamente informada sobre os benefícios e riscos do tratamento, demonstra forte motivação e está devidamente preparada para o processo, garantindo assim o respeito à sua autonomia. É importante deixar claro que, uma vez iniciada, a TARV não deve ser interrompida. Além disso, é proibida qualquer forma de coerção para iniciar o tratamento, independentemente da situação (TECHI et al, 2023).

É importante ressaltar que o uso da terapia antirretroviral não garante a eliminação da transmissão sexual do HIV. Além disso, certos fatores, como a presença de doenças sexualmente transmissíveis, podem aumentar o risco de transmissão. Portanto, é essencial promover sempre o uso de preservativos, mesmo entre pacientes com supressão viral, como medida preventiva (TECHI et al, 2023).

De acordo com o Ministério da Saúde (2022), o tratamento inicial do HIV deve consistir sempre em uma combinação de três antirretrovirais, geralmente incluindo dois inibidores de transcriptase reversa nucleosídeos/nucleotídeos (ITRN/ITRNT) combinados com um inibidor de transcriptase reversa não nucleosídeo (ITRNN).

O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza tratamento gratuito, com os medicamentos mostrados na **Quadro 1**:

Quadro 1: Lista de antirretrovirais de uso adulto disponíveis no SUS

Princípio ativo	Apresentação disponível
<i>Inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (ITRN)</i>	
Abacavir (ABC)	300 mg comprimido revestido

Lamivudina (3TC)	150 mg comprimido revestido
Tenofovir (TDF)	300 mg comprimido revestido
Zidovudina (AZT)	100 mg cápsula gelatinosa dura
<i>Inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (ITRNN)</i>	
Efavirenz (EFZ)	600 mg comprimido revestido
Etravirina (ETR)	200 mg comprimido revestido
Nevirapina (NVP)	200 mg comprimido revestido
<i>Inibidores da protease (IP)</i>	
Atazanavir (ATV)	300 mg cápsula dura
Darunavir (DRV)	800 mg comprimido revestido
	600 mg comprimido revestido
Ritonavir (RTV)	100 mg comprimido revestido
<i>Inibidores da integrase (INI)</i>	
Dolutegravir (DTG)	50 mg comprimido revestido
Raltegravir (RAL)	400 mg comprimido revestido
<i>Inibidor de entrada (antagonista de CCR5)</i>	
Maraviroque (MVQ)	150 mg comprimido revestido
<i>Inibidor da fusão</i>	
Enfuvirtida (T-20)	90 mg/ml, pó liófilo para solução injetável.
<i>Medicamentos em Dose Fixa Combinada (DFC)</i>	
Tenofovir/Lamivudina (TDF/3TC)	300 mg/300 mg comprimido revestido
Tenofovir/Lamivudina/Efavirenz (TDF/3TC/EFV)	300 mg/300 mg/600 mg comprimido revestido
Zidovudina/Lamivudina (AZT/3TC)	300 mg/150 mg comprimido revestido
Dolutegravir/Lamivudina (DTG/3TC)	50 mg/300 mg comprimido revestido

Fonte: Adaptado de Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias em Saúde, Ministério da Saúde, 2023.

3.3.1. Tenofovir + Lamivudina

O TDF é considerado um medicamento classificado como inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (ITRN), usado no tratamento do HIV-1. Além disso, ele também age como um inibidor da polimerase para o HBV (FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA, 2018).

Tenofovir é um análogo de nucleotídeo da adenosina 5-monofosfato. Em sua forma original, o tenofovir é um dianion com pH fisiológico e apresenta uma baixa permeabilidade de membrana, além de uma baixa biodisponibilidade oral. Para aumentar a biodisponibilidade oral e a permeabilidade da membrana, o tenofovir é comercializado como pró-fármacos, como o TDF e o TAF (WASSNER, 2020).

A principal desvantagem do TDF está relacionada à sua tendência à nefrotoxicidade, especialmente entre diabéticos, hipertensos, indivíduos de ascendência negra e idosos, além de quando administrado junto com outros medicamentos nefrotóxicos. Pacientes com doença renal pré-existente devem preferencialmente optar por outra combinação de inibidores de transcriptase reversa nucleosídeos (ITRN). Além disso, observou-se uma correlação entre o uso de TDF e a diminuição da densidade óssea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A Lamivudina é um medicamento usado para tratar a infecção pelo HIV-1 e hepatite B crônica. Ele pertence à classe dos inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (ITRN), agindo para bloquear a replicação do vírus (ANVISA, 2017b).

Funciona de forma semelhante à timidina, um componente do DNA, interrompendo a replicação do vírus quando incorporada em seu DNA. Geralmente, é combinada com outros medicamentos antirretrovirais, como o Tenofovir, para formar uma terapia altamente eficaz, conhecida como coquetel antirretroviral (ARAÚJO, 2023).

Quanto à junção de Tenofovir e Lamivudina, de acordo com Amariles (2019), essa combinação é crucial para maximizar a eficácia do tratamento contra o HIV-1. Ambos os medicamentos agem como inibidores da transcriptase reversa, interferindo na replicação do vírus em diferentes estágios

do ciclo viral. Essa terapia combinada reduz a carga viral, retardando a progressão da doença e minimizando o risco de resistência viral.

3.4. Impurezas em medicamentos

As impurezas em produtos farmacêuticos representam qualquer componente que não seja o fármaco ativo ou excipiente, incluindo impurezas orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. A presença dessas impurezas pode afetar a segurança e eficácia do medicamento, sendo essencial sua determinação e controle durante o processo de produção (MAESTRELO, 2020).

3.4.1. Tipos de impurezas

- **Impurezas Orgânicas:** São compostos de origem orgânica que podem estar presentes no medicamento devido a processos de fabricação, armazenamento ou manipulação. Por exemplo, produtos de degradação do fármaco ativo, impurezas geradas durante a síntese do medicamento ou mesmo contaminantes ambientais (MACHADO, 2020).
- **Impurezas Inorgânicas:** São substâncias de natureza inorgânica que podem estar presentes nos medicamentos. Elas podem advir de fontes como reagentes utilizados na síntese do medicamento, materiais de embalagem ou mesmo de processos de purificação inadequados (FIELBIG, 2019).
- **Solventes Residuais:** Durante o processo de fabricação de medicamentos, é comum o uso de solventes para dissolver componentes ou facilitar reações químicas. No entanto, alguns desses solventes podem permanecer no produto final em quantidades pequenas, mas ainda assim significativas. Esses solventes residuais podem representar riscos à saúde se presentes em quantidades acima dos limites permitidos (MINAMI, 2022).

3.4.2. Importância da análise de impurezas

A presença de impurezas nos produtos farmacêuticos podem afetar tanto a segurança quanto a eficácia do medicamento. Impurezas inesperadas ou em quantidades elevadas podem causar efeitos colaterais indesejados, diminuir a eficácia do tratamento ou mesmo representar riscos à saúde do paciente (MAESTRELO, 2020).

Por isso, é essencial que as impurezas sejam identificadas, quantificadas e controladas durante o processo de produção farmacêutica. Isso envolve a implementação de métodos analíticos sensíveis e específicos para detecção e quantificação de impurezas, além de medidas rigorosas de controle de qualidade ao longo de todas as etapas de fabricação do medicamento. A regulamentação farmacêutica estabelece limites aceitáveis para impurezas em produtos farmacêuticos e exige que os fabricantes garantam que seus produtos estejam em conformidade com esses padrões de qualidade (ANVISA, 2017).

3.5. Sobre as Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo

As Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) consistem em cooperações entre produtores públicos e entre estes e empresas privadas. O objetivo das PDP é o desenvolvimento, transferência de tecnologia, produção, capacitação produtiva e tecnológica do Brasil em produtos estratégicos para o SUS (BRASIL, 2014).

A inclusão das PDP na agenda política brasileira se deu em um contexto político favorável. Diversas frentes políticas reconheceram o potencial do desenvolvimento produtivo do Complexo Econômico Industrial da Saúde (Ceis) para impulsionar a economia e ampliar o acesso a tecnologias em saúde prioritárias para o país (SILVA, 2020).

Ainda de acordo com Silva (2020), a criação da iniciativa teve como base a Lei de Inovação, que possibilitou a compra preferencial de produtos e serviços pelo governo federal de empresas que investissem em pesquisa e desenvolvimento de tecnologia no país. Além disso, as três esferas de governo e as agências de fomento estimularam a criação de alianças estratégicas para

pesquisa e desenvolvimento, com o objetivo de gerar inovações e transferir e difundir tecnologia (BRASIL, 2004).

3.6. Validação de método analítico

3.6.1. Introdução

A validação de método analítico é um processo importante na análise de produtos farmacêuticos, garantindo a confiabilidade e precisão dos resultados obtidos. Envolve uma série de parâmetros e critérios que devem ser cumpridos para assegurar a qualidade dos dados gerados (LOPES, 2020).

A ANVISA destaca a importância de testar a funcionalidade correta do método na validação de métodos analíticos, avaliando a precisão, exatidão e linearidade para determinar com precisão a quantidade de um composto em uma amostra e detectar impurezas, mesmo em quantidades muito pequenas. Na transferência de método, a validação pode ser parcial, mas deve ser feita no laboratório receptor (ANVISA, 2017a).

Essa validação parcial deve avaliar, pelo menos, os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade. Como a validação parcial do método analítico analisada neste trabalho inclui a quantificação de impurezas, também incluiu-se o limite de quantificação (ANVISA, 2017a).

3.6.1.1 Validação analítica completa

Caso a metodologia não esteja descrita em compêndio oficial, é realizada uma validação analítica completa, conforme os parâmetros estabelecidos no **Quadro 2**:

Quadro 2: Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	não	sim	não	sim

Precisão Repetibilidade	não	sim	não	sim
Precisão Intermediária	não	sim (1)	não	sim (1)
Seletividade (2)	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não (3)	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não (3)
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

Fonte: ANVISA, RDC nº 166, Ministério da Saúde, 2017.

(1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

(2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

(3) Pode ser necessário em alguns casos.

3.6.1.2. Validação parcial

Na validação parcial, são demonstradas algumas características essenciais do método analítico previamente validado, garantindo a qualidade dos resultados obtidos sob as condições de uso. Isso é feito avaliando-se pelo menos os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade, e, no caso de métodos destinados à quantificação de impurezas, o limite de quantificação também deve ser incluído na validação parcial (ANVISA, 2017a).

Quando um método é transferido entre laboratórios, ele é considerado validado se um estudo de validação parcial for realizado nas instalações do laboratório receptor (ANVISA, 2017a).

É fundamental que os documentos de validação e validação parcial detalhem os procedimentos, parâmetros analíticos, critérios de aceitação e resultados de maneira suficiente para permitir sua reprodução e, quando aplicável, avaliação estatística (ANVISA, 2017a).

3.6.3. Parâmetros avaliados na validação parcial

3.6.3.1. Precisão

A precisão na análise deve ser avaliada considerando a concordância entre os resultados obtidos através de testes realizados em amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (ANVISA, 2017).

3.6.3.2. Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser comprovada por sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse de forma inequívoca, mesmo na presença de outros componentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2017).

Isso quer dizer que o método deve ser capaz de distinguir o analito de interesse de outras substâncias que podem estar presentes na amostra, garantindo a precisão e confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017).

3.6.3.3. Exatidão

A exatidão analisa a proximidade dos resultados que cada amostra tem do valor considerado verdadeiro. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da substância química de referência (SQR) (ANVISA, 2017).

3.6.3.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis considerando as condições específicas do experimento. É importante ressaltar que o limite de quantificação deve ser consistente com o limite de especificação da impureza. Além disso, para produtos sujeitos a regulamentações que estabelecem parâmetros para a notificação, identificação

e qualificação de produtos de degradação em medicamentos, o limite de quantificação deve ser igual ou inferior ao limite de notificação (ANVISA, 2017).

De acordo com o Art. 32 da RDC 166/2017, para determinação de impurezas, o limite de quantificação deve ser de até 120% (cento e vinte por cento) da concentração no limite da especificação de cada impureza individual (ANVISA, 2017).

3.6.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), também conhecida como HPLC (do inglês High-Performance Liquid Chromatography), é uma técnica analítica amplamente utilizada em laboratórios de controle de qualidade, especialmente na indústria farmacêutica. Sua versatilidade permite a detecção e quantificação de diversos compostos em diferentes matrizes, como medicamentos, alimentos e amostras ambientais (GAMA, 2019; SCHEUER, 2022).

O princípio da CLAE baseia-se na separação dos componentes de uma amostra através da interação diferencial entre duas fases imiscíveis: a fase estacionária, geralmente uma coluna empacotada com partículas sólidas, e a fase móvel, um solvente ou mistura de solventes que flui através da coluna. A eficiência da separação depende da escolha adequada da fase estacionária, da composição da fase móvel, da temperatura e do fluxo (AMBRÓSIO, 2022).

A CLAE oferece alta sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, sendo capaz de detectar e quantificar compostos em baixas concentrações. A utilização de diferentes tipos de detectores, como UV/Vis, fluorescência, índice de refração e espectrometria de massa, amplia a gama de aplicações da técnica, permitindo a análise de uma variedade de compostos com diferentes propriedades físico-químicas (SCHEUER, 2022).

Na indústria farmacêutica, a CLAE desempenha um papel crucial em diversas etapas, desde o desenvolvimento de novos medicamentos até o controle de qualidade do produto final. A técnica é utilizada para determinar a pureza de fármacos, identificar e quantificar impurezas, avaliar a estabilidade de formulações e monitorar processos de produção (SCHEUER, 2022).

Sua aplicação na determinação de impurezas é fundamental para garantir a segurança e eficácia dos fármacos, uma vez que a presença de impurezas pode afetar a estabilidade, biodisponibilidade e toxicidade dos medicamentos (ICH, 2017).

Diversos estudos recentes têm demonstrado a eficácia da CLAE na determinação de impurezas em medicamentos. Por exemplo, Scheuer (2022) desenvolveu e validou um método de CLAE para a determinação do teor e impurezas orgânicas do insumo farmacêutico desloratadina, obtendo resultados satisfatórios em termos de precisão, exatidão e linearidade.

Da mesma forma, Castillo e Afanasjeva (2023) validaram um método de CLAE para quantificar o fluconazol e suas impurezas orgânicas, demonstrando a versatilidade da técnica na análise de diferentes classes de fármacos e impurezas.

A crescente demanda por análises rápidas, precisas e eficientes tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias e aprimoramentos na CLAE. A automação, a miniaturização de sistemas e o desenvolvimento de novas fases estacionárias são exemplos de avanços recentes que têm contribuído para aumentar a eficiência e a aplicabilidade da técnica (DA SILVA, 2019).

A concentração da solução amostra (C_a) pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$C_a = C_p \left(\frac{R_a}{R_p} \right)$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra;

C_p = concentração da solução padrão;

R_a = resposta (área ou altura) do pico da solução amostra;

R_p = resposta (área ou altura) do pico da solução padrão.

Apesar de sua ampla utilização e inúmeras vantagens, a CLAE apresenta alguns desafios, como a complexidade do equipamento, a necessidade de preparo adequado das amostras e a otimização das condições cromatográficas. No entanto, a contínua evolução da técnica e o

desenvolvimento de novas tecnologias têm permitido superar esses desafios, tornando a CLAE uma ferramenta cada vez mais poderosa e indispensável na análise de produtos farmacêuticos e em diversas outras áreas (GAMA, 2019).

4. DELINEAMENTO METODOLÓGICO

Este estudo, de natureza quantitativa, foi realizado no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (Lafepe), no setor de pesquisa e desenvolvimento (COP&D), entre agosto e setembro de 2023. A pesquisa teve duração de 30 dias e utilizou ensaios analíticos experimentais.

Os ensaios foram baseados em metodologias previamente validadas e desenvolvidas pela indústria farmacêutica privada, parceira do Lafepe no desenvolvimento produtivo e na covalidação de métodos analíticos. Essa parceria garante a confiabilidade e a qualidade dos resultados obtidos.

Para garantir clareza e concisão, os detalhes específicos da pesquisa, como os métodos analíticos utilizados, as variáveis analisadas e os resultados obtidos, estão descritos nas próximas seções.

4.1. Materiais e reagentes

Os padrões de referência foram utilizados como comparação para as análises da amostra.

Os reagentes foram utilizados na preparação das soluções e no processo de análise.

Todos os lotes dos padrões de referência e reagentes foram certificados e atenderam aos requisitos de qualidade.

4.1.1. *Substâncias Químicas de Referência:*

- **Tenofovir:** Lote PC2023/003
- **Lamivudina:** Lote PC 2021/069
- **Ácido Fumárico:** Lote 15-ABY-179-1

4.1.2. *Produtos:*

- **Fumarato de tenofovir desoproxila 300 mg + lamivudina 300 mg comprimido revestido:** Lote 21080847
- **Placebo com fumarato de tenofovir desoproxila:** Lote 0370/22
- **Placebo com lamivudina:** Lote 0371/22, laboratório Cristália

- **Placebo sem ativos:** Lote 0369/22, laboratório Cristália

4.1.3. Reagentes:

- **Acetato de amônio:** Lote BCCC 8342, SIGMA-ALDRICH®, Estados Unidos
- **Ácido fosfórico:** Lote 139, QUEST PRODUTOS QUÍMICOS®, Brasil
- **Metanol grau HPLC:** J. T. BAKER®, Brasil
- **Acetonitrila grau HPLC:** J. T. BAKER®, Brasil

4.2. Equipamentos e Materiais: detalhes e especificações

Todos os equipamentos foram calibrados e qualificados antes do uso.

Os materiais foram selecionados por sua qualidade e compatibilidade com os métodos analíticos utilizados.

As condições de operação dos equipamentos e os procedimentos de utilização dos materiais foram rigorosamente controlados.

4.2.1. Instrumentos e Equipamentos

- **Balança analítica:** Shimadzu®, Japão
- **Cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE:** Hitachi, Merck®, Alemanha
- **Lavadora ultrassônica:** Unique®, Brasil
- **pHmetro:** Mettler Toledo®, Estados Unidos
- **Purificador de água:** Milli-Q, Merck®, Alemanha
- **Incubadora Shaker:** SPLabor®, Brasil

4.2.2. Materiais

- **Coluna cromatográfica:** Hypersil BDS C18 (4,6 mm x 250 mm - 5 µm) - Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos
- **Filtros:** Empore Extraction Disks 2215 (3M™, Estados Unidos)
- **Membrana:** 0,45 µm (Durapore, Merck®, Alemanha)

4.3. Condições cromatográficas

- **Técnica:** Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

- **Fase Estacionária:** Hypersil BDS C18 (4,6 mm x 250 mm - 5 µm) - Thermo Scientific ®
- **Fase Móvel:**
 - **Fase Móvel A:** Solução Tampão Acetato pH 5,4/ Acetonitrila (97:3)
 - **Fase Móvel B:** Acetonitrila
- **Fluxo:** 1,0 mL/min.
- **Volume de Injeção:** 5,0µL
- **Tempo de corrida:** 65 minutos
- **Tempos de retenção:**
 - **Lamivudina:** cerca de 7 minutos;
 - **Tenofovir Desoproxila:** cerca de 43,5 minutos;
- **Temperatura da coluna:** 25°C
- **Temperatura do amostrador:** 10 °C
- **Detector:** UV 260 nm
- **Tempo de retenção relativo do ácido fumárico:** Em relação ao tenofovir desoproxila: cerca de 0,06
- **Programa de eluição da fase móvel:** Vide Tabela 1

Tabela 1: Programa de eluição da fase móvel

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0	97	3
0 → 10	97	3
10 → 55	97 → 53	3 → 47
55 → 57	53 → 97	47 → 3
57 → 65	97	3

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023.

4.4. Especificações técnicas

4.4.1. Impurezas relacionadas ao Tenofovir Desoproxila:

- Tenofovir Monoester (impureza A): Máximo 3,5%.

- Qualquer outra impureza relacionada ao Tenofovir Desoproxila: máximo 0,5%,
- Sendo permitido até no máximo duas impurezas acima de 0,2%.
- Impurezas totais relacionadas ao Tenofovir Desoproxila: máximo de 6,0%

4.4.2. Impurezas relacionadas à Lamivudina:

- Qualquer outra impureza relacionada à Lamivudina: máximo 0,3%, sendo permitido até no máximo uma impureza acima de 0,2% e até no máximo duas impurezas acima de 0,1%.
- Impurezas totais relacionadas à Lamivudina: máximo de 0,6%.

4.4.3. Impurezas desconhecidas:

- Impurezas desconhecidas relacionadas à associação: máximo 0,2%.
- Quaisquer outras impurezas desconhecidas: máximo de 0,2%.
- Impurezas totais desconhecidas: máximo 1,0%.

Quadro 3: Tempo de retenção relativo de impurezas

Impureza	Tempo de retenção relativo (~)	Fator resposta (F)	Origem
Impureza desconhecida	0,065	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0655	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0656	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0657	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0658	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0661	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,0664	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0777	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0785	1	Fumarato de tenofovir desoproxila

Impureza desconhecida	0,0786	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,079	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0791	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0792	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,0795	1	Associação
Impureza desconhecida	0,086	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Tenofovir	~0,0900	2,1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,1245	1	Associação
Impureza desconhecida	0,1311	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,168	1	Associação
Impureza desconhecida	0,1694	1	Associação
Impureza desconhecida	0,1738	1	Associação
Impureza desconhecida	0,1753	1	Associação
Impureza desconhecida	0,178	1	Associação
Impureza desconhecida	0,1783	1	Associação
Impureza desconhecida	0,1988	1	Lamivudina
Impureza desconhecida	0,2079	1	Associação
Impureza desconhecida	0,2085	1	Associação
Impureza desconhecida	0,2728	1	Associação
Impureza desconhecida	0,2731	1	Associação
Impureza desconhecida	0,2929	1	Associação
Impureza desconhecida	0,4216	1	Associação

Impureza desconhecida	0,4221	1	Associação
Impureza desconhecida	0,4321	1	Associação
Impureza desconhecida	0,4897	1	Associação
Impureza desconhecida	0,4898	1	Associação
Tenofovir monoéster	~0,5000	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,5069	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,5127	1	Associação
Impureza desconhecida	0,5134	1	Associação
Impureza desconhecida	0,5217	1	Associação
Impureza desconhecida	0,5218	1	Associação
Impureza desconhecida	0,5464	1	Associação
Impureza desconhecida	0,5689	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,5739	1	Associação
Impureza desconhecida	0,5751	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6044	1	Associação
Impureza desconhecida	0,605	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6395	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6508	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6518	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6729	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6739	1	Associação

Impureza desconhecida	0,6973	1	Associação
Impureza desconhecida	0,6975	1	Associação
Impureza desconhecida	0,7177	1	Associação
Impureza desconhecida	0,735	1	Associação
Impureza desconhecida	0,7285	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,729	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,7303	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,7314	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,7409	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,7414	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,7425	1	Associação
Impureza desconhecida	0,7427	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,7439	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,802	1	Associação
Impureza desconhecida	0,8026	1	Associação
Impureza desconhecida	0,9728	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	0,9738	1	Associação
Impureza desconhecida	0,9935	1	Associação
Impureza desconhecida	1,0178	1	Associação
Impureza desconhecida	1,0179	1	Associação
Impureza desconhecida	1,032	1	Associação

Fonte:

Impureza desconhecida	1,0657	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	1,0658	1	Associação
Impureza desconhecida	1,066	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	1,0661	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	1,0662	1	Fumarato de tenofovir desoproxila
Impureza desconhecida	1,1766	1	Associação
Impureza desconhecida	1,1767	1	Associação

Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

4.5. Preparo das soluções

4.5.1. Solução tampão acetato pH 5,4

Para preparar a solução tampão, foram pesados 1,9g de acetato de amônio e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL. O acetato de amônio foi então dissolvido em aproximadamente 800 mL de água. Em seguida, o volume de água foi completado e o pH foi ajustado para $5,4 \pm 0,05$ com ácido fosfórico. Após essa etapa, a solução foi homogeneizada..

A solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ m e depois em filtro EMPORE Octadecyl C18 47 mm Extraction Disks (3M – 2215).

A filtração foi feita com a utilização de bomba de vácuo com manômetro aberto, para que ocorresse uma filtração por gotejamento, não deixando permitir que a membrana secasse no vácuo, desde a etapa de ativação, até a etapa final de filtração.

Antes de iniciar a filtração, foi necessário realizar a ativação da membrana em frasco de descarte, adicionando 150 mL de metanol e, antes de secar, adicionou-se 100 mL de água, sempre deixando sobre a membrana cerca de 2 a 3 mL. Este procedimento de ativação da membrana foi realizado a cada filtração de 1000 mL de tampão acetato pH 5,4.

4.5.2. Fase móvel A

1. Solução tampão acetato pH 5,4/ acetonitrila (97:3) ;
2. Homogeneizar, filtrar em membrana de 0,45 µm e desgaseificar.

4.5.3. Fase móvel B

Acetonitrila.

4.5.4. Solução padrão

Para a preparação da solução padrão, foram pesados 12,0 mg do padrão de lamivudina e 12,0 mg do padrão de tenofovir desoproxila, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, os padrões foram dissolvidos em 2,0 mL de metanol e submetidos a ultrassom por 1 minuto à temperatura ambiente.

Após essa etapa, aproximadamente 2 mL de fase móvel A foram adicionados e o sistema foi novamente submetido a ultrassom por mais 1 minuto a temperatura ambiente. A solução foi então diluída e o volume completado com a fase móvel. Em seguida, a solução foi homogeneizada.

É importante controlar tanto o tempo quanto a temperatura do ultrassom, pois estes podem afetar a degradação do fumarato de tenofovir desoproxila em tenofovir monoéster.

4.5.5. Solução padrão diluída

Para preparar a solução padrão diluída, foi adicionado 1,0 mL da solução padrão a um balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com a fase móvel A. Após a homogeneização, a solução foi filtrada através de membrana PVDF 0,45 µm (concentração final de 0,06 mg/mL de lamivudina e 0,06 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila). Esta solução diluída é estável por aproximadamente 152 horas.

4.5.6. Solução de adequabilidade do sistema

A quantidade de amostra equivalente a 60 mg dos ativos fumarato de tenofovir desoproxila e lamivudina foi pesada e transferida para um béquer. Em seguida, foi dissolvida em 2,0 mL de metanol e submetida a ultrassom por 1 minuto à temperatura ambiente. Após isso, foram adicionados 18,0 mL de fase móvel A, e o sistema foi aquecido em banho de água fervente por 20 minutos. Após o processo, a solução foi filtrada através de membrana PVDF 0,45 µm.

4.5.7. Solução amostra

Foram transferidos 5 comprimidos da amostra para um balão volumétrico de 500 mL para dissolução em 100,0 mL de metanol. O sistema foi submetido a ultrassom por 1 minuto a temperatura ambiente, seguido de agitação em mesa (250 rpm) por 5 minutos. Em seguida, aproximadamente 100 mL de fase móvel A foram adicionados, e o sistema foi novamente submetido a ultrassom por 1 minuto e agitação em mesa (250 rpm) por 10 minutos. Após isso, o volume foi completado com fase móvel A e, após a homogeneização, a solução foi filtrada através de membrana PVDF 0,45 µm (concentração final de 3,0 mg/mL de lamivudina e 3,0 mg/mL de fumarato de tenofovir desoproxila).

4.5.8. Placebo

A quantidade de placebo equivalente a 300,0 mg dos ativos na amostra foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, foi dissolvida em 20,0 mL de metanol e submetida a ultrassom por 1 minuto a temperatura ambiente, seguido de agitação em mesa agitadora (250 rpm) por 5 minutos. Após essa etapa, aproximadamente 20,0 mL de fase móvel A foram adicionados, e o sistema foi novamente submetido a ultrassom por 1 minuto e agitação em mesa (250 rpm) por 10 minutos. Finalmente, o volume foi completado com fase móvel A, homogeneizado e filtrado através de membrana PVDF 0,45 µm.

4.5.9. Solução de ácido fumárico

Pesou-se cerca de 5,0 mg de padrão de ácido fumárico em balão volumétrico de 25 mL, Dissolveu em 5,0 mL de metanol e deixou em ultrassom

por 1 minuto; Adicionou 5,0 mL de fase móvel A e deixou em ultrassom por mais 1 minuto; Completou o volume com fase móvel A e homogeneizou, em seguida, filtrada em membrana de 0,45 μ m. (cf = 0,2 mg/mL de ácido fumárico).

4.5.10. Solução estoque Fumarato de Tenofovir Desoproxila (SE1)

Pesou-se com exatidão, cerca de 10mg de Padrão de Fumarato de Tenofovir Desoproxila e transferiu para balão volumétrico de 10 mL; Dissolveu em 1,0 mL de metanol e deixou em ultrassom por 1 minuto (em temperatura ambiente); adicionou 1,0 mL de fase móvel A e deixou em ultrassom por mais um minuto (em temperatura ambiente); diluiu, completou o volume com fase móvel A e homogeneizou (Cf = 1,0 mg/mL de Fumarato de Tenofovir Desoproxila).

4.5.11. Solução estoque Lamivudina (SE2)

Pesou-se com exatidão, cerca de 10mg de Padrão de Lamivudina e transferiu para balão volumétrico de 10 mL; dissolveu em 1,0 mL de metanol e deixou em ultrassom por 1 minuto (em temperatura ambiente); adicionou 1,0 mL de fase móvel A e deixou em ultrassom por mais um minuto (em temperatura ambiente); diluiu, completou o volume com fase móvel A e homogeneizou (Cf = 1,0 mg/mL de Lamivudina).

4.5.12. Solução amostra sintética para repetibilidade (para substâncias relacionadas desconhecidas - SRD)

Transferiu-se 300 μ L da SE1 e 180 μ L da SE2 para balão volumétrico de 20 mL; adicionou a quantidade de placebo suficiente para atingir a concentração de trabalho; Completou o volume com fase móvel A e homogeneizou, em seguida, Filtrou em membrana de 0,45 μ m (Cf = 15 μ g/mL de Fumarato de Tenofovir Desoproxila e 9 μ g/mL de Lamivudina).

4.5.13. Solução amostra sintética para repetibilidade (para substância relacionada conhecida - SRC)

Transferiu-se 2,1 mL da SE1 para balão volumétrico de 20 mL, foi adicionada a quantidade de 3 mL de placebo necessária para atingir a

concentração de trabalho, completou o volume com fase móvel A e homogeneizou, logo após filtrou-se em membrana de 0,45 µm (Cf = 105,0 µg/mL de Fumarato de Tenofovir Desoproxila).

4.5.14. Solução amostra sintética para limite quantificação

Transferiu-se 30 µL da SE1 e 30 µL da SE2 para balão volumétrico de 20 mL; adicionou 3 mL de placebo, suficiente para atingir a concentração de trabalho, completou o volume com fase móvel A e homogeneizou, logo após filtrou em membrana de 0,45 µm (Cf = 1,5 µg/mL de Fumarato de Tenofovir Desoproxila e 1,5 µg/mL de Lamivudina).

4.5.15. Solução de Amostra Sintética para seletividade

Pesou-se aproximadamente 30,0 mg de padrão primário de Lamivudina e 30,0 mg de padrão primário de fumarato de tenofovir desoproxila, adicionou 3 mL de placebo, suficiente para atingir a concentração de trabalho, Posteriormente, a mistura foi dissolvida em 2,0 mL de metanol e submetida a ultrassom por 1 minuto à temperatura ambiente, seguida de agitação em mesa agitadora por 5 minutos a 250 rpm. Após isso, foram adicionados 2,0 mL de fase móvel A e o sistema foi submetido a ultrassom por mais 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de agitação em mesa agitadora por 10 minutos a 250 rpm. O volume foi então completado com a fase móvel A e a solução foi homogeneizada. Logo em seguida, a solução foi filtrada através de membrana de 0,45 µm. A concentração final foi de 3,0 mg/mL tanto de Lamivudina quanto de Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

4.6. Parâmetros avaliados para validação da metodologia

A metodologia descrita para quantificação de impurezas de fumarato de tenofovir desoproxila na concentração de 3,0 mg/mL e na lamivudina na concentração de 3,0 mg/mL no produto acabado fumarato de tenofovir desoproxila 300 mg + Lamivudina 300 mg comprimido revestido será validada de forma parcial, frente a confirmação dos parâmetros de precisão,

seletividade, exatidão e limite de quantificação, por se tratar de uma transferência de tecnologia, conforme descrito na RDC 166/ 2017 da ANVISA.

4.6.1. Precisão

A precisão foi representada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade foi verificada com 6 replicatas da solução SRD e 6 replicatas SRC preparadas individualmente, sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e instrumentação, em uma única corrida analítica.

A precisão intermediária foi verificada com 6 replicatas da solução SRD e 6 replicatas SRC preparadas individualmente, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos, mesma instrumentação e em uma única corrida analítica.

A análise foi feita com a injeção de 3 vezes a solução padrão, 1 vez o padrão controle, e 1 vez cada amostra.

4.6.2. Seletividade

A seletividade demonstra se o método consegue identificar o analito de maneira inequívoca na presença de outros componentes. As seguintes soluções foram injetadas no HPLC: solução tampão, fase móvel A, fase móvel B(acetonitrila), solução adequabilidade do sistema, solução placebo, solução placebo contendo tenofovir desoproxila, solução placebo contendo lamivudina, solução de amostra sintética, solução padrão diluído, solução amostra, solução de ácido fumárico. As demais soluções em uma única injeção, e a solução padrão e amostra injetadas em triplicata.

4.6.3. Exatidão

A exatidão analisa a proximidade dos resultados que cada amostra tem do valor considerado verdadeiro. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da substância química de referência (SQR).

4.6.4. Solução amostra sintética para exatidão (para substâncias relacionadas desconhecidas)

Transferir alíquotas das soluções estoques e quantidade de placebo para balão volumétrico adequado de acordo com o **Quadro 4**:

Quadro 4: Substâncias relacionadas desconhecidas

Nível	Ativos	Concentração (%)	Alíquota (mL)	Solução estoque utilizada	Placebo (mg)	Balão volumétrico (mL)	Concentração final (µg/mL)
Baixo	Todos	0,05%	0,03	SE1 e SE2	3	20	1,5
Médio	Fumarato de Tenofovir Desoproxila	0,50%	0,3	SE1	3	20	15
	Lamivudina	0,30%	0,18	SE2			9
Alto	Todos	2,40%	0,72	SE1 e SE2	3	10	72

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Nota: (%) porcentagem referente à concentração de lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila na solução amostra.

Completar o volume com fase móvel A, homogeneizar e filtrar em membrana PVDF de 0,45 µm.

4.6.5. Solução amostra sintética para exatidão (para substâncias relacionadas conhecida)

Transferir alíquotas das soluções estoques e quantidade de placebo para balão volumétrico adequado de acordo com o **Quadro 5**:

Quadro 5: Substâncias relacionadas conhecidas

Nível	Ativos	Concentração (%)	Alíquota (mL)	Solução estoque utilizada	Placebo (mg)	Balão volumétrico (mL)	Concentração final (µg/mL)
Baixo	Fumarato de Tenofovir Desoproxila	0,05%	0,03	SE1	3	20	1,5

Médio	Fumarato de Tenofovir Desoproxila	3,50%	1,05	SE1	3	10	105,0
Alto	Fumarato de Tenofovir Desoproxila	4,20%	0,63	SE1	3	5	126,0

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Nota: (%) porcentagem referente à concentração de lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila na solução amostra.

Completar o volume com fase móvel A, homogeneizar e filtrar em membrana PVDF de 0,45

4.6.6.Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Foi determinada utilizando seis amostras sintéticas, em uma mesma corrida analítica, mesma instrumentação, mesmo analista, e mesmas condições de operação.

Foi injetado 5 vezes a solução de adequabilidade do sistema, 3 vezes a solução padrão diluída, 1 vez cada amostra sintética, 1 vez a solução diluente e 1 vez o padrão confirmação.

4.7. Processamento de dados

4.7.1. Precisão

De acordo com a legislação vigente os resultados de precisão devem ser expressos através do desvio padrão relativo. O valor máximo aceitável será determinado após utilização da equação de Horwitz. E a precisão intermediária deverá ser avaliada através do teste t student, para comparação dos resultados obtidos entre cada analista, no qual o T calculado deverá ser menor do que o T tabelado para aprovação.

4.7.2. Limite de quantificação

É calculado a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos valores obtidos do total de amostras.

4.7.3. Seletividade

É avaliado o perfil cromatográfico, e verificado se os picos apresentam-se separados e com ausência de interferentes significativos.

4.7.4. Exatidão

É calculado a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos valores obtidos, e o grau de recuperação em cada nível e recuperação individual.

Cálculo de Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV):

Realizado por meio da determinada fórmula: $DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100$.

Em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Cálculo do teste t student:

Transcorreu por meio da determinada fórmula: $t = (CMD1 - CMD2) / \sqrt{(DP1^2/n1 + DP2^2/n2)}$, em que CMD1 e CMD2 são as médias de cada analista, DP1 e DP2 são os desvios padrão para cada analista, e n1 e n2 o número de amostras de cada analista

Cálculo de grau de recuperação:

Evoluiu-se por meio da seguinte fórmula: “recuperação=(concentração média experimental/ concentração teórica) X 100”.

Valor máximo de desvio padrão relativo aceitável:

Deu-se a partir da equação de horwitz para 6 amostras ($DPR\% = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$) e para 12 amostras ($DPR\% = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$)

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Seletividade

A seletividade foi comprovada através das análises realizadas com a injeção das soluções: solução tampão, fase móvel A, fase móvel B, solução adequabilidade do sistema, solução placebo, solução placebo contendo fumarato de tenofovir desoproxila, solução placebo contendo lamivudina, solução de amostra sintética, solução de fumarato de tenofovir desoproxila, solução padrão diluído, solução amostra e solução de ácido fumárico. Seguem abaixo a figura 4 (de 4a até 4l) representando os resultados da corrida analítica.

Figura 4: Avaliação da seletividade do método analítico para determinação de impurezas do Fumarato de Tenofovir Desoproxila e Lamivudina.

Figura 4a: Cromatograma da Seletividade Solução Tampão

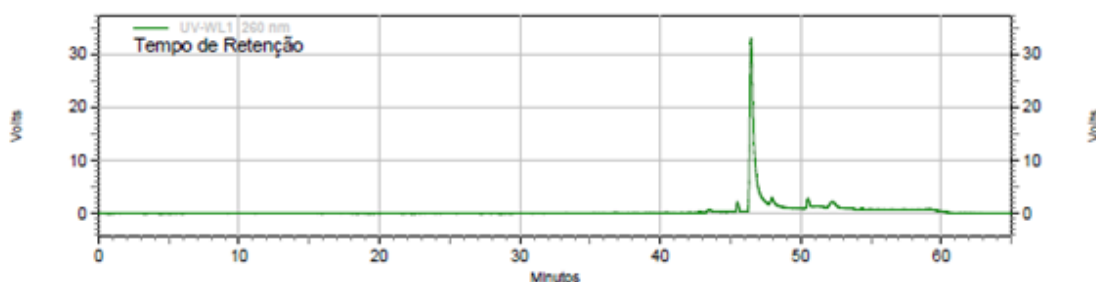


Figura 4b: Cromatograma da Seletividade Fase Móvel A

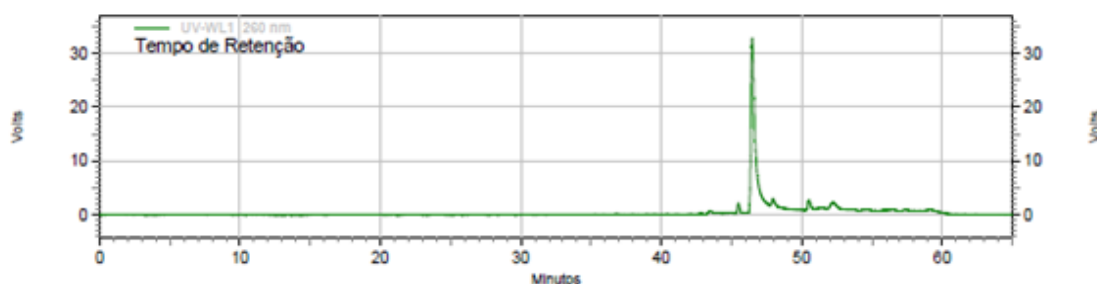


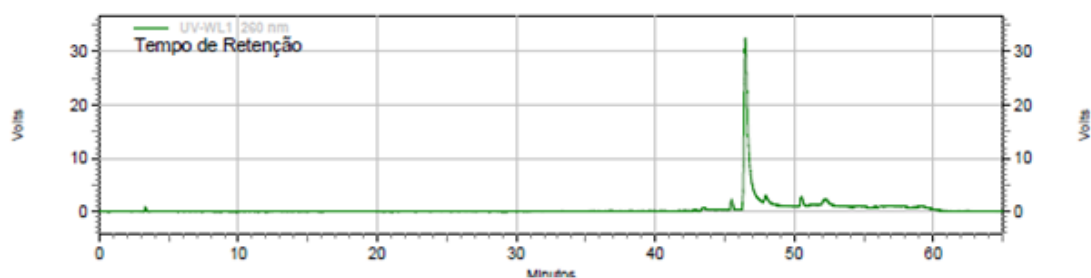
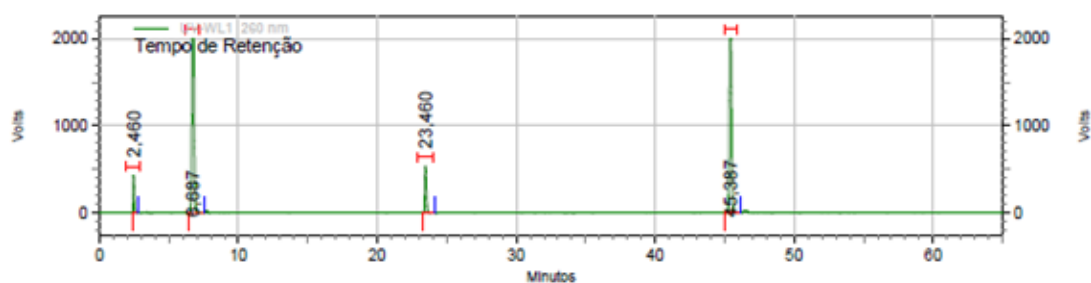
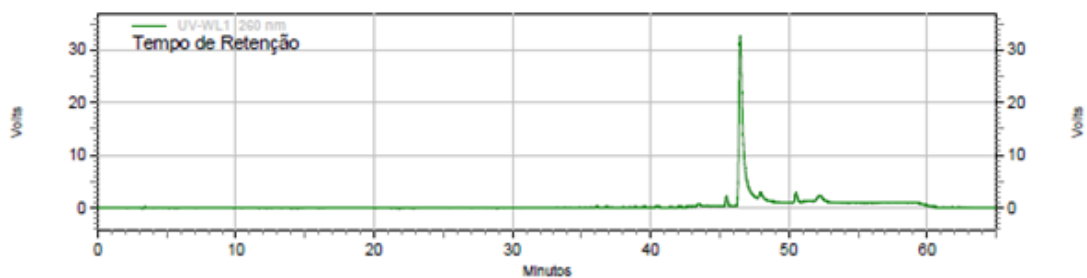
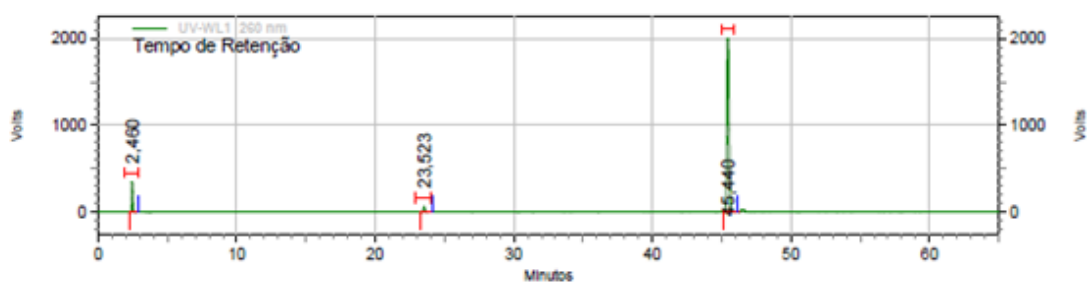
Figura 4c: Cromatograma da Seletividade Fase Móvel B**Figura 4d:** Cromatograma da Seletividade Solução adequabilidade do sistema**Figura 4e:** Cromatograma da Seletividade Solução Placebo**Figura 4f:** Cromatograma da Seletividade Solução Placebo contendo Tenofovir Desoproxila

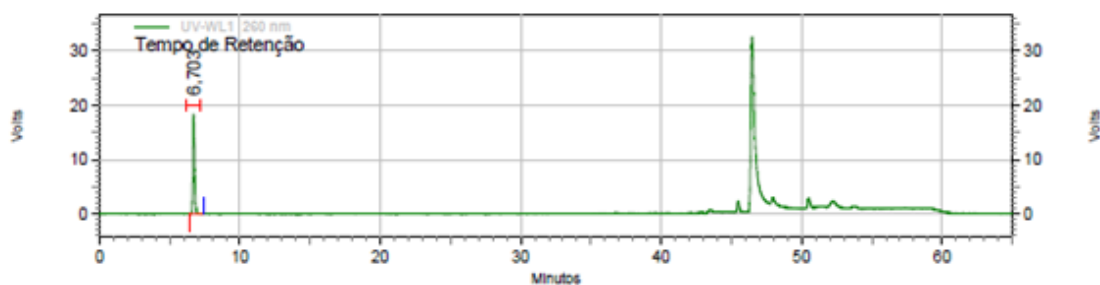
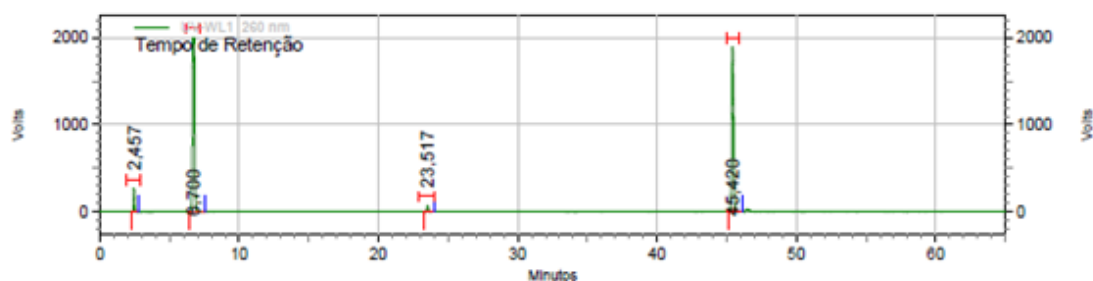
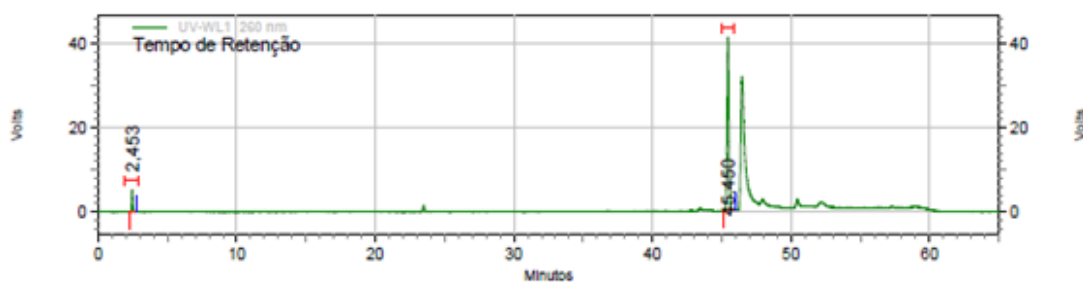
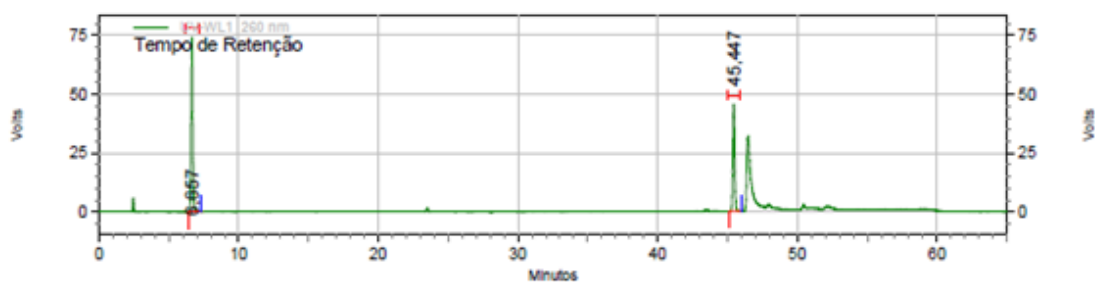
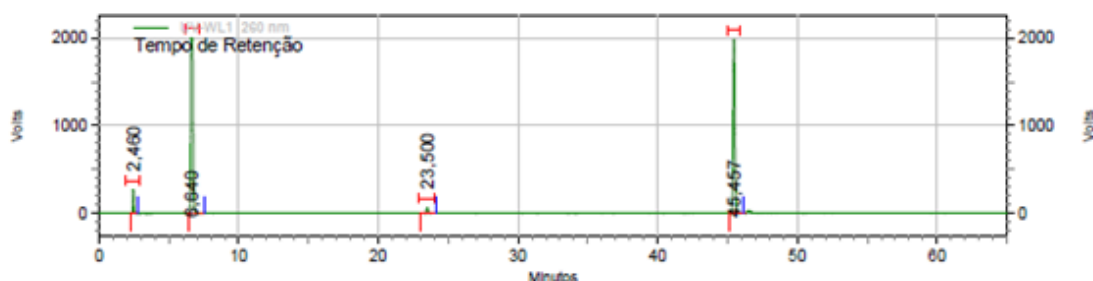
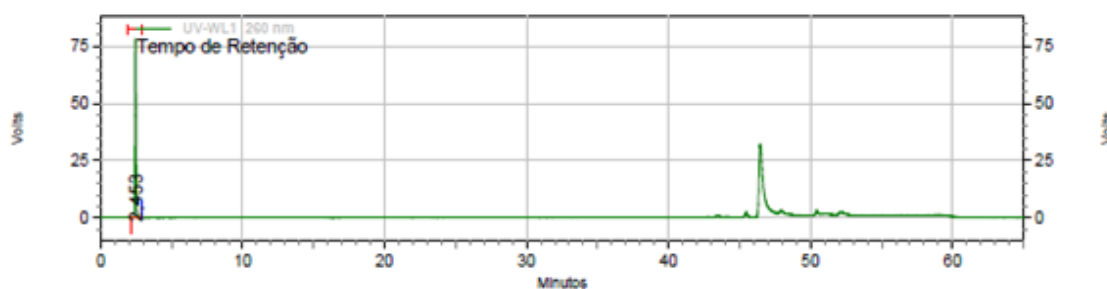
Figura 4g: Cromatograma da Seletividade Solução Placebo contendo Lamivudina**Figura 4h:** Cromatograma da Seletividade Solução de Amostra Sintética**Figura 4i:** Cromatograma da Seletividade Solução de Tenofovir**Figura 4j:** Cromatograma da Seletividade Solução Padrão diluído

Figura 4k: Cromatograma da Seletividade Solução Amostra**Figura 4l:** Cromatograma da Seletividade Solução de ácido fumárico

Conforme descrito por Santana (2020), a seletividade é um parâmetro crucial na validação de métodos analíticos, permitindo a correta identificação das impurezas alvo. Além disso, deve haver a pureza de pico da substância em estudo que resulte em picos regulares, ou seja, sem assimetrias como caldas e ombros.

Ao observar os cromatogramas foi verificado que, durante a corrida cromatográfica, não houve interferência referente às soluções injetadas no tempo de retenção do Fumarato de Tenofovir Desopoxila e Lamivudina. Fica claro a pureza do pico de ambos os ativos não havendo co-eluição deles com picos interferentes (SOUZA CANÁRIO et al, 2023)

Sendo assim, o método foi considerado seletivo para teste de impurezas do produto acabado nas concentrações propostas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrando-se capaz de separar com eficácia as impurezas sem interferentes nos resultados, corroborando com a literatura (ANVISA, 2017).

5.2. Precisão

A precisão do método foi dividida em duas partes: repetibilidade e precisão intermediária.

5.2.1. Repetibilidade

A repetibilidade para substâncias relacionadas desconhecidas (SRD) foi determinada utilizando seis amostras sintéticas com concentração final (Cf) de 0,015mg/mL ou 15,0µg/mL de Fumarato Tenofovir Desoproxila e 0,009mg/mL ou 9,0 µg/mL de Lamivudina sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Na tabela 2 (2a e 2b) seguem os resultados da repetibilidade para SRD.

Tabela 2a. Resultados da repetibilidade de Fumarato Tenofovir Desoproxila (SRD)

Amostra	Tenofovir mg/mL	% Tenofovir
1	0,0152	101,54
2	0,0152	101,1
3	0,0153	101,88
4	0,0153	101,83
5	0,015	100,13
6	0,0153	101,78
Média	0,0152	101,38
DP	0,0001	-
DPR%	0,66	-

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Tabela 2b. Resultados da repetibilidade da Lamivudina (SRD)

Amostra	Lamivudina mg/mL	% Lamivudina
1	0,0087	97,03
2	0,0096	106,62
3	0,0097	107,45

4	0,0097	107,39
5	0,0095	105,6
6	0,0097	107,34
Média	0,009483	105,24
DP	0,0004	-
DPR%	3,88	-

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Pode-se observar que a repetibilidade para as SRD atende a RDC 166, visto que: Fumarato Tenofovir Desoproxila desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 7,10% e o valor encontrado foi de 0,66%; e Lamivudina o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 7,66% e o valor encontrado foi de 3,88%.

Para os dois ativos na concentração das SRD o DPR encontrado foi inferior ao aceitável.

A repetibilidade para substância relacionada conhecidas (SRC) foi determinada utilizando seis amostras sintéticas com concentração final (Cf) de 0,105mg/mL ou 105,0µg/mL de Fumarato Tenofovir Desoproxila sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Na tabela 3 seguem os resultados da repetibilidade para SRC.

Tabela 3: Resultados da repetibilidade de Tenofovir (SRC)

Amostra	Tenofovir mg/mL	% Tenofovir
1	0,1059	100,81
2	0,1046	99,59
3	0,1046	99,65
4	0,0974	92,79
5	0,095	90,5
6	0,0985	93,81
Média	0,101	96,19
DP	0,0046	-
DPR%	4,52	-

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Pode-se observar que a repetibilidade atende a RDC 166, visto que o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 5,29% e o valor encontrado foi de 4,52%, inferior ao requisitado.

5.2.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada por meio da proximidade dos resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em dias diferentes e realizada por operadores distintos, com 6 determinações da solução SRD e 6 replicatas SRC. Na tabela 4 (4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 4f), seguem os resultados da Precisão intermediária e teste t Student, respectivamente.

Tabela 4a. Resultado da Precisão Intermediária de Tenofovir (SRD)

Amostra	Tenofovir mg/mL		% Tenofovir	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	0,0152	0,015	101,54	99,76
2	0,0152	0,0149	101,1	99,27
3	0,0153	0,0149	101,88	99,35
4	0,0153	0,0155	101,83	103,22
5	0,015	0,0144	100,13	95,73
6	0,0153	0,0143	101,78	95,13
Média	0,0152	0,0148	101,38	98,74
Desvio Padrão	0,0001	0,0004	-	
DPR% (valor aceitável 7,10)	0,66	3	-	
DPR% Grupo (valor aceitável 10,64)	2,47		-	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Tabela 4b. Resultado do Teste *t* Student de Tenofovir (SRD)

	Analista 1	Analista 2
Média	0,0152	0,0148
Stat T	2,125	
t crítico bi-caudal	2,2281	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Foi verificado que o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 7,10% para 6 amostras e de 10,64% para as 12 amostras e os valores encontrado foram inferiores aos requisitados: Analista 1 = 0,66% e Analista 2 = 3,00% e para o total das amostras avaliadas nos dois laboratórios foi de 2,47%. Após aplicação do teste *t* Student, o *t* calculado para Tenofovir foi de 2,1250; valor inferior ao *t* tabelado de 2,2281; com 95% de confiança.

Tabela 4c. Resultado da Precisão Intermediária de Lamivudina (SRD)

	Lamivudina mg/mL		% Lamivudina	
Amostra	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	0,0087	0,0089	97,03	98,89
2	0,0096	0,0091	106,62	101,3
3	0,0097	0,0093	107,45	103,56
4	0,0097	0,0093	107,39	103,39
5	0,0095	0,0091	105,6	101,38
6	0,0097	0,0094	107,34	103,98
Média	0,0095	0,0092	105,24	102,08
Desvio Padrão	0,0004	0,0002	-	
DPR% (valor aceitável 7,66)	3,88	1,9	-	
DPR% Grupo (valor aceitável 11,49)	3,34		-	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Tabela 4d. Resultado do Teste t Student.

-	Analista 1	Analista 2
Média	0,0095	0,0092
Stat T	1,7086	
t crítico bi-caudal	2,2281	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Foi verificado que o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 7,66% para 6 amostras e de 11,49% para as 12 amostras e os valores encontrado foram inferiores aos requisitados: Analista 1 = 3,88% e Analista 2 = 1,90% e para o total das amostras avaliadas nos dois laboratórios foi de 3,34%. Após aplicação do teste t Student, o t calculado para Lamivudina foi de 1,7086; valor inferior ao t tabelado de 2,2281; com 95% de confiança.

Tabela 4e. Resultado da Precisão Intermediária de Tenofovir (SRC)

	Tenofovir mg/mL		% Tenofovir	
Amostra	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	0,1059	0,1017	100,81	96,85
2	0,1046	0,1004	99,59	95,66
3	0,1046	0,0984	99,65	93,67
4	0,0974	0,0982	92,72	93,53
5	0,095	0,1	90,5	95,28
6	0,0985	0,0982	93,81	93,49
Média	0,101	0,0995		
DP	0,0046	0,0015		
DPR% (valor aceitável 5,29)	4,52	1,47		
DPR% Grupo (valor aceitável 7,94)	3,32			

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Tabela 4f: Resultado do Teste t Student

-	Analista 1	Analista 2
Média	0,101	0,0995
Stat T	0,7767	
t crítico bi-caudal	2,4469	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Os valores de DPR obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária estão abaixo de 2%, o que atende aos critérios de aceitação da RDC 166/2017 e demonstra a boa precisão do método. Essa precisão é comparável à observada no estudo de Silva (2019), que validou um método por CLAE-FD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência) para análise de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras, obtendo coeficientes de variação (CV) entre 3,27% e 11,90% para repetibilidade e entre 5,11% e 11,23% para reprodutibilidade intralaboratorial. A alta precisão em ambos os estudos demonstra a robustez da técnica de CLAE na quantificação de fármacos e seus metabólitos em diferentes matrizes.

Foi verificado que o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 5,29% para 6 amostras e de 7,94% para as 12 amostras e os valores encontrados foram inferiores aos requisitados: Analista 1 = 4,52% e Analista 2 = 1,47% e para o total das amostras avaliadas nos dois laboratórios foi de 3,32%. Após aplicação do teste t Student, o t calculado para Tenofovir foi de 0,7767; valor inferior ao t tabelado de 2,4469; com 95% de confiança. Portanto, pode-se concluir que o método foi preciso para impurezas do produto acabado Fumarato de Tenofovir Desoproxila 300 mg + Lamivudina 300 mg comprimido revestido por CLAE.

5.3. Exatidão

A exatidão para SRD foi preparada considerando as seguintes concentrações em triplicata: Baixo - 0,0015 mg/mL (0,05%) para ambos ativos; Médio - 0,015mg/mL (0,5%) do Fumarato de Tenofovir Desoproxila e 0,009 mg/mL (0,3%) da Lamivudina e Alto – 0,072mg/mL (2,40%) para ambos os ativos. Os resultados estão registrados na **tabela 5** (tabela 5a e 5b)

Tabela 5a: Resultado da Exatidão do Tenofovir (SRD)

mg/mL				% Recuperação			
Amostra	0,05%	0,50%	2,40%	Amostra	0,05%	0,50%	2,40%
1	0,0016	0,0158	0,0727	1	104,11%	105,33%	101,01%
2	0,0016	0,0158	0,0719	2	109,97%	105,54%	99,89%
3	0,0016	0,0157	0,0693	3	108,94%	104,57%	96,29%
Média	0,0016	0,0158	0,0713	Média	107,67%	105,14%	99,07%
DPR%	2,91	0,49	2,49	Limite inferior	80,00%	80,00%	80,00%
DPR Aceitável%	10,03	7,1	5,6	Limite superior	110,00%	110,00%	110,00%

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Tabela 5b: Resultado da Exatidão da Lamivudina (SRD)

mg/mL				% Recuperação			
Amostra	0,05%	0,30%	2,40%	Amostra	0,05%	0,30%	2,40%
1	0,0015	0,0084	0,0695	1	100,15%	92,79%	96,58%
2	0,0015	0,0083	0,0696	2	99,73%	92,73%	96,63%
3	0,0015	0,0083	0,0666	3	100,01%	92,73%	92,51%
Média	0,0015	0,0083	0,0686	Média	99,96%	92,75%	95,24%
DPR%	0,21	0,04	2,48	Limite inferior	80,00%	80,00%	80,00%
DPR Aceitável%	10,03	7,66	5,6	Limite superior	110,00%	110,00%	110,00%

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

A exatidão para SRC foi preparada considerando as seguintes concentrações do Fumarato de Tenofovir Desoproxila em triplicata: Baixo - 0,0015 mg/mL (0,05%); Médio - 0,105mg/mL (3,50%) e Alto – 0,126mg/mL (4,20%) para ambos os ativos. Foi observada a capacidade de recuperação do método, para a cada concentração: para 0,05% o valor de recuperação é de 80 a 110% e DPR% de 10,03; para 3,50% o valor de recuperação é de 90 a 107% e DPR% de 5,29 e para 4,20% o valor de recuperação é de 90 a 107% e DPR% de 5,15. Os resultados estão registrados na tabela 6.

Tabela 6: Resultado da Exatidão do Tenofovir (SRC)

mg/mL				% Recuperação			
Amostra	0,05%	3,50%	4,20%	Amostra	0,05%	3,50%	4,20%
1	0,0016	0,1004	0,1136	1	107,66%	95,65%	90,16%
2	0,0016	0,1005	0,1138	2	107,91%	95,75%	90,35%
3	0,0016	0,1002	0,1199	3	109,30%	95,39%	95,19%
Média	0,0016	0,1004	0,1158	Média	108,29%	95,59%	91,90%
DPR%	0,82	0,2	3,1	Limite inferior	80,00%	90,00%	90,00%
DPR Aceitável%	10,03	5,29	5,15	Limite superior	110,00%	107,00%	107,00%

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Foi observada a capacidade de recuperação do método, para a cada concentração: para 0,05% o valor de recuperação é de 80 a 110% e DPR% de 10,03; para 0,5% o valor de recuperação é de 80 a 110% e DPR% de 7,10; para 0,3% o valor de recuperação é de 80 a 110% e DPR% de 7,66 e para 2,40% o valor de recuperação é de 80 a 110% e DPR% de 5,60.

A exatidão foi avaliada através da recuperação das impurezas adicionadas ao medicamento. Os testes demonstraram uma recuperação adequada das impurezas, indicando que o método é preciso e exato, conforme os critérios da ANVISA (2017).

É interessante notar que Scheuer (2022) também obteve recuperações satisfatórias na validação do método para desloratadina, com valores entre

98,17% e 101,14%, confirmando a exatidão da técnica de CLAE para a análise de fármacos e impurezas.

5.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado para garantir que as menores concentrações das impurezas pudessem ser detectadas e quantificadas com precisão. De acordo com Leite et al. (2015), determinar o LQ é fundamental para assegurar a segurança dos medicamentos, uma vez que níveis excessivos de impurezas podem comprometer a saúde dos pacientes. Os resultados obtidos foram satisfatórios e dentro dos padrões estabelecidos pela RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017).

O limite de quantificação foi determinada utilizando seis amostras sintéticas com concentração final (Cf) de 0,0015 mg/mL ou 1,5µg/mL de Fumarato Tenofovir Desoproxila e Lamivudina sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Na tabela 7 (7a e 7b) seguem os resultados do LQ.

Tabela 7a: Resultados do LQ de Fumarato Tenofovir Desoproxila

Amostra	Tenofovir mg/mL	% Tenofovir
1	0,00156	104,11
2	0,00165	109,97
3	0,00163	108,94
4	0,00158	105,38
5	0,00158	105,01
6	0,00164	109,37
Média	0,001607	107,13
DP	0,00004	
DPR%	2,4	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

Tabela 7b: Resultados do LQ de Lamivudina

Amostra	Lamivudina mg/mL	% Lamivudina
1	0,00149	99,15
2	0,00148	98,74
3	0,00149	99,02
4	0,00149	99,14
5	0,00148	98,34
6	0,00149	99,42
Média	0,001485	98,97
DP	0,00001	
DPR%	0,38	

Fonte: Protocolo de Validação de Método Analítico da Coordenadoria De Pesquisa e Desenvolvimento, Lafepe, 2023

O limite de quantificação do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), que foi de 2,40% para o tenofovir e 0,38% para o lamivudina. Ambos os valores são inferiores ao limite aceitável de 10,04%, indicando que o método apresenta boa precisão na quantificação dos analitos.

A sensibilidade do método em quantificar baixas concentrações dos analitos é corroborada pelo estudo de Machado (2020), que, mesmo utilizando uma coluna C18 menor (4,6 mm x 100 mm) e um volume de injeção menor (2 µL), obteve resultados satisfatórios na validação de um método analítico para quantificação de impurezas orgânicas de um analgésico por CLAE-DAD. No presente estudo, a utilização da coluna Hypersil BDS C18, com suas características de alta eficiência e seletividade, contribuiu para a obtenção de resultados precisos e exatos na determinação do LQ, mesmo com um volume de injeção maior (5,0 µL).

6. CONCLUSÃO

A validação do método analítico para determinação de impurezas em fumarato de tenofovir desoproxila e lamivudina por CLAE demonstrou sua adequação aos critérios da RDC nº 166/2017, garantindo a qualidade e segurança desses medicamentos essenciais no tratamento do HIV. Os resultados obtidos, que atenderam aos parâmetros de precisão, exatidão, seletividade e limite de quantificação, confirmam sua aplicabilidade na rotina do laboratório para o controle de qualidade desses princípios ativos.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, Maria. Entendendo a Imunologia do HIV e da AIDS: Biotec e Oportunidades. **LinkedIn**, 20 de fevereiro de 2023. Disponível em:

<https://www.linkedin.com/pulse/entendendo-imunologia-do-hiv-e-da-aids-biotec-oportunidades/?originalSubdomain=pt>. Acesso em: 02 de abr. de 2024.

AMARILES, Pedro et al. Efectividad y seguridad del esquema genérico lamivudina/tenofovir y efavirenz en pacientes con VIH/SIDA naïve: estudio fase IV no aleatorizado, Cali-Colombia 2012-2014. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 1, p. 32-40, 2019. DOI:

<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000100032>. Disponível em:

https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182019000100032&script=sci_arttext. Acesso em: 01 de abr. de 2024.

AMBRÓSIO, Isabela Sayuri. **Desenvolvimento de uma fase estacionária baseada na imobilização de um polímero fluorado sobre sílica aluminizada para separação de compostos polares**. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2022. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.98>. Acesso em: 18 mai. 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução de Diretoria Colegiada - **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 52-55. Disponível em: <https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/handle/anvisa/1292>. Acesso em: 01 de abr. de 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 658** de 30 de março de 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-658-de-30-de-marco-de-2022-389846242>. Acesso em: 18 fev. 2024.

ARAÚJO, Thiago Pinho Cordeiro et al. Simplificação terapêutica com lamivudina (3TC) e dolutegravir (DTG) em pessoas vivendo com HIV na Bahia: dados de vida real. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103055, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S141386702300315X>. Acesso em: 1 abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.531, de 12 de novembro de 2014**. Redefine as diretrizes e os critérios para a definição da lista de produtos estratégicos para o Sistema Único

de Saúde (SUS) e o estabelecimento das Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) e disciplina os respectivos processos de submissão, instrução, decisão, transferência e absorção de tecnologia, aquisição de produtos estratégicos para o SUS no âmbito das PDP e o respectivo monitoramento e avaliação. Diário Oficial da União. 13 Nov 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt2531_12_11_2014.html. Acesso em: 1 abr. 2024.

BRASIL. **Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências. Diário Oficial da União, 3 Dez 2004. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/l10.973.htm. Acesso em: 1 abr. 2024.

CANÁRIO, A. C.; CERIZE, N. P.; MARCANTE, A.; SÁ, A. P. N.; ROVARE, V. P.; SANTOS, W. F.; OLIVEIRA, S. S. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do teor de formaldeído por HPLC em leite. **Evidência**, v. 23, n. 1, p. 89-104, 2023. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/32593>. Acesso em 10 jun. 2024.

CASTILLO, James Alexander; AFANASJEVA, Natalia. Validación de la metodología para cuantificar el fluconazol y sus impurezas orgánicas en materia prima por cromatografía líquida de alta resolución. **Biomed.**, Bogotá, v. 43, supl. 1, p. 229-244, Aug. 2023. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572023000500229&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 1 jun. 2024.

CRIBBS, Sushma K.; CROTHERS, Kristina; MORRIS, Alison. Pathogenesis of HIV-related lung disease: immunity, infection, and inflammation. **Physiological reviews**, v. 100, n. 2, p. 603-632, 2020. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00039.2018>. Acesso em: 16 mar. 2024.

SILVA, Thaís Michelle Liziere da. **Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/31554>. Acesso em: 18 mai. 2024.

EPIVIR®: lamivudina. Ana Carolina Carotta Anacleto. Rio de Janeiro: GlaxoSmithKline Brasil Ltda., 2023. Bula de remédio. Disponível em: <https://br.gsk.com/media/6273/epivir-comprimidos.pdf>. Acesso em 19 jan. 2024.

FELICIANO DOS SANTOS, J.; ALVES DA SILVA, S.; ZANETTI DE ROSSI, G.; PALMA DE ALMEIDA, A. Validação de metodologia analítica para quantificação de desoxinivalenol em amostras de trigo e produtos a base de trigo por CLAE-UV. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 17, n. 8, 2021. DOI: 10.14808/sci.plena.2021.081509. Disponível em: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/6329>. Acesso em: 18 mai. 2024.

FERREIRA, B.; IZAR, F.; LEMOS, C.; RIBAS, J. L. C. Antibióticos e antirretrovirais: uma abordagem biotecnológica. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 234–248, 2017. Disponível em: <https://revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/800>. Acesso em: 15 jan. 2024

FIEBIG, Leticia Cristina. **Aspectos históricos e técnicos da aplicação das técnicas de espectrometria atômica na análise de impurezas inorgânicas elementares em insumos e produtos da indústria farmacêutica**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Análise Instrumental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/23727>. Acesso em: 14 mar. 2024.

FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA. Bula de fumarato de tenofovir desoproxila para o profissional de saúde. Belo Horizonte: Fundação Ezequiel Dias, 2018. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/fumarato-de-tenofovir-desoproxila/>. Acesso em 19 jan. 2024.

GAMA, Rodolpho Guilherme Menezes. **Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência**: Uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico. 2019. 83 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos / Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34911> . Acesso em: 1 abr. 2024.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **ICH guideline Q3D(R2) on elemental impurities**. 2017. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/partners-networks/international-activities/multilateral-coalitions-and-initiatives/international-council-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich>. Acesso em: 01 jun. 2024.

LEITE, Débora I. et al. Tenofovir: relação estrutura-atividade e métodos de síntese. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2347-2376, 2015. Disponível em: <https://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/1142>. Acesso em: 15 jan. 2024

LIMA, Thatyana Milene Santos. **Otimização do Fluxo das Análises do Controle de Qualidade de Medicamentos em Laboratório Farmacêutico Oficial**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos / Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/47999>. Acesso em: 20 jan. 2024

LOPES, Jéssica Edneuzza Bueno. **Desenvolvimento e validação de método para doseamento de gliclazida utilizando a técnica de RMNq-1H**. 2020. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2498>. Acesso em: 14 mar. 2024.

MACHADO, Patrícia Vieira. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de impurezas orgânicas de dipirona sódica monoidratada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2020. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/5125>. Acesso em: 14 mar. 2024.

MAESTRELO, Luana de Fátima. **Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade para quantificação de secnidazol e compostos relacionados por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2020. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2020. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/5170>. Acesso em: 14 mar. 2024.

MANUAL MSD. Ciclo de vida simplificado do HIV. **Manual MSD Versão Saúde para a Família**, 2023. [Imagem]. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/figure/ciclo-de-vida-simplificado-do-hiv>. Acesso em: 02 abr. 2024.

MINAMI, Fabiana. **Gerenciamento de risco para impurezas farmacêuticas**. Trabalho de conclusão de curso de graduação, Universidade Federal de São Paulo, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/items/d329fe35-7051-4730-bbc0-27aa80a1a193>. Acesso em: 14 mar. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias em Saúde (CONITEC). Relatório Técnico - PCDT para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos - Módulo 1**. Brasília: CONITEC, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2023/relatorio-tecnico-pcdt-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos-modulo-1>. Acesso em 21 mar. 2024.

MODENEZE, Caroline Seriani. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica verde para quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas**. 2022. 109 f. Dissertação (Mestrado em Multicêntrico em Química de Minas Gerais) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unifei.edu.br/jspui/handle/123456789/3377>. Acesso em: 18 mai. 2024.

MOTA, Leida Simone Lima. **Caracterização funcional, estrutural e mecanismo de ação dos novos inibidores de entrada do HIV**. Trabalho Final de Mestrado Integrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/43478>. Acesso em: 14 jan. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Número Estimado de Pessoas Vivendo com HIV. **Genebra: OMS**, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people-living-with-hiv>. Acesso em: 16 de março de 2024.

SANTANA, Daniela Silva. **Verificação de métodos farmacopeicos na vigilância sanitária de medicamentos**. 2020. 74f. Trabalho de Conclusão de Curso, (Especialização)-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/58612>. Acesso em: 20 jan. 2024

SCHEUER, Lucas Marcelo. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV/VIS para determinação do teor e impurezas orgânicas do insumo farmacêutico desloratadina**. 2022. 39 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2022. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/6646>. Acesso em: 18 mai. 2024.

SILVA, Gabriela de Oliveira. **Parcerias para o desenvolvimento produtivo e a produção pública de medicamentos: uma proposta de monitoramento estratégico**. 2017. 286 f. Dissertação (Mestrado em Políticas Públicas em Saúde)—Escola Fiocruz de Governo, Fundação Oswaldo Cruz, Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/49066>. Acesso em: 20 jan. 2024

SILVA, Gabriela de Oliveira; ELIAS, Flávia Tavares Silva. Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo: uma proposta de monitoramento estratégico. **Saúde em Debate**, v. 43, p. 217-233, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/3KcGyhqDjdr8P3m4TPCWnXP/>. Acesso em: 1 abr. 2024.

TECHI, L. de C.; CAVALCANTE, I. dos S. .; LIMA, D. A. .; OLIVEIRA, J. E. N. .; LOPES, S. D. S. .; MENDES, J. P. S. .; NOGUEIRA, T. L. .; MENDES, E. de A. S. . Adherence to antirretroviral therapy by patients with HIV in Brazil and factors that harmful it: an integrative review . **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. e4612943123, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i9.43123. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/43123>. Acesso em: 17 mar. 2024.

WASSNER, Chanie; BRADLEY, Nicole; LEE, Yuman. A review and clinical understanding of tenofovir: tenofovir disoproxil fumarate versus tenofovir alafenamide. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)**, v. 19, p. 2325958220919231, 2020. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2325958220919231>. Acesso em: 14 mar. 2024.

ZUGE, Samuel Spiegelberg; PAULA, Cristiane Cardoso de; PADOIN, Stela Maris de Mello. Efetividade de intervenções para adesão à terapia antirretroviral em adultos com HIV: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 54, p. e03627, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reeusp/a/KTJqkWK9RXtwcvHr94ntxDk/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 17 mar. 2024.

8. ANEXOS

Anexo A - Carta de Anuência



Recife, 10 de maio de 2024.

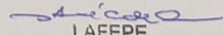
CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, Camila França da Silva, estudante do curso de Bacharelado em Farmácia da UNIBRA, estagiária lotada na Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (COPED), solicito autorização para utilizar como Trabalho de Conclusão de Curso a monografia intitulado de "VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TESTE DE IMPUREZAS DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA + LAMIVUDINA", estudo esse que foi desenvolvido nesta coordenadoria, sob orientação do farmacêutico Marcos André Cunha de Oliveira.

Camila França da Silva

Camila França da Silva

Estagiária



LAFEPE
Marcos André C. Oliveira
Farmacêutico Industrial
CRF PE 02587