

DETERMINAÇÃO DE LAMIVUDINA, ESTAVUDINA E NEVIRAPINA, EM COMPRIMIDOS, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Gisele Rodrigues da Silva, Gustavo Portela Lages, Gerson Antônio Pianetti, Elzília de Aguiar Nunan, Cristina Duarte Vianna Soares e Ligia Maria Moreira de Campos*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

Recebido em 23/2/05; aceito em 24/3/06; publicado na web em 1/8/06

DETERMINATION OF LAMIVUDINE, STAVUDINE AND NEVIRAPINE IN TABLETS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. A high performance liquid chromatography method was developed to quantify lamivudine, stavudine and nevirapine combined in tablets. The separation was carried out in less than 10 min using a phosphate buffer of pH 3.0 and acetonitrile (75:25, v/v) as the mobile phase, a LiChrospher ODS column and UV detection at 266 nm. The method was linear over the range of 15-135 µg/mL (lamivudine), 4-36 µg/mL (stavudine) and 20-180 µg/mL (nevirapine). The accuracy ranged from 98.56 to 102.04% and intra-day and inter-day precision was less than 1% for the three drugs. The method showed robustness, remaining unaffected by deliberate variations in relevant parameters.

Keywords: antiretroviral; HPLC; validation.

INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). As consequências clínicas da infecção pelo HIV devem-se à sua capacidade em desarmar o sistema imune do hospedeiro, devido à depleção dos linfócitos que expressam, superficialmente, o antígeno CD4-positivo (CD4+). A redução progressiva dos linfócitos CD4+ em conjunto com alterações qualitativas e quantitativas do sistema imune leva à susceptibilidade do organismo às infecções oportunistas¹.

O principal objetivo da terapia anti-retroviral é retardar a progressão da imunodeficiência, possibilitando aumento do tempo e da qualidade de vida da pessoa infectada. A terapia inicial geralmente é composta por dois fármacos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) associados a um fármaco inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN)^{2,3}.

A estavudina (d4T) e a lamivudina (3TC), fármacos ITRN, são, preferencialmente, recomendados para comporem a terapia anti-retroviral. O uso da nevirapina (NVP), um ITRNN, representa alternativa viável para integrar o esquema triplo² (Figura 1). A estavudina (2',3'-didesidro-desoxitimidina) e a lamivudina ((2*R*-cis)-4-amino-1-[2(hidroximetil)-1,3-oxatiolana-5-il]-2-(1*H*)-pirimidiona), análogos de timidina e citidina, respectivamente, são fosforiladas por enzimas quinases celulares, gerando metabólitos ativos que inibem a transcriptase reversa do HIV por competição com nucleosídeos de ocorrência natural, resultando na finalização prematura da síntese do DNA viral. A nevirapina (11-ciclopropil-5,11-diidro-4-metil-6*H*-dipirido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-ona) induz mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima transcriptase reversa do HIV, impedindo sua ação^{4,6}.

Apesar dos avanços na abordagem clínica da infecção pelo HIV, devido à administração de esquemas terapêuticos potentes, ainda se constata falhas terapêuticas decorrentes de toxicidade do fármaco, resistência viral e, principalmente, falta de adesão ao tratamento². Um dos principais motivos que levam à diminuição da

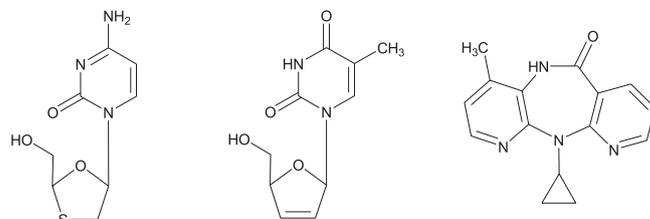


Figura 1. Estruturas químicas da lamivudina (3TC), estavudina (d4T) e nevirapina (NVP)

adesão ao tratamento, pelos pacientes portadores do HIV, é a alta complexidade do regime terapêutico, com a administração diária de grande número de comprimidos e cápsulas, utilizados por tempo indeterminado^{2,7}. Uma alternativa para minimizar o problema da descontinuidade da terapia é o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo fármacos anti-retrovirais (ARV) associados.

Recentemente, a indústria farmacêutica Cipla (Mumbai Central, Mumbai, Índia) iniciou a distribuição de comprimidos contendo lamivudina, estavudina e nevirapina associadas (Triomune®). Os pacientes beneficiados com este tratamento encontram-se em países africanos⁸. Assim, o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo anti-retrovirais combinados deixa de ser uma perspectiva futura e torna-se realidade.

Vários métodos analíticos para quantificação de estavudina, lamivudina e nevirapina, isoladamente ou associados, encontram-se disponíveis na literatura. Estes fármacos têm sido amplamente investigados em estudos clínicos, nos quais a determinação dos ARV acontece em matrizes biológicas⁹⁻¹³. Porém, constatou-se a ausência de publicações que descrevam a quantificação destes ARV associados em comprimidos.

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em modo isocrático, para quantificação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos de Triomune 40®. O método destina-se às análises rotineiras de controle de qualidade dessa associação em medicamentos.

*e-mail: ligiammc@farmacia.ufmg.br

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Medicamento

Comprimidos de Triomune 40[®], contendo 40 mg de estavudina, 150 mg de lamivudina e 200 mg de nevirapina (Cipla Ltd., Mumbai Central, Índia, lote G33720, fabricado em 09/2003, validade até 02/2005).

Padrões de trabalho

Estavudina (Instituto Vital Brazil AS, Rio de Janeiro, Brasil - teor 100,23%), lamivudina (Laob Bioquímicos Ltda., São Paulo, Brasil - teor 99,94%), nevirapina (Labogem S/A Química Fina e Tecnologia, São Paulo, Brasil - teor 99,88%).

Excipientes

Lactose e amido (Meggle AG, Wasserburg, Alemanha); dióxido de silício coloidal (Degussa AG, Frankfurt, Alemanha); talco, estearato de magnésio e hidroxipropilcelulose (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil); celulose microcristalina e glicolato de amido sódico (Blanver Farmoquímica Ltda., São Paulo, Brasil).

Reagentes

Fosfato de potássio monobásico (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico (Merck, Darmstadt, Alemanha), acetonitrila (ACN) (J. T. Baker, Phillipsburg, USA), água ultrapura obtida por sistema Milli-Q-Plus (Millipore, USA).

Equipamentos e condições cromatográficas

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett Packard, HP 1100, equipado com bomba quaternária HP 1100, forno de coluna, auto-injetor HP 1100, detector UV-Vis DAD HP 1100. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se o programa HP ChemStation. Utilizou-se coluna Merck LiChrospher[®] C18 (5 µm, 250 x 4,0 mm d.i.), mantida a 30 °C. A fase móvel era constituída de mistura de 25 partes de acetonitrila e 75 partes de tampão fosfato pH 3,0. A solução tampão foi preparada dissolvendo-se 7,09 g de fosfato de potássio monobásico em água ultrapura para 1000 mL e ajustando-se o pH em 3,0, com ácido fosfórico. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção de 20 µL e a detecção em 266 nm.

Método

Determinação dos ARV em comprimidos

Solução padrão estoque

Transferiram-se 37,5 mg de 3TC, 10 mg de d4T e 50 mg de NVP para o mesmo balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 35 mL de mistura de ACN e água (80:20). Deixou-se em ultra-som por 20 min. Completou-se o volume com a mesma mistura de solventes.

Solução padrão diluída

Transferiram-se 5 mL da solução padrão estoque para balão volumétrico de 50 mL e diluiu-se para 50 mL com a fase móvel. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm. As concentrações finais de 75 µg/mL 3TC, 20 µg/mL d4T e 100 µg/mL NVP foram consideradas concentrações de trabalho.

Solução amostra

Pesaram-se 10 comprimidos, determinou-se o peso médio e pulverizou-se finamente. Transferiu-se, para balão volumétrico de 50 mL, quantidade de pó equivalente a um quarto do peso médio, correspondendo, teoricamente, a 37,5 mg de 3TC, 10 mg de d4T e 50 mg de NVP. Acrescentaram-se 35 mL de mistura de ACN e água (80:20). Deixou-se em ultra-som por 20 min. Completou-se o volume com a mesma mistura de solventes e filtrou-se em papel de filtro. Transferiram-se 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e diluiu-se com a fase móvel, obtendo-se concentrações teóricas de 75 µg/mL 3TC, 20 µg/mL d4T e 100 µg/mL NVP. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm.

Solução placebo

Transferiram-se, para balão volumétrico de 50 mL, quantidade de pó dos excipientes que compõem a formulação de Triomune¹⁴, equivalente a um quarto do peso médio, correspondendo a 18,3 mg de lactose, 0,5 mg de dióxido de silício coloidal, 0,5 mg de talco, 79,0 mg de celulose microcristalina, 4,0 mg de glicolato de amido sódico, 0,5 mg de estearato de magnésio, 2,0 mg de hidroxipropilcelulose, 10,0 mg de amido. Acrescentaram-se 35 mL de mistura de ACN e água (80:20). Deixou-se em ultra-som por 20 min. Completou-se o volume com a mesma mistura de solventes e filtrou-se em papel de filtro.

Validação

Os parâmetros de validação avaliados foram os designados no "Guia International Conference on Harmonisation" (ICH)¹⁵, para métodos de quantificações de fármacos em medicamentos, a saber, seletividade, linearidade, precisão intra-dia e inter-dias, exatidão e robustez.

Seletividade

A seletividade foi demonstrada da seguinte maneira: prepararam-se 2 grupos de soluções. O grupo 1 era representado por 5 soluções padrão diluídas. O grupo 2 era representado por 5 soluções padrão diluídas, preparadas de forma idêntica à das soluções do grupo 1, mas adicionadas de 5 mL de solução placebo. Também foi preparada uma solução placebo diluída, diluindo-se 5 mL da solução placebo para 50 mL com a fase móvel. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata. Calculou-se a média das áreas dos picos de cada fármaco, em cada grupo. Realizou-se análise estatística de comparação de médias (teste t de Student) com o intuito de demonstrar que os excipientes não exerciam influência, estatisticamente significativa, sobre as áreas dos picos dos fármacos.

Calcularam-se os parâmetros cromatográficos: resolução, fator de retenção, fator de separação e fator de cauda. Avaliou-se a pureza dos picos dos ARV traçando-se espectros no UV em cinco pontos diferentes de cada pico.

Linearidade

Transferiram-se alíquotas adequadas de solução padrão estoque para balões volumétricos de 50 mL de modo a obter, após diluição com a fase móvel, concentrações de 20, 60, 100, 140 e 180% da concentração de trabalho de cada ARV. As soluções foram injetadas em triplicata. Todas as soluções foram preparadas em três dias consecutivos, obtendo-se três curvas analíticas para cada ARV. Realizou-se análise de variância (ANOVA)¹⁶ para demonstrar que não existia diferença estatisticamente significativa entre as três curvas analíticas do fármaco. Traçou-se a curva analítica comum e calcularam-se a equação de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e o coeficiente de correlação.

Precisão

Precisão intra-dia

Prepararam-se seis soluções amostra e uma solução padrão diluída. As soluções amostra foram injetadas em duplicata e a padrão diluída, em triplicata. A precisão intra-dia foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR) dos seis doseamentos realizados no primeiro dia.

Precisão inter-dias

Prepararam-se seis soluções amostra e uma solução padrão diluída. As soluções amostra foram injetadas em duplicata e a padrão diluída, em triplicata. Calculou-se o DPR dos seis doseamentos realizados no segundo dia. A precisão inter-dias foi expressa como o DPR dos doze doseamentos.

Exatidão

Utilizou-se o método de adição de padrão. Prepararam-se três soluções amostra adicionadas de cada padrão de ARV, em três concentrações (80, 100 e 120% da concentração de trabalho). Para tal, pesou-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 40, 60 e 80% da concentração de trabalho dos ARV e adicionaram-se 40% dos padrões de 3TC, d4T e NVP. Prepararam-se três soluções amostra não adicionadas de padrão, em três concentrações (40, 60 e 80% da concentração de trabalho). Para tal, pesou-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 40, 60 e 80% da concentração de trabalho dos ARV. Prepararam-se três soluções padrão diluídas, a 40% da concentração de trabalho dos ARV. A exatidão foi avaliada calculando-se a porcentagem de recuperação [(%)RE] de 3TC, d4T e NVP, respectivamente.

Robustez

Foram feitas alterações deliberadas nos seguintes parâmetros: fluxo e pH da fase móvel, temperatura, analistas e colunas. Utilizaram-se três colunas, classificadas pela idade: coluna nova (ainda não utilizada), coluna de meia idade (utilizada no desenvolvimento do método proposto) e coluna velha (utilizada no desenvolvimento de outros métodos e em análises rotineiras do laboratório). Prepararam-se duas soluções amostra e uma solução padrão diluída para cada modificação. As soluções foram injetadas em triplicata. Calculou-se o teor de 3TC, d4T e NVP, a resolução entre os picos e o fator de cauda dos picos em cada parâmetro modificado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização do método de separação

Como ponto de partida para o desenvolvimento do método de quantificação dos ARV associados, foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na ref.17 para doseamento da nevirapina na matéria-prima. Portanto, os constituintes da fase móvel foram tampão fosfato pH 3,0 e ACN, na proporção 60:40. Nesta condição 3TC e d4T eluíram, nesta ordem, em cerca de 2,5 min, mas sem resolução de linha de base. Já a NVP eluiu em 4,17 min, com excelente resolução. Em seguida, foram feitas alterações das proporções dos constituintes da fase móvel, aumentando-se a proporção de tampão de 5 em 5%, na tentativa de melhorar a resolução entre 3TC e d4T. A cada alteração, a resolução melhorava, até que, na proporção 75:25 de tampão e ACN, os picos de 3TC (2,552 min) e d4T (2,915 min) ficaram totalmente resolvidos (resolução superior a 2,5) e o tempo de retenção da NVP não ultrapassou 10 min (Figura 2). Essa fase móvel foi considerada a mais adequada para a separação, em modo isocrático, dos 3 ARV.

A distância entre o segundo e terceiro picos (estavudina e nevirapina) poderia ser reduzida com eluição em gradiente. Porém, o

método com gradiente apresenta algumas desvantagens que limitam sua utilização em análises de rotina. O tempo de análise é prejudicado pela necessidade de reequilíbrio da coluna e a transferência do método pode ser impossibilitada pela diferença entre equipamentos. Diante destas desvantagens, optou-se pela eluição isocrática.

Durante as etapas de desenvolvimento foram testados, para a detecção, quatro comprimentos de onda, correspondentes aos máximos de absorção da d4T (266 nm), 3TC (271 nm) e NVP (237 e 282 nm). Selecionou-se o comprimento de onda de 266 nm para a detecção, em função das maiores intensidades de resposta obtidas para as três substâncias, em especial para a estavudina, presente em menor concentração no medicamento.

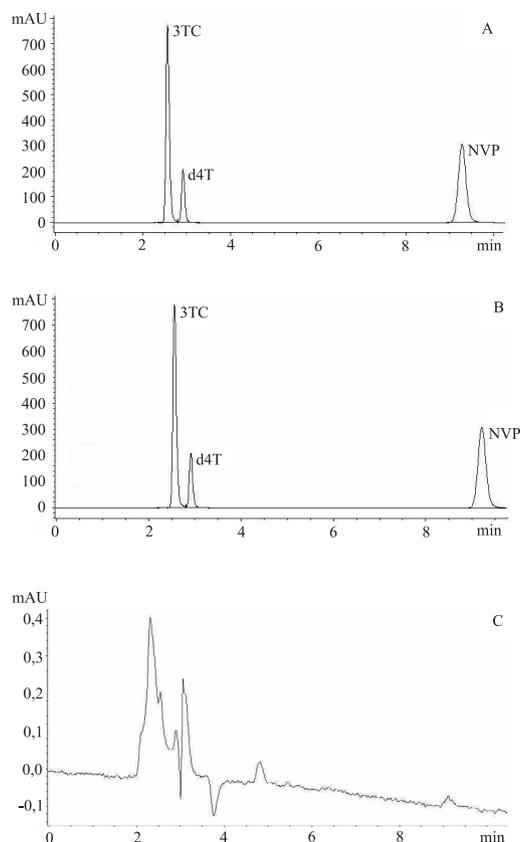


Figura 2. Cromatogramas da solução padrão diluída (A), solução padrão diluída adicionada de placebo (B) e solução placebo diluída (C): lamivudina (75 µg/mL) (2,552 min), estavudina (20 µg/mL) (2,915 min) e nevirapina (100 mg/mL) (9,334 min). Condições: coluna C_{18} 250 mm x 4 mm, fase móvel tampão pH 3/ACN (75:25), fluxo 1,0 ml/min, detecção em 266 nm, temperatura 30 °C, volume de injeção 20 µL, cromatógrafo HP 1100

Validação do método

Seletividade

Na Figura 2 está apresentado o cromatograma obtido com as condições estabelecidas. Observou-se a completa separação entre 3TC, d4T e NVP, mesmo na presença dos excipientes do placebo. O cromatograma do placebo apresentou picos com tempo de retenção próximos de 2,5 min, mas com intensidades muito baixas, não constituindo interferência em potencial. Por meio da análise estatística realizada, pode-se aceitar a hipótese nula: a média das áreas dos picos de cada fármaco, presentes nas soluções padrão diluídas (grupo 1), não difere, estatisticamente, da média das áreas dos picos de cada fármaco, presentes nas soluções padrão diluídas adicionadas de

placebo (grupo 2). Assim, confirmou-se que os excipientes não apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre as áreas dos picos dos ARV, o que permitiu demonstrar a seletividade do método. Na Tabela 1 estão indicadas as médias das áreas dos picos dos ARV, bem como os valores de *t* calculado e *t* tabelado ($p < 0,05$).

Tabela 1. Análise estatística para avaliar a seletividade: média das áreas ($n = 5$) dos picos dos anti-retrovirais nos grupos 1 e 2, comparação entre médias (valores de *t* calculado e *t* tabelado)

	Lamivudina (3TC)	Estavudina (d4T)	Nevirapina (NVP)
Grupo 1	4224,9	1243,3	3724,3
Grupo 2	4230,1	1250,6	3745,4
<i>t</i> calculado	0,168	0,639	0,762
<i>t</i> tabelado _{8; 0,05}	2,306		

Os parâmetros cromatográficos calculados estão indicados na Tabela 2. Os fatores de retenção variaram entre 0,5 e 20^{18} , demonstrando que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. Os valores de resolução calculados foram superiores a 2,0, o que mostra a total separação entre os picos dos fármacos, em nível de linha de base, e consequentemente, a qualidade da separação cromatográfica. Os valores de fator de cauda, próximos da unidade, são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos para avaliar a seletividade: fator de retenção, fator de separação, resolução e fator de cauda

Parâmetro	Lamivudina (3TC)	Estavudina (d4T)	Nevirapina (NVP)
Fator de retenção	0,93	1,21	6,11
Fator de separação	-	1,30	5,05
Resolução	-	2,7	28,2
Fator de cauda	1,2	1,2	1,2

Foram traçados os espectros no UV do pico do fármaco, em cinco pontos diferentes. Todos os espectros se sobrepuseram, demonstrando a pureza dos picos e seletividade do método.

Linearidade

Mediante a análise de variância (ANOVA) das inclinações das três curvas analíticas obtidas para cada fármaco, constatou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre estas inclinações ($p < 0,05$), o que permitiu estabelecer uma curva analítica comum para cada ARV. Os coeficientes de correlação (*r*) das curvas analíticas comuns foram superiores a 0,999, indicando forte correlação linear entre as concentrações e as áreas (Tabela 3).

Precisão

As precisões intra-dia e inter-dias do método foram determinadas pelo doseamento dos comprimidos, em sextuplicata, em dois dias consecutivos, e expressas em DPR. Os valores de DPR obtidos no doseamento de cada ARV estão abaixo de 1%, o que demonstra a precisão do método (Tabela 4).

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da (%RE) dos fármacos, nas concentrações 80, 100 e 120% da concentração de trabalho. As re-

cuperações variaram entre 98,56 e 102,04% para os três ARV, nas três concentrações, o que possibilitou demonstrar a exatidão do método (Tabela 5).

Tabela 3. Análise estatística (ANOVA) para avaliar a linearidade: dados obtidos a partir das três curvas analíticas da lamivudina (3TC), estavudina (d4T) e nevirapina (NVP); intervalo linear, equação da reta comum e coeficiente de correlação (*r*)

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Reta comum	3TC 247539584	1	247539584
	d4T 22168210	1	22168210
	NVP 200190744	1	200190744
Diferença entre retas	3TC 679	2	339
	d4T 394	2	197
	NVP 2500	2	1250
Resíduos retas individuais	3TC 29743	39	763
	d4T 3464	39	89
	NVP 26523	39	680
Dentro dos grupos	3TC 247570005	42	5894524
	d4T 22172068	42	527906
	NVP 200219767	42	4767137
F calculado	3TC 0,445	F tabelado	3,238
	d4T 2,217		
	NVP 1,838		($p < 0,05$)
Intervalo	3TC 15-135 µg/mL	Equação da reta	$21,047 + 55,282x$ $r = 0,9999$
	d4T 4-36 µg/mL	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	$-0,232 + 62,037x$ $r = 0,9999$
	NVP 20-180 µg/mL		$5,405 + 37,311x$ $r = 0,9999$

Tabela 4. Teores, em porcentagem, dos anti-retrovirais nos comprimidos, calculados em dois dias diferentes, para avaliar a precisão intra-dia e inter-dias

	Lamivudina (3TC)	Estavudina (d4T)	Nevirapina (NVP)
Média dos teores T(%) (dia 1) ($n = 6$)	101,70	91,56	103,30
DPR intra-dia 1	0,27	0,23	0,64
Média dos teores T(%) (dia 2) ($n = 6$)	102,43	91,55	102,25
DPR intra-dia 2	0,25	0,50	0,83
DPR inter-dias 1 e 2	0,45	0,37	0,88

DPR – desvio padrão relativo; T(%) – teores dos anti-retrovirais nos comprimidos, em porcentagem

Robustez

Calcularam-se os teores dos ARV nos comprimidos a cada parâmetro modificado. Estes teores não apresentaram variações significativas em relação aos teores obtidos aplicando-se o método

Tabela 5. Percentagens de recuperação dos anti-retrovirais, nas concentrações 80, 100 e 120%, para avaliar a exatidão

	Porcentagem de recuperação		
	Lamivudina (3TC)	Estavudina (d4T)	Nevirapina (NVP)
80%	100,41	99,34	100,32
	101,47	101,61	101,52
	102,04	101,83	101,19
100%	98,61	98,56	101,26
	101,99	101,87	101,99
	99,86	100,71	101,89
120%	100,58	99,64	101,67
	101,95	101,97	99,99
	101,45	101,42	100,68

nas condições estabelecidas (ver média dos teores de cada ARV obtidos no item *Precisão*). Calcularam-se os valores de resolução, que foram superiores a 2, indicando adequada separação dos picos, e os valores de fator de cauda, que ficaram próximos da unidade, indicando simetria dos picos (Tabela 6). Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o método é robusto.

CONCLUSÃO

Um método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos foi desenvolvido e validado. O método, em fase reversa e modo isocrático, demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato e robusto, além de simples e rápido, podendo ser aplicado a análises rotineiras de controle de qualidade.

Tabela 6. Parâmetros modificados para demonstrar robustez, teores dos anti-retrovirais nos comprimidos após cada modificação, resolução e fator de cauda dos picos dos anti-retrovirais

Parâmetro		Lamivudina (3TC)			Estavudina (d4T)			Nevirapina (NVP)		
		T(%)	R	T	T(%)	R	T	T(%)	R	T
Fluxo	0,7 mL/min	102,45 ¹	-	1,2	91,09 ¹	2,9	1,2	102,01 ¹	29,4	1,1
		102,08 ²	-	1,3	89,17 ²	2,9	1,2	101,69 ²	29,1	1,1
	0,9 mL/min	102,41	-	1,2	90,71	2,6	1,2	102,52	27,4	1,1
		102,22	-	1,2	89,72	2,6	1,2	103,36	27,5	1,1
Temperatura	26 °C	101,84	-	1,2	89,42	2,6	1,2	102,22	27,9	1,1
		101,49	-	1,2	89,08	2,7	1,2	102,31	28,1	1,1
	35 °C	102,59	-	1,3	89,77	2,8	1,2	102,34	27,9	1,1
		100,96	-	1,3	89,94	2,7	1,2	102,34	27,8	1,1
		100,57	-	1,3	89,74	2,7	1,2	101,40	28,3	1,2
pH tampão	2,8	100,79	-	1,3	89,16	2,7	1,2	102,17	28,0	1,1
		100,24	-	1,3	89,96	2,4	1,0	101,04	28,3	1,1
	3,2	100,47	-	1,3	89,60	2,4	1,2	101,49	28,1	1,1
		102,86	-	1,2	91,36	2,7	1,2	102,96	27,7	1,1
analistas		102,70	-	1,3	89,14	2,7	1,2	102,63	27,6	1,1
coluna	nova	101,03	-	1,2	89,46	2,7	1,1	101,62	27,3	1,0
		101,24	-	1,2	90,21	2,7	1,1	101,89	27,2	1,0
	meia idade	101,90	-	1,3	90,21	2,7	1,2	102,11	28,4	1,2
		100,88	-	1,3	89,77	2,7	1,2	102,19	28,3	1,2
	velha	101,35	-	1,3	89,55	2,6	1,2	102,05	28,0	1,1
		100,91	-	1,3	90,05	2,6	1,2	101,93	28,0	1,1

¹ – solução amostra 1; ² – solução amostra 2; T(%) – Teor dos anti-retrovirais nos comprimidos, em porcentagem; R – Resolução; T – Fator de cauda

REFERÊNCIAS

- Goldman, L.; Bennet, J. C.; *Cecil tratado de medicina interna*, 21^a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.
- <http://www.aids.gov.br>, acessada em Novembro 2003.
- Gazzard, B. G.; Moyle, G. J.; Weber, J.; Johnson, M.; Bingham, J. S.; Brettle, R.; Churchill, D.; Fisher, M.; Griffin, G.; Jefferies, D.; King, E.; Gorner, R.; Lee, C.; Pozniak, A.; Smith, J. R.; Tudor-Williams, G.; Williams, I.; *Lancet* **1997**, 349, 1086.
- Merck & Co. Inc.; *The Merck Index*, 13rd ed., WhiteHouse Station: New Jersey, 2001.
- Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed., Mc. Graw-Hill: New York, 2001.
- United States Pharmacopeial Convention; *Drug information for the health care professional*, 20th ed., Englewood: Micromedex, 2000.
- Roca, B.; Gómez, C. J.; Arnedo, A.; *Journal of Infection* **2000**, 41, 50.
- Laurent, C.; Kouanfack, C.; Koulla-Shiro, S.; Nkoué, N.; Bourgeois, A.; Calmy, A.; Lactuock, B.; Nzeusseu, V.; Mougnotou, R.; Peytavin, G.; Liégeois, F.; Nerrienet, E.; Tardy, M.; Peeters, M.; Andrieux-Meyer, I.; Zekeng, L.; Kazatchkine, M.; Mpoudi-Ngolé, E.; Delaporte, E.; *Lancet* **2004**, 364, 29.
- Sarasa, M.; Riba, N.; Zamora, L.; Carné, X.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, 746, 183.
- Hoetelmans, R. M. W.; Profijt, M.; Meenhorst, P. L.; Mulder, J. W.; Beijnen, J. H.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1998**, 713, 387.
- Lopez, R. M.; Pou, L.; Gomez, M. R.; Ruiz, I.; Monterde, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, 751, 371.
- Simon, V. A.; Thiam, M. D.; Lipford, L. C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 913, 447.
- Rezk, N. L.; Tidwell, R. R.; Kashuba, A. D. M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 791, 137.
- <http://mednet3.who.int/prequal/WHOPAR/Triomune%20WHOPAR%20part%200%20-%208%20combined.pdf>, acessada em Outubro 2004.
- International Conference on Harmonization (ICH); *Topic Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Proceedings of the Commission of European Communities*, 1996.
- Snedecor, G. W.; Cochran, W. G.; *Statistical methods*, 8th ed., Ames: Iowa State Univ., 1989.
- Farmacopéia Brasileira*; 4^a ed., Atheneu: São Paulo, 2002, 240 a 240-2.
- Snyder, R. L.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC method development*, 2nded., Wiley Interscience: New York, 1997.