

---

---

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ANTIRRETROVIRAL TENOFOVIR

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE ANTIRETROVIRAL TENOFOVIR DETERMINATION

Thaís Dolfini Alexandrino<sup>1</sup>; Mariana Bortholazzi Almeida<sup>2</sup>; Mirela Fulgencio Rabito<sup>3</sup>; Tiago Bervelier Madeira<sup>2</sup>; Vinicius Ricardo Acquaro Junior<sup>2</sup>; Suzana Lucy Nixdorf<sup>2</sup>; Marlene Maria Fregonezi Nery<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Brasil

#### RESUMO:

O fumarato de tenofovir desoproxila (TDF), pró-fármaco oral, pertencente à classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs). Os ITRNs destacam-se como terapêutica de primeira linha contra a infecção pelo HIV-1, sendo o TDF um dentre os produzidos no Brasil. Visando uma produção de medicamentos que assegure o cumprimento de padrões de qualidade, garantindo eficácia e segurança, o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos necessita de métodos analíticos validados. Com esse objetivo, um método espectrofotométrico para a determinação quantitativa do FTD na matéria-prima e comprimidos utilizando HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> como solvente a 258 nm foi desenvolvido e validado. Não houve interferência dos excipientes e revestimento testados. A curva de calibração, obtida a partir da relação absorvância versus concentração, mostrou-se linear na faixa de 4,00 a 38,00 mg mL<sup>-1</sup> apresentando Equação da reta ( $y = 0.0213x + 0.0271$ ) com coeficiente de determinação de 0,995. A exatidão média do método para três níveis de concentração foi de 99,0% (DPR=0,66 %) com precisão repetitividade e intermediária adequadas (DPR<5%) e limites de detecção de 2,52 mg mL<sup>-1</sup> e de quantificação de 8,70 mg mL<sup>-1</sup>. Assim, este método constitui uma ferramenta analítica importante, por ser simples, sendo útil para o controle de qualidade do antirretroviral tenofovir, já que esse é um dos medicamentos mais caro do esquema terapêutico, distribuído gratuitamente no Brasil para portadores do vírus da AIDS e da Hepatite B.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fumarato de tenofovir desoproxila, Controle de qualidade, UV.

**ABSTRACT:**

The tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is a pro-drug, an antiretroviral belonging to inhibitors class of transcriptase reverse nucleoside analogues (ITRNs). The ITRNs stand as first-line anti-HIV-1 therapy, being TDF one of those produced in Brazil. Aiming medicine production that ensures compliance with quality standards, warranting effectiveness and safety, the quality control of pharmaceutical products, requires validated analytical methods. With this objective a spectrophotometric method for determining FTD content in raw material and tablets using HCl  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  as solvent at 258 nm was developed and validated. Excipients and coating do not interfere. The calibration curve obtained from absorbance versus concentration was linear from 4.00 to  $38.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  presenting Equation ( $y = 0.0213x + 0.0271$ ) with determination coefficient of 0.995. The average accuracy of the method for three level was 99.0% (RSD=0.66%) with adequate repeatability and intermediate precision (RSD<5%) and detection limit of  $2.52 \mu\text{g mL}^{-1}$  and quantification limit of  $8.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Therefore, this method is an important analytical tool, due to its simplicity, being useful for tenofovir antiretroviral drug quality control, since it is the most expensive medicines of therapeutic scheme, freely distributed in Brazil for patients infected by virus of AIDS and Hepatitis B.

**KEYWORDS:** Tenofovir disoproxil fumarate, Quality Control, UV.

**1. INTRODUÇÃO**

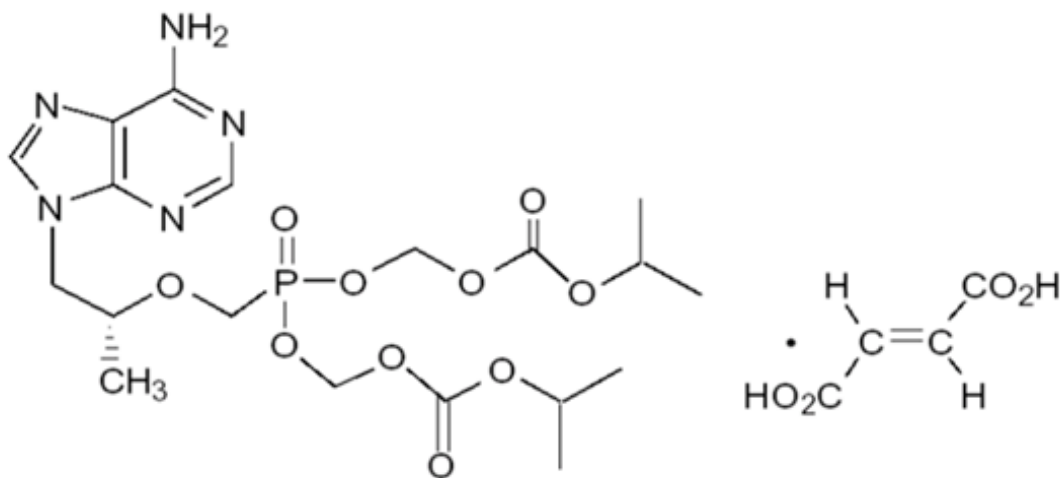
O HIV, vírus da imunodeficiência humana, é um retrovírus que afeta o sistema imune das pessoas infectadas. O início do tratamento precoce está associado a benefícios clínicos e de prevenção do HIV, melhorando a qualidade de vida e reduzindo a incidência de infecção em nível de comunidade (SOUZA, 2003).

A terapia antirretroviral é recomendada para todas as pessoas com diagnóstico confirmado de HIV, e também para as pessoas com tuberculose ativa e co-infecção com HBV (vírus da hepatite B) apresentando doença hepática grave, grávidas e mulheres que amamentam crianças menores de cinco anos, indivíduos em relacionamento soro discordante (OMS, 2013). Para que a terapia seja potente contra a infecção pelo HIV é necessária à combinação de no mínimo três antirretrovirais.

O governo brasileiro visando à defesa e garantia dos direitos de indivíduos infectados por HIV/AIDS estabeleceu o acesso gratuito aos antirretrovirais (FORTUNAK e ANTUNES, 2014). E para garantir a viabilidade da política de distribuição desses medicamentos, vem fortalecendo a sua produção nacional, iniciada em 1993. Dentre os medicamentos produzidos está o fumarato de tenofovir desoproxila (TDF), cuja produção iniciou-se em 2011(FUNED, 2011).

O fumarato de tenofovir desoproxila teve seu uso aprovado pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, em 2001. É quimicamente

denominado de 9-[(R)-2-[(isopropoxicarbonil) oxi] metoxi]fosfonil] metoxi] propil] adenina fumarato, sua fórmula molecular é  $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$  (USP, 2012).



**FIGURA 1.** Estrutura do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)

**Fonte:** Google.

O TDF pertence à classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs). Oito medicamentos nucleosídeo-nucleotídeo atuam inibindo a enzima transcriptase reversa: zidovudina (AZT), estavudina (d4T), zalcitabina (DDC), lamivudina (3TC), didanosina (DDI), abacavir (ABC), emtricitabina (FTC) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) (SOUZA & ALMEIDA, 2003). Os fármacos análogos de nucleosídeos destacam-se como terapêutica de primeira linha contra a infecção pelo HIV-1 (GARFORTH et al., 2008). O TDF tem resposta positiva também para supressão do vírus da hepatite B (GISH, et al., 2005; SWEETMAN, 2007).

O TDF é um pró-fármaco análogo de dideoxynucleosídeos (LAVRA, 2006), já que sua atividade antiviral necessita que esse seja fosforilado por quinases, cujo metabólito trifosfato formado é o responsável por interromper a replicação do DNA, impedindo a extensão da fita e consequentemente a replicação viral (GARFORTH et al., 2008).

Embora o Brasil já produza o TDF e este seja amplamente utilizado nas terapias supressoras de AIDS e Hepatite, há poucos métodos descritos na literatura para a determinação do seu teor. A maioria deles aplica HPLC para análise em fluidos biológicos e associado a outros fármacos REZK et al. (2005), KING et al. (2006), MANGOANKAR & DESAI (2008), APPALA et al. (2008) e RAJU et al. (2008), KANDAGAL et al. (2008), DELAHUNTY et al. (2006) e por MASSAKI et al. (2007), GOMES et al. (2008), JOSHI et al. (2009), PATEL et al. (2009) e SHARMA &

GUPTA (2009). Já, a determinação do TDF por espectrofotometria foi proposta por SHIRKHEDKAR et al. (2009), SUDHA et al. (2010), SHAMA e MEHTA (2010).

Para que essa produção seja realizada assegurando o cumprimento de padrões de qualidade, de modo a garantir a eficácia e segurança dos medicamentos, o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos produzidos é imprescindível, sendo necessária a utilização de métodos de análise validados. Entretanto, atualmente não existem descritos em compêndios oficiais métodos para a determinação de TDF em matéria-prima e comprimidos.

O tempo de análise, o custo e a eficiência do método analítico são critérios importantes durante o desenvolvimento de metodologias. O método espectrofotométrico apresenta grande aplicabilidade, pois este representa uma técnica simples, rápida, econômica e adequada à rotina de controle de qualidade.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método de análise espectrofotométrico na região do ultravioleta visando à determinação do teor de TDF em comprimidos e matéria-prima.

## 2. MATERIAL E EQUIPAMENTOS

O TDF, padrão secundário (99,9% - lote PD-0217) e a Amostra 1 (matéria-prima- 98,9% - lote 13327/2011), foram cedidos pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, São Paulo, Brasil), já as amostras 2 e 3 (comprimidos 300 mg), foram fornecidos pela Secretária Municipal de Saúde de Curitiba. As matérias-primas utilizadas para a composição do placebo (amido pré-gelatinizado, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, lactose e celulose microcristalina) e o revestimento (Opadry II Y-30-10671-A) foram de grau farmacêutico. Os solventes utilizados foram preparados a partir de: ácido clorídrico p.a. (Carlo Erba, Itália), água ultrapura (Milli-Q<sup>®</sup>), etanol p.a. (Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (Biotec, Brasil).

Os equipamentos utilizados foram: espectrofotômetro (Waters 2487, Milford, MA, EUA), balança analítica (Mettler AE-200, Greifensee, Suíça) e ultrassom (Thorton 09, INPEC – Eletrônica LTDA).

## 3. METODOLOGIA

A solubilidade do fármaco foi testada em: etanol, água purificada, HCl e NaOH. O comprimento de onda de maior absorção foi definido com solução de TDF na concentração de 30,00 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.1 Validação do método analítico

Os ensaios para determinação dos parâmetros de validação foram realizados

---

acordo com recomendações da legislação vigente, Resolução 899 de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003).

### 3.1.1 Especificidade

Para o estudo da interferência dos excipientes da formulação do TDF foram preparadas solução padrão ( $30,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e solução placebo de acordo com a sua proporção no peso médio de um comprimido.

### 3.1.2 Linearidade

Foram construídas 3 curvas de calibração analítica com 5 concentrações de padrão ( $n=3$ ), preparados na faixa dinâmica de trabalho de  $4,00$  a  $38,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a partir da solução estoque de  $300,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  em HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear.

### 3.1.3 Precisão

A repetitividade do procedimento analítico foi determinada por meio da análise de seis soluções de mesma concentração ( $25,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  em HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) pelo mesmo analista, equipamento e dia. Já a precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, porém em dias diferentes e com analistas diferentes. Os resultados foram avaliados de acordo com o Desvio Padrão Relativo (*DPR*).

### 3.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da adição à Amostra 3 e recuperação de quantidades conhecidas de soluções de TDF padrão nos níveis de concentração baixo ( $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), médio ( $15,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e alto ( $20,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As quantidades de TDF recuperadas foram calculadas utilizando-se a curva de calibração.

### 3.1.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção (*LD*) e de quantificação (*LQ*) foram calculados pelo quociente do desvio padrão dos coeficientes lineares das 3 curvas de calibração pela média dos coeficientes angulares, multiplicados por 3 e 10, respectivamente.

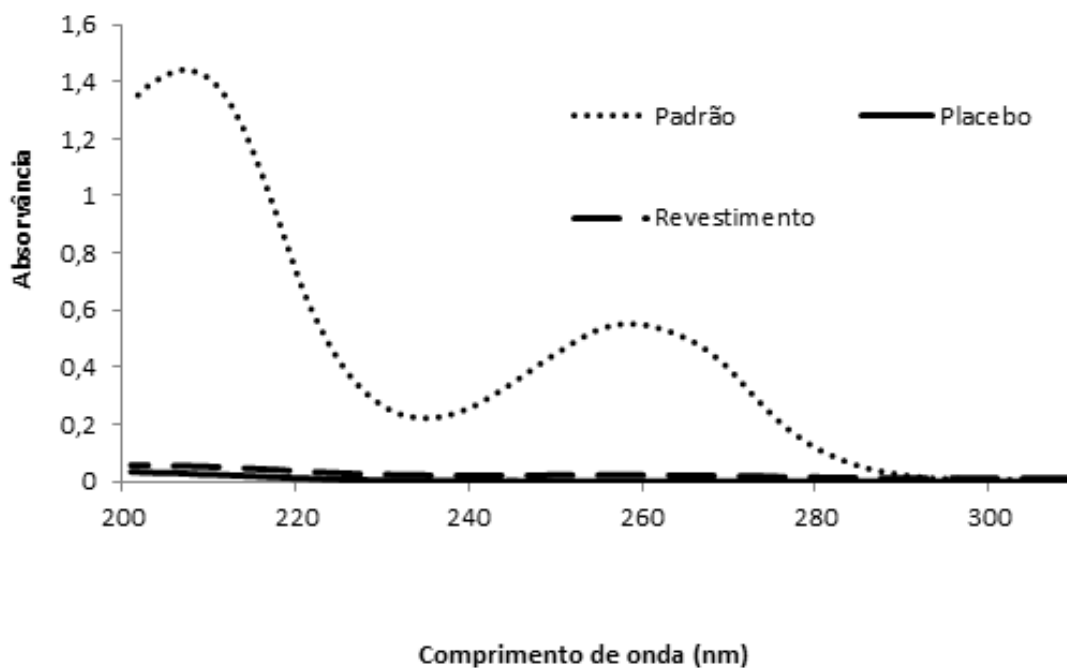
### 3.1.6 Aplicação do Método

Para Amostra 1 foram pesados, em triplicata,  $300,00 \text{ mg}$  e para as Amostras 2 e

3 foram determinados os pesos médio de 20 comprimidos e após triturados, pesou-se o equivalente a 300,00 mg do pó, em triplicata. As amostras pesadas foram diluídas até concentração de  $30,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  em HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , filtradas e suas concentrações determinadas em espectrofotômetro a 258 nm utilizando a Equação da reta de calibração.

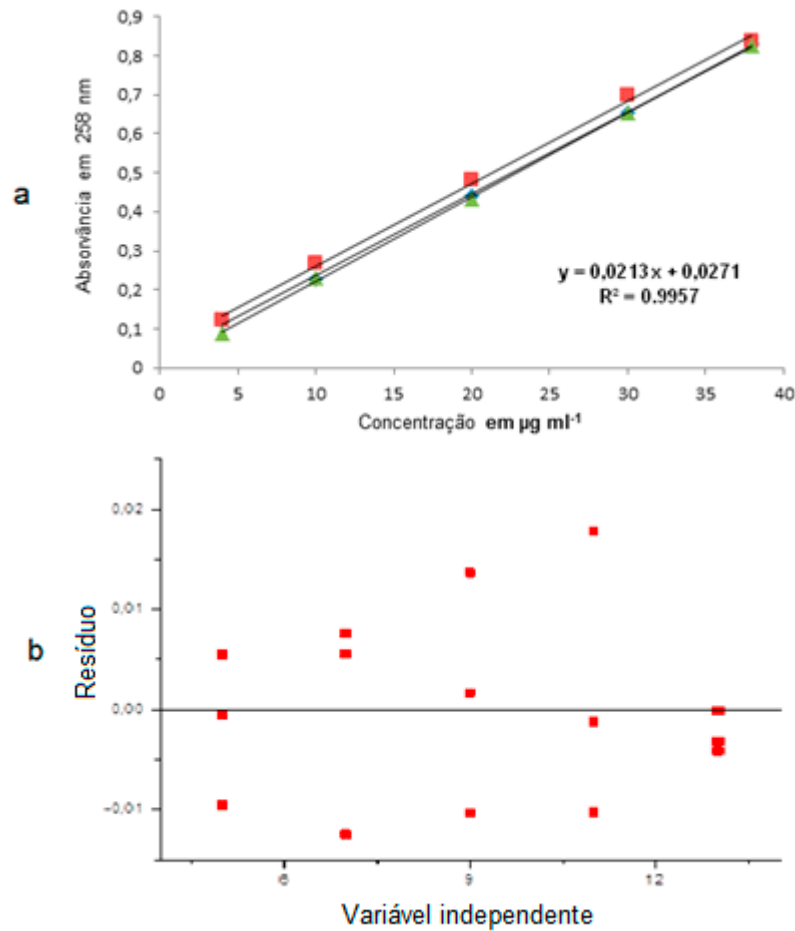
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A varredura espectral do TDF apresentou picos máximos de absorção a 210 e 258 nm, sendo o último o comprimento de onda utilizado para a validação do método. Não foram observados sinais de interferentes do placebo, nem do revestimento nesta região, conforme observado na Figura 2.



**FIGURA 2.** Varredura espectral do FTD, placebo e revestimento em espectrofotômetro

O método mostrou-se linear ( $r^2=0,9957$ ) nas condições propostas conforme Figura 3a. O gráfico de resíduo (Figura 3b) demonstrou que os valores residuais estiveram distribuídos aleatoriamente com baixa dispersão em relação ao valor médio, indicando que são independentes da variância, demonstrando a ausência de tendência nos dados. Aplicando-se análise de variância para o modelo previsto, observa-se que a falta de ajuste não é significativa a 99% de confiança ( $p<0,01$ ).



**FIGURA 3.** Curva de calibração analítica na faixa de 4,00 a 38,00  $\mu\text{ mL}^{-1}$  (a) e análise de resíduos (b)

Os limites de detecção e quantificação calculados a partir das curvas de calibração foram de 2,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 8,70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O método foi considerado preciso já que apresentou *DPR* 1,51 % para o ensaio de repetitividade e 1,19 % para precisão intermediária, estando em conformidade com os valores especificados ( $DPR < 5\%$ ) (BRASIL, 2003).

O método foi considerado exato já que as médias das porcentagens de recuperação do padrão de TDF estão de acordo com os limites especificados (98 a 102 %) (Tabela 1) (BRASIL, 2003).

**TABELA 1.** Resultados do ensaio de exatidão para a amostra 3 com adição de padrão em 3 níveis de concentração ( $n=3$ ).

Quantidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Recuperação (%)
Adicionada	Recuperada	
10,00	9,83	98,30 ( $\pm 0,02$ )*
15,00	14,87	99,10 ( $\pm 0,14$ )*
20,00	19,92	99,60 ( $\pm 0,39$ )*

\* Desvio Padrão

O teor médio de TDF encontrado na Amostra 1, 2 e 3 foi de 95,90; 93,87 e 94,24 % ( $\pm$ desvio padrão), respectivamente.

## 5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para determinação do TDF em matéria-prima e comprimidos, por ser um método simples e viável economicamente, tem aplicabilidade no controle de qualidade do medicamento, uma vez que demonstrou ser específico, linear, preciso e exato.

## 6. REFERÊNCIAS

APPALA, N. R., RAO, V. J., VANITHA, P. K., MUKILTEO, K. AND SRINIVASU, K. Simultaneous estimation of tenofovir disoproxil, emtricitabine and efavirenz in tablet dosage form by RP- HPLC. **Orient. J. Chem.** v.24, n.2, p.1103-1106, 2008.

**BRASIL.** Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 2 de junho de 2003.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. **J. Chromatogr. B**, v.830, p.6-12, 2006.

FORTUNAK, J. M.; ANTUNES, O. A.C.; **A Produção de ARVs no Brasil: Uma avaliação.** Disponível em <[http://www.abiaids.org.br/\\_img/media/ARV.pdf](http://www.abiaids.org.br/_img/media/ARV.pdf)>. Acesso em jan. 16 de 2014.



---

**FUNED** – Fundação Ezequiel Dias. O SUS no combate à AIDS. Disponível em <<http://funed.mg.gov.br/noticias/tenofovir/>>. Acesso em jan. 16 de 2014.

GARFORTH, S. J.; PARNIAK, M. A.; PRASAD, V. R. Utilization of a Deoxynucleoside Diphosphate Substrate by HIV Reverse Transcriptase. **Plos One**, Peking, v.3, n.4, p.1-10, apr. 2008

GISH, R. G.; TRINH, H.; LEUNG, N.; CHAN, F. K. L.; FRIED, M. L.; WRIGHT, T. L.; WAN, C.; ANDERSON, J.; MONDOU, E.; SNOW, A.; SORBEL, J.; ROUSSEAU, F.; COREY, L. Safety and antiviral activity of emtricitabine (FTC) for the chronic hepatitis B infection: a two-year study. **J. Hepatol.** v.43, n.1, p.60-66, 2005.

GOMES, N. A.; VAIDYA, V. V.; PUDAGE, A.; JOSHI, S. S.; PAREKH, S. A. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a bioequivalence study. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.48, n.3, p.918-26, 2008

JOSHI, M.; NIKALJE, A. P.; SHAHED, M.; DEHGHAN, M. HPTLC method for the simultaneous estimation of emtricitabine and tenofovir in tablet dosage form. **Indian J. Pharm. Sci.** v.71, n.1 p.95-97, 2009.

KANDAGAL, P. B.; MANJUNATH, D. H.; SEETHARAMAPPA, J.; KALANUR, S. S. RP-HPLC method for the determination of tenofovir in pharmaceutical formulations and spiked human plasma. **Anal. Lett.** v.41, n.4, p.561-70, 2008.

KING, T.; BUSHMAN, L.; KISER, J.; ANDERSON, P. L.; MICHELLE, R.; DELAHUNTY, T.; FLETCHER, C. V. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of tenofovir-diphosphate in human peripheral blood mononuclear r cells. **J. Chromatogr. B**, v.843, n.27, p.47-56, 2006.

LAVRA, Z. M. M. **Obtenção Tecnológica de anti-retroviral dose fixa combinada à base de lamivudina, zidovudina e nevirapina**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

MANGOANKAR, K.; DESAI, A. Simultaneous estimation of emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz from tablets by reverse phase high performance liquid chromatography method. **Indian Drugs.** v.45, n.3, p.188-192, 2008.

---

MASSAKI, T.; YUICHI, K.; NAOYA, O.; ATSUSHI, H.; KAZUHIDE, B.; TSUGUHIRO, K. Determination of plasma tenofovir concentration using a conventional LC-MS method. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, p.1784-86, 2007.

**O M S** – Organização mundial da saúde. Disponível em <[http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/art/arv2013\\_chapter07\\_low.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/art/arv2013_chapter07_low.pdf)>. Acesso em 16 jan. de 2014.

PATEL, S.; BAGHEL, U.S.; RAJESH, P.; PRABHAKAR, D.; ENGLA, G.; NAGAR, P.N. Spectrophotometric method development and validation for simultaneous estimation of Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in bulk drug and tablet dosage form. **Intern. J. Pharm. and Clin. Res.**, v.1, n.1, p.28-30, 2009.

RAJU, B. V. N.; PANDA, G.; RAO, G. N.; ROCKEY, J. HPLC-UV Assay method for clindamycin palmitate hydrochloride as drug substance and oral solution. **J. Anal. Lett.**, v.41, p. 2033-2043, 2008.

REZK, N. L. ; CRUTCHLEY, R. D. ; KASHUBA, A.D. M. Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir in human plasma using high performance liquid chromatography after solid phase extraction. **J. Chromatogr. B**, v.822, p.201-208, 2005.

SHAMA, R.; MEHTA, K. Simultaneous Spectrometric Estimation of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Lamivudina in Three Component Tablet Formulation Containing Efavirez. **Indian J. Pharm. Sci.**, v.72, n.4, p.527-530, 2010.

SHARMA, R.; GUPTA, P. A Validated RP HPLC Method for Simultaneous Estimation of Emtricitabine and Tenofovir Disoproxil Fumarate in a Tablet Dosage Form. **Eurasian J. Anal. Chem.**, v.4, n.3, p.276-284, 2009.

SHIRKHEDKAR, A. A.; BHIRUD, C. H.; SURANA, S. J. Application of UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Tenofovir Disoproxil Fumarate in Tablets. **Pak. J. Pharm. Sci.** v.22, p.1, p.27-29, 2009.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V.; Drogas Anti-VIH: Passado, Presente e Perspectivas Futuras. **Quim. Nova**. v. 26, p. 366, 2003.

SUDHA, T.; SAMINATHAN, J.; HEMALATHA, P.V.; RAVIKUMAR, V.R. Simultaneous Ultraviolet Spectrophotometric Estimation of Tenofovir Disoproxil Fumarate and

Emtricitabine in Bulk and in Tablet Dosage Form. **Inter. J. of Biopharm.** v.1, n.1, p.26-30, 2010.

SWEETMAN, S.; **Martindale: The Complete Drug Reference**, 33th ed., Pharmaceutical Press: London, 2007.

**USP** - United States Pharmacopeial Convention. Disponível em <[http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/pendingStandards/m3429\\_authorized.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/pendingStandards/m3429_authorized.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2013.