



VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DO RITONAVIR INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO

***Validation of the analytical method for determining the content of ritonavir
active pharmaceutical inputs***

Priscilla Rodrigues Pires da Silva^{1*}, Manuela Silva de Lima Barros da Paz², Miriam da Silva Fonseca³, Monique Ferraz Pereira³, Rosy Kelly Lima da Silva Pimentel³,
Alexsandra da Silva Matias Cabral³

1Universidade Cruzeiro do Sul/Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes, Recife-PE, Brasil.

2Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

3Centro Universitário Maurício de Nassau, Recife-PE, Brasil.

**Autor para Correspondência: priscillarpres1@gmail.com*

RESUMO

O vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida acomete muitos brasileiros e uma substância antirretroviral utilizada no tratamento da doença é o ritonavir. Sob a condição de assegurar sua ação farmacológica, faz-se necessária a realização de testes laboratoriais para conferir o teor da substância ativa no medicamento e esses ensaios devem ser validados para sustentar resultados confiáveis e reprodutíveis. Com o objetivo de validar o método analítico para determinação do teor do ritonavir insumo farmacêutico ativo, realizou-se um estudo experimental quantitativo no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes. Foram aplicados os parâmetros de seletividade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão, para validação parcial, utilizando a técnica cromatografia líquida de alta eficiência, com o ativo na concentração de 0,025 mg/mL. Os dados foram tratados



estatisticamente, calculando-se concentração, desvio padrão relativo (DPR) e teste t Student. O método demonstrou a seletividade, pelas soluções testadas, diante da inexistência de interferentes no tempo de retenção do analito. A precisão foi obtida com recuperações entre 80,0% e 110,0% e DPR abaixo de 6,57% e 9,86%, para seis e doze amostras comparadas, respectivamente. O teste t apresentou-se abaixo do especificado, pois o t calculado foi inferior ao t tabelado com 95% de confiança, inferindo-se que não houve variações estatisticamente significativas entre as amostras analisadas. A exatidão manteve-se entre 80,0% e 110,0%, com DPR máximo de 6,80%, 6,57% e 6,39% para os níveis de concentração baixo, médio e alto, respectivamente. Dessa forma, o método foi validado, podendo ser utilizado nas análises de rotina laboratorial.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta eficiência; Ritonavir; Controle de qualidade; Antirretroviral.

ABSTRACT

The virus that causes the acquired immunodeficiency syndrome affects many Brazilians and an antiretroviral substance used in the treatment of the disease is ritonavir. Under the condition of ensuring its pharmacological action, it is necessary to carry out laboratory tests to check the content of the active substance in the drug and these tests must be validated to support reliable and reproducible results. In order to validate the analytical method for determining the content of ritonavir as an active pharmaceutical ingredient, a quantitative experimental study was carried out at the Pharmaceutical Laboratory of the State of Pernambuco Governador Miguel Arraes. The parameters of selectivity, precision (repeatability and reproducibility) and accuracy were applied for partial validation, using the high performance liquid chromatography technique, with the active at a concentration of 0.025 mg/mL. Data were statistically treated, calculating concentration, relative standard deviation (RPD) and Student's t test.



The method demonstrated the selectivity, by the tested solutions, in view of the inexistence of interfering in the analyte retention time. Precision was obtained with recoveries between 80.0% and 110.0% and DPR below 6.57% and 9.86%, for six and twelve compared samples, respectively. The t test was below what was specified, as the calculated t was lower than the t tabulated with 95% confidence, implying that there were no statistically significant variations between the samples analyzed. The accuracy remained between 80.0% and 110.0%, with a maximum DPR of 6.80%, 6.57% and 6.39% for the low, medium and high concentration levels, respectively. Thus, the method was validated and can be used in routine laboratory analyses.

Keywords: High performance liquid chromatography; Ritonavir; Quality control; Antiretroviral.

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (MIRANDA; OIVEIRA; CORDEIRO, 2017), vem acometendo milhares de brasileiros a cada ano, comprometendo o sistema imunológico do indivíduo, o que o deixa vulnerável a doenças oportunistas e neoplasias (BRASIL, 2010).

Por se tratar de um problema grave de saúde pública (SOUZA, 2015), o Brasil decretou no Congresso Nacional a Lei nº 9.313, de 13 de novembro de 1996, que dispõe sobre a distribuição de medicamentos antirretrovirais pelo Sistema Único de Saúde (SUS), garantindo a convergência universal para tratamento de todos pacientes portadores da doença (BARROS; SILVA, 2017; BRASIL, 1996; BROJAN *et al.*, 2020). Sendo assim, através da terapia antirretroviral (TARV), foi possível conseguir permitir uma expectativa de vida bastante parecida à dos indivíduos não infectados, desde que cumprida adequadamente a terapia (TESSAROLO; SOUZA; JUNIOR CRISPIM, 2020).



Dentre as drogas empregadas no tratamento da enfermidade, destaca-se o ritonavir (RTV) insumo farmacêutico ativo (IFA), substância da classe hidroxietilamina peptidomimética, que atua como inibidor da protease do vírus, sendo mais ativo contra o tipo 1 do que contra o tipo 2 (BRASIL, 2010; JOTA, 2011). Na presença desse fármaco, as partículas virais tornam-se imaturas e não infecciosas, trazendo benefícios na sobrevida dos pacientes que fazem uso da terapêutica (JOTA, 2011).

Sob a condição de que a ação do fármaco possa ser assegurada durante seu período de validade, torna-se necessário um sistema de garantia da qualidade, segurança e eficácia de medicamentos. Assim sendo, em conformidade às normas das Boas Práticas de Fabricação (BPF), através da RDC nº 301/2019, é imprescindível que haja verificação, avaliação e comprovação desses requisitos através de ensaios previamente estabelecidos, de acordo com o que as normas regulamentadoras preconizam (BRASIL, 2019; GEYER, 2019).

Dentre esses ensaios, tem-se o teor do princípio ativo na composição do medicamento, que é verificado mediante metodologia analítica aplicada em laboratório de controle de qualidade das indústrias farmacêuticas. Sua avaliação torna-se necessária, pois implicará de forma relevante na biodisponibilidade do fármaco no organismo (SILVA, 2016).

À vista disso, a execução do teste poderá ser efetivada através de técnica por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (GOUTAL *et al.*, 2016), utilizada para identificação (PING *et al.*, 2015) e quantificação de diversos compostos químicos (CAMPOS; QUEIROZ; ROSTON, 2016). Também chamada de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OHIRA, 2018), o método de análise consiste na separação de compostos químicos, presentes em uma mistura, de acordo com seu tempo de retenção, sendo a substância arrastada pela fase móvel através da fase estacionária que preenche uma coluna capilar (LUCIANI-GIACOBBE, 2018). Neste sentido, tem ganhado destaque entre os



métodos convencionais, pois quantifica o teor da substância ativa e verifica a qualidade do IFA pelo fabricante (CARMO, 2017).

No entanto, tais procedimentos analíticos, antes de serem utilizados na rotina, precisam ser considerados métodos validados a fim de sustentar a confiabilidade do processo (SILVA, 2016). Um método analítico é considerado validado se as suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos e de forma documentada (BRASIL, 2017).

Para isso, existem órgãos e instituições que exigem a realização da validação dos métodos, com o intuito de verificar a confiança dos seus resultados e demonstrações de competência técnica, determinando orientações a serem seguidas (PAGAN *et al.*, 2019). No Brasil, as metodologias analíticas são avaliadas pelos órgãos reguladores Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) (INMETRO, 2018).

Para a Anvisa, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 27 de julho de 2017 é a diretriz que norteia a validação de métodos analíticos (GOES, 2019), estabelecendo os parâmetros que atendam às exigências das aplicações dos testes (BRASIL, 2017). Tais validações podem ser totais ou parciais, sendo estas últimas executadas quando o método já está validado ou apresenta monografia oficial, devendo ser analisado, pelo menos, os parâmetros de seletividade, precisão e exatidão, desde que o desempenho dos ensaios seja comprovado por reprodução no local onde será transferida a metodologia (BRASIL, 2017; USP, 2018).

Diante disso, a validação para quantificação de substâncias químicas se faz pertinente, sendo recomendada tanto pelas boas práticas de fabricação de medicamentos, através da RDC nº 301/2019, assim como os parâmetros preconizados pela RDC nº 166/2017, ambas da Anvisa.

Para tanto, a execução de uma validação deve ser fundamentada em critérios que a justifiquem. À vista disso, tem-se a transferência de tecnologia do



medicamento e seu IFA, onde uma indústria farmacêutica privada repassa sua tecnologia a um laboratório público nacional. Esse benefício é estabelecido pelas políticas das parcerias para o desenvolvimento produtivo, adotado pelo Ministério da Saúde que firma um compromisso de compra aos parceiros privados. Assim, oportuniza-se ao país uma maior autonomia, gradativo aumento da produtividade e competitividade, desenvolvimento e inovação dos laboratórios públicos, reduções nos preços, além de facilitar o acesso do medicamento à população que necessita fazer o seu uso.

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi validar o método analítico para a determinação do teor do ritonavir insumo farmacêutico ativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa refere-se a uma abordagem quantitativa, realizada por meio de ensaios analíticos experimentais efetivados no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (Lafepe), no setor de controle de qualidade. Tais ensaios foram apoiados em metodologias previamente validadas e desenvolvidas pela indústria farmacêutica privada, a qual realiza parceria para o desenvolvimento produtivo com o Laboratório público executor da covalidação.

Materiais

A substância química caracterizada utilizada foi o ritonavir, lote 01266/2018 utilizado como padrão nas análises e a amostra, o ritonavir IFA, lote PC2019/024. Os reagentes utilizados foram a acetonitrila grau HPLC (Merck®, Alemanha), o butanol (LiChrosolv®, Alemanha), o tetra-hidrofurano livre de estabilizante (Scharlau®, Espanha) e o reagente fosfato de potássio monobásico (J. T. Baker®, Brasil)



Equipamentos e instrumentos

Foram utilizados nas preparações e análises: cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE DAD Arranjo de Diodo (Hitachi, Meck[®], Alemanha), balança analítica (Mettler Toledo[®], Suíça), lavadora ultrassônica (Unique[®], Brasil) e coluna cromatográfica (YMC-Park C4 (4,6 mm x 150 mm - 3 µm) – YMC Co.Ltd).

Condições Cromatográficas

O padrão e as amostras de RTV IFA foram injetados no cromatógrafo sob as seguintes condições de operação: fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 50 µL, com tempo de corrida de 40 minutos, temperatura da coluna de 60 °C e detector de 260 nm. A fase móvel foi composta de acetonitrila, tetra-hidrofurano (livre de estabilizante), n-butanol e solução A (18:8:5:69). A fase estacionária, uma coluna cromatográfica YMC-Park C4 (4,6 mm x 150 mm - 3 µm).

A coluna cromatográfica especificada foi acondicionada no equipamento de CLAE, deixando a fase móvel passar por ela até a estabilização do sistema para, então, ser injetado, separadamente, o volume indicado (50 µL) das soluções preparadas, padrão para calibração e amostra.

Preparo das soluções

Solução A, fase móvel e diluente

Para a solução A, foram pesados 4,1 g de fosfato de potássio monobásico em balança analítica e transferidos para balão volumétrico de 1000 mL. Após diluição do reagente em água purificada, foi aferido o volume com o mesmo solvente e a solução homogeneizada.



Para o preparo da fase móvel, foi feita uma mistura de acetonitrila, tetra-hidrofurano (livre de estabilizante), n-butanol e solução A na proporção de 18:8:5:69, respectivamente. Após, filtrada em membrana de 0,45 μm e desgaseificada em lavadora ultrassônica.

Já o diluente, foi preparado através de uma mistura de acetonitrila e solução A na proporção de 1:1 e desgaseificado em lavadora ultrassônica.

Solução padrão

Foram pesados 50 mg de padrão caracterizado de RTV, transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, dissolvidos e o volume aferido com diluente, seguido de homogeneização (solução padrão estoque). Desta solução, foram transferidos 5 mL para um balão volumétrico de 100 mL, aferindo o seu volume com diluente e posterior homogeneização. Em seguida, 5 mL da solução anterior foram adicionados a um balão volumétrico de 20 mL e aferido o seu volume com diluente. Essa solução final foi homogeneizada e filtrada em membrana de 0,45 μm , cuja concentração final foi de 0,025 mg/mL de RTV.

Solução amostra

Foram pesados 25 mg de RTV IFA, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos e aferido o volume com o diluente. Após homogeneização, foi retirada uma alíquota de 10 mL e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, aferido o volume com diluente e posterior homogeneização. Em seguida, foi filtrado em membrana 0,45 μm , obtendo-se uma concentração de 0,025 mg/mL do analito.

Validação do método analítico

O método analítico foi validado conforme a RDC nº166/2017, Anvisa, por CLAE, na concentração de 0,025 mg/mL de RTV IFA. Por se tratar de uma



transferência de tecnologia, foi executada uma validação parcial, aplicando-se os seguintes parâmetros: seletividade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão com faixa de trabalho entre 80 e 120% do valor teórico, relacionados a validação de métodos de teor de IFA (BRASIL, 2017).

Seletividade

A seletividade do método analítico foi realizada através da injeção, no equipamento de CLAE, da solução diluente, solução A, fase móvel, solução padrão e solução amostra. A solução padrão e a solução amostra foram injetadas em triplicata e as demais soluções em uma única injeção, todas após serem filtradas em membrana de 0,45 µm.

Precisão

A precisão foi expressa por meio da repetibilidade e da reprodutibilidade, cujas preparações seguiram o procedimento da solução amostra, porém em sextuplicata. Para a análise da repetibilidade, foram individualmente preparadas seis amostras, sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação. Para a reprodutibilidade, foram preparadas outras seis amostras de RTV IFA, porém em laboratório diferente (pesquisa e desenvolvimento - COP&D), sob as mesmas condições da repetibilidade (BRASIL, 2017), sendo um segundo analista. As amostras foram injetadas no equipamento após serem filtradas em membrana de 0,45 µm, junto com o padrão em triplicata.

Exatidão

A exatidão foi preparada considerando as seguintes concentrações: 0,020 mg/mL (80%), 0,025 mg/mL (100%) e 0,030 mg/mL (120%), sendo, respectivamente, níveis baixo, médio e alto. As amostras foram preparadas de



maneira independente em triplicata, para cada nível, sendo utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da substância química caracterizada.

Foram preparadas, pesando-se 20 mg do padrão caracterizado de RTV e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, dissolvendo e completando o volume com diluente. Em seguida, foi pipetada uma alíquota de 5 mL para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com diluente. Dessa solução, foram retirados os volumes de 4 mL, 5 mL e 6 mL, nesta ordem e de forma independente, transferidos para balões volumétricos de 20 mL e aferidos com o diluente, sendo obtidas as concentrações dos respectivos níveis de 80%, 100% e 120%. Depois de homogêneas, as soluções foram filtradas em membrana 0,45 µm e injetadas no equipamento de CLAE, três amostras da solução padrão e mais três amostras para cada nível de concentração.

Processamento e análise dos dados

Os dados foram analisados a partir das áreas dos picos do analito RTV obtidos nos cromatogramas das soluções padrão e amostra. O tratamento estatístico dos dados foi realizado através de ferramentas disponíveis no programa de planilha eletrônica de cálculo Microsoft Office Excel® 2010, sendo calculadas a concentração comum e a recuperação percentual de RTV IFA em cada uma das preparações injetadas, assim como a média e o desvio padrão relativo dos valores obtidos, em consonância com cada parâmetro avaliado, além do teste t Student, sendo este último para a reprodutibilidade.

Cálculo da concentração

A concentração comum foi obtida conforme a equação “Concentração = CP x (AI / AT)”, em que CP é a concentração de RTV no padrão (0,025 mg/mL), AI refere-se área do pico de RTV obtido com a solução amostra e AT, a área do pico



de RTV obtido com a solução padrão. A recuperação percentual foi calculada, conforme a expressão "Recuperação % = 100 x (CR / CT)", em que CR é a concentração real da substância obtida na solução amostra e CT é a concentração teórica da substância em cada parâmetro avaliado.

Cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR)

Foi calculado através da fórmula "DPR = (DP / CMD) X 100", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Cálculo do teste t Student

Foi calculado pela 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.

Especificação

Para a seletividade, foram avaliados os cromatogramas das soluções injetadas no equipamento, a fim verificar a presença de algum componente no mesmo tempo de retenção do RTV.

Os critérios de aceitação para a recuperação percentual da precisão e exatidão foram entre 80% a 110%.

Na precisão, para um número de seis amostras, foi admitido DPR máximo de 6,57% e de 9,56%, para um total de doze amostras analisadas. O valor tabelado para o teste t Student foi de 2,2281 como valor limite.

Na exatidão, o DPR especificado foi de acordo com cada concentração de trabalho, tendo como limite os valores de 6,8%, 6,57% e 6,39%, para as



respectivas concentrações de 0,020 mg/mL (nível baixo), 0,025 mg/mL (nível médio) e 0,030 mg/mL (nível alto).

Os parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação foram definidos de acordo com as características do analito e da natureza do método (Brasil, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A verificação da seletividade do método cromatográfico foi observada com a identificação do analito através da comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da solução padrão e solução amostra (SUBRINHO, 2019). Verificou-se que os picos característicos da separação das soluções podem ser visualizados entre 2 e 5 minutos de corrida, o tempo de retenção da substância RTV IFA na fase estacionária foi de 29,3 minutos, tanto na solução padrão quanto na solução amostra, cujas concentrações encontradas mostram-se concordantes e iguais a 0,025 mg/mL. Os cromatogramas das soluções diluente, solução A e fase móvel foram comparados a fim de investigar a presença de qualquer composto no mesmo tempo de retenção do analito no comprimento de onda do método (260 nm), de modo que não foram observados nenhum pico no tempo especificado destas soluções testadas. Isso demonstra a separação dos componentes de maneira seletiva.

Assim, a verificação de todos os cromatogramas permitiu considerar o método analítico em questão como seletivo, uma vez que foi capaz de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que possam estar presentes na amostra (BRASIL, 2017). A interferência em uma amostra pode ser proveniente da matriz analisada ou mesmo de outro analito presente na amostra (INMETRO, 2018), cuja ausência pode ser observada de forma visual (IOZZI, 2017).

A figura 1 apresenta graficamente os resultados obtidos para esta análise.

Figura 1. Avaliação da seletividade do método analítico para determinação do teor do ritonavir insumo farmacêutico ativo.

Figura 1a. Diluente

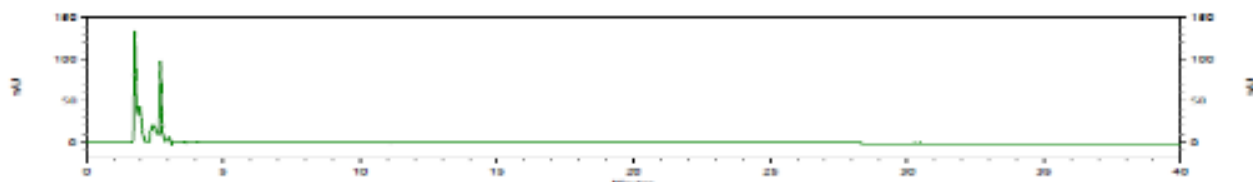


Figura 1b. Solução A



Figura 1c. Fase móvel

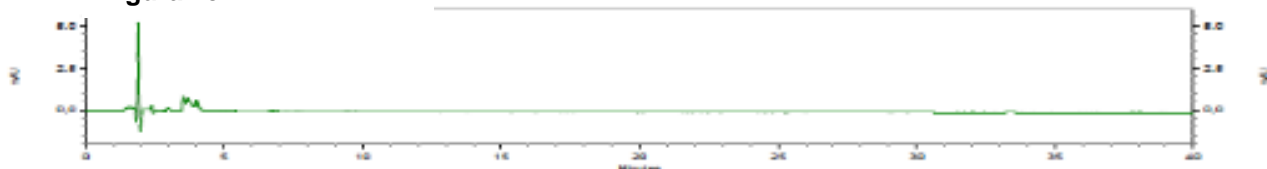


Figura 1d. Solução padrão ritonavir

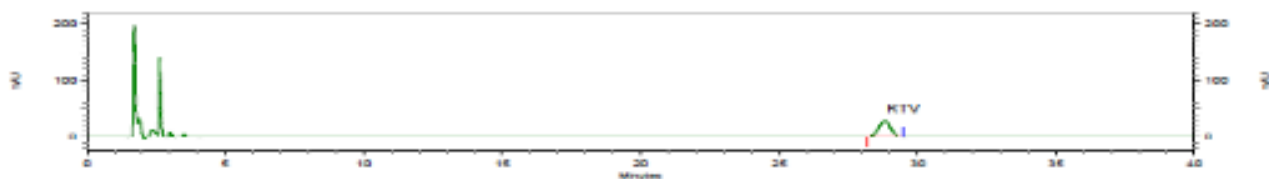
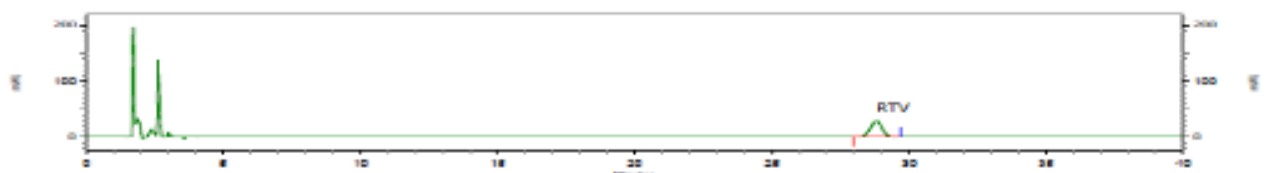


Figura 1e. Solução amostra ritonavir IFA



Precisão

A verificação da precisão do método cromatográfico foi observada através dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade, preconizadas pela RDC nº



166/2017, Anvisa, para validação parcial (BRASIL, 2017). Os resultados obtidos, incluindo a repetibilidade e a reprodutibilidade, apresentaram os percentuais de recuperação tanto individual quanto médio entre os valores de 98,38% e 100,34%, para a concentração avaliada. Para o DPR%, foram obtidos os valores de 0,63%, 0,53% e 0,63%, para o primeiro analista, segundo analista e para o total de amostras analisadas, respectivamente.

A precisão de um método analítico proporciona avaliar quão próximo os resultados são obtidos quando um procedimento é aplicado repetidas vezes (SUBRINHO, 2019), podendo ser expressa através da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade e demonstrada através da dispersão dos resultados por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) (GIUDICE, 2016).

Pode-se observar que a repetibilidade e a reprodutibilidade atenderam a RDC n° 166/2017, visto que o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável era de 6,57% para 6 amostras e de 9,86% para as 12 amostras e os valores encontrados foram inferiores aos requisitados. A recuperação percentual foi de 80 a 110% do valor teórico, permanecendo os resultados encontrados dentro do especificado.

Após aplicação do teste t Student, o t calculado foi de -1,6331, valor inferior ao t tabelado de 2,2281 com 95% de confiança, não havendo diferença estatisticamente significativa para as variáveis analisadas. Portanto, pode-se concluir que o método foi preciso, observando-se a tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) para determinação do teor do ritonavir insumo farmacêutico ativo na concentração de 0,025mg/mL.

Repetibilidade		
Analista 1 (COQUA)		
Amostras	Concentração (%)	Concentração (mg/mL)
1	98,38	0,025
2	99,24	0,025
3	99,62	0,025
4	99,14	0,025
5	99,23	0,025
6	100,30	0,025
Média	99,32	0,025



Analista 2 (COP&D)		
Amostras	Concentração (%)	Concentração (mg/mL)
1	100,34	0,025
2	100,33	0,025
3	99,83	0,025
4	98,90	0,025
5	100,05	0,025
6	99,77	0,025
Média	99,87	0,025

Reprodutibilidade - Analistas 1 e 2 (12 amostras)		
Analistas	Média concentração (%)	Média concentração (mg/mL)
1 e 2	99,59	0,025

Teste t Student calculado	
-1,6331	

Exatidão

A exatidão foi preparada considerando as concentrações no nível baixo, médio e alto, sendo respectivamente 0,020mg/mL (80%); 0,025mg/mL (100%) e 0,030mg/mL (120%). Foi observado que a capacidade de recuperação aceitável do método era de 80 a 110% para as três concentrações e DPR% aceitáveis conforme a seguir: para 80%, DPR % de 6,80; para 100%, DPR% de 6,57 e para 120%, DPR% de 6,39.

Sendo assim, os resultados obtidos apresentaram os percentuais de recuperação dentro dos valores estabelecidos para as concentrações avaliadas. E os resultados de DPR (%) obtidos nas três concentrações citadas foram, respectivamente, de 0,17 para 80%, 0,10 para 100% e 0,40 para 120%. Tendo em vista tais considerações, o método analítico pode ser considerado exato. Portanto, a exatidão do método analítico foi comprovada, uma vez que demonstrou grau de concordância entre os resultados individuais em relação a um valor médio aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017), como determina a RDC nº 166/2017.

Os resultados podem ser observados na tabela 2.



Tabela 2. Avaliação da exatidão do método para determinação do teor do ritonavir insumo farmacêutico ativo na concentração de 0,025mg/mL.

Exatidão		
Nível baixo (80%)		
Amostras	Recuperação (%)	Concentração (mg/mL)
1	101,88	0,020
2	101,65	0,020
3	101,99	0,020
Média	101,84	0,020

Nível médio (100%)		
Amostras	Recuperação (%)	Concentração (mg/mL)
1	101,74	0,025
2	101,59	0,025
3	101,56	0,025
Média	101,63	0,025

Nível alto (120%)		
Amostras	Recuperação (%)	Concentração (mg/mL)
1	101,39	0,030
2	100,97	0,030
3	101,76	0,031
Média	101,37	0,030

CONCLUSÕES

O método analítico apresentado para determinação do teor do ritonavir insumo farmacêutico ativo foi considerado validado, pois apresentou resultados dentro das especificações conforme os parâmetros avaliados, atendendo às exigências preconizadas pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 166 de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ele foi considerado seletivo, preciso e exato. A partir disso, poderá ser utilizado nas análises de rotina laboratorial, sendo adequado para quantificar o teor do ativo, tendo a concentração de 0,025mg/mL, na composição do seu insumo farmacêutico ativo.



REFERÊNCIAS

BARROS, S. G.; SILVA, L. M. A terapia antirretroviral combinada, a política de controle da Aids e as transformações do Espaço Aids no Brasil dos anos 1990. **Revista saúde em debate**. Rio de Janeiro, RJ, v. 41, n.3, p.114-128, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017.

BRASIL. Lei nº 9.313, de 13 de novembro de 1996. **Distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de Aids**. Diário Oficial da União 1996. Disponível em: <http://www.pge.sp.gov.br/centrodeestudos/bibliotecavirtual/dh/volume%20i/saudel/ei9313.htm>. Acesso em 29 agosto de 2021.

BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde. **Planejamento da produção local de insumos farmacêuticos utilizados em fármacos e medicamentos priorizados pelo Ministério da Saúde: avaliação do status de patenteamento dos fármacos antirretrovirais Efavirenz, Ritonavir, Lopinavir, Atazanavir, Tenofovir e Darunavir e de produtos relacionados / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde** – Brasília: Ministério da Saúde, 2010; 34 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Resolução RDC nº 301 de 22 de agosto de 2019. **Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 2019c

BROJAN, L. E. F.; MARCA, L. M.; DIAS, F. A.; RATTMANN, Y. D. **Uso de drogas anti-retrovirais por pessoas vivendo com HIV / AIDS e conformidade com o Protocolo Clínico e as Diretrizes de Terapia**. Einstein, São Paulo. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082020000100237&lng=en. Acesso em 27 agosto 2021.

CAMPOS, J. M.; QUEIROZ, S. C. N.; ROSTON, D. M. **Validação de método analítico para quantificação de interferentes endócrinos em águas residuais após tratamento secundário**. Congresso ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Campinas-SP, 2017.

CARMO, A. C. M. **Panorama de indeferimento de registro de medicamentos sintéticos em 2015 ambiental**. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília), Brasília, 2017.



GEYER, A. R. C. **Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos no Brasil: Estabelecimento, Situação Atual e Desafios**. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília), Brasília, DF, 2019.

GIUDICE G. H. Parâmetros de uma validação analítica: uma revisão bibliográfica. **Acta de Ciências & Saúde**, Taguatinga Sul, DF, v. 1 , n. 1, p. 130-134, 2016.

GOES JUNIOR, E. J. A.; ROEDER, J. S.; OLIVEIRA, K. B.; FERREIRA, M. P.; SILVA, J. G. D. *Validation of a spectro photometric method for quantification of acetyl salicylic acid in pharmaceutical formulations: a proposal of experimental activity for instrumental analysis*. **Química Nova**, v.42, p.99-104, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v42n1/0100-4042-qn-42-01-0099.pdf>. Acesso em 25 agosto 2021.

GOUTAL, S.; AUVITY, S.; LEGRAND, T.; HAUQUIER, F.; CISTERNINO, S.; CHAPY, H.; SABA, W.; TOURNIER, N. *Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arterio venous concentration gradient*. **J Pharm Biomed**, n. 123, p.173-178, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907700> Acesso em 26 agosto 2021.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ- CGCRE-008, 2018

IOZZI G. M. **Avaliação das Impurezas elementares do medicamento captopril por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**. Rio de Janeiro. Trabalho de Conclusão do Curso (Especialização em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde/INCQS. Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

JOTA, F. A. **Os antirretrovirais através da história, da descoberta até os dias atuais**. Rio de Janeiro. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Fármacos/ Farmanguinhos. Rio de Janeiro, 2011.

LUCIANI-GIACOBBE, L. C.; GUZMAN, M. L.; MANZO, R. H.; OLIVERA, M. E. *Validation of a simple isocratic HPLC-UV method for rifampicin and isoniazid quantification in human plasma*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.8, p.093-099, 2018. Disponível em: [http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/2681 _ pdf](http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/2681_pdf). Acesso em 30 agosto 2021.



MIRANDA, O. C. P. S, OLIVEIRA, J. S. D.; CORDEIRO, T. M. S. C. Estratégias de enfrentamento adotadas por mulheres vivendo com *hiv/aids*: uma revisão sistemática. **Revista Saúde.Com.** v. 13 n. 3, p. 941-950, 2017.

OHIRA, S.; KANEDA, K.; MATSUZAKI, T.; MORI, S.; MORI, M. *et al.* **Universal HPLC Detector for Hydrophilic Organic Compounds by Means of Total Organic Carbon Detection.** **Analytical chemistry**, v.90, n.11, p.6461-6467, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/acs.analchem.7b04849>. Acesso em 26 agosto 2021.

PAGAN F. S.; LIMA A. F.; MACIEL JUNIOR U. F.; FERREIRA D. C. Validação de método analítico para quantificação do fipronil por cromatografia líquida de alta eficiência. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, GO, v.16 n. 29, p. 2457, 2019.

PING, Q. I; ZI-HAO, L.; GUI-YUN, C.; XIAO, J.; ZHI-AN, L.; LI-NI, L.; JUN ZHOU, XUE-WU, Z. Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. **Elsevier. Food Chemistry**, v.181, p.101-110, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615002654>. Acesso em 25 agosto 2021.

SILVA, A. F. A. **Validação de Métodos Analíticos para controlo de qualidade de um medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).** Lisboa, 2016.

SOUZA, K. R. **Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização como padrão secundário.** Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos. Rio de Janeiro, 2015.

SUBRINHO, F. L. **Validação de metodologia analítica por HPLC para quantificação de posaconazol em nanopartículas de PLGA : análise do perfil de liberação e caracterização das partículas poliméricas**, 2019. xv, 57 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

TESSAROLO, V. K.; SOUZA, S.R.; JUNIOR CRISPIM, C. Fatores relacionados à adesão ao tratamento antirretroviral em uma unidade de atendimento especializado. **Revista. Assoc. Med. Bras.** Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010442302020000300300290&lng=en. Epub 03 de junho de 2020. Acesso em 25 agosto 2021.

USP. **Pharmacopoeia National Formulary.** USA, Baltimore, MD: 2018.