

Karina Rocha de Souza

**Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz:  
viabilização como padrão secundário**

Rio de Janeiro  
2015

Karina Rocha de Souza

**Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização  
como padrão secundário**

Apresentação da Dissertação de Mestrado,  
como um dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre, ao Programa de Pós-  
graduação em Gestão, Pesquisa e  
Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica,  
do Instituto de Tecnologia em Fármacos –  
FIOCRUZ.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/  
Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

<b>S719e</b>	<b>Souza, Karina Rocha de</b>
<b>Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização como padrão secundário. / Karina Rocha de Souza. – Rio de Janeiro, 2015.</b>	
xxi, 150f. il : 30 cm.	
Orientador: Leonardo Lucchetti Caetano da Silva	
Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2015.	
Bibliografia: f. 138-150	
1. Efavirenz. 2. Padrão de Referência. 3. Estabilidade. 4. Teor. 5. Substâncias Relacionadas. 6. Título	
CDD 615.1	

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Karina Rocha de Souza

**Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização  
como padrão secundário**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovada em 21 de Agosto de 2015.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
(Farmanguinhos – FIOCRUZ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erika Martins de Carvalho  
(Farmanguinhos – FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha  
(Farmanguinhos – FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Marcelo Raul Romero Tappin  
(Farmanguinhos – FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo Emílio e Fátima que me ensinaram o valor de um sonho e me deram apoio e estrutura para buscá-lo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas e por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, por serem alicerces da minha vida, pelo amor, orações, incentivo e apoio incondicional em todos os meus sonhos. São vocês que proporcionam todas as condições para que eu possa vencer. Ao meu irmão Rafael, agradeço pela parceria, pelos conselhos e pelo exemplo que tenho a ser seguido.

Agradeço em especial ao Ricardo Lúcio pelas palavras de carinho, dedicação, amor e paciência.

Ao meu orientador, Leonardo Lucchetti, por acreditar em mim e me incentivar na busca do conhecimento, pelas boas conversas, dicas e sugestões, pelos ensinamentos e pela dedicação dispensados durante todo o projeto, sem seus auxílios não conseguiria concretizar este trabalho.

À turma do mestrado, que tanto ajudou no meu amadurecimento e na certeza de que amizades valem mais do que “networking”. Em especial a Marcela, Tais e Vanessa pelo aprendizado, pela amizade e pelos momentos de angústias compartilhados. Obrigada por terem feito as aulas de todas as quintas mais divertidas, e com certeza, sem vocês essa trajetória não seria tão prazerosa.

Agradeço a minha chefe, Maria Lúcia, pela generosidade em compartilhar ensinamentos, pelo apoio, compreensão, pela credibilidade e liberação para as atividades do mestrado.

A todos do Controle de Qualidade, principalmente aos companheiros de turno, que tiveram muitos momentos de muito trabalho, garantindo a tranquilidade ao laboratório durante as minhas ausências. Obrigada Carine e Bruno pela ajuda na execução das análises, esse trabalho é fruto do nosso esforço e dedicação.

Agradeço aos amigos do LEES – Farmanguinhos pelo auxílio na análise térmica dos materiais. Em especial ao Rafael Seiceira por dividir seu conhecimento e que com toda paciência e carinho, me ajudou, atendeu e esclareceu muitas dúvidas. Mesmo não sendo oficial, obrigada pela co-orientação e disponibilidade de sempre, o sucesso desse trabalho também é seu.

Aos integrantes da Plataforma de Métodos Analíticos - Farmanguinhos que me receberam de portas abertas para eu realizar minhas análises. Obrigada Mazzei e Thiago Bandini pela oportunidade, disponibilidade e ajuda de sempre.

Agradeço aos professores da banca que se dispuseram prontamente a participar dessa defesa.

À amiga Shaiene que esteve presente em todos os momentos desse projeto, desde o momento da inscrição do processo seletivo, passando a qualificação até os momentos angustiantes pré-defesa. Obrigada pelo apoio incansável e amizade incondicional.

Às amigas, Janaína, Milena, Alice, Gabi e Priscila que souberam compreender a minha ausência e impaciência durante este período, agradeço a vocês pela torcida e pelos incentivos de sempre.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram nesse processo, citadas aqui ou não, algumas mais de perto, outras nem tanto, porém todas com a sua devida importância e parcela de contribuição. Obrigada a todos, sem vocês nada disso seria possível!

O mérito do homem não reside no conhecimento que tem,  
mas no esforço que despendeu para alcançá-lo.

*Gotthold Ephraim Lessing*



## RESUMO

SOUZA, Karina Rocha de. *Estudo da estabilidade, caracterização e validade do Efavirenz: viabilização como padrão secundário*. 2015. 171f. Dissertação - Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), comumente conhecida como AIDS, constitui-se em uma das mais sérias doenças infecciosas, sendo um grande desafio para a saúde pública. Apesar de não existir nenhum tratamento para erradicar a infecção, o uso de antirretrovirais é a melhor opção para a supressão viral. O efavirenz é um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa e o terceiro mais utilizado no tratamento antirretroviral, devido às suas propriedades farmacológicas e alta potência *in vivo*. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), padrões de referência oficiais devem ser usados sempre que existirem, e na sua ausência padrões de referência devidamente caracterizados (padrões secundários) deverão ser utilizados. Não existe uma forma segura de se determinar previamente a validade dos padrões de referência, por isso a avaliação da estabilidade dos padrões durante o período de sua utilização é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados. Sendo assim, é importante um estudo mais aprofundado frente às condições de armazenamento para posterior determinação do prazo de validade desses padrões. O estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade de nove lotes das matérias-primas candidatas a padrão secundário avaliando três fabricantes diferentes frente a duas condições de armazenamento (dessecador e geladeira), através do monitoramento de seus teores de ativo e substâncias relacionadas ao longo de um ano. Para a caracterização da matéria-prima foram utilizadas técnicas termoanalíticas, espectroscópicas e difração de raios X de pó. As análises de teor e substâncias relacionadas foram realizadas utilizando HPLC. Com a caracterização confirmou-se que as amostras apresentavam o polimorfo mais estável (polimorfo I) na forma anidra. As análises cromatográficas apresentaram resultados dentro das especificações da matéria-prima, exceto duas amostras que apresentaram resultado de teor fora do especificado no último mês do estudo. Em relação ao teste de teor, catorze amostras devem ser repadronizadas antes de um ano, pois apresentaram uma variação máxima de DPR (desvio padrão relativo) de 0,5% para teores acima de 98%. No teste de substâncias relacionadas, todas as amostras apresentaram um total de impurezas de aproximadamente 0,1% ao longo do estudo de estabilidade, exceto três amostras cujo esse total foi de aproximadamente 0,3%. Em relação ao acondicionamento da matéria-prima candidata a padrão foram poucas as variações observadas nos testes de perda por secagem e titulação de Karl Fischer. Além disso, não houve grande diferença nos testes de teor e de substâncias relacionadas quando comparadas as duas condições de armazenamento. Portanto, a melhor condição de armazenamento do IFA de efavirenz é em dessecador (18 a 25°C e UR < 75%) e o fabricante B é o melhor candidato a padrão secundário, pois foi o que apresentou menor teor de impurezas totais e individuais, e menores variações no teor e na perda por secagem.

Palavras-chave: Efavirenz. Padrão de Referência. Estabilidade. Teor. Substâncias Relacionadas.

## ABSTRACT

Infection with human immunodeficiency virus (HIV) commonly known as AIDS, is one of the most serious infectious diseases in the world and a major challenge to public health. Although there is no treatment to eradicate the infection, the use of antiretrovirals is the best option for viral suppression. Efavirenz is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and the third most used in antiretroviral treatment due to its pharmacological properties and high potency *in vivo*. According to the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), official reference standards must be used whenever they exist, and in the absence of these, reference standards properly characterized (secondary standards) should be used. There is no sure way to determine, previously, in advance the validity of reference standards. Thus, the evaluation of the stability of these reference standards during the period of use is critical to ensure the reliability of results. Therefore, it is important to conduct further studies exploring the storage conditions for later determination of validity of these standards. The study aims to evaluate the stability of nine batches of raw materials candidates for secondary standard evaluating three different manufacturers under two storage conditions (desiccant and refrigerator), by monitoring their assay and related substances over a year. For the characterization of the raw material thermoanalytical techniques, spectroscopic techniques and powder diffraction X-ray were used. The assay and related substances analysis were performed using HPLC. With the characterization analysis confirmed that the samples had the most stable polymorph (polymorph I) in the anhydrous form. The chromatographic analysis showed results within the specifications of the raw material, except two samples that presented results outside the specified in the assay at the last month of study. In this test, fourteen samples should undergo a new round of characterization before a year because has had a maximum variation of DPR (standard deviation) of 0.5% for contents above 98%. In related substances test, all samples exhibited results of total impurities of approximately 0.1% throughout the study of stability, except for three samples: the total amount was approximately 0.3%. Regarding the storage conditions of the standard few variations were observed in tests of loss on drying and Karl Fischer titration. Furthermore, there are no great difference in assay and related substances tests when compared to the two storage conditions. So, the best storage condition of efavirenz standard is in desiccant (18 to 25°C and RH <75%) and the manufacturer B is the best candidate for secondary standard because it showed the lowest results of total and individual impurities with minor variations in assay and loss on drying.

Keywords: Efavirenz. Reference Standard. Stability. Assay. Related Substances.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FÓRMULA ESTRUTURAL PLANA.....	30
FIGURA 2: POSSÍVEIS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO DO EFAVIRENZ.....	31
FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE CARACTERIZAÇÃO.....	33
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DAS PRINCIPAIS IMPUREZAS DO EFAVIRENZ. ....	39
FIGURA 5: CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DO EFAVIRENZ E DA IMPUREZA SR695.....	40
FIGURA 6: IMPUREZA COM TR 20,76 MINUTOS. ....	41
FIGURA 7: CROMATOGRAMA DAS IMPUREZAS DO EFAVIRENZ.....	42
FIGURA 8: ESTRUTURA QUÍMICA DE OUTRAS IMPUREZAS DO EFAVIRENZ.....	42
FIGURA 9: EFAVIRENZ (S) E SEU ENANTIÔMERO (R).....	43
FIGURA 10: CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO EFAVIRENZ.....	44
FIGURA 11: ESTABILIDADE FÍSICA DE POLIMORFOS.....	55
FIGURA 12: FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS.....	67
FIGURA 13: FLUXOGRAMA DOS TESTES ANALÍTICOS REALIZADOS. ....	71
FIGURA 14: GRÁFICO COMPARATIVO DOS RESULTADOS DE TGA E PERDA POR SECAGEM DAS AMOSTRAS DO DESSECADOR.....	90
FIGURA 15: GRÁFICO COMPARATIVO DOS RESULTADOS DE TGA E PERDA POR SECAGEM DAS AMOSTRAS DA GELADEIRA. ....	90
FIGURA 16: ESPECTRO UV DO PADRÃO DE EFAVIRENZ.....	91
FIGURA 17: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO PADRÃO DE EFAVIRENZ. ....	93
FIGURA 18: CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE EFAVIRENZ USP E SEUS PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA (6º MÊS DE ANÁLISE). ....	95
FIGURA 19: PUREZA DE PICO DO PADRÃO DE EFAVIRENZ NO TESTE DE TEOR.....	96
FIGURA 20: GRÁFICO DAS DIFERENÇAS PERCENTUAIS DAS AMOSTRAS DO DESSECADOR..	101
FIGURA 21: GRÁFICO DAS DIFERENÇAS PERCENTUAIS DAS AMOSTRAS DA GELADEIRA.....	101
FIGURA 22: RESULTADO DE TEOR DOS LOTES DE MENOR VARIAÇÃO DE DIFERENÇA PERCENTUAL DE CADA FABRICANTE AO LONGO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	102
FIGURA 23: CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE EFAVIRENZ USP E SEUS PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA (6º MÊS DE ANÁLISE). ....	103
FIGURA 24: SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS TRÊS FABRICANTES NO TEMPO DE 12 MESES. ....	105
FIGURA 25: HIDRÓLISE BÁSICA DO EFAVIRENZ E SEUS PRINCIPAIS PRODUTOS. ....	106

FIGURA 26: PERFIL DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA A – 3 (GELADEIRA) NOS TEMPOS DE 3, 6 E 12 MESES. ....	110
FIGURA 27: GRÁFICOS COMPARATIVOS DO TEOR X IMPUREZAS DO FABRICANTE A (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	111
FIGURA 28: COMPORTAMENTO DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA B – 4 GELADEIRA AO LONGO DOS MESES DE ESTUDO DE ESTABILIDADE. ....	112
FIGURA 29: GRÁFICOS COMPARATIVOS DO TEOR X IMPUREZAS DO FABRICANTE B (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	115
FIGURA 30: PERFIL DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA C - 7 (GELADEIRA) NOS TEMPOS DE 1, 6, 9 E 12 MESES.....	116
FIGURA 31: GRÁFICOS COMPARATIVOS DO TEOR X IMPUREZAS DO FABRICANTE C (DESSECADOR E GELADEIRA) .....	120
FIGURA 32: CROMATOGRAMA SOLUÇÃO DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA.....	122
FIGURA 33: PUREZA DE PICO DO EFAVIRENZ NA SOLUÇÃO DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA. ..	123
FIGURA 34: PUREZA DE PICO DO ENANTIÔMERO (R) DO EFAVIRENZ NA SOLUÇÃO DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA.....	123
FIGURA 35: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DO TESTE DE SOLVENTES RESIDUAIS. ....	125
FIGURA 36: CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO AMOSTRA C – 9 DO TESTE DE SOLVENTES RESIDUAIS.....	126
FIGURA 37: PERFIL DE IMPUREZAS AO LONGO DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS. ....	133

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: CLASSES DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS .....	25
QUADRO 2: DIVISÃO DE LOTES POR FABRICANTES. ....	66
QUADRO 3: PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA O TESTE DE TEOR (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010A). ....	74
QUADRO 4: PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA O TESTE DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010A). ....	75
QUADRO 5: PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA O TESTE DE EXCESSO ENANTIOMÉRICO (MÉTODO DESENVOLVIDO PELO LDVA). ....	77
QUADRO 6: PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA O TESTE DE SOLVENTES RESIDUAIS (FARMACOPEIA AMERICANA, 2013B). ....	78

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CORRELAÇÃO DOS PICOS DAS AMOSTRAS X REFERÊNCIA NO PADRÕES DE DIFRAÇÃO. ....	81
TABELA 2: RESULTADOS DO PONTO DE FUSÃO, NO TEMPO ZERO DAS AMOSTRAS ANALISADAS. ....	82
TABELA 3: DADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CURVAS DE DSC DAS AMOSTRAS DO DESSECADOR ANALISADAS ( $T_{ONSET}$ , $T_{PICO}$ E ENTALPIA), EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE.....	84
TABELA 4: DADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CURVAS DE DSC DAS AMOSTRAS DA GELADEIRA ANALISADAS ( $T_{ONSET}$ , $T_{PICO}$ E ENTALPIA), EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE.....	84
TABELA 5: DADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CURVAS DE DSC DAS AMOSTRAS ANALISADAS ( $T_{ONSET}$ , $T_{PICO}$ E ENTALPIA) NO 12º MÊS EM DESSECADOR E GELADEIRA. ....	86
TABELA 6: RESULTADOS DE TGA, EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE, DAS AMOSTRAS DE EFAVIRENZ ACONDICIONADAS EM DESSECADOR E GELADEIRA. ....	87
TABELA 7: RESULTADOS DE PERDA POR SECAGEM, EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE, DAS AMOSTRAS DE EFAVIRENZ ACONDICIONADAS EM DESSECADOR E GELADEIRA. ....	89
TABELA 8: ANÁLISES REALIZADAS EM CADA TEMPO POR GRUPO. ....	94
TABELA 9: RESULTADOS DE TEOR E A DIFERENÇA PERCENTUAL ENTRE OS RESULTADOS, DOS TRÊS LOTES DO FABRICANTE A AO LONGO DOS MESES DE ANÁLISE.....	97
TABELA 10: RESULTADOS DE TEOR E A DIFERENÇA PERCENTUAL ENTRE OS RESULTADOS, DOS TRÊS LOTES DO FABRICANTE B AO LONGO DOS MESES DE ANÁLISE.....	98
TABELA 11: RESULTADOS DE TEOR E A DIFERENÇA PERCENTUAL ENTRE OS RESULTADOS, DOS TRÊS LOTES DO FABRICANTE C AO LONGO DOS MESES DE ANÁLISE.....	100
TABELA 12: RELAÇÃO DAS IMPUREZAS ENCONTRADAS NO ESTUDO DE ESTABILIDADE COM AS DESCRITAS NA LITERATURA.....	104
TABELA 13: RELAÇÃO DE IMPUREZAS ENCONTRADAS AO LONGO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE SEPARADAS POR FABRICANTE. ....	105
TABELA 14: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA A – 1 (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	107
TABELA 15: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA A – 2 (DESSECADOR E GELADEIRA) ....	108
TABELA 16: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA A – 3 (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	109
TABELA 17: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA B - 4 (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	112
TABELA 18: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA B - 5 (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	113
TABELA 19: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA B - 6 (DESSECADOR E GELADEIRA). ....	114

TABELA 20: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA C - 7 (DESSECADOR E GELADEIRA).....	117
TABELA 21: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA C - 8 (DESSECADOR E GELADEIRA).....	118
TABELA 22: TEOR DAS IMPUREZAS DA AMOSTRA C - 9 (DESSECADOR E GELADEIRA).....	119
TABELA 23: RESULTADOS DE TEOR DE ÁGUA POR TITULAÇÃO DE KARL FISCHER, EM TODOS OS TEMPOS DE ANÁLISE, DAS AMOSTRAS DE EFAVIRENZ ACONDICIONADAS EM DESSECADOR E GELADEIRA.....	127
TABELA 24: RESULTADOS DA ROTAÇÃO ESPECÍFICA A 20°C DE TODOS OS LOTES ANALISADOS.....	128
TABELA 25: RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO DILUÍDA DO TESTE DE TEOR ARMazenada À TEMPERATURA AMBIENTE (18 A 25°C).....	130
TABELA 26: RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO DILUÍDA DO TESTE DE TEOR ARMazenada EM GELADEIRA (2 A 8°C).....	130
TABELA 27: RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO MÃE DO TESTE DE TEOR ARMazenada EM GELADEIRA (2 A 8°C).....	131
TABELA 28: RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO DO TESTE DE TEOR SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS.....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ARV – Antirretroviral  
BCS - Sistema de Classificação Biofarmacêutica  
BP – *British Pharmacopoeia*  
CG – Cromatografia gasosa  
CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência  
DAD - *Diode Array Detector*  
DMF - *Drug Master File*  
DPR – Desvio padrão relativo  
DRX – Difração de raios X  
DRXP – Difração de raios X de pó  
DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Exploratória Diferencial)  
DST – Doença sexualmente transmissível  
EFV – Efavirenz  
ETBE – t-butil-etil-éter  
FAR – Farmanguinhos  
FB – Farmacopeia Brasileira  
FDA – *Food and Drug Administration*  
HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)  
HSM - Termomicroscopia  
ICH – *International Conference on Harmonization*  
IFA – Insumo farmacêutico ativo  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial  
IP – Inibidores da protease  
IV – Infravermelho  
LAFEPE – Laboratório Farmacêutico de Pernambuco  
LDVA - Laboratório de Desenvolvimento e Validação Analítica  
LEES – Laboratório de Estudo dos Estados Sólidos  
µL - Microlitros



mg – Miligramas  
mL - Mililitros  
MSD – Merck Sharp & Dohme  
MTBE – t-butil-metil-éter  
nm – Nanômetros  
NNRTI – Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa  
NRTI – Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPAS – Organização Panamericana de Saúde  
PA - Para análise  
Pb - Chumbo  
POP – Procedimento Operacional Padrão  
ppm – Partículas por milhão  
RE - Resolução Específica  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SQR – Substância Química de Referência  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TGA – Termogravimetria  
TR – Tempo de retenção  
TRR – Tempo de retenção relativo  
UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância  
UR – Umidade relativa  
USP – *United States Pharmacopeia*  
UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>24</b>
2.1 ANTIRRETROVIRAIS .....	24
2.2 EFAVIRENZ .....	26
2.2.1 <i>A história do efavirenz no Brasil</i> .....	27
2.2.2 <i>Propriedades físico-químicas do insumo farmacêutico ativo</i> .....	29
2.2.3 <i>Polimorfismo</i> .....	30
2.2.3.1 <i>Caracterização</i> .....	32
a) <u>Difração de Raios X (DRX)</u> .....	33
b) <u>Análise Térmica</u> .....	34
c) <u>Técnicas Espectroscópicas</u> .....	35
2.2.4 <i>Impurezas</i> .....	37
2.2.4.1 <i>Impurezas do efavirenz</i> .....	38
a) <u>Impurezas Principais</u> .....	39
b) <u>Impurezas Enantioméricas</u> .....	43
2.3.1 <i>Estudo de estabilidade e a legislação brasileira</i> .....	48
2.3.2 <i>Fatores que afetam a estabilidade de fármacos</i> .....	50
2.3.2.1 <i>Temperatura</i> .....	50
2.3.2.2 <i>pH</i> .....	51
2.3.2.3 <i>Umidade</i> .....	51
2.3.2.4 <i>Luz</i> .....	52
2.3.2.5 <i>Reações de Hidrólise</i> .....	53
2.3.2.6 <i>Reações de Oxidação</i> .....	53
2.3.2.7 <i>Reações de Fotólise</i> .....	54
2.3.2.8 <i>Polimorfismo</i> .....	54
2.3.3 <i>Técnicas analíticas utilizadas no estudo de estabilidade</i> .....	55
2.3.4 <i>Estabilidade de Soluções</i> .....	57
2.4 PADRÃO DE REFERÊNCIA .....	57
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>63</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>65</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	65

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	65
<b>5 METODOLOGIA .....</b>	<b>66</b>
5.1 MATERIAIS .....	69
5.2 EQUIPAMENTOS.....	70
5.3 MÉTODOS .....	71
5.3.1 <i>Caracterização</i> .....	71
5.3.1.1 Determinação da estrutura por difração de raios X de pó .....	71
5.3.1.2 Técnicas termoanalíticas (Ponto de fusão, DSC, TGA e Perda por secagem).....	72
5.3.1.3 Técnicas espectroscópicas (Ultravioleta e Infravermelho) .....	72
5.3.2 <i>Análises Cromatográficas</i> .....	73
5.3.2.1 Teor e Substâncias Relacionadas .....	73
5.3.2.2 Excesso Enantiomérico .....	76
5.3.2.3 Solventes Residuais .....	77
5.3.3 <i>Análises Físico-Químicas Complementares</i> .....	79
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO .....	81
6.1.1 <i>Determinação da estrutura por difração de raios X de pó</i> .....	81
6.1.2 <i>Técnicas termoanalíticas (Ponto de fusão, DSC, TGA e Perda por secagem)</i> .....	82
6.1.2.1 Ponto de Fusão .....	82
6.1.2.2 Calorimetria exploratória diferencial .....	83
6.1.2.3 Termogravimetria.....	86
6.1.2.4 Perda por secagem .....	87
6.1.3 <i>Técnicas espectroscópicas (Ultravioleta e Infravermelho)</i> .....	91
6.1.3.1 Ultravioleta.....	91
6.1.3.2 Infravermelho.....	92
6.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	94
6.2.1 <i>Teor</i> .....	95
6.2.2 <i>Substâncias Relacionadas</i> .....	102
6.2.3 <i>Excesso enantiomérico</i> .....	121
6.2.4 <i>Solventes Residuais</i> .....	124
6.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	126
6.3.1 <i>Teor de água</i> .....	126

6.3.2 Rotação específica a 20°C.....	128
6.3.3 Cinzas sulfatadas.....	129
6.3.4 Metais pesados.....	129
6.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES.....	129
6.4.1 Soluções diluídas do teste de teor.....	130
6.4.2 Solução-mãe do teste de teor.....	131
6.4.3 Soluções do teste de substâncias relacionadas.....	132
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>134</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>135</b>
<b>9 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>151</b>

ANEXO 1 - SOBREPOSIÇÃO DOS PADRÕES DE DIFRAÇÃO DA AMOSTRA A – 1, DESSECADOR E GELADEIRA, NO TEMPO INICIAL E 12 MESES.....	151
ANEXO 2 - SOBREPOSIÇÃO DOS PADRÕES DE DIFRAÇÃO DA AMOSTRA B - 4, DESSECADOR E GELADEIRA, NO TEMPO INICIAL E 12 MESES. ....	152
ANEXO 3 - SOBREPOSIÇÃO DOS PADRÕES DE DIFRAÇÃO DA AMOSTRA C - 7, DESSECADOR E GELADEIRA, NO TEMPO INICIAL E 12 MESES. ....	153
ANEXO 4 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DA AMOSTRA A – 1 (DESSECADOR) NOS TEMPOS ANALISADOS. ....	154
ANEXO 5 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DA AMOSTRA A – 1 (GELADEIRA) NOS TEMPOS ANALISADOS. ....	155
ANEXO 6 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DA AMOSTRA B – 4 (DESSECADOR) NOS TEMPOS ANALISADOS. ....	156
ANEXO 7 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DA AMOSTRA B - 4 (GELADEIRA) NOS TEMPOS ANALISADOS. ....	157
ANEXO 8 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DA AMOSTRA C - 7 (DESSECADOR) NOS TEMPOS ANALISADOS. ....	158
ANEXO 9 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DA AMOSTRA C – 7 (GELADEIRA) NOS TEMPOS ANALISADOS. ....	159
ANEXO 10 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DOS FABRICANTES A, B E C (DESSECADOR) NO 12º MÊS. ....	160
ANEXO 11 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE DSC DOS FABRICANTES A, B E C (GELADEIRA) NO 12º MÊS.....	161
ANEXO 12 - PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DO FABRICANTE A - 1 (DESSECADOR).....	162
ANEXO 13 - PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DO FABRICANTE A - 1 (GELADEIRA). ....	163
ANEXO 14 - PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DO FABRICANTE B - 4 (DESSECADOR).....	164
ANEXO 15 - PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DO FABRICANTE B - 4 (GELADEIRA). ....	165
ANEXO 16 - PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DO FABRICANTE C - 7 (DESSECADOR).....	166
ANEXO 17 - PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DO FABRICANTE C - 7 (GELADEIRA). ....	167
ANEXO 18 - ESPECTROS NO UV DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS. ....	168
ANEXO 19 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO IV DAS AMOSTRAS DO FABRICANTE A. ....	169
ANEXO 20 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO IV DAS AMOSTRAS DO FABRICANTE B. ....	170
ANEXO 21 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO IV DAS AMOSTRAS DO FABRICANTE C. ....	171

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do HIV<sup>1</sup>, nos anos 80, a AIDS<sup>2</sup> é considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A doença torna os indivíduos suscetíveis a uma vasta variedade de infecções oportunistas e cânceres desde os primeiros estágios da infecção (LEVER, 2005).

A multiplicação do HIV dentro de um organismo se repete 2,5 bilhões de vezes por dia, e é essa capacidade de reprodução que debilita a defesa do organismo depois de algum período (SOUZA, 2005).

Foi constatada a eficácia de vários esquemas múltiplos de fármacos que inibem a replicação viral, reverterem à depleção das células de defesa (linfócitos T - CD4) e reduzem acentuadamente a taxa de morbidade e mortalidade. Apesar de todo esse avanço, muitos pacientes não se beneficiam da terapia antirretroviral devido ao aparecimento de resistência viral, ocorrência de efeitos adversos da terapia crônica ou incapacidade de aderir a esquemas complexos (RAFFANTI; HAAS, 2003).

Grande parte dos medicamentos que compõem o coquetel de antirretrovirais é constituído por drogas patenteadas de alta efetividade produzidas por laboratórios transnacionais cujos preços são extremamente altos (HOIRISCH, 2010).

Desde o início da epidemia de AIDS no Brasil, em 1980, até junho de 2014, foram registrados no Brasil 757.042 casos, de acordo com o Boletim Epidemiológico de 2014. Até junho, foram notificados 70.677 casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) entre adultos e 773 em crianças. O Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais estima aproximadamente 734 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil no ano de 2014, correspondendo a uma prevalência de 0,4% da população (Ministério da Saúde, 2015).

---

<sup>1</sup> O termo em inglês HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), será utilizado ao longo do texto pelo caráter de amplo uso que já adquiriu.

<sup>2</sup> Em Inglês, a doença é conhecida como AIDS, sigla para *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, a qual, da mesma forma, também já está inserida no cotidiano comum e será, por isso, utilizada livremente ao longo do texto.

A forte e incisiva luta brasileira por melhores preços para os medicamentos anti-HIV permitem que o país ofereça hoje, pelo sistema público de saúde, o melhor tratamento disponível, com drogas em número maior e com menos efeitos adversos (HOIRISCH, 2010).

Para que haja atendimento à lei de distribuição gratuita dos antirretrovirais (ARVs), uma das estratégias do governo foi investir nos laboratórios e recursos humanos nacionais para a produção de versões genéricas de medicamentos cujas patentes já expiraram (HOIRISCH, 2010).

O Brasil foi o primeiro país a decretar o licenciamento compulsório de um medicamento para a AIDS, o efavirenz (EFV), que é o antirretroviral mais usado pelos pacientes brasileiros. Desde o licenciamento compulsório houve aproximadamente uma economia de 103 milhões de dólares (2007 a 2011). Hoje, das 38 apresentações de medicamentos ARVs usados no tratamento para a AIDS, 14 são produzidas em nosso país (Ministério da Saúde, 2014b).

Vários procedimentos analíticos de produtos farmacêuticos dependem do uso de substâncias químicas de referência (SQR) ou padrões de referência para caracterização e/ou quantificação de suas propriedades, sendo fundamentais no controle de qualidade de medicamentos (STOEF et al., 2011).

O propósito de se estabelecer um padrão secundário é o seu uso durante análises de rotina na determinação de identidade, pureza e, em particular, o conteúdo ativo em preparações farmacêuticas (WHO, 1999).

Não há uma forma segura de se determinar previamente à validade dos padrões de referência. Assim, a avaliação da estabilidade dos padrões durante o período de sua utilização é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados (STOEF et al., 2011).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Antirretrovirais

Após a identificação do agente causador da AIDS, os avanços mais expressivos têm ocorrido no desenvolvimento de fármacos antirretrovirais efetivos para o tratamento dos indivíduos infectados com HIV (DOMINGOS, 2006).

O número de agentes antirretrovirais aumentou extraordinariamente no decorrer das últimas décadas, em grande parte como resposta à infecção viral (RAFFANTI; HAAS, 2003).

O princípio central da terapia consiste em inibir a replicação do vírus de maneira mais completa e durável possível, evitando ao máximo a toxicidade (Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1 - Infected Adults and Adolescents, 2013).

A abordagem para o tratamento de pacientes infectados tem mudado significativamente nos últimos anos, resultado de avanços no entendimento da patogênese do HIV, na disponibilidade de novos agentes antirretrovirais e no uso de terapias combinadas que demonstram ser mais efetivas que a monoterapia (LAVRA, 2006). A terapia de combinação tem retardado significativamente a progressão da doença, o que permitiu uma maior e melhor qualidade de vida para os pacientes (COLOMBRINI; LOPES; FIGUEIREDO, 2006).

Atualmente para o tratamento dispõe-se das seguintes classes de ARV: inibidores nucleosídeos da transcriptase (ITRNs), inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNNs), inibidores da protease (IPs), inibidores de fusão (IsF), inibidores da integrase (Inis) e antagonistas de CCR5 (receptores específicos de quimiocinas) (HUGHES; BARBER; NELSON, 2008). O Raltegravir, da classe dos inibidores da integrase, representa o mais recente avanço na busca de agentes anti-HIV eficazes e seletivos (DE CLERCQ, 2010).

Pesquisas atuais concentram esforços em busca de novos compostos antirretrovirais pertencentes às classes já utilizadas e também na busca de fármacos que atuem em outras fases do ciclo de replicação do vírus, como por exemplo: inibidores de adsorção e antagonistas de co-receptores virais (DE CLERCQ, 2002).



O quadro 1, a seguir, resume as classes dos antirretrovirais, seus mecanismos e os fármacos correspondentes.

Quadro 1: Classes dos fármacos antirretrovirais

<b>Classe</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Fármacos e suas combinações</b>
Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa	Atuam na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia de DNA criada pelo vírus. Tornam essa cadeia defeituosa, impedindo a reprodução viral.	Zidovudina, Abacavir, Didanosina, Estavudina, Zalcitabina, Lamivudina, Tenofovir e Lamivudina + Zidovudina
Inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa	Bloqueiam diretamente a ação da enzima e a multiplicação do vírus.	Efavirenz, Nevirapina, Delaviridina e Etravirina
Inibidores da protease	Atuam na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV.	Amprenavir, Atazanavir, Darunavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Fosamprenavir, Ritonavir, Lopinavir + Ritonavir, Tipranavir e Saquinavir
Inibidores de fusão	Impedem a entrada do vírus na célula e, por isso, ele não pode se reproduzir.	Enfuvirtida
Inibidores da integrase	Bloqueiam a atividade da enzima responsável pela inserção do DNA do vírus ao DNA humano. Assim inibe a replicação viral e sua capacidade de infectar novas células.	Raltegravir
Antagonistas da CCR5	Previnem a interação da glicoproteína gp120 com o receptor CCR5 necessário para a entrada do vírus nas células.	Maraviroc

Fonte: Ministério da Saúde, 2014b (Adaptado).

Desde 1996, o Brasil distribui, gratuitamente, o coquetel anti-AIDS para todos que necessitam do tratamento. Atualmente, o Ministério da Saúde oferece 22 medicamentos ARV e até outubro de 2014, quase 400 mil pacientes encontravam-se em tratamento, um aumento de aproximadamente 12% quando comparado a 2013 (aproximadamente 355 mil) (Ministério da Saúde, 2015).

## 2.2 Efavirenz

O efavirenz, (4S)-6-cloro-4-(2-ciclopropiletinil)-4-(trifluorometil)-2,4-diidro-1H-3,1-benzoxan-2-ona, foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em setembro de 1999 como um inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa. A DuPont Pharmaceuticals foi responsável pela pesquisa e desenvolvimento do efavirenz, anteriormente conhecido como DMP-266. O medicamento, hoje, é comercializado sob os nomes Stocrin® (Merck Sharp & Dohme) e Sustiva® (Bristol-Myers Squibb) (FDA, 2013).

Este medicamento foi patenteado pela Bristol-Myers e teve a sua licença expirada em 2012, permitindo a sua fabricação e comercialização em qualquer país, independente da prerrogativa de licenças compulsórias (COSTA et al., 2015).

Os inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa, conhecidos como alostéricos não competitivos, são compostos sintéticos quimicamente distintos. O bloqueio da atividade da transcriptase ocorre por meio da ligação adjacente ao sítio ativo, induzindo a alterações na configuração deste local, levando a uma drástica redução na eficiência da enzima (RAFFANTI; HAAS, 2003).

O EFV apresenta atividade contra uma variedade de cepas mutantes do HIV1. Apesar de sua potência e eficácia, tem limitações importantes para uso em gestantes e por seus efeitos colaterais no Sistema Nervoso Central (SNC). Além disso, já são relatados casos de resistência ao EFV devido à ocorrência de mutações na transcriptase reversa (COSTA et al., 2015).

A forma ideal de utilização destes fármacos é na terapia combinada com análogos de nucleosídeos e inibidores de protease, onde a atividade sinérgica é mais potente (DE CLERCQ, 2004).

Este fármaco é o terceiro mais utilizado no tratamento antirretroviral, devido às suas propriedades farmacológicas e alta potência *in vivo*. Até o final de 2013, as recomendações emitidas por agências nacionais e internacionais indicavam a preferência por tratamento contendo o efavirenz (OMS, 2015).

### 2.2.1 A história do efavirenz no Brasil

O governo brasileiro tem compromisso com o acesso universal ao tratamento das pessoas que vivem com o HIV/AIDS, conforme presente nos princípios do Sistema Único de Saúde (SUS), na Lei 9.313/96 e, primordialmente, previsto na Constituição Federal de 1988 (CHAVES, 2007).

O Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde brasileiro vem sendo considerado um dos melhores do mundo e atende milhares de infectados que recebem os medicamentos gratuitamente através do SUS (MARTINS, 2014).

Uma vez compromissado com a política de distribuição gratuita e, motivada por limitações orçamentárias, na década de 90 foi iniciada a produção de ARVs por laboratórios privados nacionais. Durante esses anos, o governo brasileiro incentivou os laboratórios públicos a produzir versões genéricas de medicamentos antirretrovirais. A produção nacional de genéricos teve uma função regulatória ao permitir que o governo acompanhasse e estabelecesse limites para os preços praticados pelas empresas privadas (RODRIGUES, 2007).

Os medicamentos antirretrovirais de primeira linha produzidos no Brasil não estavam sob proteção patentária, já que na época do início da produção não eram reconhecidas as patentes farmacêuticas. Esse fato permitiu que sete ARVs fossem produzidos como genéricos nacionais, o que reduziu o custo do tratamento e ampliou o acesso aos pacientes (PONTES, 2007).

Como o Brasil começou a reconhecer patentes para medicamentos a partir de 1997, muitos ARVs foram protegidos por patentes ou estão com pedidos depositados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (CHAVES, 2007). Esses medicamentos, agora patenteados no Brasil, impactaram e seguem impactando na política de distribuição universal de ARVs (PONTES, 2007).

Durante a primeira metade da década de 2000, o governo brasileiro negociou com sucesso descontos em uma série de medicamentos patenteados e utilizou a ameaça de licença compulsória como instrumento de pressão (FORD et al., 2007).

Nessa época, o laboratório detentor da patente do efavirenz, a Merck Sharp & Dohme (MSD) estabeleceu preços diferenciados para os diversos países com base no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e/ou com base na prevalência do HIV (HOIRISCH, 2010).

Desde 2006, o Brasil vinha pressionando o laboratório Merck, sem sucesso, a reduzir o valor de US\$ 1,59 para US\$ 0,65 pelo comprimido de 600mg. O Ministério da Saúde declarou o medicamento de “interesse público” e anunciou a intenção de comprar a versão genérica da Índia por um preço de US\$ 0,45 o comprimido (LIMA, 2013).

A MSD inicialmente apresentou uma proposta de 2% de redução e, posteriormente, após a declaração de interesse público do medicamento, de 30%, o que foi considerado insuficiente pelo governo, não atendendo ao interesse nacional (CHAVES, 2007). Desta forma, o Presidente Luiz Inácio Lula da Silva anunciou, em 04 de maio de 2007, através do Decreto nº 6.108, o licenciamento compulsório do efavirenz, para fins de uso público não comercial com validade de cinco anos e podendo ser renovado por mais cinco (LIMA, 2013).

A decisão do governo brasileiro foi tomada visando manter a excelência do Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde e garantir o atendimento e fornecimento de medicamentos aos doentes. A medida decretada pelo governo foi inédita na América Latina, consagrando-se, portanto, a primeira vez que o Brasil licencia um remédio protegido por patente (MARTINS, 2014).

Depois de decretar o licenciamento compulsório em 2007, o Ministério da Saúde passou a importar da Índia genéricos pré-qualificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Paralelamente, foi iniciado o desenvolvimento do efavirenz nacional. A decisão do governo federal foi de desenvolver a formulação do medicamento e incentivar a produção do princípio ativo. Para isso, Farmanguinhos e Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (Lafepe) desenvolveram a etapa de formulação e a produção final do medicamento (Ministério da Saúde, 2014a).

Para o consórcio formado pelas empresas privadas Cristália, Nortec e Globequímica ficou a responsabilidade do fornecimento do insumo farmacêutico ativo (IFA) para os laboratórios públicos (RODRIGUES, 2007). Cada uma das

empresas farmoquímicas é responsável pela produção de cinco toneladas anuais do princípio ativo utilizado por Farmanguinhos para fabricação do efavirenz, totalizando 15 toneladas ao ano (Portal dos Fármacos, 2013).

Desde 2009, a apresentação farmacêutica mais utilizada do efavirenz passou a ser produzida no Brasil, na forma de genérico. Os laboratórios indianos, Aurobindo e Ranbaxy, forneceram o medicamento até 2010, e seus estoques duraram até 2011 quando a produção passou a ser inteiramente nacional. Em 2012, foram contratados pelo Ministério da Saúde 57 milhões de comprimidos de efavirenz a Farmanguinhos. (Ministério da Saúde, 2014a).

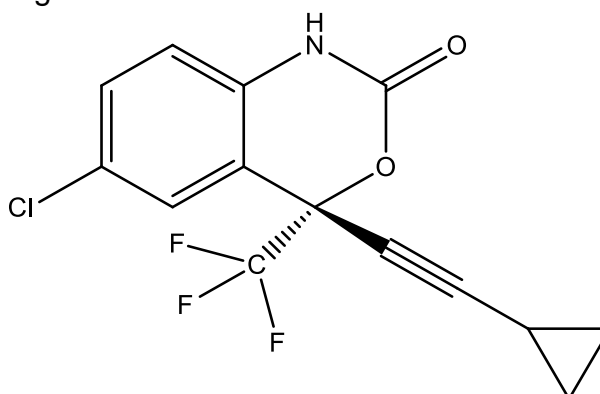
Em maio de 2012, foi prorrogado por mais cinco anos o prazo de vigência do licenciamento compulsório pelo Decreto nº 7.723/2012 (BRASIL, 2012) uma vez que, o efavirenz é o antirretroviral mais usado pelos pacientes que recebem o coquetel para tratamento de HIV/AIDS, atendendo cerca de 85 mil pacientes no país (Portal dos Fármacos, 2013).

### 2.2.2 Propriedades físico-químicas do insumo farmacêutico ativo

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010a), o efavirenz possui fórmula molecular  $C_{14}H_9ClF_3NO_2$ , com massa molar de 315,7g/mol. Sua aparência é de pó cristalino branco ou quase branco e com faixa de fusão de 136 a 141°C. É uma substância opticamente ativa e, adicionalmente, também apresenta baixa densidade e alta estaticidade, caracterizada por meio da aderência em superfícies.

É um ativo praticamente insolúvel em água, mas solúvel em metanol e diclorometano. Sua solubilidade em meio aquoso é de 9,0 µg/ml e pertence à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), ou seja, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade, o que leva a uma má absorção gastrointestinal devido à baixa solubilidade do fármaco. Além disso, o efavirenz possui uma taxa de dissolução intrínseca inferior a 0,1mg/min/cm<sup>2</sup>, o que pode ser um fator limitante da velocidade de absorção oral (SATHIGARI et al., 2009).

Figura 1: Fórmula Estrutural Plana.



Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010a.

### 2.2.3 Polimorfismo

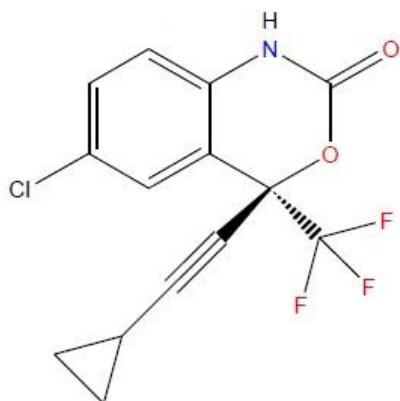
Uma das primeiras definições de polimorfismo foi feita por McCrone em 1964, na qual afirmava que o polimorfismo é a fase cristalina sólida de um dado composto resultante da possibilidade de, pelo menos, dois diferentes arranjos das moléculas do composto no estado sólido (DESIRAJU, 2008). Segundo esta mesma fonte, o polimorfismo pode ser definido como a capacidade de um mesmo composto químico existir em diferentes formas cristalinas com diferentes arranjos de moléculas na rede cristalina.

Os sólidos cristalinos possuem arranjos regulares de moléculas que se repetem em três dimensões, enquanto os sólidos amorfos carecem desse ordenamento na hora de formar os cristais e não possuem uma rede cristalina distinguível. Esta diferença na periodicidade das moléculas resulta em diferenças nas propriedades físicas e químicas dos cristais e dos sólidos amorfos (DATTA; GRANT, 2004).

O polimorfismo é um tema de grande interesse para a indústria farmacêutica. Os insumos farmacêuticos ativos podem ser encontrados em várias formas sólidas distintas, incluindo polimorfos (anidros, solvatos e hidratos), sais, cocrystalis e sólidos amorfos. Cada forma apresenta propriedades físico-químicas únicas que podem influenciar na biodisponibilidade, processabilidade e estabilidade do medicamento (MORISSETTE, 2004).

A grande quantidade de sítios de ligação de hidrogênio no efavirenz (Figura 2), o torna um candidato potencial para apresentar modificações cristalinas mediante recristalização (CHADHA et al., 2012a).

Figura 2: Possíveis ligações de hidrogênio do Efavirenz



Legenda: Átomos em vermelho: aceptores de hidrogênio e átomos em azul: doadores de hidrogênio.

Segundo Chadha e colaboradores (2012b), até 1999 não era conhecida nenhuma forma cristalina estável do efavirenz e na primeira patente, em 1999, foi afirmada a existência de cinco formas cristalinas diferentes. Logo após, mais algumas patentes e publicações apareceram descrevendo os métodos para a preparação usando diferentes solventes.

A literatura de patentes até 2012 revelava 23 formas polimórficas diferentes de efavirenz, um mono-hidrato e uma forma amorfa, embora haja alguma ambiguidade sobre o número real de formas sólidas (polimorfos e solvatos) deste ativo (CHADHA et al., 2012a). Isso ocorre porque os pedidos de patentes descrevem algumas formas polimórficas para o efavirenz, mas as informações quanto às suas caracterizações são insuficientes e difíceis de provar (MELO et al., 2013).

No início da sua descoberta, não foram relatadas formas polimórficas estáveis do efavirenz, porém era necessário o estudo das formas cristalinas estáveis para se produzir o IFA seguro e eficaz. Com isso, foi descoberto que a forma I é a termodinamicamente mais estável. Devido à maior estabilidade, essa forma é mais usada para a formulação do medicamento (RADESCA et al., 2004).

Devido à sua baixa solubilidade em água, podem ser observadas diferenças significativas na biodisponibilidade das várias formas polimórficas do EFV. Em um estudo de comparação dos polimorfos I e II do EFV, Fandaruff e colaboradores (2014) constataram que o polimorfo II é tão estável quanto o polimorfo I e significativamente mais solúvel. Este conhecimento tem relevância fundamental para a indústria farmacêutica, uma vez que o polimorfo II pode ser um excelente candidato com vantagens evidentes em relação ao IFA atualmente utilizado. Segundo esses mesmos autores, estudos recentes têm sido relacionados à co-cristais, solvatos e a outras formas cristalinas; no entanto, estudos sobre sua estabilidade termodinâmica, a melhoria das propriedades de dissolução e efeitos da morfologia na dissolução intrínseca têm sido raramente relatados.

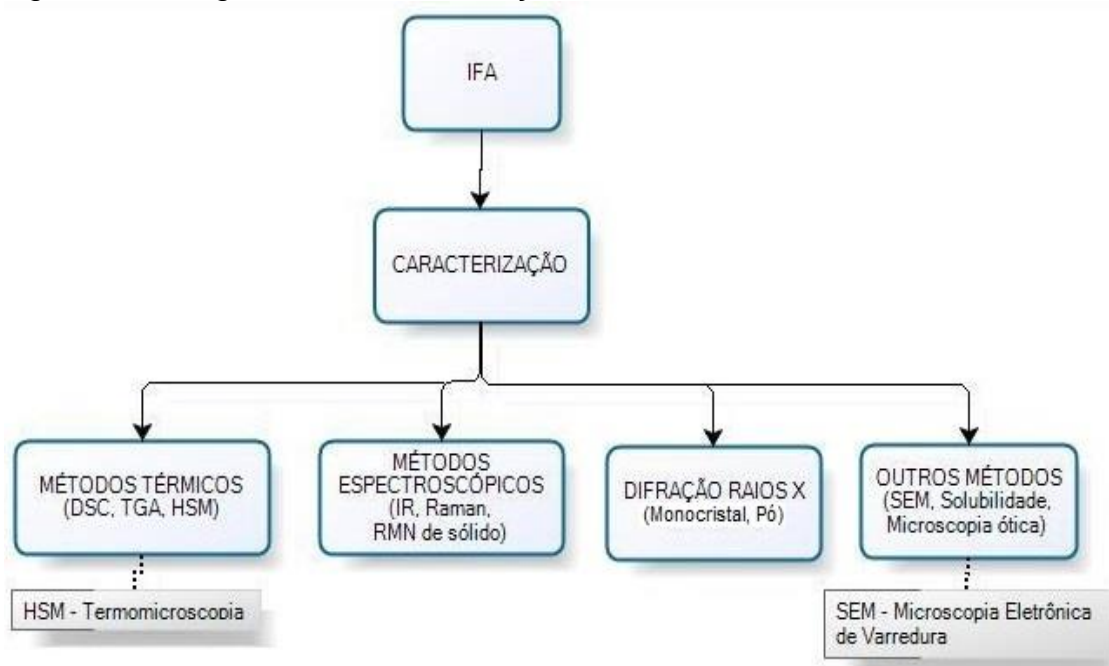
#### 2.2.3.1 Caracterização

A caracterização dos insumos farmacêuticos é utilizada como uma ferramenta de predição que permite o conhecimento das características físicas, químicas e mecânicas dos materiais (QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

Várias técnicas estão disponíveis para a investigação do estado sólido. Estas incluem microscopia (termomicroscopia), espectroscopia (Infravermelho, Raman, RMN de sólido), difração de raios X (de monocristal e de pó) e análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica). A combinação dessas técnicas é frequentemente usada para uma melhor caracterização do estados sólido (NIAZI, 2007).



Figura 3: Fluxograma de caracterização.



Fonte: GIBSON, 2009 (Adaptado).

#### a) Difração de Raios X (DRX)

Os métodos de DRX, tanto de cristal como de pó, fornecem dados a respeito da estrutura cristalina de um fármaco no estado sólido (QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

A difração é um fenômeno de dispersão. Ao incidir sobre os sólidos cristalinos, os raios X são espalhados em todas as direções (NIAZI, 2007). A dispersão ocorre na mesma intensidade das distâncias interatômicas da estrutura cristalina (GIBSON, 2009).

Os dados obtidos com a difração de raios X fornecem informações sobre a conformação da molécula e seu empacotamento, interações moleculares (principalmente ligações de hidrogênio) e localização de solventes na rede cristalina. Esta técnica é reconhecida como uma das mais adequadas para a identificação/quantificação de polimorfos, uma vez que cada forma cristalina apresenta conformações diferentes e/ou arranjos moleculares diferentes na estrutura cristalina (QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

A técnica de difração de raios X de monocristal é a mais indicada para demonstrar a existência de polimorfismo (PRADO et al., 2014).

Quando a determinação de uma estrutura de cristal usando DRX de um único cristal é difícil, devido à indisponibilidade de cristais adequados, técnicas computacionais podem ser utilizadas para prever as estruturas cristalinas (DATTA, GRANT, 2004).

#### b) Análise Térmica

A análise térmica é geralmente conduzida com o objetivo de avaliar alterações físicas e químicas que ocorrem em uma amostra em função de um programa de temperatura (QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

Existe uma série de técnicas analíticas térmicas que podem ser usadas para caracterizar os polimorfos. Entre as técnicas mais comumente utilizadas para avaliação de formas polimórficas e fenômenos relacionados estão a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA) e Termomicroscopia (HSM) (GIBSON, 2009). Esse mesmo autor afirma que o DSC é um dos métodos mais usados para estudar propriedades do estado sólido, pois nele podem ser observados fenômenos endotérmicos (fusão) e fenômenos exotérmicos (cristalização e decomposição) (GIBSON, 2009).

Nesta técnica, a amostra a ser investigada e o material de referência (termicamente inerte não contendo amostra) são aquecidos concomitantemente e submetidos a um programa controlado de temperatura ao longo do tempo. O princípio básico da técnica é manter a diferença de temperatura da amostra e da referência constante. Qualquer evento físico-químico que ocorra na amostra (fusão, cristalização, transição vítrea) e que envolva a troca de calor com o meio deverá ser compensado com o fornecimento ou a retirada de energia para que a diferença de temperatura permaneça constante (NIAZI, 2007).

Segundo Gibson (2009), o DSC também pode ser utilizado para análise de pureza. No entanto, é limitado para compostos com pureza acima de 98%, e que não degradem na fusão. Quando métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) não são aplicáveis pode-se usar o DSC para estimar a pureza, porém este é muito menos preciso do que o CLAE. Como conclusão, esta mesma fonte mostra claramente que o DSC pode ser uma técnica informativa, mas não

deve ser utilizada de forma isolada, uma vez que informações adicionais a partir de outras técnicas são quase sempre necessárias para a completa interpretação dos resultados.

Contrário a essa afirmação, Dooren e Müller (1984) afirmam que o uso da técnica de DSC é ideal para a comparação de purezas de lotes no controle de qualidade; em especial para impurezas que são estruturalmente muito semelhantes à substância pura (como modificações polimórficas, intermediários de síntese e os produtos de degradação). Porém, suas principais desvantagens são que a substância a ser analisada deve ser razoavelmente estável durante a fusão (sem decomposição) e as substâncias devem ter um elevado grau de pureza. Por fim, o método é extremamente preciso, pois coeficientes de variação inferior a 0,1% podem ser facilmente alcançados.

O DSC tem muitas vantagens sobre as técnicas de análise convencionais com base na separação do composto puro e das impurezas (tais como técnicas cromatográficas). É uma técnica simples e rápida que requer pequena quantidade de amostra (<5mg) e que não necessita de procedimentos de padrões de comparação.

A termogravimetria é uma análise térmica utilizada para identificação de perdas de massa durante uma programação de temperatura, bem como para avaliação da estabilidade térmica dos fármacos. A técnica está baseada em uma balança de sensibilidade adequada para verificação da perda de massa durante o aquecimento da amostra (GIBSON, 2009).

Nesta técnica também é possível quantificar a(s) substância(s) orgânica(s) volátil(eis), como por exemplo, água ou solventes presentes em diferentes locais na rede cristalina, o que fornece a ela uma vantagem quando comparada à análise de titulação de Karl Fischer ou a perda por dessecação, nas quais é possível avaliar somente a quantidade total de umidade (água) presente no composto (NIAZI, 2007).

### c) Técnicas Espectroscópicas

As técnicas espectroscópicas podem desempenhar um papel extremamente importante na caracterização (BRITAIN, 2008). Além de ser usada como uma

técnica de identificação química, a espectroscopia também pode ser utilizada para distinguir diferentes estruturas de compostos no estado sólido (GIBSON, 2009).

A espectroscopia vibracional (Infravermelho e Raman) produz informação sobre o movimento de grupos funcionais no sólido, e se as vibrações moleculares são afetadas pelas diferenças estruturais que caracterizam as diferentes formas de cristal (BRITTAİN, 2008).

A espectroscopia no infravermelho diferencia estruturas de estado sólido da mesma forma como ele diferencia e identifica as estruturas químicas. Os diferentes arranjos de átomos na ligação do estado sólido, para ambientes moleculares diferentes, induzem uma variabilidade nas frequências de alongamento. Estas diferenças são usadas para distinguir as formas polimórficas de um composto. Esta técnica é especialmente importante para a caracterização de polimorfos, pois padrões de ligação de hidrogênio frequentemente diferem entre as formas. Além disso, os grupos funcionais afetados mostrarão graus variados de mudança nas posições das bandas dos picos (NIAZI, 2007).

Após a cristalografia de raios X, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de estado sólido (SSNMR) pode ser considerada como uma técnica extremamente poderosa para a caracterização em nível molecular de um sólido farmacêutico, pois permite distinguir as formas polimórficas. É importante ressaltar que o espectro de RMN é uma impressão digital do analito analisado, pois este método espectroscópico produz informações sobre os ambientes químicos individuais de cada átomo do composto em estudo (BRITTAİN, 2008).

Além de permitir a investigação seletiva dos componentes individuais em uma formulação sólida sem qualquer tratamento químico ou físico da amostra, é uma técnica não destrutiva e não invasiva, quantitativa e seletiva, e ao contrário de DRX, os picos no espectro de RMN podem ser atribuídos aos grupos funcionais específicos. Apesar das amplas aplicações, há alguns aspectos negativos da análise de RMN, incluindo o elevado custo dos equipamentos e o grau de conhecimento necessário para coletar e analisar os resultados (QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

Por isso, a técnica de RMN no estado sólido combinadas com as outras técnicas de caracterização já mencionadas, formam um conjunto valioso para a avaliação criteriosa de fármacos.

#### 2.2.4 Impurezas

A Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia - USP) classifica as impurezas em três tipos: orgânicas, que são aquelas que podem surgir durante o processo de fabricação ou durante o período de vida útil da substância; inorgânicas, que são as que normalmente resultam do processo de síntese como, por exemplo, metais pesados e sais inorgânicos; e, por último, os solventes residuais que são líquidos orgânicos ou inorgânicos usados na síntese do IFA (USP, 2013a).

O número de metais tóxicos e solventes residuais que podem ocorrer numa substância são limitados. A sua toxicidade é bem caracterizada e os limites estabelecidos nas farmacopeias garantem que estes não podem contribuir para o perfil de efeitos secundários do fármaco, ao contrário das impurezas orgânicas, que são as mais problemáticas (GÖRÖG, 2008).

A presença de impurezas, mesmo em pequenas quantidades, pode influenciar na eficácia e na segurança dos produtos farmacêuticos, pois podem causar efeitos farmacológicos e toxicológicos indesejados (RIBEIRO et al., 2007).

Uma das maneiras de assegurar a qualidade e a segurança dos medicamentos é pelo monitoramento e controle eficaz das impurezas. Portanto, as análises de impurezas estão entre as questões mais importantes do controle de qualidade na indústria farmacêutica (NAGESWARA RAO; NAGARAJU, 2003).

Nos últimos anos, as agências reguladoras estão com a atenção voltada para análise de impurezas. Diferentes compêndios, como por exemplo, a Farmacopeia Americana (USP), a Farmacopeia Britânica (BP) e a Farmacopeia Brasileira (FB) estão especificando cada vez mais os limites permitidos de impurezas presentes nos IFAs assim como nos produtos farmacêuticos (RIBEIRO et al., 2007).

Em geral, de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH) sobre impurezas em novos medicamentos, a identificação de impurezas abaixo do nível de 0,1% não é considerada necessária a menos que as impurezas tenham potenciais tóxicos. Porém, em todos os casos, as impurezas devem ser qualificadas (ROY, 2002).

O perfil das impurezas depende da via de síntese, da origem e da pureza dos materiais de partida assim como dos reagentes, das condições do método de purificação e do armazenamento (GÖRÖG, 2008).

Como a maioria das impurezas são características da via de síntese, uma vez que existem várias possibilidades de síntese de um fármaco, é possível que o mesmo produto de fabricantes diferentes possa gerar impurezas de síntese diferentes (NAGESWARA RAO; NAGARAJU, 2003).

É por isso que o espectro de impurezas, ou seja, atividades analíticas cujo objetivo é a detecção, identificação/elucidação da estrutura e determinação quantitativa das impurezas são a questão-chave na análise farmacêutica moderna (GÖRÖG, 2008).

Quase todas as impurezas orgânicas são determinadas por cromatografia ou métodos combinados. As vantagens do uso das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) encontram-se na combinação de sensibilidade, eficiência e velocidade de análise (GIBSON, 2009).

As impurezas orgânicas necessitam de uma consideração cuidadosa quando forem quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, porque podem não produzir as respostas do detector em relação ao padrão de referência, ou seja, a quantificação por área percentual dessas não seria apropriada nesses casos. O correto seria usar métodos analíticos combinados para isolar e identificar essas impurezas de modo que um padrão de referência adequado possa ser utilizado (BROWNE, 2009).

A espectrometria de massa é amplamente usada para a caracterização e identificação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos. A cromatografia líquida combinada com espectrometria de massa (LC-MS) é considerada como uma das técnicas mais importantes para análise de impurezas e vem se tornando o método de escolha para suporte analítico em várias etapas do controle de qualidade (NAGESWARA RAO; NAGARAJU, 2003).

#### 2.2.4.1 Impurezas do efavirenz

A pesquisa bibliográfica revela que existem métodos analíticos disponíveis para determinação do efavirenz a partir de matrizes biológicas (WOOLF et al., 2002; RARAS-NACENTA et al., 2001; LAGMANN et al., 2001; VELDKAMP et al., 1999) e métodos analíticos para a determinação do efavirenz com a combinação de outros

fármacos antivirais (FAN; STEWART, 2002; LEMMER et al., 2005; NOTARI et al., 2006) (HAMRAPURKAR et al., 2010).

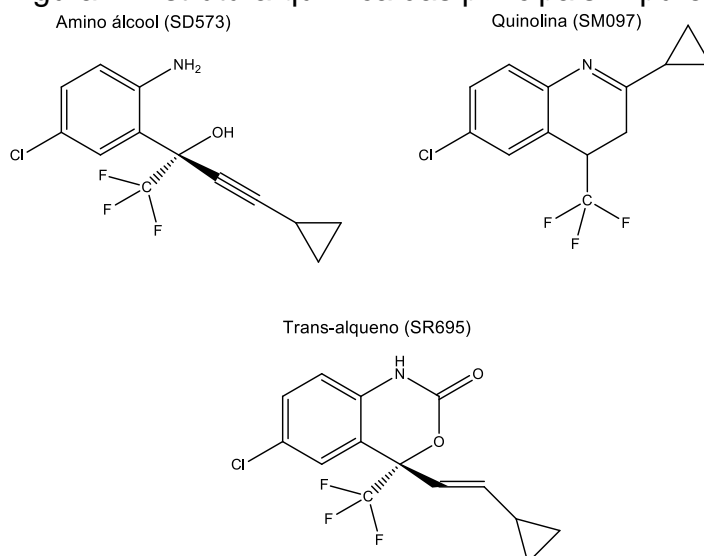
Poucos métodos falam sobre as análises de impurezas do efavirenz na literatura, tanto de IFA como de formas farmacêuticas (RIBEIRO et al., 2007; WEISSBURG et al., 2002; MONTGOMERY et al., 2001; HAMRAPURKAR, PHALE e SHAH, 2009; HAMRAPURKAR et al., 2010). Os métodos mencionados estão diretamente relacionados com a determinação de impurezas orgânicas (SESHACHALAM; NARASIMHA RAO; CHANDRASEKHAR, 2008).

Segundo Nageswara Rao e Nagaraju (2003), o artigo de Montgomery e colaboradores (2001) é um dos que mais detalham as impurezas encontradas e o método de análise desenvolvido foi validado conforme as diretrizes do ICH.

#### a) Impurezas Principais

As três impurezas mais estudadas do efavirenz são o amino álcool (SD573), a quinolina (SM097) e o trans-alqueno (SR695) (MONTGOMERY et al., 2001), cujas estruturas estão mostradas na figura 4.

Figura 4: Estrutura química das principais impurezas do efavirenz.



Fonte: MONTGOMERY et al., 2001 (Adaptado).

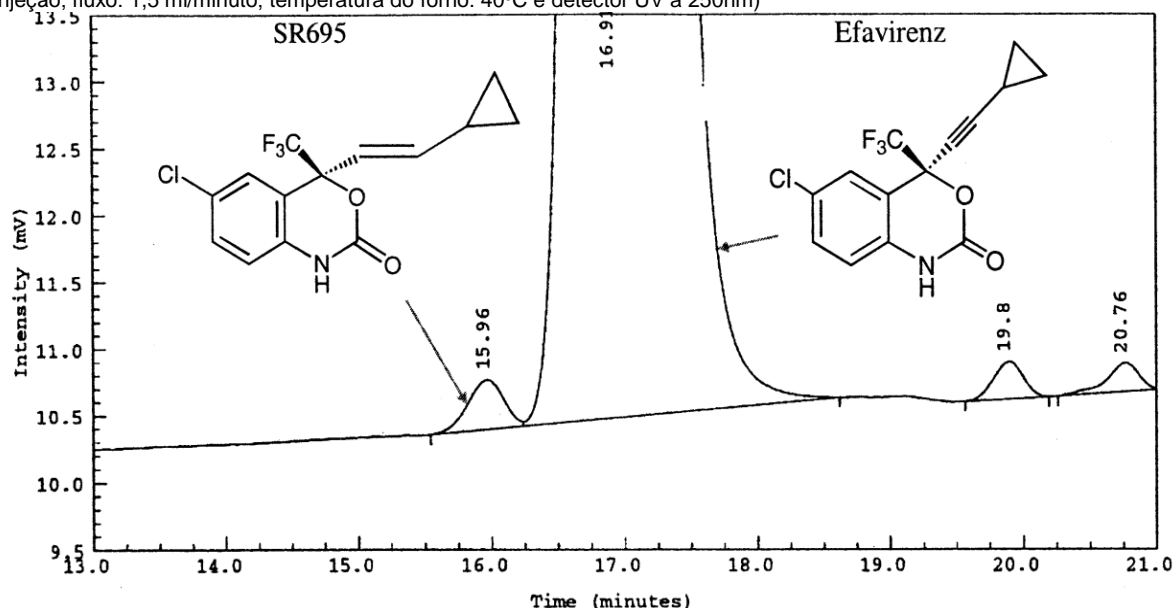
A quinolina e o amino álcool são conhecidos como os principais produtos de degradação do efavirenz. Por apresentarem perfis de absorção diferentes na região do ultravioleta, suas identificações são facilitadas (RIBEIRO et al., 2007).

O amino álcool também pode ser considerado uma impureza de síntese já que, dependendo da rota sintética, pode ser um dos intermediários (MONTGOMERY et al., 2001).

O trans-alqueno possui a fórmula estrutural que difere do efavirenz por conter uma ligação dupla trans enquanto o IFA contém uma ligação tripla, ou seja, sua formação ocorre pela reação de redução da tripla ligação da substância ativa (WEISSBURG et al., 2002). Devido à semelhança estrutural, a separação dos picos por CLAE é uma das dificuldades da análise dessa impureza.

Figura 5: Cromatograma de separação do efavirenz e da impureza SR695.

(condições cromatográficas – coluna: Zorbax® SB-CN, 15cm x 4,6mm; fase móvel: (A) 90% água/10% metanol com 0.05% ácido trifluoracético, (B) 90% metanol/10% água com 0.05% ácido trifluoracético; gradiente: linear de 60:40 (A:B) até 50:50 por 16 minutos, 35:65 por 7 minutos, 30:70 por 5 minutos, 20:80 por 1 minuto, manter esta condição por 2 minutos e retornar em 1 minuto a condição inicial de 60:40 (A:B), equilibrar por no mínimo 8 minutos antes da próxima injeção; fluxo: 1,5 ml/minuto; temperatura do forno: 40°C e detector UV a 250nm)



FONTE: WEISSBURG et al., 2002.

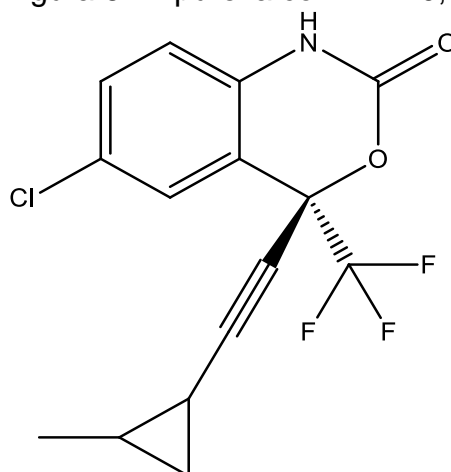
Conforme observado na figura 5, Weissburg e colaboradores (2002) apresentaram a eluição dos dois compostos na seguinte ordem trans-alqueno (tempo de retenção (TR) – 15,96 minutos) e efavirenz (TR – 16,91 minutos),



apresentando uma resolução de 0,6 e um tempo de retenção relativo para o trans-alqueno de 0,94.

Segundo Montgomery e colaboradores (2001), a impureza no tempo de retenção de 19,8 minutos corresponde ao composto SP234 (Figura 8, página 42). A impureza em 20,76 minutos não foi descrita por esses autores, porém a Farmacopeia Americana (2015) menciona o composto (S)-6-Cloro-4-[[[(2RS,2RS)-2-metilciclopropil]etinil]-4-(trifluorometil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona (Figura 6) como tendo o tempo de retenção relativo de 1,28, que é o correspondente ao da impureza encontrada por Weissburg e colaboradores (2002).

Figura 6: Impureza com TR 20,76 minutos.

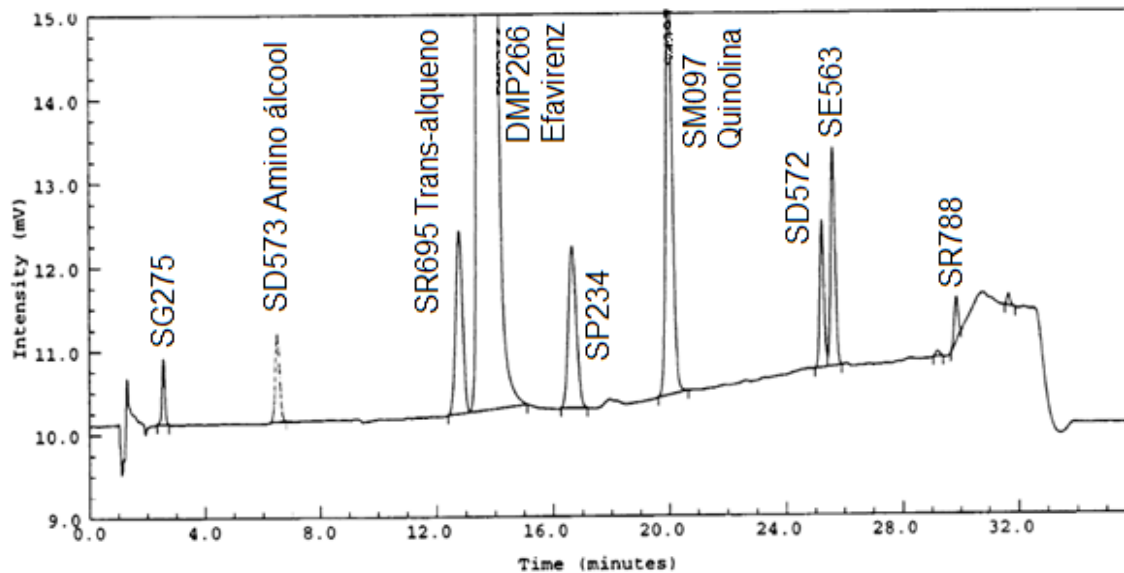


FONTE: USP, 2015 (Adaptado).

Além das três impurezas principais (amino álcool, quinolina e trans-alqueno) foram observadas outras impurezas no estudo de desenvolvimento e validação de método realizado por Montgomery e colaboradores (2001), que podem ser observadas no cromatograma da figura 7 (página 42) e na figura 8 (página 42).

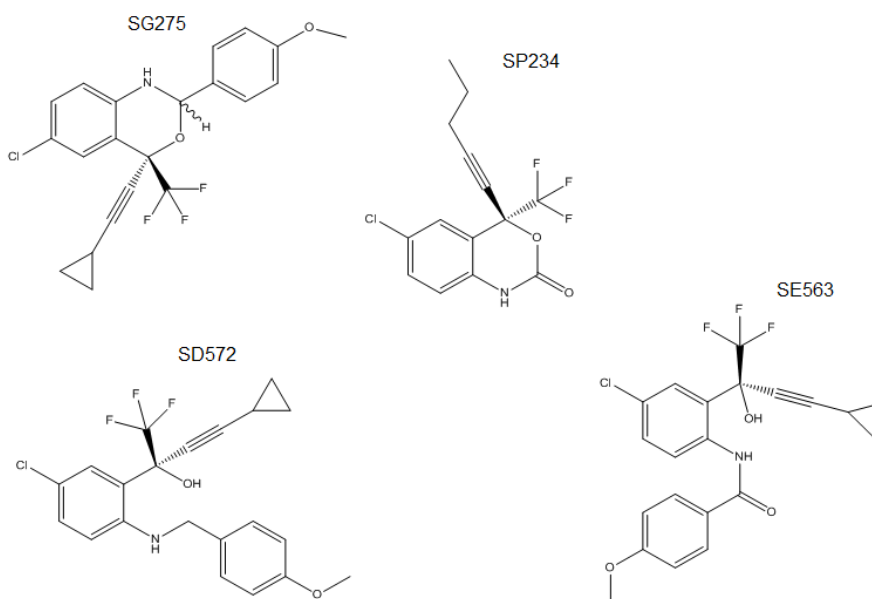
Figura 7: Cromatograma das impurezas do efavirenz.

(condições cromatográficas – coluna: Zorbax® SB-CN, 15cm x 4,6mm; fase móvel: (A) 90% água/10% metanol com 0,05% ácido trifluoracético, (B) 90% metanol/10% água com 0,05% ácido trifluoracético; gradiente: linear de 60:40 (A:B) até 50:50 por 16 minutos, 35:65 por 7 minutos, 30:70 por 5 minutos, 20:80 por 1 minuto e manter esta condição por 2 minutos e retornar em 1 minuto à condição inicial de 60:40 (A:B), equilibrar por no mínimo 8 minutos antes da próxima injeção; fluxo: 1,5 ml/minuto; temperatura do forno: 40°C e detector UV a 250 nm).



FONTE: MONTGOMERY et al., 2001(Adaptado).

Figura 8: Estrutura química de outras impurezas do efavirenz.



FONTE: MONTGOMERY et al., 2001 e USP, 2015 (Adaptado)

A impureza SR788 não teve sua estrutura descrita por Montgomery e colaboradores (2001). No cromatograma, observa-se que o tempo de retenção relativo referente a essa impureza é de 2,1 que, segundo a Farmacopeia Americana (2015), corresponde a uma impureza desconhecida.

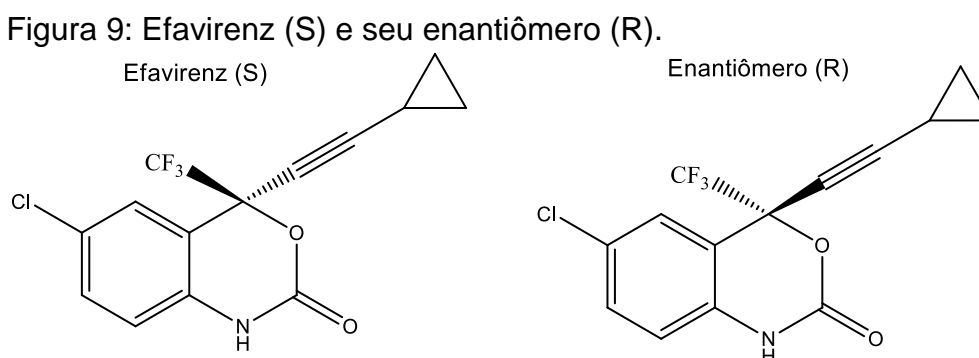
O método de substâncias relacionadas usado pela Farmacopeia Brasileira (2010a) é igual ao estudado por Montgomery e colaboradores (2001); nele foi observado que nenhuma impureza ou produto de degradação conhecido causa interferência no pico do efavirenz, o que comprova que o método é específico e de indicação para estudo de estabilidade do fármaco.

#### b) Impurezas Enantioméricas

A separação de enantiômeros tornou-se um elemento essencial e importante, particularmente na indústria farmacêutica, uma vez que alguns enantiômeros racêmicos têm diferentes propriedades farmacocinéticas e diversificados efeitos farmacológicos e toxicológicos (PUJERI; KHADER; SEETHARAMAPPA, 2013).

Para um fármaco com um único isômero opticamente ativo pode haver impurezas enantioméricas presentes no IFA. Os estereoisômeros indesejáveis também são classificados como impurezas orgânicas (ROY, 2002).

Como o efavirenz é uma molécula assimétrica, sendo comercializado na sua forma S, o seu isômero R é considerado impureza enantiomérica (Figura 9) (SESHACHALAM; NARASIMHA RAO; CHANDRASEKHAR, 2008).



As rotas sintéticas disponíveis para o IFA têm como principal obstáculo a etapa enantiosseletiva para a formação do carbono estereogênico, visto que o insumo farmacêutico ativo deverá ser obtido enantiomericamente puro e com bom rendimento global (COSTA et al., 2015).

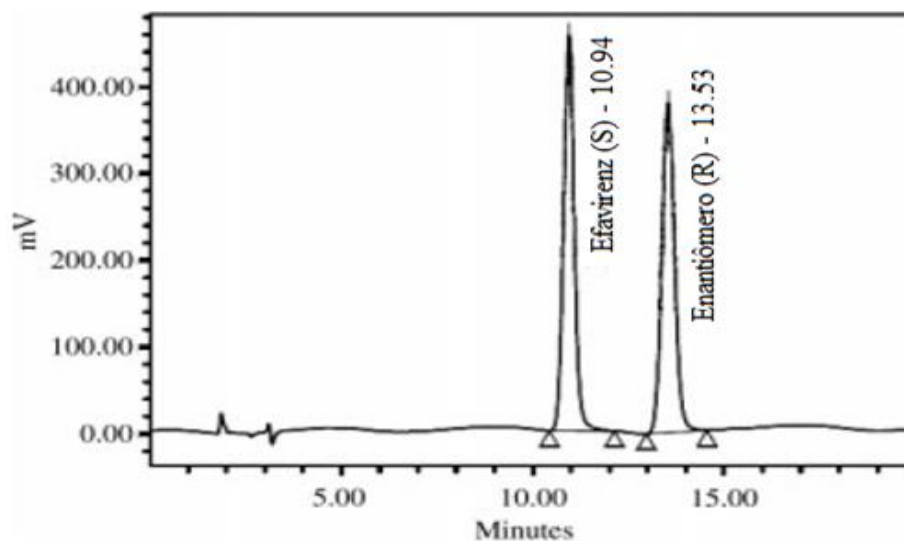
O método de análise de impurezas quirais é diferente dos normalmente usados para substâncias relacionadas uma vez que requer técnicas específicas de separação como, por exemplo, o uso de colunas quirais (com base de polissacarídeos) e o uso de solventes polares (SESHACHALAM; NARASIMHA RAO; CHANDRASEKHAR, 2008).

Portanto, o desenvolvimento de novos métodos para separações quirais eficientes vem ganhando importância principalmente nas análises por CLAE, eletroforese capilar e cromatografia gasosa (PUJERI; KHADER; SEETHARAMAPPA, 2013).

O método de cromatografia líquida, validado por Seshachalam e Narasimha Rao e Chandrasekhar (2008) apresentou uma eficiente separação entre os picos do efavirenz (S) (TR – 10,94 minutos) e o seu enantiômero (R) (TR – 13,53 minutos) apresentando uma resolução de 4,59 conforme pode ser observado na figura 10.

Figura 10: Cromatograma de separação dos enantiômeros do efavirenz.

(condições cromatográficas – coluna: Chiralcel OD 25cm x 4,6 mm - 10 µm; fase móvel: n-hexano:álcool isopropílico:ácido fórmico (80:20:0.1 v/v/v); gradiente: isocrático; fluxo: 1,0 ml/minuto; temperatura do forno: 25°C e detector de UV a 254nm)



FONTE: SESHACHALAM; NARASIMHA RAO; CHANDRASEKHAR, 2008.

## 2.3 Estudo de Estabilidade

Com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, são preconizados estudos de estabilidade (SILVA et al., 2009).

A estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o produto farmacêutico ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (ANVISA, 2005).

Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado e aquele em que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (SILVA et al., 2009).

As razões para a determinação da estabilidade de produtos farmacêuticos fundamentam-se, entre outras, na preocupação com a saúde pública. Esta é uma importante avaliação, pois a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos. Em termos de eficácia, o efeito mais óbvio da instabilidade farmacêutica é a diminuição da potência do medicamento; entretanto, se os produtos de degradação formados são tóxicos, seu acúmulo é tão importante quanto, ou mais, que a diminuição da potência (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

A Resolução Específica nº1/2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que propõe um Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, determina que o estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos deve contemplar a quantificação de produtos de degradação assim como o método analítico correspondente.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 45/2012, que dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos, produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas ocorridas no

intermediário ou insumo farmacêutico ativo devido à ação do tempo e/ou à ação de agentes externos, tais como luz, temperatura, pH, água, ou pela reação com um excipiente e/ou com a embalagem primária.

A estabilidade é considerada como um dos critérios mais importantes do controle de qualidade farmacêutico. O propósito do estudo de estabilidade é fornecer evidências sobre como a qualidade de um fármaco ou de um produto farmacêutico pode variar com o tempo em função de uma variedade de fatores ambientais tais como temperatura, umidade e luz, e possibilita também estabelecer as condições de armazenamento, os períodos de reteste e os prazos de validade recomendados (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Prazo de validade é definido como data limite para a utilização de um insumo farmacêutico ativo ou produto farmacêutico definida pelo fabricante, caracterizado como período de vida útil e fundamentado nos estudos de estabilidade específicos, mantidas as condições de armazenamento e transporte estabelecidas (ANVISA, 2005; ANVISA, 2012).

A definição das condições do estudo de estabilidade é baseada na análise dos efeitos das condições climáticas existentes. As temperaturas médias em qualquer parte do planeta são derivadas dos dados climáticos coletados, e o mundo pode dessa forma ser dividido em quatro zonas climáticas (I a IV). Os países que se encontram nas zonas climáticas I e II são constituídos pelos Estados Unidos, países da União Europeia e Japão. Esses países adotam uma temperatura de  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$  combinada com umidade relativa de  $(60\pm 5)\%$  ou uma temperatura de  $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$  combinada com umidade relativa de  $(65\pm 5)\%$  em seus estudos de estabilidade de longa duração. As zonas climáticas III (quente e seca) e IV (quente e úmida) englobam aqueles países que não foram cobertos pelo guia do *International Conference of Harmonization*, estando o Brasil localizado na zona climática IV (ICH-Q1A(R2), 2003).

No ano de 2003, o ICH, em conjunto com a Organização Mundial de Saúde, realizou uma pesquisa entre os países membros das zonas III e IV para harmonizar uma condição de temperatura e umidade com o objetivo de reduzir as inúmeras condições adotadas até então. Como não houve objeção entre os participantes dessa pesquisa foi adotada a condição de temperatura de  $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$  combinada com umidade  $(65\pm 5)\%$  para os estudos de estabilidade de longa duração dos países pertencentes às zonas climáticas III e IV (ICH-Q1F, 2003).

No entanto, com base em novos cálculos e discussões, alguns países da zona climática IV expressaram seu desejo de incluir uma margem maior de segurança em relação às já preconizadas pelo guia ICH Q1F e, como consequência, vários países e regiões, incluindo o Brasil, revisaram suas próprias legislações de estabilidade e definiram a condição de temperatura de  $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$  combinada com umidade  $(75\pm 5)\%$  para os seus estudos de estabilidade de longa duração. Devido a esta divergência dos requisitos globais para realização dos estudos de estabilidade, o comitê diretivo do ICH decidiu suprimir o guia ICH Q1F e deixar a definição das condições de armazenamento em zonas climáticas III e IV para os respectivos países membros e a OMS (ICH, 2014).

Porém, quando se trata de padrão de referência ou padrão de trabalho devemos mantê-los armazenados nas condições previstas no rótulo e no caso de armazenamento em dessecador deve-se seguir as condições exigidas para um laboratório prevista na RDC nº17 de 2010, que é de uma temperatura de 18 a  $25^{\circ}\text{C}$  e umidade máxima de 75% (ANVISA, 2010).

É recomendado um intervalo pré-definido para as condições de temperatura e umidade relativa nas câmaras de armazenamento: temperaturas devem ser controladas com margem de erro de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidades relativas com margem de erro de  $\pm 5\%$  (ORIQUI; MORI; WONGTSCHOWSKI, 2013).

A temperatura e umidade reais de armazenamento devem ser monitoradas durante o estudo de estabilidade, pequenas variações devido à abertura de portas são consideradas inevitáveis. Além disso, o efeito de variações devido à falha no equipamento deve ser acompanhado e ter seu impacto avaliado no estudo de estabilidade (ANVISA, 2012).

Segundo a RDC nº 45 (2012), os fabricantes do insumo farmacêutico ativo são os responsáveis pela realização do estudo de estabilidade, não sendo essa uma atividade da indústria farmacêutica. Porém, para o laboratório de controle de qualidade desta indústria é interessante a realização de um estudo de acompanhamento dos IFAs candidatos a padrão secundário, uma vez que eles são o critério de referência da maioria das análises do laboratório.

### 2.3.1 Estudo de estabilidade e a legislação brasileira

No Brasil, para atender aos novos requisitos de condições de estabilidade relativos à zona climática IV, a ANVISA publicou a RE nº1/2005 a qual regulamentou a realização dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos com a finalidade de prever, determinar ou acompanhar seu prazo de validade. A resolução em questão aplicou-se a todas as formas farmacêuticas, sejam elas sólidas, semissólidas, líquidas ou gasosas (ANVISA, 2005).

A preocupação da ANVISA com os estudos de estabilidade e a formação de produtos de degradação vem aumentando. Como resultado, observa-se a publicação da RDC nº 58 de 2013 que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares (ANVISA, 2013). A RDC nº 45 (2012) que trata desse assunto para insumos farmacêuticos ativos.

Embora o conceito do estudo de degradação forçada não seja novo para a indústria farmacêutica, o procedimento para sua realização não foi claramente definido pelas legislações vigentes nem pelo guia de estabilidade do ICH, assim como por nenhum outro órgão regulatório. Com isso, ainda existe muita divergência entre as empresas farmacêuticas com relação ao estudo de degradação, particularmente no que diz respeito às concentrações de agentes degradantes a serem utilizadas e ao tempo de exposição (ANVISA, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em agosto de 2014, publicou a Consulta Pública nº 68 com a proposta de um guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação com o objetivo de divulgar a opinião da ANVISA quanto à realização do perfil de degradação e quanto aos procedimentos para identificação e qualificação de produtos de degradação. Este guia tem a finalidade apenas de orientar e não modifica em nenhuma forma a aplicação ou a vigência de outras Resoluções (particularmente, da RDC nº 58 de 2013), mas sim divulga o entendimento da Agência com relação a este regulamento e qual a melhor forma de cumpri-lo.

As indústrias brasileiras, tanto farmacêuticas como farmoquímicas, ao seguirem a RE nº1 de 2005 ou a RDC nº 45 de 2012 (respectivamente), conduzem



os seus testes de estabilidade através da realização de três tipos de estudos: estudo de estabilidade acelerada, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade de acompanhamento.

Estudo de estabilidade acelerado é o estudo projetado para acelerar possíveis degradações químicas e/ou mudanças físicas de insumos farmacêuticos ativos em condições forçadas de armazenamento (ANVISA, 2012). Os dados assim obtidos podem ser usados para avaliar o impacto a curto prazo do transporte fora das condições ideais de armazenamento e prever possíveis degradações (ICH, 2014).

Este tipo de estudo vem demonstrando empiricamente e com grande probabilidade de acerto o que ocorreria no produto farmacêutico quando este fosse submetido a condições normais de armazenamento por longo período de tempo. Na grande maioria das vezes, o estudo de longa duração confirma o prognóstico dado pelo estudo acelerado (SILVA et al., 2009).

O estudo de estabilidade de longa duração é empregado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um insumo farmacêutico ativo e, opcionalmente, após a data de reteste ou o prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar estas datas e recomendar as condições de armazenamento (ANVISA, 2012).

Os testes referentes ao estudo de longa duração devem ser realizados em 0 (zero), 3 (três) e 6 (seis), 9 (nove), 12 (doze), 18 (dezoito) e 24 (vinte e quatro) meses para doseamento do insumo farmacêutico ativo, quantificação de produtos de degradação e, quando aplicável, a identificação de produtos de degradação (ANVISA, 2012).

O estudo de estabilidade de acompanhamento foi projetado para verificar se o produto mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de longa duração. O estudo de acompanhamento somente é realizado se o produto não sofrer nenhuma alteração após a conclusão do estudo de estabilidade de longa duração (ANVISA, 2005).

Para o IFA, os primeiros três lotes comerciais de produção devem ser colocados no programa de monitoramento da estabilidade para confirmar a data de reteste ou o prazo de validade. Nos anos seguintes, no mínimo um lote por ano de insumo farmacêutico produzido deve ser adicionado ao estudo de acompanhamento da estabilidade e testado para confirmar a estabilidade, exceto se nenhum lote tiver sido produzido naquele ano (ANVISA, 2012). O estudo de acompanhamento deve

incluir todos os testes do protocolo de estudo de estabilidade e no caso de ocorrer alteração significativa no insumo farmacêutico ativo deverá ser realizado novo estudo de estabilidade conforme preconizado nesta Resolução.

O protocolo do estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas, biológicas e microbiológicas, quando for o caso. Deve ser avaliada, também, a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação, utilizando-se metodologia adequada e validada. As impurezas de síntese que não são produtos de degradação não necessitam ser descritas no estudo de estabilidade, mas deve ser assegurado que elas não interfiram na identificação dos produtos de degradação (ANVISA, 2012).

### 2.3.2 Fatores que afetam a estabilidade de fármacos

#### 2.3.2.1 Temperatura

A temperatura é o mais importante dentre os fatores ambientais envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos uma vez que, na maioria dos casos, o aumento na temperatura afeta a estabilidade de um fármaco por meio do aumento da velocidade de reação (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

A degradação termolítica pode ser definida como a degradação causada por exposição a temperaturas elevadas o suficiente para induzir a ruptura de ligações químicas normalmente oriundas das reações de hidrólise/desidratação, isomerização/epimerização, descarboxilação, rearranjos e alguns tipos de reações de polimerização (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005). A maioria das reações ocorre mais rapidamente a temperaturas mais elevadas do que a temperaturas mais baixas (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

A influência da temperatura pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento seja ela a temperatura ambiente, sob refrigeração ou congelamento (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

### 2.3.2.2 pH

Depois da temperatura, o pH é a segunda variável mais importante que afeta a degradação do IFA e do medicamento. O efeito do pH na taxa de degradação pode ser explicado pelos efeitos catalíticos que os íons hidróxido podem ter em várias reações químicas (LACHMAN; DE LUCA; AKERS, 2001).

O pH é capaz de acelerar ou diminuir a velocidade de reações, pois as principais reações envolvidas na degradação de fármacos são a hidrólise e a oxidação e ambas podem ser catalisadas por ácidos e/ou bases. Além disso, para os medicamentos ionizáveis, a fração da droga presente em qualquer forma particular irá depender do pH da solução. Portanto, se a reatividade do fármaco depende da sua forma, a sua reatividade será dependente do pH (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

### 2.3.2.3 Umidade

A umidade é outro fator ambiental que exerce grande influência na estabilidade de produtos farmacêuticos. Não só os fármacos higroscópicos são sensivelmente degradados pela umidade relativa do ar, mas também fármacos não higroscópicos sofrem fenômenos de alteração, principalmente quando a umidade é associada aos efeitos de temperatura. A umidade pode promover reações de hidrólise e afetar a cinética de degradação de fármacos (LEITE, 2005).

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação, que podem ocorrer por duas vias. Primeiramente, a água pode participar do processo de degradação química por si só, como um reagente, induzindo a hidrólise, hidratação, isomerização ou outras reações químicas bimoleculares. Nestes casos, a velocidade de degradação é diretamente proporcional à concentração da água, do íon hidrônio ou hidróxido. De outra forma, a água também pode ser adsorvida na superfície do produto e formar uma camada de hidratação na qual a substância pode ser dissolvida e/ou degradada. A adsorção da água na superfície do produto farmacêutico pode alterar o seu estado físico e,

consequentemente, afetar sua reatividade exercendo, desta forma, influência indireta na degradação do produto (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Muitos fármacos e medicamentos são considerados como instáveis em meios úmidos e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas (SILVA et al. 2009). Segundo Pombal, Barata e Oliveira (2010) trabalhar num ambiente seco e adicionar um absorvente de umidade à embalagem pode diminuir os efeitos da umidade.

#### 2.3.2.4 Luz

As reações de decomposição de fármacos podem ser desencadeadas através de radiação luminosa que funciona como energia de ativação (LACHMAN; DE LUCA; AKERS, 2001). Porém, existem moléculas que não absorvem significativamente a luz ambiente (solar ou artificial), mas são sensíveis a radiações com menores comprimentos de onda (MOORE, 2006).

A absorção de radiações ocorre na zona do visível e ultravioleta, e fornece a energia necessária para desencadear reações de degradação tais como oxidação e redução, rearranjo de anéis, polimerização, rupturas de ligações, isomerizações e racemizações, promovendo a instabilidade farmacêutica (MURAKAMI et al., 2009).

Atualmente, o estudo de fotoestabilidade é um importante mecanismo de verificação de estabilidade de drogas e fármacos, visto que a radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, promovendo a degradação da molécula (SILVA et al., 2009).

Produtos farmacêuticos podem ser adequadamente protegidos da decomposição induzida pela luz com o uso de recipientes de vidro colorido e estocagem no escuro. Vidros de cor âmbar filtram luzes de comprimento de onda menores do que 470nm e oferecem considerável proteção aos compostos sensíveis à luz ultravioleta (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

### 2.3.2.5 Reações de Hidrólise

A hidrólise é uma das reações de degradação mais comumente observada em produtos farmacêuticos, pois muitos fármacos possuem em sua estrutura grupamentos funcionais como ésteres, amidas, amidas substituídas, lactonas e lactamas que são suscetíveis à hidrólise. Esta alteração pode ocorrer em meio aquoso ou por ação da umidade e quando ocorre hidrólise de um fármaco, verifica-se a diminuição do princípio ativo e o aumento dos produtos de degradação (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

### 2.3.2.6 Reações de Oxidação

Os mecanismos de oxidação dependem da estrutura química da substância e da presença de espécies reativas de oxigênio ou de outros oxidantes como, por exemplo, os metais pesados com duas ou mais valências que são bons catalisadores de oxidação (LACHMAN; DE LUCA; AKERS, 2001).

A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações farmacêuticas são reações em cadeia que procedem bem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação, sendo iniciada via radical (SILVA et al., 2009).

A estabilização de drogas contra oxidação envolve a observação de um número de precauções durante a manufatura e estocagem. O oxigênio em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono; contato da droga com íons de metais pesados, que catalisam oxidação, deve ser evitado e a estocagem deve ser a temperaturas reduzidas (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

### 2.3.2.7 Reações de Fotólise

A primeira lei da fotoquímica afirma que “apenas a radiação que é absorvida por uma molécula pode efetivamente produzir mudanças químicas nela” (ANDERSON; BYARD, 2004). Isso significa que as taxas de fotodegradação são diretamente dependentes da quantidade de radiação incidente e da quantidade de radiação que é absorvida pelo fármaco ou pela formulação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

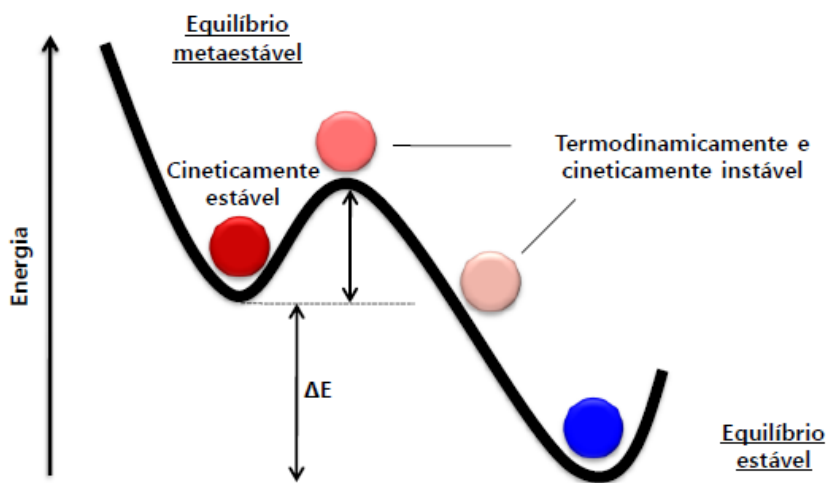
A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética. A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo à degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade dos fármacos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes últimos (SILVA et al., 2009).

### 2.3.2.8 Polimorfismo

Cada estado cristalino possui diferentes níveis de energia livre e de reatividade química o que influencia diversamente na estabilidade química dos polimorfos dos fármacos. Fármacos no estado cristalino, por se encontrarem em um nível mais baixo de energia livre, são menos reativos que os fármacos amorfos que possuem nível de energia mais elevado (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Para valores de temperatura e umidade definidos, apenas uma das formas polimórficas de um fármaco é estável, tanto cineticamente como termodinamicamente. As outras formas denominadas de metastáveis que são cineticamente estáveis, porém termodinamicamente instáveis, podem mudar de fase com o ganho de energia como, por exemplo, com o aumento da temperatura (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Figura 11: Estabilidade Física de Polimorfos.



FONTE: PRADO, 2014

### 2.3.3 Técnicas analíticas utilizadas no estudo de estabilidade

De acordo com a literatura são encontrados estudos empregando técnicas titulométricas, espectrofotométricas e cromatográficas para avaliação da estabilidade dos princípios ativos e produtos farmacêuticos (BAKSHI; SINGH, 2002).

A vantagem da utilização das técnicas analíticas titulométricas e espectrofotométricas é o baixo custo e simplicidade de execução. Entretanto, devido à sua limitação quanto à sensibilidade e principalmente especificidade, praticamente não existe relatos do seu uso para análise de estabilidade de produtos (FORSYTH; IP, 1994).

A CLAE, utilizando colunas de fase reversa, é a técnica mais empregada para se desenvolver metodologias analíticas indicativas de estabilidade, pois permite a separação de substâncias químicas com uma ampla faixa de polaridade (DOLAN, 2002). Devido à própria exigência no que diz respeito à separação de múltiplos componentes durante as análises de amostras em estudo de estabilidade, os métodos cromatográficos tornaram-se preferíveis dentre os demais métodos convencionais de análise, pois permitem a quantificação da perda do composto de origem e aparecimento de produtos de degradação (MURPHY; RABEL, 2008). Além de terem maior seletividade, os métodos cromatográficos possuem maior precisão,

exatidão e sensibilidade tornando possível a detecção de pequenas quantidades de produtos de degradação (BAKSHI; SINGH, 2002).

Os detectores de ultravioleta (UV) são bastante utilizados para o desenvolvimento dos métodos indicativos de estabilidade. Além disso, existe também a possibilidade do uso dos detectores de UV com arranjo de diodos, que permitem adquirir um espectro no UV para cada componente em separado permitindo obter informações sobre a pureza espectrofotométrica que, por sua vez, possibilita avaliar a coeluição de dois ou mais componentes no cromatograma (DOLAN, 2002).

Existem ainda as técnicas analíticas combinadas como a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (CLAE-EM) ou com a ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN) (LOVDAHL; PRIEBE, 2000).

A técnica de CLAE-EM combina a capacidade de resolução e separação da CLAE com a sensibilidade não restrita da espectrometria de massas. A fonte de ionização por *eletrospray* fornece um processo de ionização suave e, portanto, a probabilidade de não ocorrerem fragmentações da molécula original é maior. Desta maneira essa técnica constitui uma ferramenta analítica bem estabelecida para a uma rápida identificação e caracterização de cada componente presente na amostra (FENG et al., 2001).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) fornece uma elucidação a nível molecular dos compostos presentes em uma amostra complexa, incluindo os seguintes tipos de análises: teor, configuracional, pureza e estereoquímica. Com o advento da técnica de CLAE-RMN, que permitiu a análise direta das frações separadas pelo cromatógrafo, os limites de detecção foram reduzidos para menos de um micrograma de material, resolvendo desta forma as limitações quanto à sensibilidade. À medida que a técnica de CLAE-RMN se tornar comercialmente viável, as indústrias farmacêuticas começarão a utilizá-la com maior frequência (PENG, 2000).

A abordagem tradicional de estudos de estabilidade envolve a preparação de numerosa quantidade de amostras que são armazenados em condições de temperatura e/ou umidade determinada no estudo. Em geral, esta abordagem para avaliar a estabilidade de um composto é muito trabalhosa e demorada, além de necessitar de quantidades relativamente grandes da substância (MURPHY; RABEL, 2008).



### 2.3.4 Estabilidade de Soluções

Para gerar resultados reproduzíveis e confiáveis durante o estudo de estabilidade, a estabilidade de soluções de amostras e padrões deve ser determinada. Frequentemente, em equipamentos automatizados, as corridas cromatográficas são realizadas durante a noite para melhor aproveitamento do funcionamento do laboratório. Esta prática requer maior estabilidade das soluções (RIBANI et al., 2004).

Um dos critérios de estabilidade para os métodos de ensaio é que as soluções padrão e amostras sejam estáveis durante 24 horas sob condições de armazenamento definidas. Como a diminuição da temperatura é um dos fatores que podem melhorar a estabilidade, se a solução não é estável à temperatura ambiente, pode-se testar o armazenamento em geladeira a uma temperatura de 2 a 8°C (SHABIR, 2003). Segundo essa mesma fonte, os resultados do estudo de estabilidade de soluções são determinados por comparação com as respostas de soluções preparadas no dia da análise, sendo aceitável uma variação de até  $\pm 2,0\%$  (SHABIR, 2003).

## **2.4 Padrão de Referência**

Os padrões analíticos podem ser usados quantitativamente (em determinação do teor e em testes limites), qualitativamente (em testes de identificação e em de adequação do sistema cromatográfico) ou ser usados em métodos específicos (em verificação de desempenho como no caso da calibração do equipamento de ponto de fusão) (USP, 2013a).

De acordo com a RDC nº 17 de 2010, padrões de referência são exemplares de fármacos, impurezas, produtos de degradação, reagentes, dentre outros, altamente caracterizados e de mais elevada pureza, cujo valor é aceito sem referência a outros padrões. O conteúdo de um padrão primário é determinado por intermédio de uma extensa série de análises físico-químicas e completa caracterização do candidato (STOEF et al., 2011).

Ainda de acordo com a norma da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), devem ser utilizados padrões de referência oficiais, sempre que existirem. Na ausência desses, devem ser utilizados padrões de referência devidamente caracterizados. Um padrão de referência não adquirido de uma farmacopeia reconhecida deve ser do mais elevado grau de pureza possível e cuidadosamente caracterizado, a fim de garantir sua identidade, seu teor, qualidade, pureza e potência (ANVISA, 2010).

Os procedimentos analíticos utilizados para caracterizar um padrão de referência não se devem basear apenas em testes de comparação a um padrão de referência anteriormente caracterizado. Esses procedimentos devem ser qualitativamente e quantitativamente mais extensos do que os utilizados para controlar a identidade, teor, qualidade, pureza e potência do fármaco ou medicamento (ANVISA, 2010). Em contrapartida, a intensidade de caracterização e análises realizadas para obtenção do padrão secundário é menor se comparada com a obtenção de um padrão de referência primário (STOEF et al., 2011).

O padrão secundário, ou padrão de trabalho, é estabelecido por uma comparação com um padrão de referência farmacopeico, por meio de ensaios presentes nas farmacopeias ou métodos devidamente validados e registrados pelo próprio laboratório que o irá utilizar (Farmacopeia Brasileira, 2010c). Segundo a ANVISA, devem existir evidências documentais de que o lote do padrão de trabalho foi avaliado antes do uso por meio da comparação deste contra um padrão de referência oficial (ou de referência, na ausência do oficial) e que ele é requalificado em uma periodicidade definida, de acordo com um protocolo escrito (ANVISA, 2010).

Na padronização, é importante estabelecer qual será o uso do padrão secundário como material de referência. Desta forma, dependendo do seu uso, serão definidos os procedimentos para caracterização e qualificação do candidato. Por exemplo, padrões utilizados na quantificação passam por testes mais exaustivos do que padrões utilizados em análises semi-quantitativas ou qualitativas (MATHKAR et al., 2009).

Tradicionalmente, as técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), em conjunto com outras técnicas analíticas (como por exemplo, resíduo de ignição, perda por secagem e/ou titulação de Karl Fischer) são usadas para determinar o teor e a pureza de um lote específico de um composto com a finalidade de se classificar

como um padrão de referência. A pureza atribuída ao padrão de referência para uma ampla variedade de compostos pode também ser verificada utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial. Porém, ainda discute-se a utilização do DSC como uma alternativa complementar para verificar a pureza de um composto, como parte do processo de certificação do padrão de referência farmacêutica (MATHKAR et al., 2009).

A determinação do teor é o parâmetro mais importante nos padrões de referência utilizados para análises quantitativas. A análise por CLAE, quando devidamente validada, apresenta seletividade suficiente para obtenção de uma boa exatidão. Segundo GÖRÖG (2008), o desvio padrão relativo (DPR) de uma análise típica de CLAE é de 0,5 a 1%. Uma forma de melhorar a precisão das análises cromatográficas está em aumentar o número de amostras a serem analisadas (HOFER et al., 2007). A repetição das análises em dias diferentes também é útil para aumentar a confiabilidade dos resultados (SOARES, 2001).

Os valores expressos podem estar em matéria ativa, ou tal qual, onde não é desconsiderada a presença de umidade. Padrões expressos em matéria ativa são preferenciais, pois dispensam qualquer tratamento prévio à sua utilização. No entanto, é preciso verificar se os valores de umidade continuam constantes durante o período de utilização. Padrões higroscópicos devem ser dessecados antes da sua utilização, e no caso de a substância ser instável a temperaturas altas, deve-se fazer a correção do teor em base anidra após determinação da umidade (perda por dessecação ou teor de água) (USP, 2013a).

A determinação de impurezas é útil na verificação da qualidade da substância candidata à padronização, pois traz informações quanto à presença de outras substâncias orgânicas além do composto de interesse e, principalmente, a respeito da estabilidade durante o armazenamento (STOEF et al., 2011).

Porém, em muitos casos, as impurezas cromatográficas são desconhecidas, ou os padrões não estão disponíveis; assim, as impurezas são determinadas assumindo que essas possuem os mesmos fatores resposta que o componente principal (WILLIAMS, 2006).

No caso dos testes de substâncias relacionadas, quando não houver o padrão da impureza, pode-se usar o tempo de retenção relativo no cromatograma e o fator resposta, previamente validado no método analítico, para quantificar as impurezas encontradas (USP, 2013a).

No processo de avaliação da pureza de padrões de referência, o método baseado no princípio do equilíbrio de massa (método do balanço de massa) é normalmente empregado para quantificar todas as impurezas, incluindo umidade e cinzas, e a soma de todas as impurezas é subtraída de 100% (MA et al., 2009).

O DSC com base no princípio da termodinâmica também pode determinar o teor absoluto de impurezas totais numa amostra. A determinação da pureza por DSC tem as vantagens como: praticidade, velocidade, reprodutibilidade, não necessidade de uso de padrão de referência e utilização de pequena quantidade de amostra (GAO; DING; HU, 2011).

A determinação do ponto de fusão utilizando métodos calorimétricos vem sendo bastante empregado como método de avaliação do grau de pureza de fármacos. Através da técnica de DSC pode-se determinar a faixa de fusão de uma substância e, baseando-se na equação de van't Hoff é possível determinar a fração molar de impurezas contidas neste material (RODRIGUES et al., 2005).

O método de DSC para a determinação de pureza aplica-se a amostras com elevado grau de pureza (> 98%), porém segundo Gao, Ding e HU (2011) relatórios sobre a incerteza da determinação da pureza por DSC ainda são escassos, especialmente na padronização das substâncias de referências, pois a técnica poderia complementar o balanço de massa (GAO; DING; HU, 2011). O método de balanço de massa é geralmente considerado como o mais correto e é recomendado pela Organização Mundial de Saúde, pela Farmacopeia Europeia e pela Farmacopeia Internacional para a determinação do teor de padrões de referência (MA et al., 2009).

Produtos de degradação reais e potenciais devem ser isolados e identificados durante o desenvolvimento do padrão de referência. Tipicamente, as impurezas orgânicas são identificadas e confirmadas utilizando espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida; ressonância magnética nuclear (RMN) é utilizada para identificação e quantificação de impurezas orgânicas e solventes residuais; plasma indutivamente acoplado à espectrometria de massa é usado para as impurezas inorgânicas; e cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa é usada para os solventes residuais (BROWNE, 2009).

Os padrões previstos pela USP, em geral, não estão certificados para o controle do polimorfismo, exceto para aqueles princípios ativos para os quais é

solicitada a difração de raios X, como a ranitidina e a carbamazepina (CAPUCHO; MASTROIANNI; CUFFINI, 2008).

A determinação de padrão secundário pode incluir um conjunto reduzido de análises, dependendo dos resultados iniciais da matéria-prima de origem. Recomenda-se que algumas medidas sejam adotadas durante o estudo de estabilidade para evitar sua interrupção como, por exemplo, o uso de pelo menos duas condições de armazenamento. Além disso, o período de requalificação pode ser de 3, 6 e 12 meses para o primeiro ano e depois anualmente. Se o lote for provado estável durante pelo menos um ano, em seguida, os lotes posteriores exigirão requalificação apenas anual (BROWNE, 2009).

Os órgãos farmacopeicos possuem uma abordagem singular a respeito da validade dos padrões primários; como regra, a validade dos padrões é determinada apenas após a disponibilização de um novo lote aprovado. Isto significa que os padrões anteriores precisam ser substituídos pelo novo lote vigente (STOEF et al., 2011). Os padrões de referência da USP são considerados adequados para o uso em até um ano depois do novo lote liberado (BROWNE, 2009).

Os autores também questionam o prazo curto para substituição dos padrões após a introdução de um novo lote pelas farmacopeias. Uma forma de avaliar a estabilidade é por intermédio de retestes durante o período de utilização do padrão (WHO, 1999). Geralmente, os fatores avaliados vão depender das características da substância, como higroscopicidade, estabilidade e armazenamento (COUNCIL OF EUROPE, 2008).

Não há uma regra para se estabelecer os limites de aceitação entre os resultados obtidos no reteste com o valor declarado na padronização (WHO, 1999); no entanto, Williams, em seu artigo de 2006, sugere que o padrão seja substituído, ou repadronizado caso haja alteração de 0,5% de conteúdo para substâncias com pureza superior a 98%, ou 1% para substâncias com pureza inferior a 98% (STOEF et al., 2011).

Em todos os cenários da pesquisa, um protocolo é necessário para delinear o material de referência – padrão, lote, condições de armazenamento, frequência de teste, critérios de procedimentos analíticos, critérios de aceitação e elaboração de relatórios (BROWNE, 2009).

Até pouco tempo, a única opção para aquisição das substâncias químicas de referências era comprá-las, quando disponíveis, no mercado internacional ou em

representantes locais a um alto custo, sem considerar a demora do processo de importação, o que dificultava sua aquisição. Os mais prejudicados por este cenário eram, principalmente, o setor público, os laboratórios nacionais e os de pequeno porte (ANVISA, 2013).

No Brasil, atualmente, a compra de padrões de referência de impurezas das substâncias farmacêuticas é restrita, uma vez que, só algumas farmacopeias (Americana, Europeia, Internacional) disponibilizam essas substâncias a preços elevados e em pequena quantidade (RIBEIRO et al., 2006).

Em setembro de 2001, o Brasil começou a trilhar o caminho da autossuficiência em SQR certificadas, disponibilizando as primeiras substâncias de referência ao mercado nacional. Existem hoje 78 substâncias químicas de referência certificadas pela Farmacopeia Brasileira, muito longe do esperado para suprir as necessidades da indústria farmacêutica e dos órgãos oficiais e privados de controle de qualidade de fármacos e medicamentos (ANVISA, 2013).

Atualmente, essas substâncias já estão disponíveis para atender a demanda nacional e são distribuídas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que é o único órgão oficial responsável pelo seu fornecimento, a um custo acessível, facilitando o acesso na aquisição dessas substâncias, conseqüentemente, gerando menos dependência externa do país (ANVISA, 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

A escolha da matéria-prima efavirenz como base para este estudo é fundamentada na importância da sua produção para atendimento ao programa DST/AIDS que visa atender a toda população brasileira necessitada. Farmanguinhos é o único laboratório público nacional que produz este medicamento, que é um dos produtos mais importantes do seu portfólio.

Como já mencionado, os padrões de referência, além do alto custo, são disponibilizados em poucas quantidades, o que justifica o uso de padrões secundários na análise de rotina. Porém, a padronização dessas substâncias de acordo com a RDC nº17/2010 é de responsabilidade do próprio laboratório de controle de qualidade da indústria farmacêutica. Sendo assim, é importante um estudo mais aprofundado dessa metodologia frente às condições de armazenamento para posterior determinação do prazo de validade desses padrões secundários.

Sabe-se que o processo de compras de uma empresa pública é bastante difícil e demorado. A Lei de Licitações e Contratos (8.666/1993), formulada para todos os tipos de aquisições e serviços na área pública, acaba por impedir que processos administrativos sejam mais rápidos.

No caso de Farmanguinhos, que sua produção é voltada para atendimento dos programas estratégicos do Governo Federal, a demora nos processos aquisitórios impacta diretamente o provimento dos medicamentos para o Sistema Único de Saúde, além de impactar as demandas emergenciais do Ministério da Saúde no Brasil e no exterior.

Como a maioria dos padrões é adquirida por importação, este processo torna-se ainda mais dispendioso em relação a custo e tempo de recebimento. O estudo de estabilidade do IFA irá viabilizar o uso do padrão secundário por um tempo determinado facilitando todo o planejamento de compras além aplicação dessa metodologia para as outras matérias-primas utilizadas no laboratório.

Como a legislação permite o uso de padrões secundários, sua utilização para Farmanguinhos é vantajosa, pois no caso de demora no processo de compras ou ausência de padrão primário, o laboratório de controle de qualidade não terá suas

atividades impactadas uma vez que se tem um padrão secundário padronizado, caracterizado e com sua estabilidade avaliada.

O estudo de estabilidade das soluções irá ajudar na rotina do laboratório, uma vez que sendo definido o tempo de uso da solução pode-se fazer um melhor planejamento de análises.

Por fim, esse estudo poderá servir como base para os demais IFAs do portfólio de Farmanguinhos, podendo gerar um protocolo de avaliação da estabilidade de substâncias candidatas a padrão.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

O estudo tem como objetivo avaliar a estabilidade de diferentes lotes das matérias-primas candidatas a padrão secundário dos três fabricantes de efavirenz de Farmanguinhos, através do monitoramento de seus teores de ativo e substâncias relacionadas.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar os IFAs, candidatos a padrão secundário, dos três fabricantes de Farmanguinhos frente às suas propriedades físico-químicas.
- Realizar o estudo de estabilidade de longa duração das matérias-primas nos tempos de 0, 1, 3, 6, 9 e 12 meses, avaliando o teor do ativo e as substâncias relacionadas.
- Verificar melhor condição de armazenamento da matéria-prima candidata a padrão secundário: dessecador com sílica ou geladeira.
- Confrontar os resultados dos três fabricantes para determinar o melhor IFA para padrão secundário.
- Realizar o estudo de estabilidade do efavirenz em solução para soluções-mãe de teor e de substâncias relacionadas.
- Avaliar se a lógica utilizada para as análises realizadas gera resultados confiáveis e que possa ser aplicada na avaliação da estabilidade dos outros padrões secundários do portfólio de Farmanguinhos.

## 5 METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade de Farmanguinhos. Foram analisadas as matérias-primas de três fabricantes qualificados de efavirenz (A, B e C), sendo três lotes de cada, conforme quadro 2.

Quadro 2: Divisão de lotes por fabricantes.

	<b>Fabricante A</b>	<b>Fabricante B</b>	<b>Fabricante C</b>
<b>Lotes</b>	1, 2 e 3	4, 5 e 6	7, 8 e 9

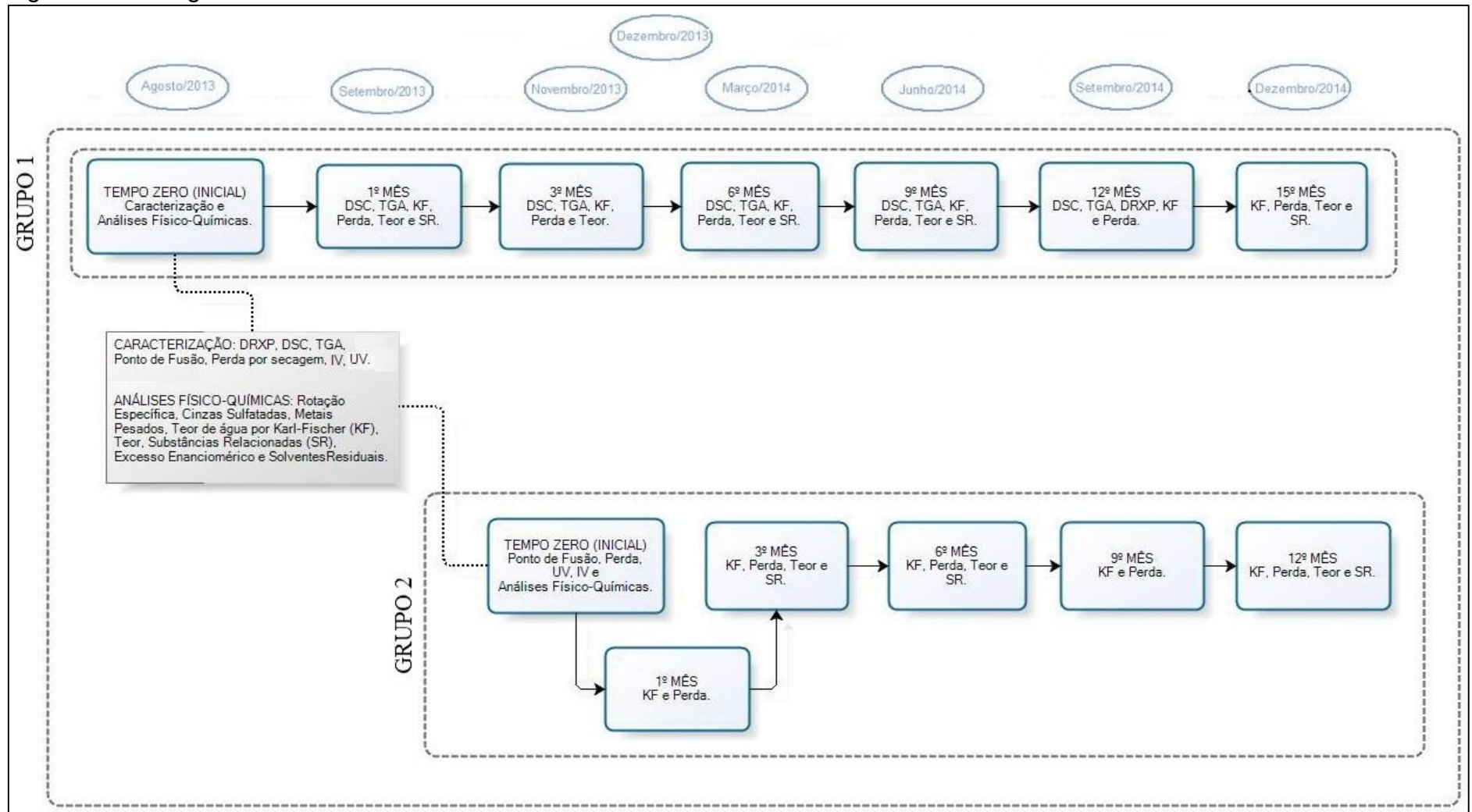
O trabalho inicialmente seria realizado somente com três lotes, um de cada fabricante; porém, no terceiro mês de análise, foi verificada a necessidade de realizar o estudo com mais seis lotes para completar três lotes por fabricante e garantir maior robustez nos resultados. Com isso, as análises foram divididas em dois grandes grupos, o primeiro grupo composto pelas amostras A – 1, B – 4 e C – 7, e o segundo pelas amostras A – 2, A – 3, B – 5, B – 6, C – 8 e C – 9.

Foram realizadas análises físico-químicas baseadas na monografia adotada pelo laboratório que, para esse IFA, é a da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010a). Tais análises foram: ponto de fusão, rotação específica, cinzas sulfatadas, metais pesados, perda por secagem, teor de água por titulação de Karl Fischer e as análises cromatográficas compostas pelos testes de teor, substâncias relacionadas, excesso enantiomérico e solventes residuais.

As análises de difração de raios X de pó, calorimetria diferencial exploratória e termogravimetria seguiram as metodologias desenvolvidas pelo Laboratório de Estudo do Estado Sólido (LEES) de Farmanguinhos.

As amostras foram avaliadas ao longo do tempo de um ano para verificação da estabilidade do ativo e determinação da validade do padrão. Paralelamente ao estudo de estabilidade foi avaliada a melhor condição de armazenamento do padrão, sendo as amostras acondicionadas em dessecador contendo sílica a uma temperatura de 18 a 25°C e em geladeira à temperatura de 2 a 8°C, e umidade máxima de 75%. Os tempos em que foram realizados os testes foram: inicial, 1, 3, 6, 9, 12, 15 meses.

Figura 12: Fluxograma das análises realizadas.



LEGENDA: DRXP – Difração de raios X de pó / DSC – Calorimetria exploratória diferencial / TGA – Termogravimetria / IV – Infravermelho / UV – Ultravioleta.

Após a análise no tempo inicial, os testes de identificação foram excluídos por serem testes complementares. Os testes como cinzas sulfatadas, metais pesados e solventes residuais não foram realizados nos tempos restantes visto que não são indicativos de degradação do insumo.

Devido à quantidade de amostras e ao grande volume de análises que o LEES tinha para realizar, todas as análises solicitadas a eles só foram realizadas nas amostras do primeiro grupo, ou seja, em um lote de cada fabricante. São eles: A – 1, B – 4 e C – 7.

A validade das matérias-primas candidatas a padrão secundário foram determinadas diante da avaliação dos resultados obtidos durante o período de um ano, em comparação com a especificação de teor da monografia (98 a 102%), análise dos desvios encontrados e análise das impurezas. Foi seguido o critério mencionado por Stoef e colaboradores (2011), em cujo trabalho é sugerido que o padrão seja substituído, ou repadronizado, caso haja alteração de 0,5% de conteúdo para substâncias com pureza superior a 98%.

O estudo de estabilidade das soluções-padrão, tanto de teor como de substâncias relacionadas, foi realizado diariamente ao longo de uma semana. As soluções-mãe foram preparadas de acordo com a monografia da Farmacopéia Brasileira (2010) e armazenadas em balões volumétricos de vidro âmbar mantidos em geladeira (2 a 8°C). Diariamente, antes de cada ensaio, as soluções foram retiradas do refrigerador para o equilíbrio da temperatura, e em seguida, as amostras foram diluídas para serem injetadas no CLAE. A solução diluída inicial também foi armazenada em geladeira e diariamente avaliada.

Todas as amostras foram injetadas em triplicata e as diferenças percentuais entre as áreas médias obtidas foram avaliadas e o limite de  $\pm 2\%$  foi adotado a partir do procedimento de validação de métodos analíticos do laboratório de controle de qualidade de Farmanguinhos.

## 5.1 Materiais

- *Padrões:* Efavirenz USP (Cat.#1234103 – Lote: FOG376 – Validade: 07/2014 e Lote: G0L369 – Lote corrente) e Efavirenz Racêmico USP (Cat.#1234114 - Lote: FOG381 – Validade: 07/2014).

- *Reagentes e soluções:* acetonitrila grau UV/CLAE, ácido acético 1M, ácido clorídrico 6M, ácido ortofosfórico P.A., ácido sulfúrico P.A., ácido trifluoracético, cicloexano grau UV/CLAE, dimetilformamida UV/CLAE, etanol grau UV/CLAE, heptano grau UV/CLAE, hexano grau UV/CLAE, hidróxido de amônio 6M, isopropanol grau UV/CLAE, metanol grau UV/CLAE, solução de Karl Fischer, solução padrão de acetato de chumbo (10ppm de Pb), tampão acetato pH 3,5, tioacetamida, t-butil-etil-éter (ETBE) grau UV/CLAE, t-butil-metil-éter (MTBE) grau UV/CLAE, tolueno grau UV/CLAE.

- *Vidrarías e acessórios:*

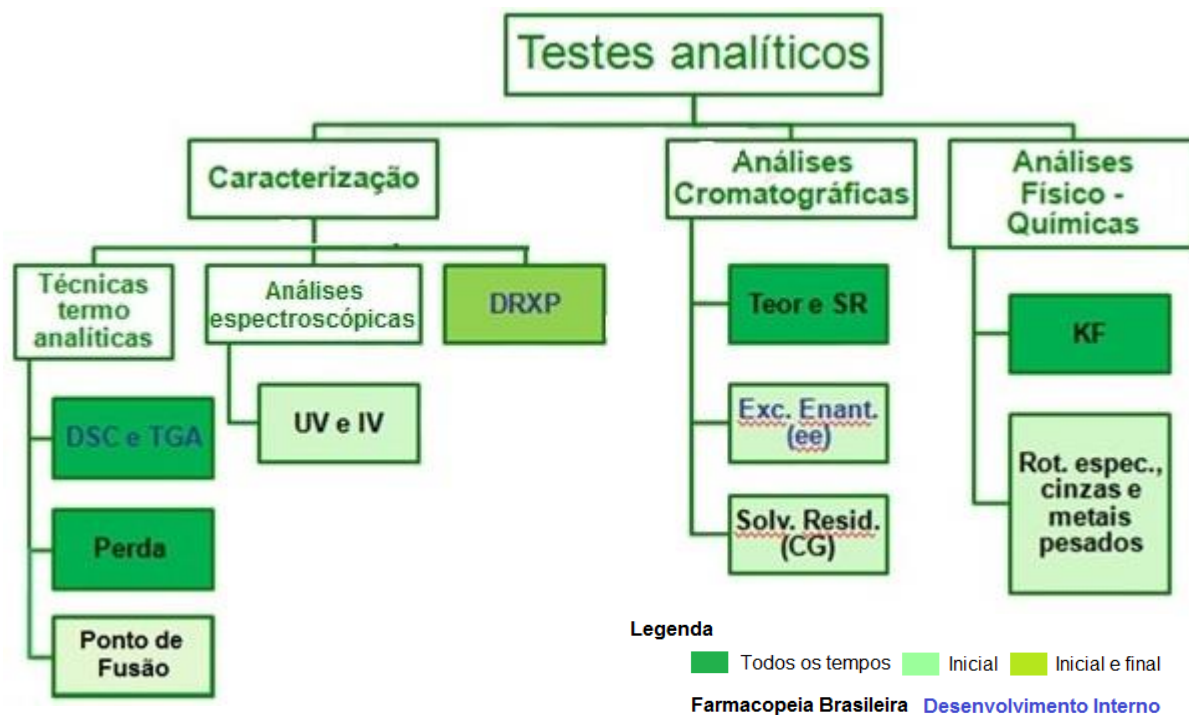
- Balões volumétricos calibrados de 20, 50, 100 e 200mL.
- Bécher de vidro.
- Bico de Bunsen.
- Cadinho de alumínio com tampa de alumínio furada.
- Cadinho de alumínio com tampa de alumínio lacrada.
- Cadinho de platina.
- Capilar aberto para ponto de fusão.
- Membrana filtrante de celulose regenerada de 0,45µm.
- Pesa-filtro.
- Pipetas volumétricas calibradas de 1, 5 e 10mL.
- Proveta volumétrica de 1000 mL.
- Tubo de Nessler.
- *Vials.*

## 5.2 Equipamentos

- Analisador termogravimétrico da marca Mettler Toledo – Modelo: 851<sup>e</sup>.
- Balança analítica Sartorius – Modelo: ME 235S.
- Calorímetro exploratório diferencial Mettler Toledo – Modelo: 822<sup>e</sup>.
- Cromatógrafo a gás Agilent – Modelo: 7890A.
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu com 2 bombas LC-10AD, degaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e detector por arranjo de diodos SPD-M10AVP. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. A aquisição de dados e controle foi realizada pelo *software* Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2.
- Cromatógrafo a líquido VWR Hitachi - LaChrom Elite, composto por uma bomba L-2130, injetor automático L-2200, forno de colunas L-2300 e detector por arranjo de diodos L-2450. A aquisição de dados e controle foi realizada pelo *software* EZChrom Elite Version 3.1.7.
- Difratorômetro Bruker - Modelo: D8-Advance.
- Estufa a vácuo VWR Brand - Modelo: 1400E.
- Espectrofotômetro UV-Vis Varian – Modelo: Carry 50.
- Espectrômetro Infravermelho FTNIR PerkinElmer – Modelo: 70866.
- Titulador Karl Fischer Titrino Methrom – Modelo: 784 KFP.
- Mufla Fornitec – Modelo: 4016.
- Polarímetro Schmidt + Haensch – Modelo: Polartronic E.
- Ponto de fusão Büchi *Melting Point* – Modelo: B 545.
- Potenciômetro Metrohm – Modelo: 780.
- Refrigerador Brastemp – Modelo: BRM 35-350.
- Termoigrômetro digital Alla Brasil – Modelo: 910.15 CHP.

### 5.3 Métodos

Figura 13: Fluxograma dos testes analíticos realizados.



#### 5.3.1 Caracterização

##### 5.3.1.1 Determinação da estrutura por difração de raios X de pó

As análises de DRXP foram realizadas no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense. Os padrões de difração foram obtidos em um difratômetro, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda$  para  $\text{K}\alpha_1 = 1.54060 \text{ \AA}$ ;  $\lambda$  para  $\text{K}\alpha_2 = 1.54438 \text{ \AA}$ ), tensão de 40kV e corrente de 40mA, com velocidade de varredura de  $0,2^\circ/\text{segundo}$  no intervalo  $2\theta$  de  $3-50^\circ$ .

### 5.3.1.2 Técnicas termoanalíticas (Ponto de fusão, DSC, TGA e Perda por secagem)

O ponto de fusão do efavirenz foi determinado no equipamento Büchi *Melting Point*, com taxa de aquecimento de 5,0°C/minuto.

Para obtenção das curvas de DSC, as amostras foram cuidadosamente pesadas em cadinhos de alumínio com tampa de alumínio lacrada. Todos os experimentos foram realizados em duplicata em um calorímetro exploratório diferencial, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 80mL/minuto, e razão de aquecimento de 10K/minuto, no intervalo de temperatura de 25 a 210°C. As amostras referentes ao 12º mês foram analisadas utilizando a razão de aquecimento de 5K/minuto.

Para obtenção das curvas de TGA, cerca de 10mg das amostras foram pesadas em cadinhos de alumínio com tampas de alumínio furadas no momento do experimento pelo amostrador automático do equipamento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata em um analisador termogravimétrico, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50mL/minuto, e razão de aquecimento de 10K/minuto, no intervalo de temperatura de 25 a 300°C.

Para análise de perda por secagem foram pesados 2g de amostra e transferidos para pesa-filtro previamente tarado e pesado. A amostra foi seca em estufa a uma temperatura de 60°C, sob pressão reduzida, por 3 horas. O percentual de perda foi determinado a partir das diferenças de massas antes e após o teste e não deverá ser maior que 1,0%.

### 5.3.1.3 Técnicas espectroscópicas (Ultravioleta e Infravermelho)

As análises espectroscópicas foram realizadas segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010a). Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 200nm a 350nm e os comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorção foram determinados. As concentrações das soluções padrão e amostra foram de 0,01mg/mL, diluídas em metanol.



Para as análises no infravermelho foi feita uma varredura na região do infravermelho médio ( $4000\text{cm}^{-1}$  a  $600\text{cm}^{-1}$ ) e em seguida a comparação do espectro obtido da amostra com o espectro do padrão, ambos realizados nas mesmas condições. As posições das bandas nos espectros foram apresentadas em número de ondas ( $\nu$ ) cuja unidade é o centímetro inverso ( $\text{cm}^{-1}$ ) e as intensidades das bandas estão expressas como transmitância (T).

### 5.3.2 Análises Cromatográficas

#### 5.3.2.1 Teor e Substâncias Relacionadas

A monografia da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010a) para efavirenz matéria-prima descreve os testes de teor e de substâncias relacionadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Todas as soluções preparadas (padrão, amostra e fase móvel) foram filtradas com auxílio de unidade filtrante de celulose regenerada  $0,45\mu\text{m}$ . A solução padrão foi injetada em sextuplicata, enquanto cada solução amostra foi injetada em triplicata.

Para a análise de teor foram preparadas solução padrão e amostra com uma concentração final de  $0,02\text{mg/mL}$ . Para isso, foram pesados aproximadamente  $40\text{mg}$  de padrão e de amostra, esta última foi pesada em duplicata, que foram diluídas em fase móvel.

Os parâmetros cromatográficos para análise de teor estão descritos no quadro 3 (página 74).

Quadro 3: Parâmetros cromatográficos para o teste de teor (Farmacopeia Brasileira, 2010a).

Equipamento	Cromatógrafo a líquido
Coluna	Spherisorb ODS-1 – C18 – 25cm x 4,0mm – 5µm (Waters – PN: PSS845542)
Fase Móvel	Acetonitrila : água : ácido fosfórico (70:30:0,1)
Gradiente	Isocrático
Fluxo	1,0mL/minuto
Volume de injeção	20µL
Temperatura	25°C
Detector	UV / DAD
Comprimento de onda	252nm

Para análise de substâncias relacionadas foi preparada a solução amostra com concentração final de 0,5mg/mL. Foram pesados aproximadamente 250mg de amostra que foi dissolvida com acetonitrila : água (50:50).

O padrão foi preparado a uma concentração final de 0,00125mg/mL, tendo uma pesada de aproximadamente 25mg. A solução padrão foi preparada utilizando o mesmo diluente da amostra, conforme mencionado acima.

Os parâmetros cromatográficos para análise de substâncias relacionadas estão descritos no quadro 4 (página 75).

Quadro 4: Parâmetros cromatográficos para o teste de substâncias relacionadas (Farmacopeia Brasileira, 2010a).

Equipamento	Cromatógrafo a líquido
Coluna	Zorbax® SB-CN - 15cm x 4,6mm - 3,5µm (Phenomenex - P.N. 863953-905)
Fase Móvel	A – metanol : água : ácido trifluoracético (10:90:0,05) B – metanol : água : ácido trifluoracético (90:10:0,05)
Gradiente	0 a 16 minutos com 40-50%B; 16,1 a 23 minutos com 50-65%B; 23,1 a 28 minutos com 65-70%B; 28,1 a 29 minutos com 70-80%B; Manter 80%B até 31minutos; Retornar linearmente de 31,1 a 32 minutos a 40%B; Reequilibrar por mais 10 minutos até a próxima injeção.
Fluxo	1,5mL/minuto
Volume de injeção	35µL
Temperatura	30°C
Detector	UV / DAD
Comprimento de onda	250nm
Tempo de Retenção Relativo	0,93 trans-alqueno 1,0 efavirenz
Limite de aceitação de impurezas	Impureza trans-alqueno: máximo de 0,15% Total de outras impurezas: máximo 0,5%

*Cálculo de trans-alqueno:*

$$\frac{A_{imp} \times 1,1 \times P_P \times Pot}{A_{pdd} \quad P_A \quad 40}$$

*Cálculo de outras impurezas e impurezas totais, respectivamente:*

$$\frac{A_i \times P_P \times Pot}{A_{pdd} \quad P_A \quad 40} \quad \text{e} \quad \frac{\sum A_i \times P_P \times Pot}{A_{pdd} \quad P_A \quad 40}$$

Onde:

$A_{imp}$  = Área do trans-alqueno na solução amostra.

$A_{pdd}$  = Área do efavirenz no padrão diluído.

1,1 = Fator de quantificação para Impureza trans-alqueno.

$P_P$  = Peso do padrão em mg.

$P_A$  = Peso da amostra em mg.

Pot = Potência do padrão tal qual, em %.

$A_i$  = Área da impureza na solução amostra.

$\Sigma A_i$  = Somatório das áreas de todas as impurezas.

### 5.3.2.2 Excesso Enantiomérico

O teste de excesso enantiomérico foi realizado com base na metodologia desenvolvida e validada pelo Laboratório de Desenvolvimento e Validação Analítica.

Foram preparadas solução de adequação do sistema e solução amostra, ambas diluídas em acetonitrila : água (40:60) e posteriormente filtradas em com auxílio de unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 $\mu$ m. Todas as soluções foram injetadas em triplicata, seguindo os parâmetros cromatográficos descritos no quadro 5 (Página 77).

Para a solução de adequação do sistema foram pesados aproximadamente 2mg de padrão de efavirenz racêmico para obter uma solução de concentração final de 0,1mg/mL. A solução amostra foi preparada em duplicata com uma concentração de 1mg/mL e pesada de aproximadamente 50mg de matéria-prima.

Quadro 5: Parâmetros cromatográficos para o teste de excesso enantiomérico (Método desenvolvido pelo LDVA).

Equipamento	Cromatógrafo a líquido
Coluna	Chiralpak AS 25cm x 4,6mm (Daicel Chemical Industries Ltda. - PN: AS00CE - LH025)
Fase Móvel	Acetonitrila : água (53:47)
Gradiente	Isocrático
Fluxo	1,0mL/minuto
Volume de injeção	20µL
Temperatura	25°C
Detector	UV / DAD
Comprimento de onda	245nm
Limite de aceitação	Mínimo 99%

### 5.3.2.3 Solventes Residuais

A análise de solventes residuais foi realizada conforme o preconizado pela Farmacopeia Americana (USP, 2013b). Como a análise de solventes residuais investiga os solventes orgânicos utilizados na síntese da matéria-prima, a análise foi realizada com base nos solventes reportados no laudo de cada fabricante. Os limites de especificação dos solventes são baseados na classe de cada solvente conforme metodologia da USP e estão descritos no quadro 6 (Página 78), assim como os parâmetros cromatográficos utilizados para o teste.

Para o preparo da amostra foram pesados em duplicata 400mg da matéria-prima, que foi diluída com dimetilformamida para obter uma concentração de 40mg/mL. A solução padrão foi preparada com uma mistura de todos os solventes a serem analisados, utilizando o mesmo diluente da solução amostra, e a concentração final de 500ppm para cada solvente.

Quadro 6: Parâmetros cromatográficos para o teste de solventes residuais (Farmacopeia Americana, 2013b).

Equipamento	Cromatógrafo a gás
Coluna	DB-624 - 30m x 0,32mm x 1,8µm (Agilent J&W – PN: 123.1334).
Gás carreador	Hélio
Gradiente	Isocrático
Fluxo	1,8mL/minuto
Volume de injeção	1µL
Temperatura do injetor	150°C
Programação do forno	Isoterma de 40°C por 5 minutos; Rampa 1: 5°C/minuto até 120°C; Rampa 2: 20°C/minuto até 200°C; Isoterma de 3 minutos.
Detector	Ionização em chama
Temperatura do detector	200°C
Programação dos fluxos de gases do detector	Hélio: 45mL/minuto Ar sintético: 450mL/minuto Nitrogênio: 45mL/minuto
Desvio padrão relativo	2,0%
Limite de aceitação	<b>Classe 2:</b> Cicloexano: < 290ppm Hexano: < 290ppm Tolueno: < 890 ppm. <b>Classe 3:</b> Etanol: < 5000ppm ETBE: < 5000ppm Heptano: < 5000ppm Isopropanol: < 5000ppm MTBE: < 2000 ppm.

### 5.3.3 Análises Físico-Químicas Complementares

As análises físico-químicas foram realizadas segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010a).

Para análise de teor de água por titulação no equipamento de Karl Fischer foram pesados aproximadamente 200mg de amostra. A titulação foi feita automaticamente e o resultado calculado pelo próprio equipamento. O teor máximo de água aceito é de 0,5%.

O teste de rotação específica foi realizado com uma solução de concentração de 3mg/mL, diluída com metanol; para isso, foram pesados aproximadamente 300mg da amostra dessecada. O metanol foi usado como branco, que assim como a solução amostra, tiveram suas rotações medidas no polarímetro Schmidt + Haensch, e o resultado deve estar na faixa de  $-86^{\circ}$  a  $-98^{\circ}$ .

A amostra preparada para o teste de cinzas sulfatadas também foi utilizada no teste de metais pesados. Foi pesada 1g de matéria-prima de efavirenz que foi transferida para um cadinho de platina previamente tarado, a amostra foi aquecida em bico de Bunsen até ficar totalmente carbonizada. Após resfriada, foi adicionado 1mL de ácido sulfúrico P.A. na amostra que foi novamente aquecida até que não houvesse mais desprendimento de vapores brancos. Em seguida, a amostra foi queimada em mufla a  $(600 \pm 50)^{\circ}\text{C}$ , até a completa carbonização. O percentual de perda foi determinado a partir das diferenças de massas antes e após o teste e não poderia ser superior a 0,2%.

Após o cálculo das cinzas sulfatadas, a amostra foi utilizada para análise de metais pesados - ao cadinho foram adicionados 4mL de ácido clorídrico 6M, que foi colocado em banho-maria até a secura. O resíduo foi umedecido com uma gota de ácido clorídrico e 10mL de água quente e mantido no banho-maria por mais 2 minutos. A amostra foi alcalinizada com hidróxido de amônio 6M e em seguida foram adicionados 25mL de água e novamente o pH foi ajustado para a faixa de 3 a 4 com ácido acético 1M. A amostra foi filtrada e a solução foi transferida para o tubo de Nessler. Esse procedimento deverá ser realizado em duplicata, pois a uma das alíquotas da amostra foram adicionados 2mL da solução padrão de acetato de chumbo (10ppm de Pb) para servir como solução controle.

A solução padrão foi preparada em um tubo de Nessler adicionando 2mL da solução padrão de acetato de chumbo (10ppm de Pb) e 25mL de água, o pH foi ajustado da mesma maneira que na amostra. A cada uma das preparações (amostra, padrão e controle) foram adicionados 2mL de solução tampão pH 3,5 e 1,2mL de tioacetamida. Todas as soluções foram diluídas com água até um volume final de 50mL. Para avaliação do resultado, as soluções devem ser observadas de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre o fundo branco e qualquer coloração desenvolvida na amostra não pode ser mais intensa que a do padrão, que corresponde a um máximo de 0,002% - 20ppm.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização

#### 6.1.1 Determinação da estrutura por difração de raios X de pó

Pela análise por difratometria de raios X de pó foram obtidos os padrões de difração referentes aos três fabricantes de EFV, no tempo inicial e ao final de 12 meses em dessecador e geladeira, os quais estão apresentados nos ANEXOS 1, 2 e 3.

Os padrões de difração de DRXP, realizados na faixa de varredura  $2\theta$  de 3 a  $50^\circ$ , dos IFAs analisados mostraram-se semelhantes entre si, com picos bem definidos indicativos da natureza cristalina. O padrão de difração sugere que todas as análises obtidas, tanto no tempo inicial como após 12 meses em dessecador e geladeira, encontram-se na forma cristalina I conforme descrito por Radesca e colaboradores (2004) (Tabela 1).

Tabela 1: Correlação dos picos das amostras x referência no padrões de difração.

Referência ( $^\circ 2\theta$ )	Amostras ( $^\circ 2\theta$ )								
	A - 1			B - 4			C - 7		
	Inicial	12 <sup>o</sup> mês		Inicial	12 <sup>o</sup> mês		Inicial	12 <sup>o</sup> mês	
Dessec.		Geladeira	Dessec.		Geladeira	Dessec.		Geladeira	
6,0	6,1	5,9	6,1	6,1	6,2	6,1	6,2	6,2	6,2
6,3	6,5	6,4	6,4	6,4	6,5	6,5	6,4	6,5	6,5
10,3	10,5	10,5	10,5	10,4	10,5	10,4	10,5	10,5	10,5
10,8	11,0	11,0	11,0	11,0	11,1	11,0	11,0	11,0	11,0
14,1	14,3	14,3	14,3	14,2	14,3	14,3	14,2	14,2	14,2
16,8	17,0	17,0	17,0	16,9	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0
20,0	20,2	20,2	20,2	20,2	20,3	20,2	20,2	20,2	20,2
20,5	20,7	20,7	20,7	20,6	20,7	20,7	20,7	20,6	20,7
21,1	21,3	21,3	21,3	21,3	21,4	21,3	21,3	21,3	21,3
24,8	25,0	25,0	25,0	24,9	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Legenda: Dessec. - Dessecador

Conforme já mencionado, as amostras apresentaram características cristalinas em seu padrão de difração, sendo os picos a 6,0; 10,3; 14,1 e 20,0° 2 $\theta$ , presente em todas as análises, característico do EFV e que, conforme a patente US6673372, corresponde à forma cristalina I.

A difratometria de raios X de pó vem sendo consolidada como uma técnica importante nas ciências farmacêuticas por representar um método rápido para obtenção de informações sobre as estruturas cristalinas dos fármacos e excipientes (BLACHÉRE; BRITAIN, 2008). Além disso, a técnica de difração de raios X é considerada confiável visto que o perfil de difração obtido é característico de cada fase cristalina (QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

### 6.1.2 Técnicas termoanalíticas (Ponto de fusão, DSC, TGA e Perda por secagem)

#### 6.1.2.1 Ponto de Fusão

Segundo a patente US6673372, existem cinco formas polimórficas (formas I, II, III, IV e V) do EFV. A patente reporta que a forma I é a termodinamicamente mais estável e apresenta o maior ponto de fusão dentre todas as formas (138 a 140°C).

Os resultados da temperatura de fusão de todos os lotes analisados variaram de 137 a 139°C e podem ser observados na tabela 2, todos estando de acordo com a especificação da Farmacopeia Brasileira (2010a) para a matéria-prima que é de 136 a 141°C.

Tabela 2: Resultados do ponto de fusão, no tempo zero das amostras analisadas.

Fabricante A		Fabricante B		Fabricante C	
Lote	Resultado (°C)	Lote	Resultado (°C)	Lote	Resultado (°C)
1	137	4	138	7	137
2	137	5	137	8	137
3	137	6	139	9	138

### 6.1.2.2 Calorimetria exploratória diferencial

Métodos térmicos fornecem informações fundamentais sobre os sistemas polimórficos, e a calorimetria exploratória diferencial é a técnica térmica mais utilizada na caracterização de polimorfos (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

A análise de DSC de todas as amostras do IFA, nos tempos inicial, 1, 3, 6 e 9 meses em dessecador e geladeira apresentou um único evento endotérmico, representado por um pico bem definido e simétrico na faixa de temperatura de 130 a 144°C, referente ao fenômeno de fusão do IFA (ANEXOS 4 ao 9).

O fenômeno de fusão corresponde ao evento endotérmico da curva de DSC que se afasta da linha base, retornando posteriormente à mesma. A denominação  $T_{onset}$  é normalmente utilizada para designar a temperatura na qual a transição começa a ocorrer e, portanto, a curva começa a desviar da linha de base. Alguns autores consideram como o ponto de fusão a temperatura na qual o evento endotérmico atinge seu ponto mais baixo na curva correspondente ao  $T_{pico}$  (RODRIGUES et al., 2005).

Nas tabelas 3 e 4 (página 84) estão demonstrados os dados obtidos a partir das curvas de DSC:  $T_{onset}$ ,  $T_{pico}$  e entalpia ( $\Delta H$ ) para as amostras de EFV dos fabricantes A, B e C, nos cinco tempos de análise e nas condições de armazenamento de dessecador e geladeira. Além disso, foi calculada a diferença percentual relativa entre as entalpias do mês analisado e a inicial, para verificar a variação entre meses.

Tabela 3: Dados obtidos a partir das curvas de DSC das amostras do dessecador analisadas ( $T_{onset}$ ,  $T_{pico}$  e entalpia), em todos os tempos de análise.

Dessecador						
Amostra	Resultado (Médias)	Inicial	1º mês	3º mês	6º mês	9ª mês
A – 1	$T_{onset}$ (°C)	136,56	136,89	135,68	136,15	136,41
	$T_{pico}$ (°C)	138,44	138,69	138,06	138,42	138,86
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-50,54	-53,77	-53,30	-52,54	-53,18
	Diferença $\Delta H$ (%) *	N/A**	8,59	7,66	6,12	7,41
B – 4	$T_{onset}$ (°C)	138,08	137,95	138,07	138,05	138,07
	$T_{pico}$ (°C)	139,24	139,14	139,20	139,30	139,37
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-52,49	-54,38	-53,90	-53,60	-52,62
	Diferença $\Delta H$ (%) *	N/A**	3,59	2,69	2,11	0,25
C – 7	$T_{onset}$ (°C)	137,43	137,34	137,35	136,52	137,42
	$T_{pico}$ (°C)	138,83	138,83	138,75	138,35	138,84
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-49,51	-52,99	-52,85	-51,66	-52,32
	Diferença $\Delta H$ (%) *	N/A**	7,03	6,74	4,34	5,67

\*Diferença (%) relativa entre a entalpia do mês e a entalpia inicial.

\*\* N/A – Não aplicável.

Tabela 4: Dados obtidos a partir das curvas de DSC das amostras da geladeira analisadas ( $T_{onset}$ ,  $T_{pico}$  e entalpia), em todos os tempos de análise.

Geladeira						
Amostra	Resultado (Médias)	Inicial	1º mês	3º mês	6º mês	9ª mês
A – 1	$T_{onset}$ (°C)	136,56	136,77	135,54	136,03	136,86
	$T_{pico}$ (°C)	138,44	138,62	138,00	138,22	138,78
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-50,54	-53,62	-49,57	-51,06	-53,03
	Diferença $\Delta H$ (%) *	N/A**	7,80	-0,35	2,65	6,60
B – 4	$T_{onset}$ (°C)	138,08	137,95	137,88	137,90	137,89
	$T_{pico}$ (°C)	139,24	139,14	139,18	139,17	139,37
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-52,49	-54,50	-54,08	-53,54	-53,33
	Diferença $\Delta H$ (%) *	N/A**	3,75	2,95	1,91	1,51
C – 7	$T_{onset}$ (°C)	137,43	137,06	137,42	137,34	137,48
	$T_{pico}$ (°C)	138,83	138,63	138,73	138,73	139,04
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-49,51	-51,39	-52,39	-52,49	-52,20
	Diferença $\Delta H$ (%) *	N/A**	3,32	5,33	5,52	4,94

\*Diferença (%) relativa entre a entalpia do mês e a entalpia inicial.

\*\* N/A – Não aplicável.

Avaliando-se os valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $T_{\text{pico}}$  obtidos, observa-se nas tabelas 3 e 4 (página 84) que os valores de  $T_{\text{pico}}$  foram menos afetados quando comparados aos valores de  $T_{\text{onset}}$ . Observa-se também que a amostra B – 4, tanto dessecador como geladeira, apresentou menores variações na diferença percentual de entalpia (0,25 a 3,59% para dessecador e 1,51 a 3,75% para geladeira).

A avaliação da pureza por DSC pode ser realizada pelo simples acompanhamento visual da curva DSC obtida com uma taxa de aquecimento lenta, observando a presença dos eventos térmicos característicos do fármaco, ou utilizando uma determinação quantitativa pelo método da Equação de van't Hoff, que determina a pureza a partir do pico de fusão do analito (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Na avaliação de pureza absoluta sabe-se que quanto maior a concentração de impurezas na amostra mais larga é a faixa de fusão. Todavia, essa técnica não deve ser utilizada para esse fim quando a substância em análise decompõe-se durante a sua fusão (DOOREN & MÜLLER, 1984). Como esse não é o caso do efavirenz, que se mostrou estável durante todos os tempos de análise, as curvas de DSC do 12º mês foram realizadas utilizando uma menor razão de aquecimento (5 K/minuto). Essa estratégia foi adotada com a finalidade de observar alguma variação no perfil da curva de DSC que pudesse indicar alteração na pureza das amostras.

Nesse tempo também foi observado o fenômeno de fusão representado por um pico simétrico e bem definido na faixa de 130 a 142°C (ANEXOS 10 e 11). Além disso, não foi observada nenhuma alteração significativa no perfil energético, confirmando que mesmo após o acondicionamento das amostras em dessecador e geladeira por um período de 12 meses, as mesmas se mantiveram estáveis em relação à sua cristalinidade.

Os dados obtidos a partir das curvas de DSC:  $T_{\text{onset}}$ ,  $T_{\text{pico}}$  e entalpia ( $\Delta H$ ) para as amostras de EFV no 12º mês de análise nas condições de armazenamento de dessecador e geladeira estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Dados obtidos a partir das curvas de DSC das amostras analisadas ( $T_{onset}$ ,  $T_{pico}$  e entalpia) no 12º mês em dessecador e geladeira.

<b>Amostra</b>	<b>Resultado (Médias)</b>	<b>Dessecador</b>	<b>Geladeira</b>
A – 1	$T_{onset}$ (°C)	137,37	136,69
	$T_{pico}$ (°C)	138,91	138,50
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-49,86	-49,79
B – 4	$T_{onset}$ (°C)	138,20	138,14
	$T_{pico}$ (°C)	139,14	139,09
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-51,30	-51,97
C – 7	$T_{onset}$ (°C)	137,55	137,52
	$T_{pico}$ (°C)	138,65	138,64
	$\Delta H$ (Jg <sup>-1</sup> )	-50,34	-50,93

Conforme pode ser verificado pelas curvas de DSC (ANEXOS 4 ao 9) e nas tabelas 3, 4 e 5 (páginas 84 e 86), as amostras avaliadas apresentaram o mesmo comportamento, com pequenas diferenças, nas variadas condições de teste.

Os resultados, quando comparados com os descritos por Radesca e colaboradores (2004), sugerem que as matérias-primas analisadas encontram-se na forma cristalina I, a mais termodinamicamente estável. Da mesma forma, as temperaturas de fusão são compatíveis com a descrita para o efavirenz matéria-prima na Farmacopeia Brasileira (2010a).

Avaliando-se os resultados obtidos pelas análises de DSC, juntamente com os resultados de DRXP e ponto de fusão, pode ser sugerido que as amostras de EFV dos três fabricantes avaliados correspondem ao polimorfo I.

### 6.1.2.3 Termogravimetria

A análise de termogravimetria (ANEXOS 12 ao 17) revelou perfis termogravimétricos similares em todas as amostras analisadas. No tempo inicial nenhuma das amostras (A – 1, B – 4 e C – 7) foi analisada, pois o laboratório estava com uma carga muito grande nas análises de rotina.

Nos demais tempos, a análise termogravimétrica foi realizada entre 25 e 180°C e em todas as amostras foi observado um evento que apresentou perda de massa menor que 0,2% (Tabela 6), relativo à presença de substância(s) orgânica(s) volátil(eis) e/ou umidade; e um evento relativo à decomposição que se inicia em aproximadamente 240°C.

Tabela 6: Resultados de TGA, em todos os tempos de análise, das amostras de efavirenz acondicionadas em dessecador e geladeira.

Tempo (mês)	Parâmetros	A - 1		B - 4		C - 7	
		Dessecador	Geladeira	Dessecador	Geladeira	Dessecador	Geladeira
1º	Perda de Massa (%)	0,02	0,02	0,01	0,02	0,03	0,04
3º	Perda de Massa (%)	0,06	0,12	0,02	0,04	0,04	0,05
6º	Perda de Massa (%)	0,12	0,10	0,04	0,05	0,09	0,11
9º	Perda de Massa (%)	0,09	0,07	0,03	0,04	0,04	0,05
12º	Perda de Massa (%)	0,10	0,07	0,03	0,04	0,03	0,05

Ao comparar todas as curvas, observa-se que os perfis termogravimétricos são similares entre todas as amostras analisadas. Os resultados obtidos mostram que a temperatura inicial de 210°C é referente à decomposição térmica do IFA, além disso, como nenhuma outra perda de massa ocorre, esse resultado confirma que as amostras correspondem a materiais anidros, eliminando a existência de formas solvatadas.

#### 6.1.2.4 Perda por secagem

De acordo com a monografia da Farmacopeia Brasileira (2010a), a matéria-prima deve apresentar uma perda de umidade inferior a 1,0%. Os percentuais de perda por secagem das amostras de efavirenz avaliadas neste ensaio estão apresentados na tabela 7 (página 89).

No tempo de 15 meses só foi realizado o teste de perda por secagem para as amostras do grupo 1 (A – 1, B – 4 e C – 7), pois para calcular o teor na base seca é necessário o resultado desse teste.

Todas as amostras avaliadas apresentaram resultados satisfatórios, com uma variação de 0 a 0,5%. Entretanto, os maiores resultados (0,3; 0,4 e 0,5%) foram pontuais no 3º mês de análise. Nos meses seguintes essas amostras tiveram o valor da perda de umidade reduzido e, em seguida, o valor ficou mantido em 0,2%.

A amostra C – 7 dessecador também apresentou uma perda 0,3% no último mês de análise (15º mês), porém esse valor não é atípico uma vez que houve um aumento gradual ao longo dos quinze meses.

Ao compararmos as amostras do dessecador com as da geladeira, observa-se que das nove amostras do dessecador somente duas, do fabricante C, apresentaram percentual de perda de massa de 0,2 e 0,3% (C – 9 e C – 7, respectivamente), o resultado das outras sete amostras foi de 0,1%. Enquanto as nove amostras de geladeira tiveram o resultado de 0,2%, exceto a amostra A – 2 que ao final dos doze meses apresentou 0,1% de perda de umidade. Portanto, as amostras do dessecador contendo sílica mantiveram-se bem protegidas da umidade, conforme sugerido por Pombal, Barata e Oliveira (2010), cujo estudo diz que adicionar um dessecante de umidade à embalagem pode diminuir os efeitos da umidade.



Tabela 7: Resultados de perda por secagem, em todos os tempos de análise, das amostras de efavirenz acondicionadas em dessecador e geladeira.

Amostras	Acondicionamento	Inicial (%)	1º mês (%)	3º mês (%)	6º mês (%)	9º mês (%)	12º mês (%)	15º mês (%)
A – 1	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
A – 2	Dessecador	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	xxx
	Geladeira		0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	xxx
A - 3	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	xxx
	Geladeira		0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	xxx
B – 4	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
B – 5	Dessecador	0	0	0	0,1	0,1	0,1	xxx
	Geladeira		0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	xxx
B - 6	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	xxx
	Geladeira		0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	xxx
C – 7	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3
	Geladeira		0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
C – 8	Dessecador	0	0	0	0,1	0,1	0,1	xxx
	Geladeira		0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	xxx
C – 9	Dessecador	0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	xxx
	Geladeira		0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	xxx

Legenda: xxx – Teste não realizado.

A análise de perda por secagem tem impacto direto na análise de teor, uma vez que o resultado de teor da amostra é calculado na base seca. As variações observadas acima podem acarretar num resultado de teor fora da especificação.

Ao comparar os resultados da termogravimetria com os da perda por secagem, observa-se uma perda de massa menor nas amostras analisadas pela primeira técnica em relação às amostras da segunda, conforme o observado nos gráficos das figuras 14 e 15 (página 90).

Nenhuma das amostras, tanto do dessecador como da geladeira, teve perda de massa pela técnica do TGA igual à da perda por secagem.

Figura 14: Gráfico comparativo dos resultados de TGA e perda por secagem das amostras do dessecador.

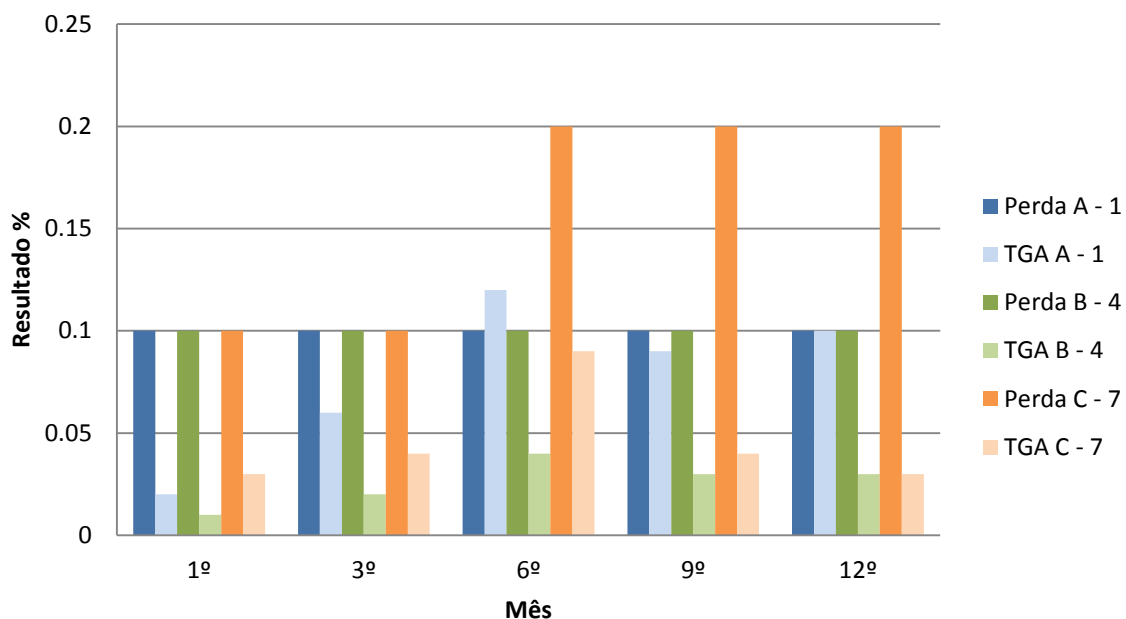
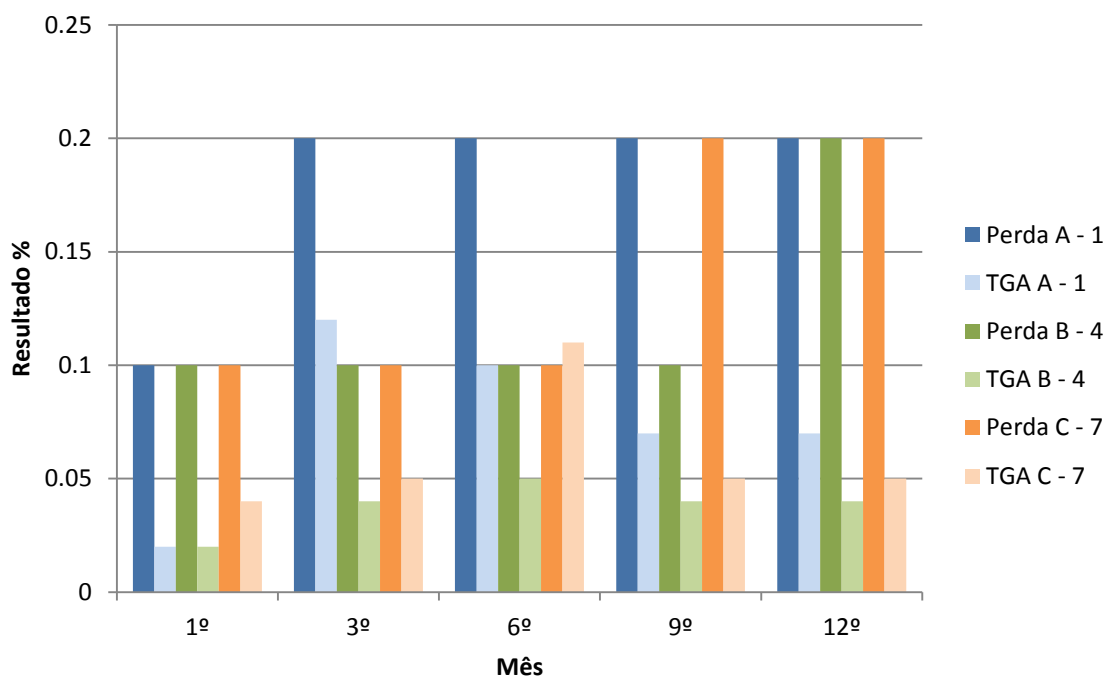


Figura 15: Gráfico comparativo dos resultados de TGA e perda por secagem das amostras da geladeira.



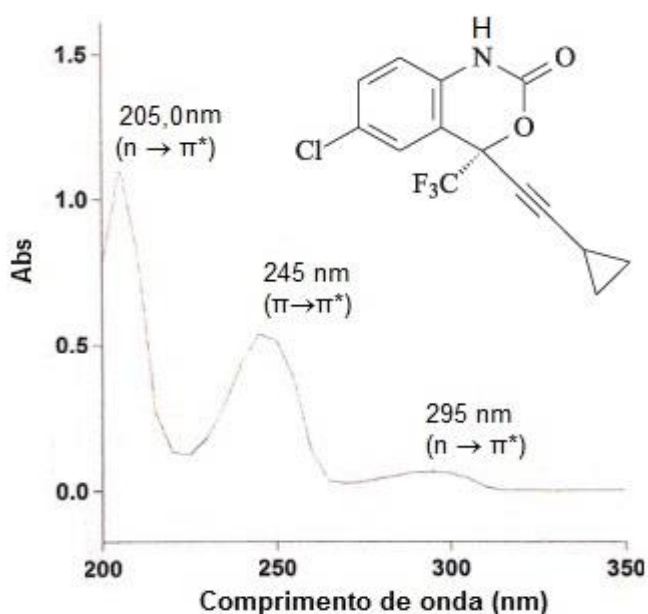
### 6.1.3 Técnicas espectroscópicas (Ultravioleta e Infravermelho)

#### 6.1.3.1 Ultravioleta

A maioria das moléculas orgânicas e dos grupos funcionais é transparente nas porções do espectro eletromagnético que chamamos de regiões do ultravioleta e visível, isto é, as regiões onde comprimentos de onda variam de 190 a 800nm. Embora a absorção da radiação ultravioleta resulte da excitação dos elétrons de um estado de baixa energia para o estado excitado, os núcleos que os elétrons unem desempenham um papel importante na determinação dos comprimentos de onda da radiação que é absorvida (PAVLA et al., 2009).

As amostras de EFV apresentaram picos intensos e os espectros foram comparados com o espectro do padrão de referência (Figura 16). Os espectros na região do ultravioleta apresentaram três bandas de absorção máxima, sendo a mais intensa em aproximadamente 205nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) referente ao N-H. A outra banda é a correspondente ao comprimento de onda aproximado de 245nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) referente a carbonila (C=O) e a menos intensa em aproximadamente 295nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ), ligação do cloro.

Figura 16: Espectro UV do padrão de efavirenz.



Os espectros de absorção no ultravioleta das soluções analisadas do IFA de efavirenz, na faixa de 200 a 350nm apresentaram picos máximos em aproximadamente 205, 245 e em 295nm (ANEXO 18). Portanto, todos estão de acordo com a especificação da Farmacopeia Brasileira (2010a) onde especifica que as amostras devem apresentar espectros similares ao do padrão e picos máximos em 206, 247 e 293nm. Além disso, observa-se equivalência entre o espectro do padrão e das amostras analisadas, o que sugere a identidade dos grupos farmacofóricos.

### 6.1.3.2 Infravermelho

As análises no infravermelho são realizadas na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e têm sua resposta baseada na vibração das espécies moleculares e seu espectro reflete a presença de grupamentos funcionais específicos, podendo caracterizar hidratos, solvatos e diferentes formas cristalinas (QIU et al., 2009).

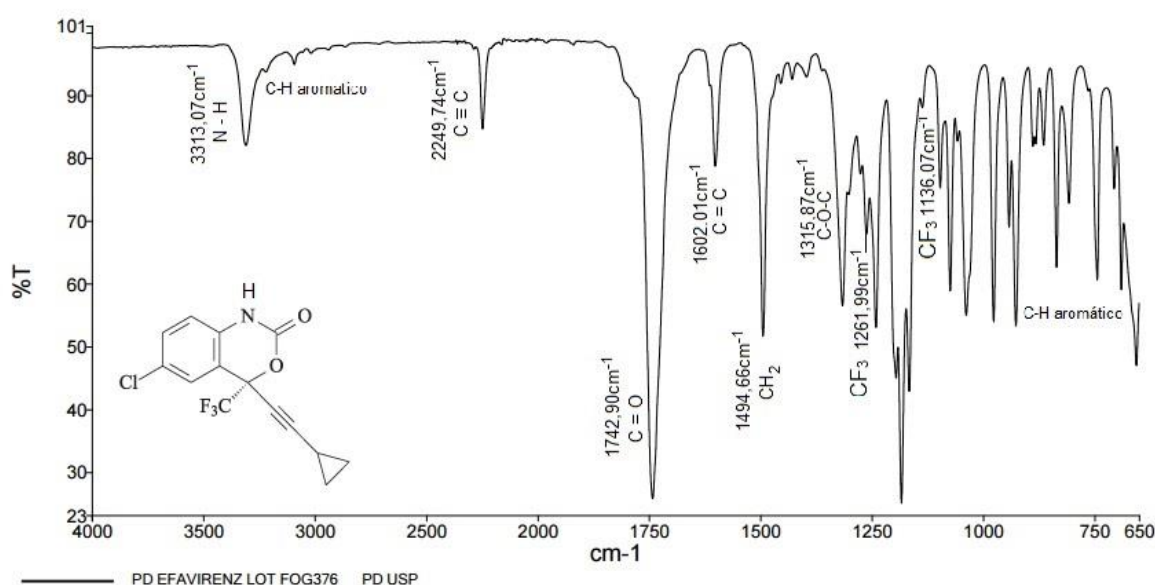
A correlação pico a pico no espectro é uma excelente evidência de identidade da molécula, pois dois compostos diferentes não apresentam exatamente o mesmo espectro de infravermelho (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Assim, para o estudo espectroscópico das amostras de efavirenz utilizadas foram empregados dados da literatura para atribuição das bandas de absorção.

O espectro no infravermelho do EFV apresenta sinais característicos de sua estrutura (Figura 17, Página 93), que segundo os autores Silverstein; Webster; Kiemle (2005); e Deshmukh e colaboradores (2011) são identificados como:

- Deformação axial de N-H a 3313  $\text{cm}^{-1}$ .
- Deformação axial da ligação tripla carbono-carbono de acetilenos dissubstituídos a 2249  $\text{cm}^{-1}$ .
- Deformação axial em 1742  $\text{cm}^{-1}$  de carbonila.
- Deformação axial em 1602  $\text{cm}^{-1}$  de ligação C=C de anel aromático.
- Deformação angular simétrica no plano em 1494  $\text{cm}^{-1}$  referente aos metilenos do ciclopropano.
- Bandas de deformação axial na região entre 1261 e 1136  $\text{cm}^{-1}$  do grupo  $\text{CF}_3$ .

- Deformação axial em  $1315\text{ cm}^{-1}$  do grupamento C-O-C, proveniente do carbamato.
- Bandas na região de  $900 - 675\text{ cm}^{-1}$  características da deformação angular fora do plano das ligações C-H do anel aromático.
- Bandas na região de  $3093\text{ a }3018\text{ cm}^{-1}$  de deformação axial do C-H de aromáticos.

Figura 17: Espectro no infravermelho do padrão de efavirenz.



Com os espectros das amostras dos três fabricantes (ANEXOS 19, 20 e 21), da região de  $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$ , foi possível confirmar que não houve nenhuma mudança significativa dos picos característicos da estrutura do EFV e tampouco aparecimento de novos picos.

Todos os IFAs foram confirmados frente ao padrão de referência, comprovando a identidade química das moléculas e nenhum espectro indicou formação de ligações de hidrogênio, o que corrobora com os resultados encontrados na difratometria de raios X e com DSC, indicando que as amostras são de um mesmo polimorfo.

## 6.2 Análises Cromatográficas

Os testes referentes ao estudo de acompanhamento devem ser realizados em 0 (zero), 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses para doseamento do insumo farmacêutico ativo, quantificação de produtos de degradação e, quando aplicável, a identificação de produtos de degradação (ANVISA, 2012).

Para os testes de teor e de substâncias relacionadas as amostras do IFA de efavirenz foram divididas em dois grupos, devido ao início das análises terem começado em tempos diferentes. A divisão dos grupos e as análises realizadas em cada tempo estão descritas na tabela 8.

Tabela 8: Análises realizadas em cada tempo por grupo.

<b>Tempos</b>	<b>Grupo 1 (A-1, B-4 e C-7)</b>	<b>Grupo 2 (A-2, A-3, B-5, B-6, C-8 e C-9)</b>
Inicial	Teor e SR (agosto/2013)	Teor e SR (novembro/2013)
1º mês	Teor e SR (setembro e outubro/2013)	Teor (dezembro/2013)
3º mês	Teor (novembro/2013)	Teor e SR (março/2014)
6º mês	Teor e SR (março/2014)	Teor e SR (junho/2014)
9º mês	Teor e SR (maio /2014)	xxx
12º mês	xxx	Teor e SR (novembro/2014)
15º mês	Teor e SR (novembro/2014)	xxx

As análises do 9º mês (grupo 2) e do 12º (grupo 1) não foram realizadas devido a problemas no equipamento. Como o 12º mês do grupo 1 seria o último mês de acompanhamento, foi realizada a análise no 15º mês.

### 6.2.1 Teor

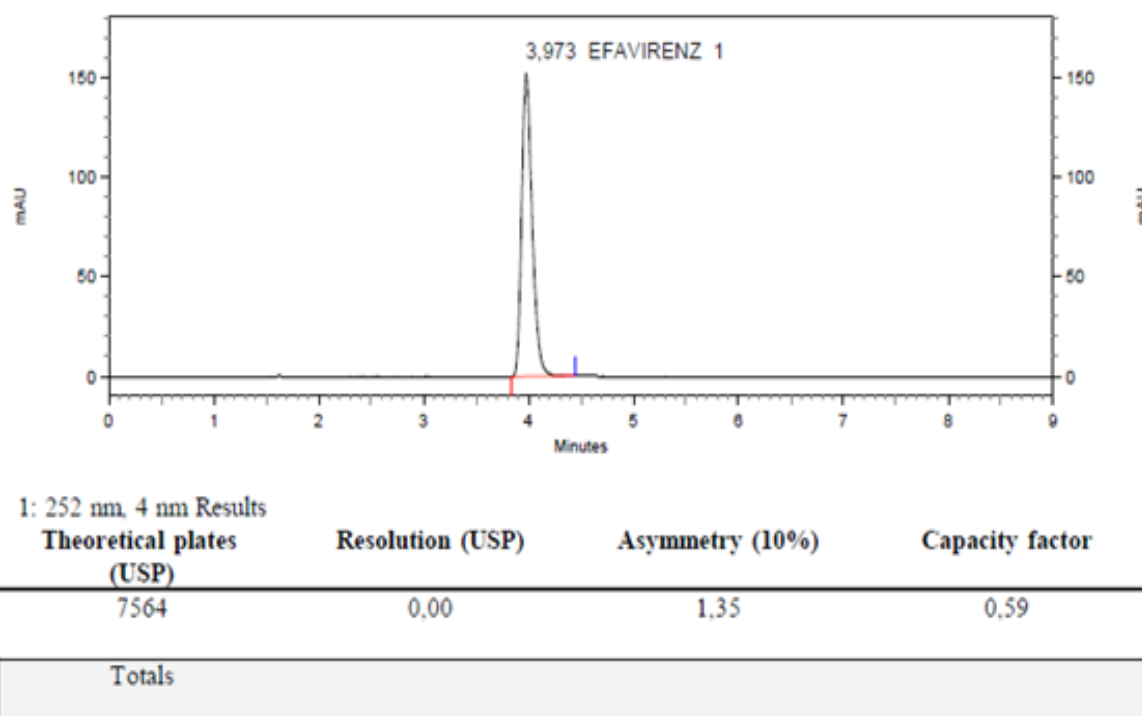
Antes de avaliar os resultados dos teores das amostras analisadas, foram verificadas as condições de análise do equipamento pelo *system suitability* da solução padrão. Essa análise do padrão foi realizada em todos os tempos do estudo.

A partir da análise do cromatograma da solução padrão de referência do efavirenz da USP, o qual está representado pela figura 18, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 3,9 minutos e assimetria de 1,35 correspondente ao fármaco. A assimetria obtida para o pico do IFA encontra-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Figura 18: Cromatograma do padrão de efavirenz USP e seus parâmetros de adequação do sistema (6<sup>o</sup> mês de análise).

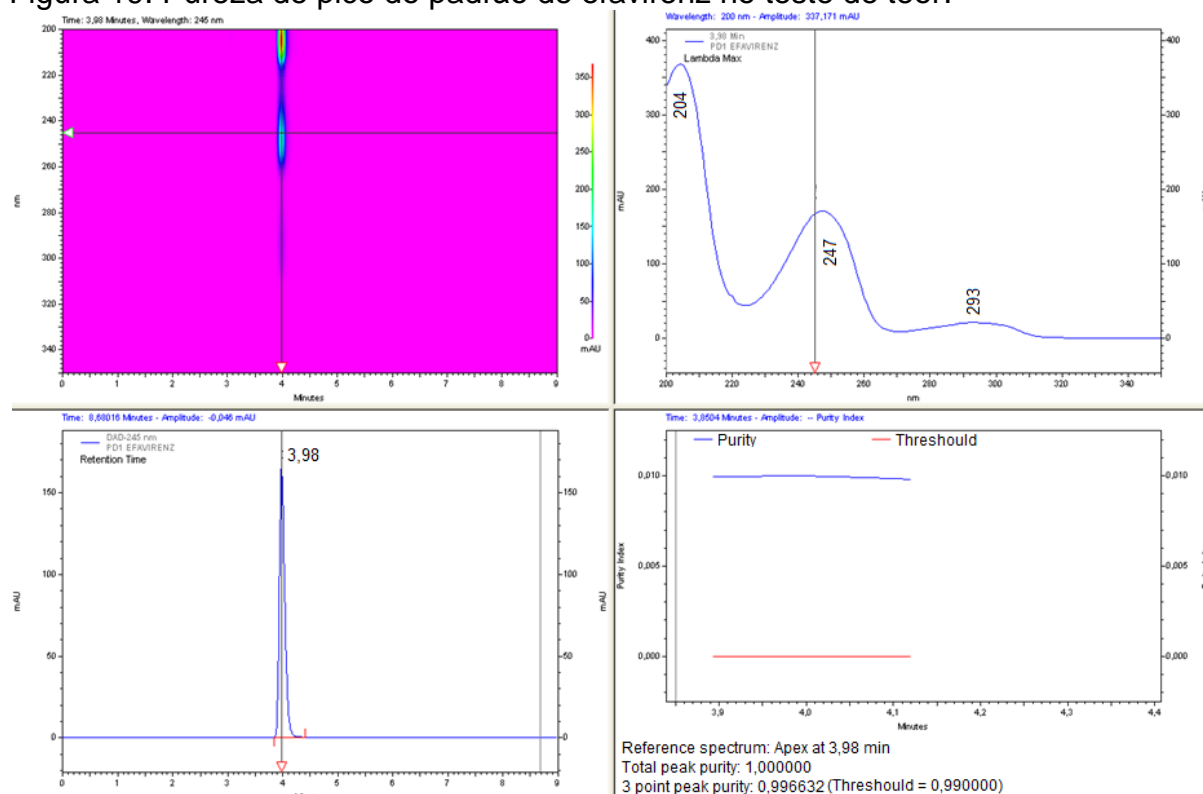
(condições cromatográficas – coluna: Spherisorb ODS 25cm x 4,0mm - 5 $\mu$ m; fase móvel: acetonitrila: água (70:30); gradiente: isocrático; fluxo: 1,0 ml/minuto; temperatura do forno: 25°C e detector de UV a 252nm).

#### Perfil Cromatográfico



A pureza total do pico do efavirenz foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 350nm e adotando uma resolução de 1nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 19.

Figura 19: Pureza de pico do padrão de efavirenz no teste de teor.



A partir da análise da figura 19, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de efavirenz foi de 1,0, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado.

O espectro da solução padrão apresenta máximos em 204, 247 e 293nm, o que confirma a identidade do IFA como sendo efavirenz conforme descrito no item 6.1.3.1 (Página 91).



Nos tempos relacionados na tabela 9, foram analisados os teores de todas as amostras. Para a realização desta análise, as matérias-primas foram armazenadas em dessecador e geladeira.

Todas as matérias-primas avaliadas apresentaram resultado de teor dentro do especificado, exceto a amostra C – 7 que apresentou, no 12º mês de análise, teores de 97,9% e 97,2% para a amostra do dessecador e da geladeira, respectivamente (Tabelas 9, 10 e 11, páginas 98 e 100). A Farmacopeia Brasileira (2010a) preconiza na monografia do efavirenz matéria-prima um teor de 98,0% a 102,0% em relação à substância dessecada.

Tabela 9: Resultados de teor e a diferença percentual entre os resultados, dos três lotes do fabricante A ao longo dos meses de análise.

Amostra	Acondicionamento	Tempos / Resultado (%)						
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º	15º
A - 1	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,7	100,6	100,8	100,7	100,1	xxx	99,3
	Diferença (%)*		-0,10	0,10	0	-0,60		-1,39
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)		100,9	101,2	100,9	100,3		100,0
	Diferença (%)*		0,20	0,50	0,20	-0,40		-0,70
A - 2	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,9	xxx	100,4	99,0	xxx	98,6	xxx
	Diferença (%)*			-0,50	-1,88		-2,80	
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)			100,2	99,1		99,4	
	Diferença (%)*			-0,69	-1,78		-1,49	
A - 3	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,5	xxx	100,0	98,5	xxx	98,5	xxx
	Diferença (%)*			-0,50	-1,99		-1,99	
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)			100,3	99,9		98,7	
	Diferença (%)*			-0,20	-0,60		-1,79	

Diferença (%)\* - Diferença percentual entre o tempo analisado e o tempo inicial.

Os lotes do fabricante A, nas duas condições de armazenamento, apresentaram uma variação de diferença percentual de (-2,80 a 0,50%). Conforme o sugerido por Williams (2006) o padrão deve ser substituído ou repadronizado caso haja alteração de 0,5% de conteúdo para substâncias com pureza superior a 98%. Sendo assim, conforme observado na tabela 10, todos os IFAs analisados do fabricante A devem ser repadronizados antes dos nove meses de uso, exceto o lote A – 1 geladeira que deve ser repadronizado antes do 15º mês.

Tabela 10: Resultados de teor e a diferença percentual entre os resultados, dos três lotes do fabricante B ao longo dos meses de análise.

Amostra	Acondicionamento	Tempos / Resultado (%)						
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º	15º
B - 4	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	101,0	101,0	101,2	100,8	100,3	xxx	98,7
	Diferença (%)*		0	0,20	-0,20	-0,69		-2,27
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)		101,1	101,0	100,9	100,8		101,2
	Diferença (%)*		0,10	0	-0,10	-0,20		0,20
B - 5	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,4	xxx	100,7	100,2	xxx	100,8	xxx
	Diferença (%)*			0,30	0,20		0,40	
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)			100,3	100,5		100,2	
	Diferença (%)*			-0,10	0,10		-0,20	
B - 6	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,4	xxx	100,8	100,1	xxx	100,6	xxx
	Diferença (%)*			0,40	-0,30		0,20	
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)			101,2	100,8		101,0	
	Diferença (%)*			0,80	0,40		0,60	

Diferença (%)\* - Diferença percentual entre o tempo analisado e o tempo inicial.

Das seis amostras analisadas do fabricante B, somente duas (B – 4, dessecador e B – 6, geladeira) apresentaram variação percentual acima de 0,5%. Ao observar mais atentamente essas duas amostras, a amostra B – 4 dessecador apresentou uma variação de -2,47% somente no 15º mês de análise, enquanto a amostra B – 6 geladeira teve uma variação de 0,80% no 3º mês e 0,60% no 12º mês.

Conforme o discutido no item 6.1.2.4 (página 87) em relação à perda por secagem, a amostra B – 6 geladeira no terceiro mês de análise teve um resultado de 0,5% de perda de umidade o que impactou diretamente no seu resultado de teor, porém nos meses seguintes o percentual se manteve em 0,2%. Sendo assim, se considerarmos esse percentual de perda por secagem de 0,2%, o teor passa a ser de 100,9% com uma variação percentual de 0,50%. Com isso, assim como a amostra B – 4 dessecador, a amostra B – 6 geladeira só teve um aumento de percentual no último mês de análise (12º mês).

Todas as outras amostras do fabricante B apresentaram um percentual de variação (-0,30 a 0,40%) abaixo do sugerido por Williams (2006) para repadronização.

Conforme pode ser observado na tabela 11 (Página 100), as amostras do fabricante C que apresentaram uma variação da diferença percentual menor que 0,5% foram C – 8 (dessecador e geladeira) e C – 9 (geladeira). Já as outras três amostras apresentaram variação de percentual de -3,28 a 0,80%.

A amostra C – 9 dessecador, teve uma variação de -1,49% já no 6º mês de análise, e esse percentual aumentou no 12º mês para -2,08%. A amostra C – 7 dessecador teve uma diferença percentual de -0,60 e -2,59%, no 9º e 15º mês, respectivamente. Esse aumento na variação do último mês é refletido pela queda do teor que se apresenta fora da especificação de 98,0 a 102,0% na base seca.

Já amostra C – 7 geladeira foi a que apresentou piores resultados, pois desde o primeiro mês a diferença percentual já era acima de 0,5%. Ao final do estudo, seu teor também já estava fora da especificação prevista pela Farmacopeia Brasileira (2010a).

Tabela 11: Resultados de teor e a diferença percentual entre os resultados, dos três lotes do fabricante C ao longo dos meses de análise.

Amostra	Acondicionamento	Tempos / Resultado (%)						
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º	15º
C - 7	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,5	100,8	100,5	100,2	99,9	xxx	97,9
	Diferença (%)*		0,30	0	-0,30	-0,60		-2,59
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)		101,1	101,0	101,3	101,3		97,2
	Diferença (%)*		0,60	0,50	0,80	0,80		-3,28
C - 8	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,4	xxx	100,3	100,4	xxx	100,8	xxx
	Diferença (%)*			-0,10	0		0,40	
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)			100,7	100,3		100,3	
	Diferença (%)*			0,30	-0,10		-0,10	
C - 9	Dessecador (18 a 25°C e UR < 75%)	100,8	xxx	100,6	99,3	xxx	98,7	xxx
	Diferença (%)*			0,20	-1,49		-2,08	
	Geladeira (2 a 8°C e UR < 75%)			100,7	101,0		100,9	
	Diferença (%)*			-0,10	0,20		0,10	

Diferença (%)\* - Diferença percentual entre o tempo analisado e o tempo inicial.

Ao se analisar os resultados dando enfoque à condição de armazenamento foram observados que tanto as amostras do dessecador quanto as da geladeira apresentam somente 3 amostras dentro do limite de  $\pm 0,5\%$ , com 11 pontos fora desse limite de variação (Figuras 20 e 21, página 101). Porém, as amostras do dessecador tiveram um número maior de amostras (seis) entre os percentuais -2,0 e -3,0, enquanto só uma amostra da geladeira está nesse intervalo.

Figura 20: Gráfico das diferenças percentuais das amostras do dessecador.

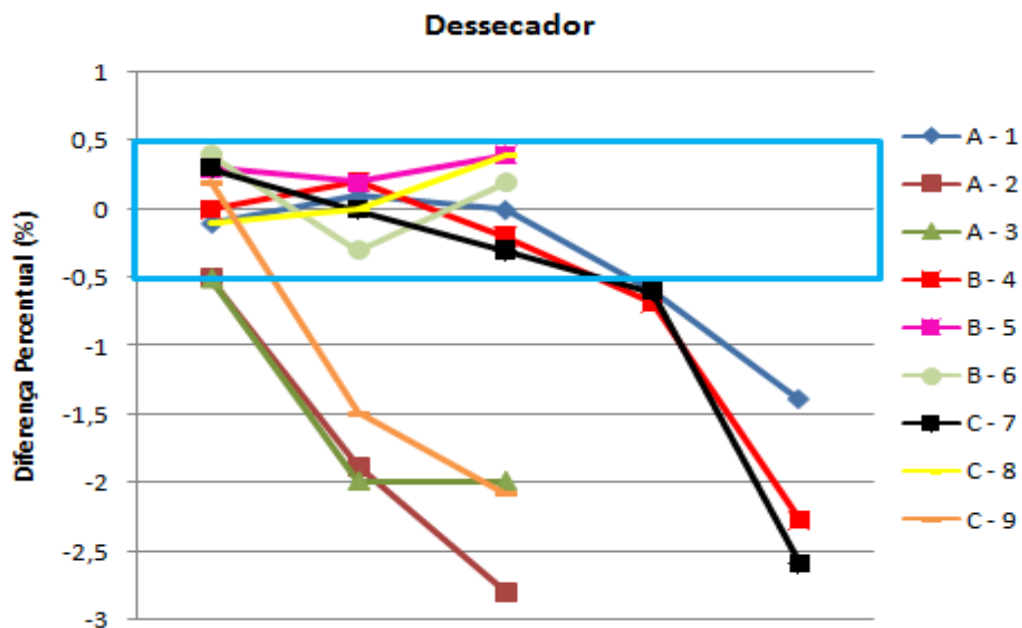
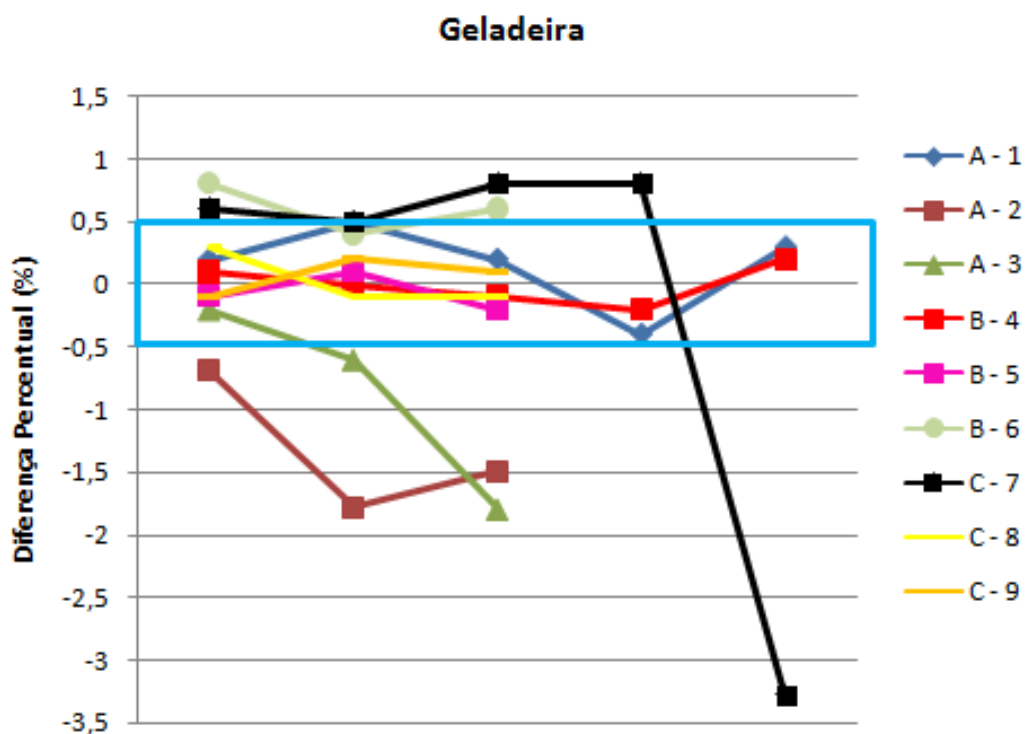
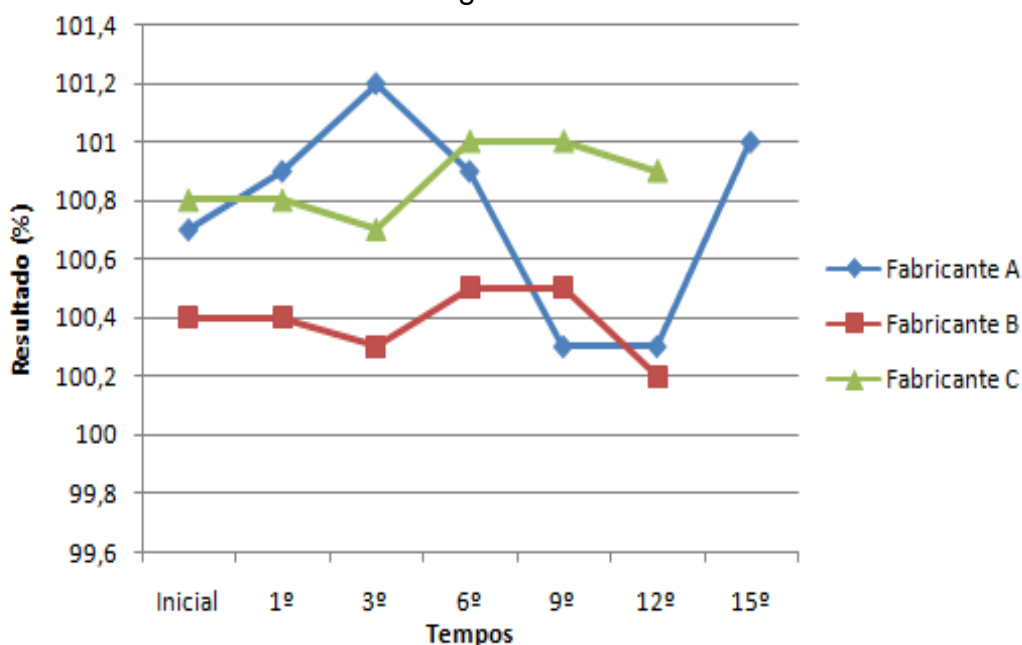


Figura 21: Gráfico das diferenças percentuais das amostras da geladeira.



Para a comparação entre os fabricantes foram separadas as amostras A – 1, B – 5 e C – 9, todas da geladeira, pois estas que tiveram menor variação na diferença percentual entre os resultados ao longo do estudo de estabilidade. Os fabricantes B e C foram os que apresentaram resultados mais constantes ao longo do tempo (Figura 22). Para montar o gráfico dessa figura, nos tempos que não tiveram análise os resultados do mês anterior foram repetidos para facilitar a visualização do gráfico.

Figura 22: Resultado de teor dos lotes de menor variação de diferença percentual de cada fabricante ao longo do estudo de estabilidade.



### 6.2.2 Substâncias Relacionadas

Assim como foi feito na análise de teor, antes da avaliação dos resultados de substâncias relacionadas foi verificada a adequação do sistema utilizando a solução padrão diluída de substâncias relacionadas. Essa análise da solução padrão foi realizada em todos os tempos do estudo.

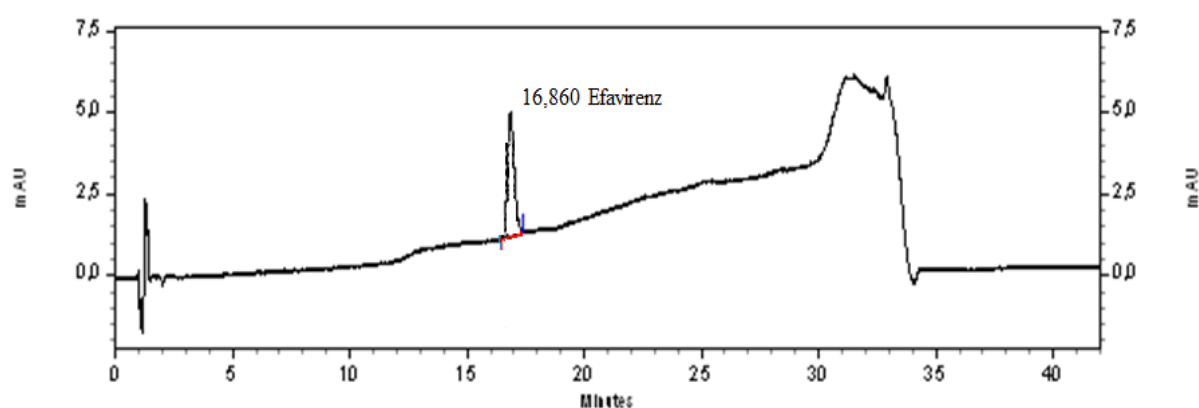
No cromatograma da solução padrão de referência do efavirenz da USP, o qual está representado pela figura 23 (página 103), observa-se um pico bem definido

com tempo de retenção de aproximadamente 16,8 minutos e assimetria de 1,16. Esse valor de assimetria encontra-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Figura 23: Cromatograma do padrão de efavirenz USP e seus parâmetros de adequação do sistema (6<sup>o</sup> mês de análise).

(condições cromatográficas – coluna: Zorbax® SB-CN, 15cm x 4,6mm; fase móvel: (A) 90% água/10% metanol com 0,05% ácido trifluoracético, (B) 90% metanol/10% água com 0,05% ácido trifluoracético; gradiente: linear de 60:40 (A:B) até 50:50 por 16 minutos, 35:65 por 7 minutos, 30:70 por 5 minutos, 20:80 por 1 minuto e manter esta condição por 2 minutos e retornar em 1 minuto à condição inicial de 60:40 (A:B), equilibrar por no mínimo 8 minutos antes da próxima injeção; fluxo: 1,5 ml/minuto; temperatura do forno: 40°C e detector UV a 250nm).

#### Perfil Cromatográfico



1: 250 nm, 4 nm Results

Theoretical plates (USP)	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	Capacity factor	S/N (ASTM)
15378,47	0,00	1,16	7,83	18,673
Totals				

Na análise dos perfis de impurezas dos três fabricantes ao longo do estudo de estabilidade foram encontrados picos cromatográficos semelhantes aos reportados por Montgomery e colaboradores (2001) e pela USP (2015). Nos cromatogramas podem-se notar respostas com tempos de retenção relativos para as impurezas e produtos de degradação próximos aos descritos em ambas as literaturas, conforme tabela 12 (Página 104).

Tabela 12: Relação das impurezas encontradas no estudo de estabilidade com as descritas na literatura.

Estudo de estabilidade		Estudo do Montgomery e colaboradores (2010)		Farmacopeia Americana (2015)	
Impureza	TRR	Impureza	TRR	Impureza	TRR*
Trans-alqueno	xxx	SR695	0,9	Impureza B	0,93
Impureza 1 (Amino álcool)	0,50	SD573	0,46	Amino álcool	0,48
Impureza 2	0,63	xxx	xxx	xxx	xxx
Impureza 3	1,15	SP234	1,17	Efavirenz pentenino <sup>a</sup>	1,16
Impureza 4	1,32	xxx	xxx	Efavirenz amino álcool metil carbamato <sup>b</sup>	1,33
Impureza 5 (Quinolina)	1,38	SM097	1,4	Quinolina	1,45
Impureza 6	1,88	SE563	1,86	Efavirenz benzoilaminoálcool <sup>c</sup>	1,9
Impureza 7	2,07	SR788	2,1	Impureza desconhecida	2,1
Impureza 8	2,14	xxx	xxx	Análogo ciclobutenilindol. <sup>d</sup>	2,18

<sup>a</sup>(S)-6-Cloro-4-(3-metilbut-3-en-1-ínil)-4-(trifluormetil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona.

<sup>b</sup>(S)-Metil-4-cloro-2-(4-ciclopropil-1,1,1-trifluor-2-hidroxi-but-3-in-2-il)fenilcarbamato.

<sup>c</sup>(S)-N-(4-Cloro-2-(4-ciclopropil-1,1,1-trifluor-2-hidroxi-but-3-in-2-il)fenil)-4-metoxibenzamida.

<sup>d</sup>Etil-5-cloro-2-ciclobutenil-3-(trifluormetil)-1H-indol-1-carboxilato.

\* TTR – Tempo de retenção relativo

Ao compararmos as impurezas presentes nos três fabricantes avaliados, nenhum dos lotes apresentou a impureza principal mencionada no método da Farmacopeia Brasileira (2010a), que é o trans-alqueno. Dentre as outras duas impurezas mais conhecidas, a quinolina está presente em todos os fabricantes enquanto o amino álcool só não está presente no fabricante B. Em relação às outras impurezas, cada fabricante tem sua particularidade, como no caso da impureza 4, que só está presente no fabricante B (Figura 24, página 105). O fabricante A apresenta todas as impurezas da tabela 13 (página 105), exceto o trans-alqueno e a impureza 4.



Figura 24: Sobreposição dos cromatogramas dos três fabricantes no tempo de 12 meses.

(condições cromatográficas – coluna: Zorbax® SB-CN 15cm x 4,6mm - 5µm; gradiente: 0 a 16 minutos com 40-50%B, 16,1 a 23 minutos com 50-65%B, 23,1 a 28 minutos com 65-70%B, 28,1 a 29 minutos com 70-80%B, mantendo 80%B até 31 minutos, retornando linearmente de 31,1 a 32 minutos a 40%B, reequilibrando por mais 10 minutos até a próxima injeção; fluxo: 1,5 mL/minuto; temperatura do forno: 25°C; detector: UV/DAD a 250nm)

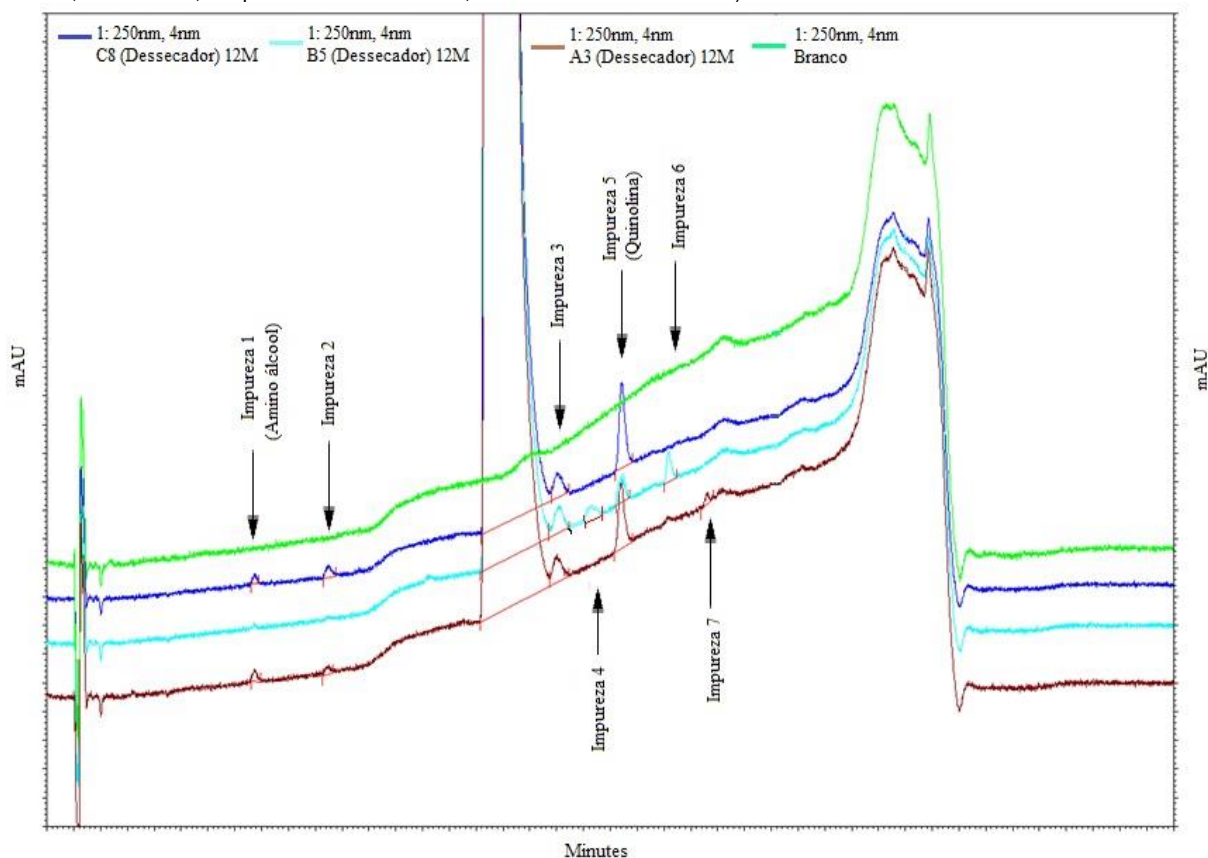


Tabela 13: Relação de impurezas encontradas ao longo do estudo de estabilidade separadas por fabricante.

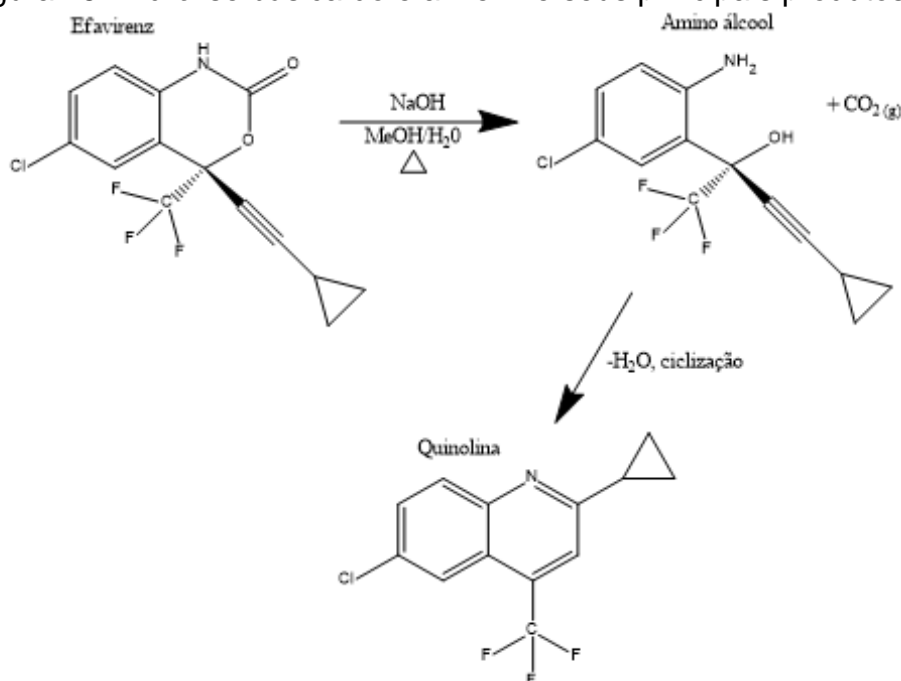
Impurezas	Fabricante A	Fabricante B	Fabricante C
Trans-alqueno	---	---	---
Impureza 1 (Amino álcool)	X	---	X
Impureza 2	X	X	X
Impureza 3	X	X	X
Impureza 4	---	X	---
Impureza 5 (Quinolina)	X	X	X
Impureza 6	X	X	---
Impureza 7	X	X	---

Segundo Menegatti, Fraga e Barreiro (2001), os fármacos são produtos de um processo sintético de múltiplas etapas e a pureza do produto final está diretamente relacionada à metodologia sintética empregada, à pureza dos intermediários e matérias-primas envolvidas na síntese. Assim, explica-se a diferença das impurezas encontradas para cada fabricante.

Segundo o DMF (*Drug Master File*) do fabricante A, as suas impurezas de síntese são: amino álcool (impureza 1), quinolina (impureza 5), a impureza 6 e o enantiômero (R). Já os outros dois fabricantes, em seus DMFs, mencionam como impurezas somente o amino álcool (impureza 1) e a quinolina (impureza 5), além do enantiômero.

Porém, é importante lembrar que entre as impurezas encontradas não são somente as impurezas de síntese, mas também os produtos de degradação. Segundo Ribeiro e colaboradores, o amino álcool e a quinolina também são os principais produtos da hidrólise básica do efavirenz.

Figura 25: Hidrólise básica do efavirenz e seus principais produtos.



De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010a), deve ser pesquisado no ensaio de substâncias relacionadas o trans-alqueno, sendo este considerado a única impureza conhecida. O limite estabelecido para esta substância é de no máximo 0,15% e, para outras impurezas, um máximo de 0,5%.

Tabela 14: Teor das impurezas da amostra A – 1 (dessecador e geladeira).

A - 1	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)						
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º	15º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd	nd		nd	nd		0,01
	<b>2</b>	nd	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	nd	0,02		0,02	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,04	0,04		0,04	0,04		0,04
	<b>6</b>	0,01	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>7</b>	nd	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd	nd		nd	nd		0,01
	<b>2</b>	nd	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	nd	0,03		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,04	0,04		0,04	0,04		0,04
	<b>6</b>	0,01	0,01		0,02	0,02		0,02
	<b>7</b>	nd	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

A amostra A – 1, tanto dessecador como geladeira, apresentou comportamento muito parecido em relação às impurezas. No final do 15º mês somente a impureza 6 teve um resultado diferente (0,01 e 0,02) entre as amostras da geladeira e do dessecador, respectivamente. Conforme pode ser observado na tabela 14, a quinolina está presente na amostra desde o mês inicial e se manteve constante ao longo dos meses, o que sugere que esta é uma impureza de síntese para esse fabricante.

Tabela 15: Teor das impurezas da amostra A – 2 (dessecador e geladeira)

A - 2	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)					
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		nd	nd		0,01
	<b>2</b>	nd		nd	nd		0,01
	<b>3</b>	0,02		0,02	0,02		0,02
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,04		0,04	0,04		0,04
	<b>6</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,04		0,04
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,04		0,05	0,05		0,06
	<b>6</b>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

A amostra A - 2 teve um comportamento diferenciado nas duas condições de armazenamento. Em relação às impurezas principais, o amino álcool na amostra do dessecador só apareceu no último mês de análise e manteve-se constante até o final do estudo, diferente da amostra da geladeira que surgiu no 3º mês de análise e aumentou ao longo do tempo. Esse evento pode ser explicado pela reação de hidrólise que o ativo pode ter sofrido no ambiente úmido da geladeira. O que também pode explicar o aumento da quinolina nessa amostra, chegando ao final do 15º mês com 0,06%, enquanto na amostra do dessecador a quinolina se manteve constante (0,04%). A amostra da geladeira apresentou a impureza 6 que não foi observada na amostra do dessecador.

Tabela 16: Teor das impurezas da amostra A – 3 (dessecador e geladeira).

A - 3	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)					
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		nd	nd		0,01
	<b>3</b>	0,03		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,05		0,05	0,05		0,05
	<b>6</b>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>7</b>	nd		0,01	0,01		0,01
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		nd	0,01		0,01
	<b>3</b>	0,03		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,05		0,06	0,06		0,06
	<b>6</b>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd

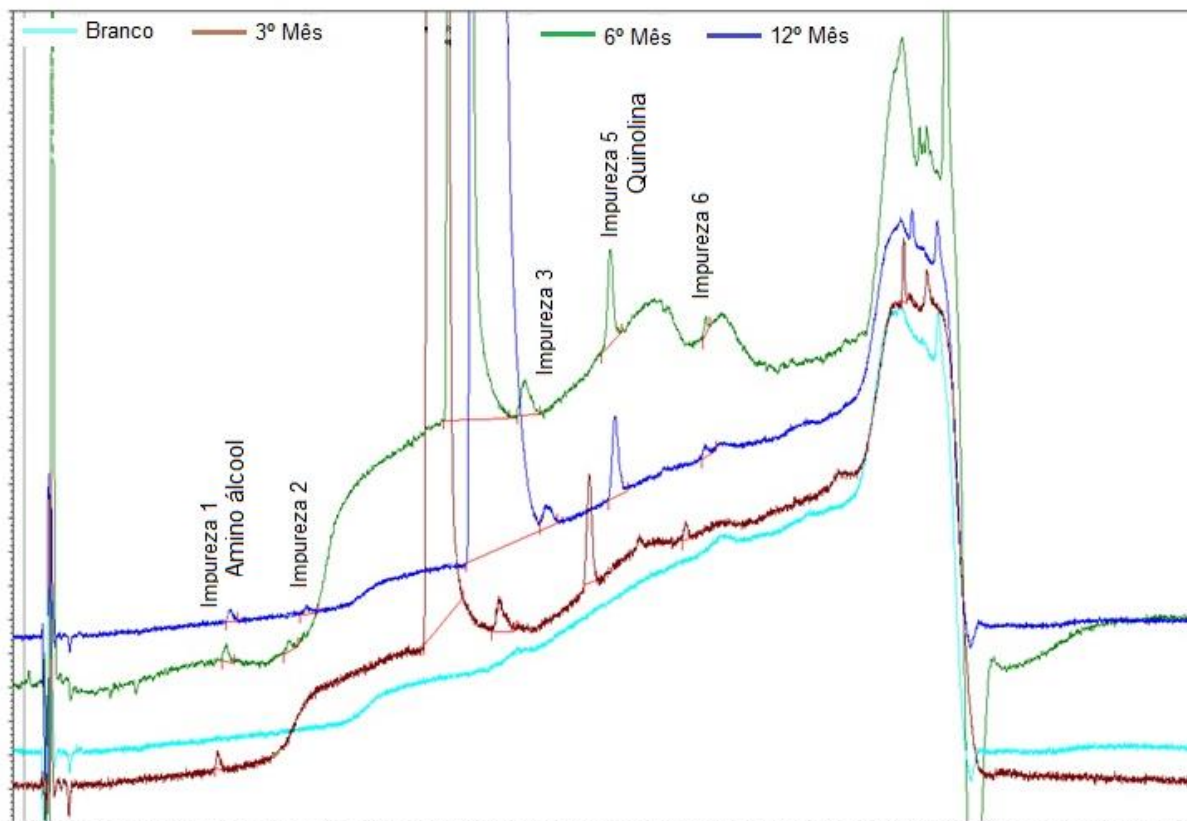
Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

As impurezas da amostra A - 3 também tiveram comportamentos parecidos quando comparadas as duas condições de armazenamento, exceto para a quinolina que manteve-se constante no dessecador e na geladeira teve um aumento logo no 3º mês de análise.

Segundo o próprio fabricante A, suas impurezas principais são o amino álcool, a quinolina e a impureza 6. Todos os três lotes apresentaram essas impurezas, além das impurezas 2 e 3 (Figura 26, página 110). Somente o lote A – 3 dessecador que apresentou a impureza 7.

Figura 26: Perfil das impurezas da amostra A – 3 (geladeira) nos tempos de 3, 6 e 12 meses.

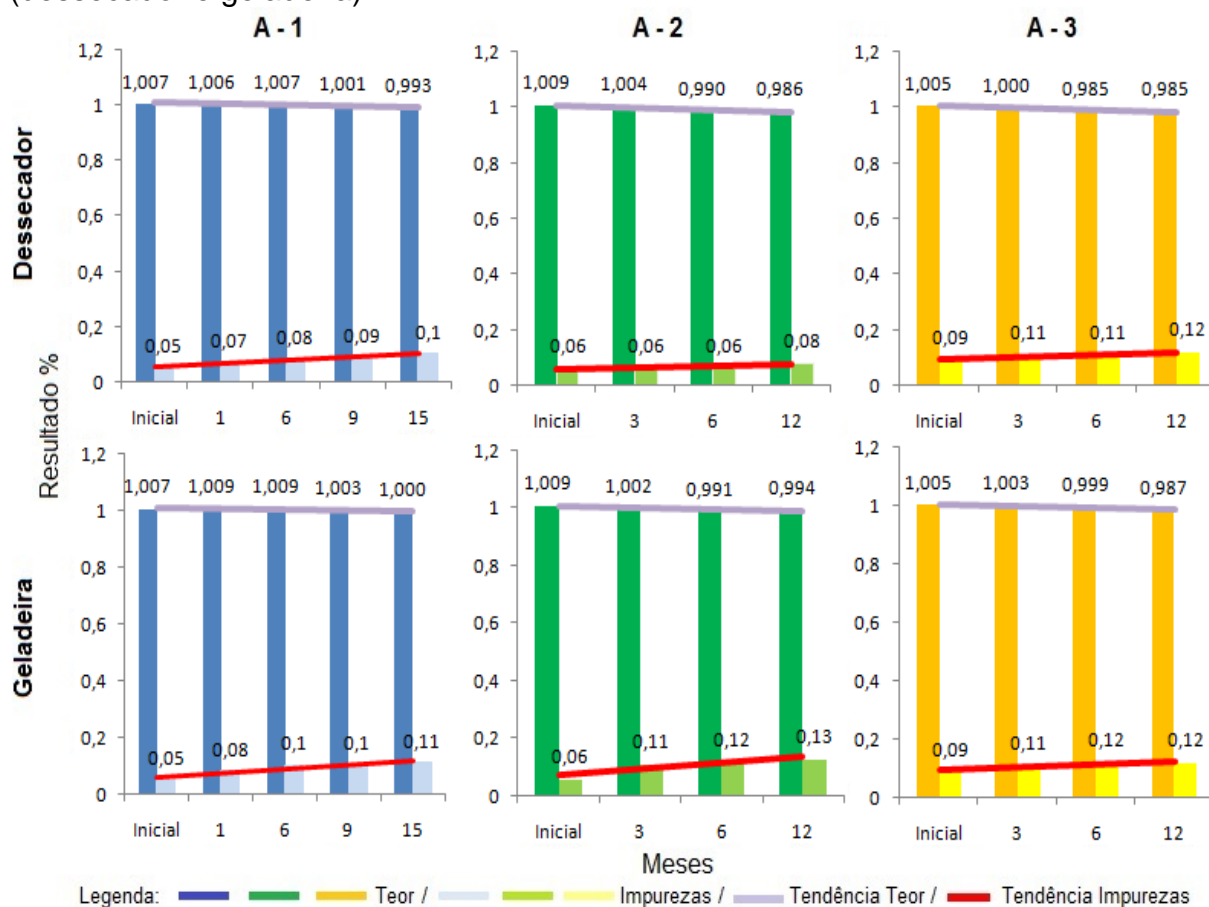
(condições cromatográficas – coluna: Zorbax® SB-CN, 15cm x 4,6mm; fase móvel: (A) 90% água/10% metanol com 0,05% ácido trifluoroacético, (B) 90% metanol/10% água com 0,05% ácido trifluoroacético; gradiente: linear de 60:40 (A:B) até 50:50 por 16 minutos, 35:65 por 7 minutos, 30:70 por 5 minutos, 20:80 por 1 minuto e manter esta condição por 2 minutos e retornar em 1 minuto à condição inicial de 60:40 (A:B), equilibrar por no mínimo 8 minutos antes da próxima injeção; fluxo: 1,5 ml/minuto; temperatura do forno: 40°C e detector UV a 250nm).



Todas as amostras do fabricante A tiveram resultado satisfatório segundo a especificação da Farmacopeia Brasileira (2010a). Quando são comparados o total de impurezas com a análise de teor observa-se que as amostras do fabricante A tiveram um comportamento parecido para as três amostras nas duas condições de armazenamento (Figura 27, página 111).

Para a construção do gráfico o resultado do teor foi dividido por 100 para facilitar a visualização do somatório das impurezas.

Figura 27: Gráficos comparativos do teor x impurezas do Fabricante A (dessecador e geladeira).



Os resultados de todas as impurezas encontradas nas amostras do fabricante B estão apresentados nas tabelas 17, 18 e 19 (Página 112 a 114).

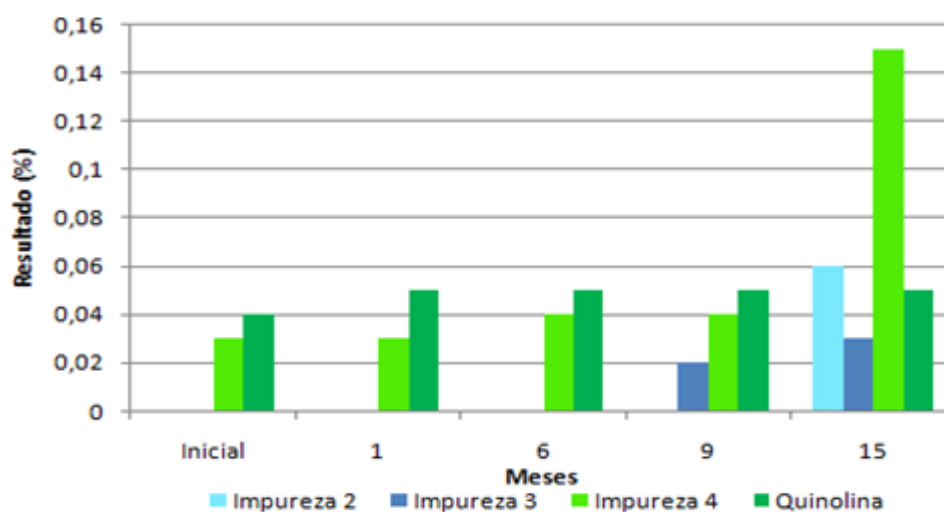
Na amostra B – 4 foram encontradas quatro impurezas e a quinolina apresentou comportamento semelhante nas duas condições de armazenamento (Tabela 17, Página 112). A amostra B – 4 dessecador foi a que apresentou um comportamento atípico frente às outras amostras desse fabricante. A impureza 2, que não havia sido detectada até o 9º mês de análise, no último mês de análise teve um resultado de 0,06%. Já a impureza 4 teve um aumento de 0,03 para 0,04% do 1º para o 6º mês e no último mês esse percentual subiu para 0,15% (Figura 28, página 112).

Tabela 17: Teor das impurezas da amostra B - 4 (dessecador e geladeira).

B - 4	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)						
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º	15º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd	nd		nd	nd		nd
	<b>2</b>	nd	nd		nd	nd		0,06
	<b>3</b>	nd	nd		nd	0,02		0,03
	<b>4</b>	0,03	0,03		0,04	0,04		0,15
	<i>5 - Quinolina</i>	0,04	0,05		0,05	0,05		0,05
	<b>6</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd	nd		nd	nd		nd
	<b>2</b>	nd	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	nd	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>4</b>	0,03	0,03		0,03	0,03		0,03
	<i>5 - Quinolina</i>	0,04	0,04		0,05	0,05		0,05
	<b>6</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

Figura 28: Comportamento das impurezas da amostra B – 4 geladeira ao longo dos meses de estudo de estabilidade.





As impurezas da amostra B – 5 apresentaram perfis semelhantes para as duas condições de armazenamento (Tabela 18), exceto as impurezas 3 e a quinolina que tiveram um resultado maior para a amostra da geladeira no último mês de análise (0,04 e 0,03%, respectivamente), o que pode ser um indicativo de degradação da amostra.

Tabela 18: Teor das impurezas da amostra B - 5 (dessecador e geladeira).

B - 5	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)					
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		nd	nd		nd
	<b>2</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<i>5 - Quinolina</i>	nd		0,02	0,02		0,02
	<b>6</b>	nd		0,02	0,02		0,02
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		nd	nd		nd
	<b>2</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,04		0,04
	<b>4</b>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<i>5 - Quinolina</i>	nd		0,03	0,03		0,03
	<b>6</b>	nd		0,02	0,02		0,02
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

A principal diferença entre os resultados das impurezas da amostra B – 6, do dessecador e da geladeira, é a presença da impureza 7 na amostra do dessecador. Diferente das outras amostras analisadas, a quinolina teve um maior teor da impureza na amostra do dessecador ao invés da amostra da geladeira. Em relação às outras impurezas encontradas (3, 4 e 6) o comportamento foi parecido nas duas condições de armazenamento (Tabela 19).

Tabela 19: Teor das impurezas da amostra B - 6 (dessecador e geladeira).

B - 6	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)					
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		nd	nd		nd
	<b>2</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<i>5 - Quinolina</i>	nd		0,01	0,02		0,02
	<b>6</b>	nd		0,03	0,03		0,03
	<b>7</b>	nd		0,01	0,01		0,01
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	nd		nd	nd		nd
	<b>2</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<i>5 - Quinolina</i>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>6</b>	nd		0,03	0,03		0,03
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

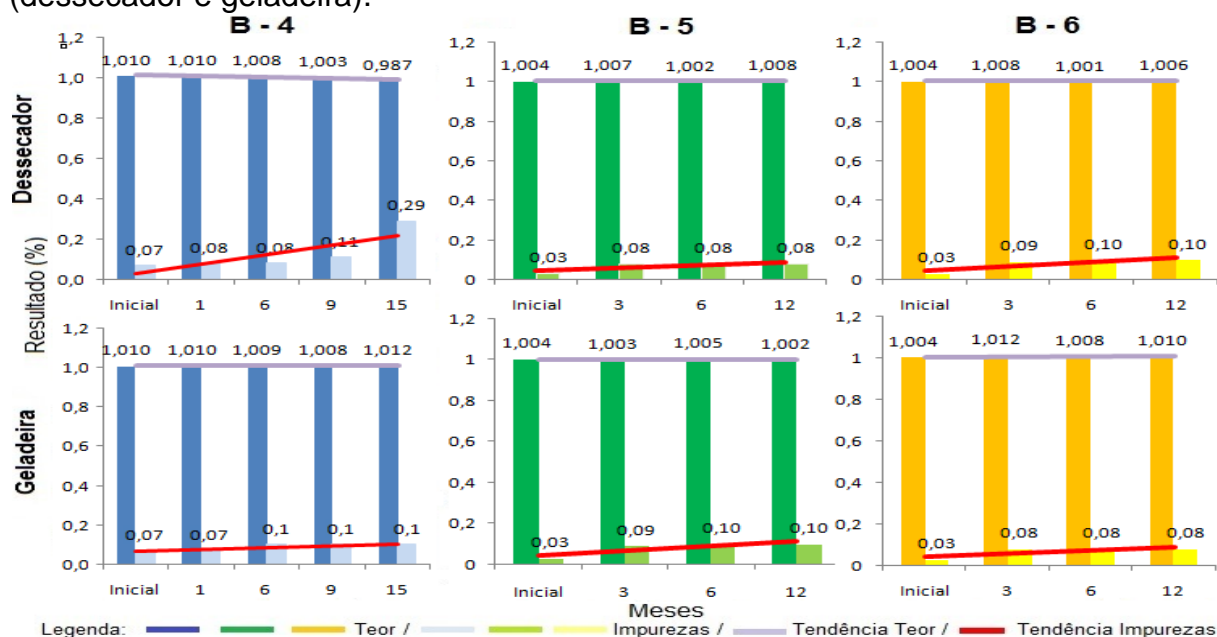
O fabricante B possui duas impurezas características que, segundo seu DMF, são o amino álcool e a quinolina. Porém, observando os resultados apresentados, verifica-se que o amino álcool não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas desse fabricante, o que pode sugerir que o processo de purificação está sendo eficiente.

Todas as amostras analisadas do fabricante B apresentam resultado satisfatório conforme o especificado pela Farmacopeia Brasileira (2010a): nenhuma das amostras apresentou a impureza trans-alqueno e as outras impurezas encontradas não tiveram teor acima de 0,5%.

Ao analisar o resultado das impurezas frente aos resultados obtidos do teor (Figura 29), observamos que as amostras B – 4 (geladeira), B – 5 e B – 6 nas duas condições de armazenamento tiveram comportamentos similares uma vez que o teor quase não mostrou alteração e a soma das impurezas foi de aproximadamente 0,1%. Já para amostra B – 4 dessecador verifica-se uma queda no teor (101,0 para 98,7%) e um total de impurezas no final do estudo de 0,29%. A queda no teor pode ser explicada pelo aumento nas impurezas, sugerindo uma possível degradação da amostra.

Para a construção do gráfico o resultado do teor foi dividido por 100 para facilitar a visualização do somatório das impurezas.

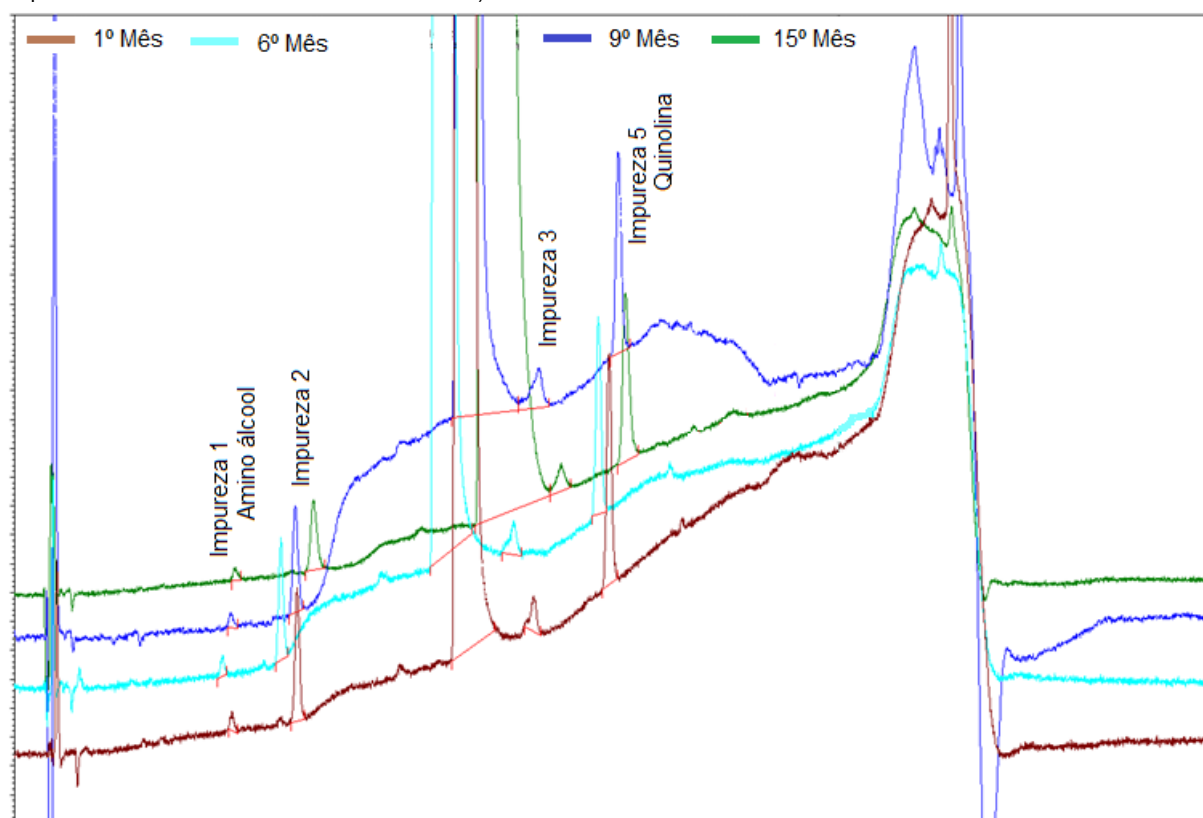
Figura 29: Gráficos comparativos do teor x impurezas do Fabricante B (dessecador e geladeira).



O fabricante C é o que apresenta menor número de impurezas, quatro no total (Figura 30). Segundo o DMF do fabricante as impurezas principais são o trans-alqueno, que não foi detectado, o amino álcool e a quinolina. As outras duas impurezas detectadas foram as impurezas 2 e 3.

Figura 30: Perfil das impurezas da amostra C - 7 (geladeira) nos tempos de 1, 6, 9 e 12 meses.

(condições cromatográficas – coluna: Zorbax® SB-CN, 15cm x 4,6mm; fase móvel: (A) 90% água/10% metanol com 0,05% ácido trifluoracético, (B) 90% metanol/10% água com 0,05% ácido trifluoracético; gradiente: linear de 60:40 (A:B) até 50:50 por 16 minutos, 35:65 por 7 minutos, 30:70 por 5 minutos, 20:80 por 1 minuto e manter esta condição por 2 minutos e retornar em 1 minuto à condição inicial de 60:40 (A:B), equilibrar por no mínimo 8 minutos antes da próxima injeção; fluxo: 1,5 ml/minuto; temperatura do forno: 40°C e detector UV a 250nm).



A amostra C – 7 apresentou o mesmo comportamento nas duas condições de armazenamento para todas as impurezas (Tabela 20, página 117), exceto a impureza 3 na amostra da geladeira que teve um aumento de 0,02 para 0,03% no 6º mês de análise e esse valor se manteve até o final do estudo.

Apesar de apresentar poucas impurezas essa amostra teve um resultado alto quando comparado aos outros fabricantes para as impurezas 2 e quinolina. A impureza 2 apresentou um resultado de 0,06% enquanto a quinolina teve como

resultado de teor de impureza 0,15%, ambos os resultados desde o primeiro mês de análise. Porém, tais impurezas não tiveram aumento no percentual ao longo dos meses de análise, o que sugere que essas impurezas não sofreram degradação.

Tabela 20: Teor das impurezas da amostra C - 7 (dessecador e geladeira).

C - 7	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)						
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º	15º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	0,01	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	0,06	0,06		0,06	0,06		0,06
	<b>3</b>	0,02	0,02		0,02	0,02		0,02
	<b>4</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,15	0,15		0,15	0,15		0,15
	<b>6</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	0,01	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	0,06	0,06		0,06	0,06		0,06
	<b>3</b>	0,02	0,02		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,15	0,15		0,15	0,15		0,15
	<b>6</b>	nd	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

A amostra C – 8 apresentou comportamento semelhante para todas as impurezas nas duas condições de armazenamento, exceto a impureza 3. Ao final do estudo a amostra do dessecador apresentou resultado de 0,03% enquanto a amostra da geladeira teve como resultado 0,04% (Tabela 21, página 118).

Tabela 21: Teor das impurezas da amostra C - 8 (dessecador e geladeira).

C - 8	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)					
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,06		0,06	0,06		0,06
	<b>6</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,04		0,04
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,06		0,06	0,06		0,06
	<b>6</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

Na última amostra analisada (C – 9) o comportamento das impurezas foi parecido com as demais impurezas desse fabricante. Em ambas as condições de armazenamento a quinolina teve um aumento no 3º mês de análise e se manteve constante até o final do estudo (0,05 para 0,06%); o mesmo aconteceu com a impureza 2, que inicialmente não havia sido detectada e no terceiro mês apresentou um teor de 0,01% que foi mantido ao longo do estudo.

Ao comparar as condições de armazenamento, somente a impureza 3 que teve comportamento diferente e ao final do estudo tem-se como resultado 0,03% para a amostra do dessecador e 0,04% para a amostra da geladeira (Tabela 22, página 119).

Tabela 22: Teor das impurezas da amostra C - 9 (dessecador e geladeira).

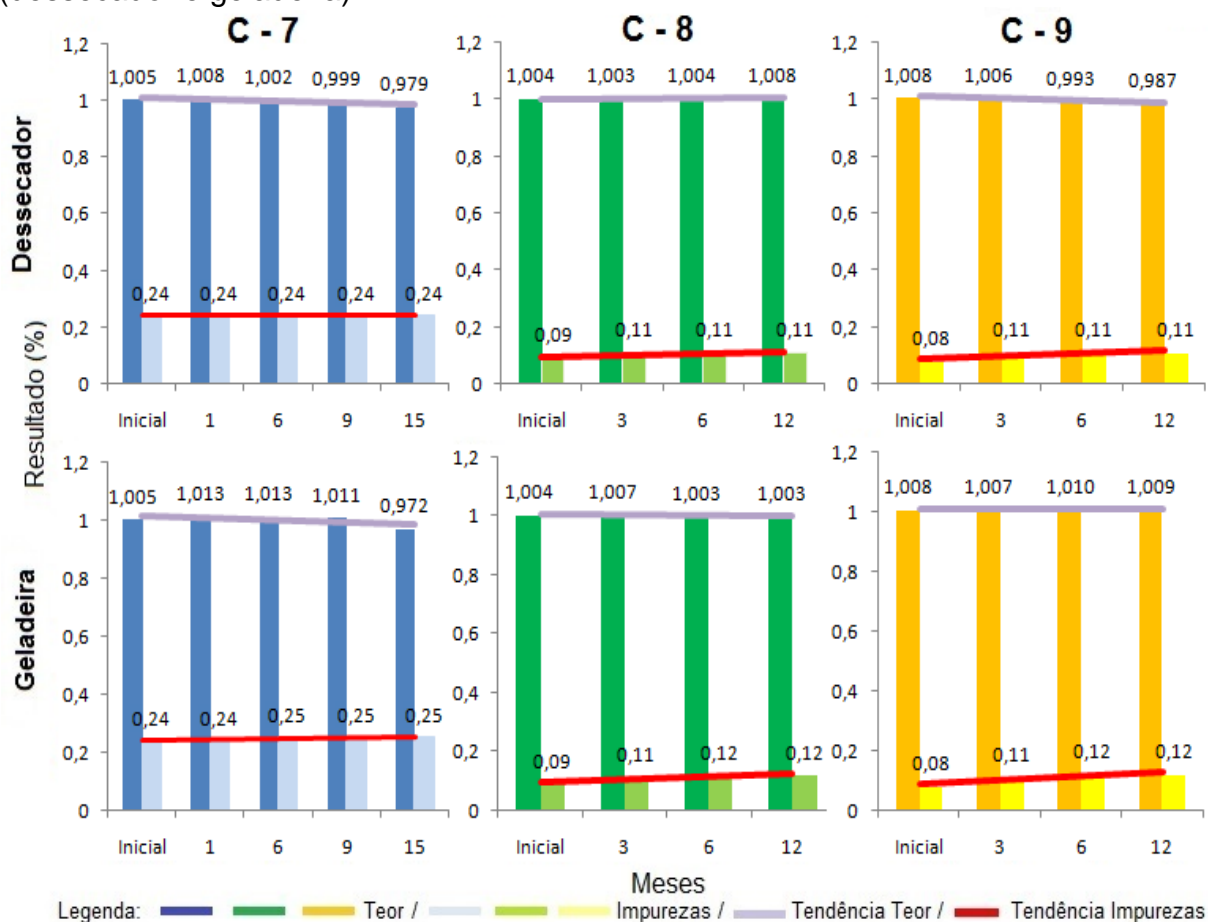
C - 9	Impurezas	Tempo (mês) / Resultados (%)					
		Inicial	1º	3º	6º	9º	12º
Dessecador	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,03		0,03
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,05		0,06	0,06		0,06
	<b>6</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd
Geladeira	<i>Trans-alqueno</i>	nd	xxx	nd	nd	xxx	nd
	<i>1 - Amino álcool</i>	0,01		0,01	0,01		0,01
	<b>2</b>	nd		0,01	0,01		0,01
	<b>3</b>	0,02		0,03	0,04		0,04
	<b>4</b>	nd		nd	nd		nd
	<i>5 - Quinolina</i>	0,05		0,06	0,06		0,06
	<b>6</b>	nd		nd	nd		nd
	<b>7</b>	nd		nd	nd		nd

Legenda: nd – não detectado / xxx – não analisado

Todas as amostras analisadas do fabricante C apresentam resultado satisfatório conforme o especificado pela Farmacopeia Brasileira (2010a), nenhuma das amostras apresentou a impureza trans-alqueno e as outras impurezas encontradas não tiveram teor acima de 0,5%.

Ao analisar o resultado das impurezas frente aos resultados obtidos do teor observamos que as amostra C – 7 (geladeira e dessecador) e C – 9 (dessecador) tiveram uma queda no teor, porém sem alteração no total de impurezas. Já as outras três amostras apresentaram comportamento parecido uma vez que o teor e as impurezas se mantiveram praticamente constantes (Figura 31, página 120).

Figura 31: Gráficos comparativos do teor x impurezas do Fabricante C (dessecador e geladeira)



Ao longo do estudo de estabilidade de substâncias relacionadas todas as amostras (dessecador e geladeira), apresentaram um total de impurezas de aproximadamente 0,1%, exceto as amostras B – 4 (dessecador) e C – 7 (dessecador e geladeira), cujo total foi de aproximadamente 0,3%. Para a amostra B – 4 esse aumento é resultado do aumento das impurezas 2 e 4. Já a amostra C – 7 apresenta uma soma de impurezas alta devido à presença da quinolina, com um teor de 0,15% desde o início do estudo, o que não foi observado nas outras amostras analisadas.

A Farmacopeia Brasileira (2010a) não especifica um valor para a soma das impurezas encontradas, sua avaliação é somente individual. Assim, com o estudo de estabilidade das amostras de efavirenz, observa-se que nenhuma das impurezas encontradas apresentou teor maior que 1,0% conforme o especificado pela literatura utilizada.



Quando são comparadas as condições de armazenamento, não foi observada nenhuma alteração significativa entre as duas formas de acondicionamento, tendo os IFAs dos três fabricantes apresentado o mesmo comportamento tanto em geladeira quanto em dessecador - exceto a amostra 4 do fabricante B, que apresentou um aumento de impurezas e queda no teor quando armazenada no dessecador.

### 6.2.3 Excesso enantiomérico

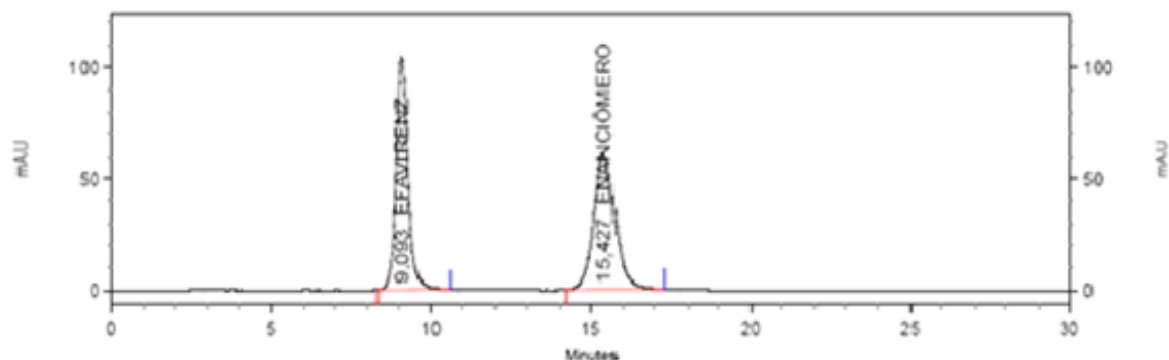
Antes de avaliar os resultados do excesso enantiomérico das amostras analisadas, foram verificadas as condições de análise do equipamento pelo *system suitability* da solução de adequação do sistema. Essa análise foi realizada em todos os tempos do estudo.

A partir da análise do cromatograma da solução de adequação, o qual está representado pela figura 32 (página 122), observam-se dois picos bem definidos com tempos de retenção de aproximadamente 9,1 minutos para o efavirenz e de 15,4 minutos para o enantiômero R. A assimetria para cada pico foi de 1,12 e 1,05, respectivamente e ambas encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). O critério de resolução previsto no método é de no mínimo 2, o valor obtido foi de 6,94 estando dentro do limite especificado.

Figura 32: Cromatograma solução de adequação do sistema.

(condições cromatográficas – coluna: Chiralpak AS 25cm x 4,6 mm; fase móvel: acetonitrila: água (53:47); gradiente: isocrático; fluxo: 1,0 ml/minuto; temperatura do forno: 25°C e detector de UV a 245nm).

Perfil Cromatográfico



1: 245 nm, 4

nm Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)
1	EFAVIREN Z	9,093	11091623	2872,78 2895,30	0,00 6,94	1,12 1,05
2	ENANCIÔM ERO	15,427	10870193			
Totals				21961816		

A pureza total do pico do efavirenz e do seu enantiômero foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 350nm e adotando uma resolução de 1nm. O teste de pureza de pico está representado pelas figuras 33 e 34 (página 123).

Figura 33: Pureza de pico do efavirenz na solução de adequação do sistema.

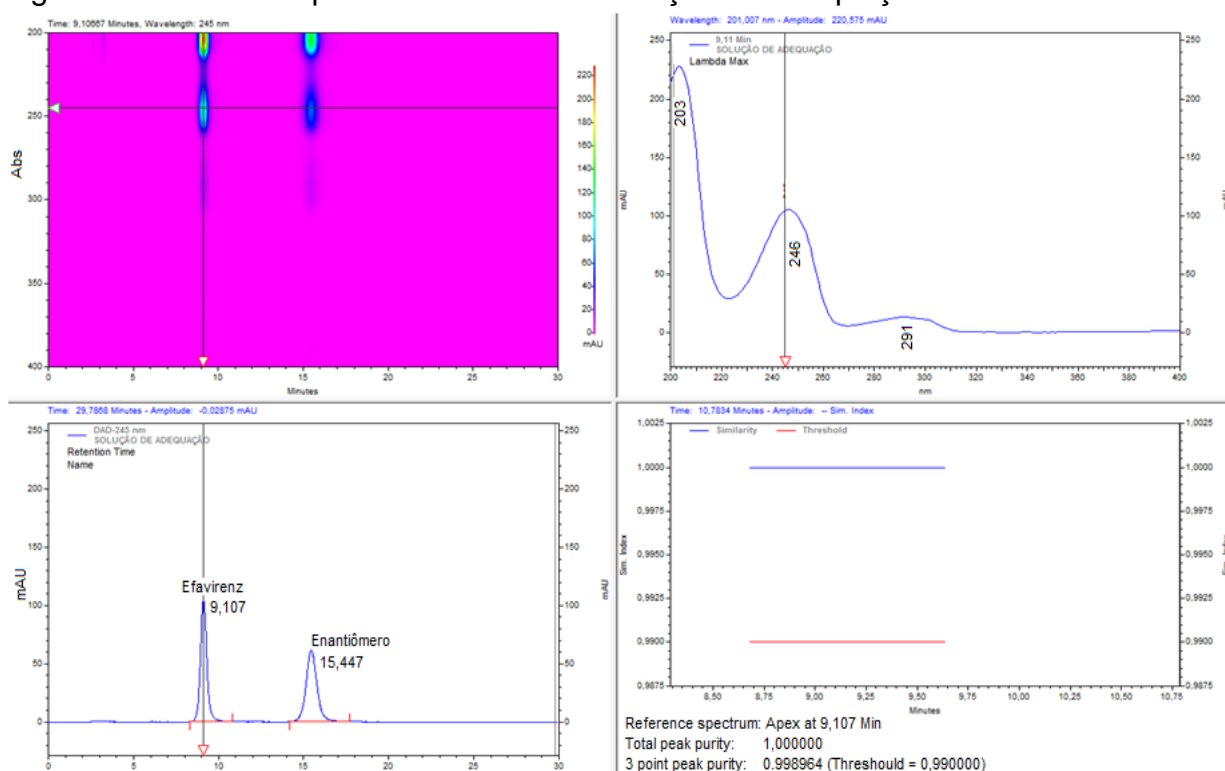
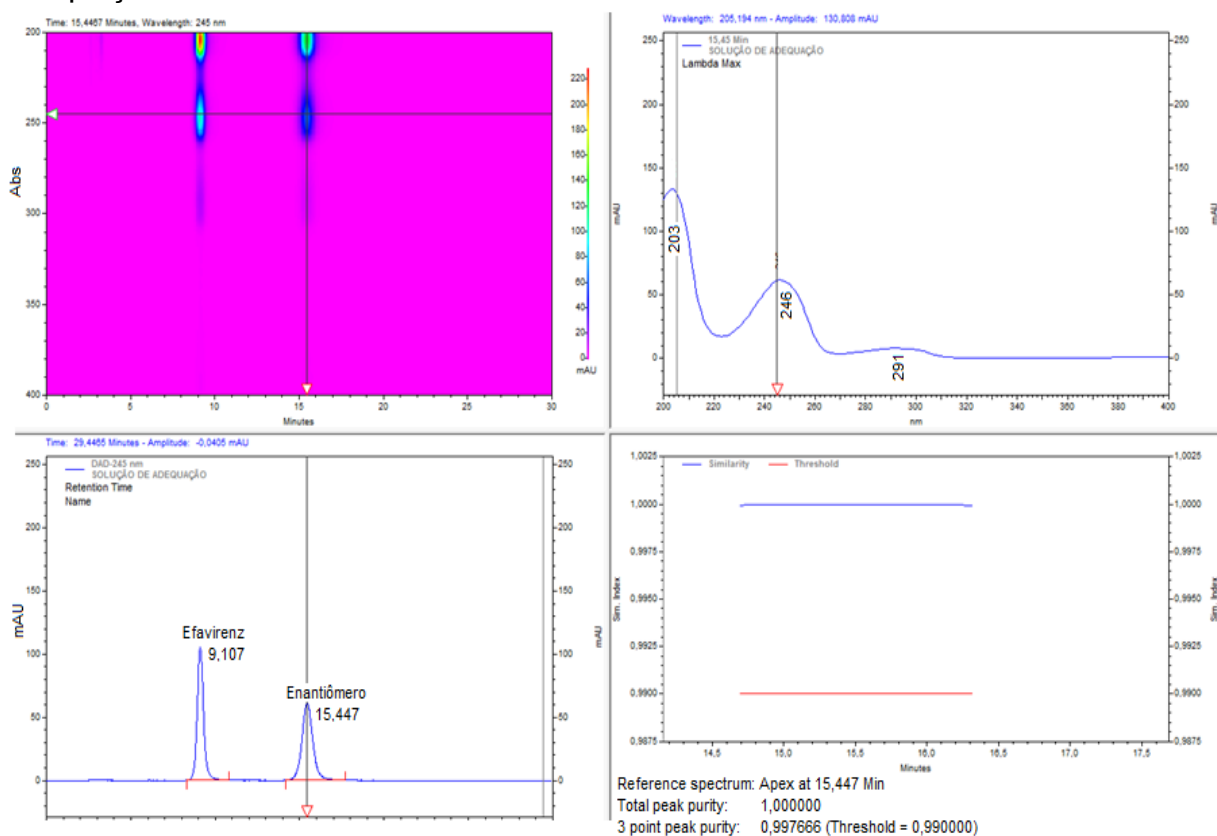


Figura 34: Pureza de pico do enantiômero (R) do efavirenz na solução de adequação do sistema.



A partir da análise das figuras 33 e 34 (página 123), observa-se que o valor do índice de pureza obtido tanto para o pico de efavirenz como do enantiômero foi de 1,000, os quais foram superiores ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). O resultado sugere se tratar de compostos puros, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção dos picos avaliados.

Conforme especificação do método desenvolvido por Farmanguinhos, o limite aceitável de enantiômero é de 1,0%, em todas as amostras analisadas não foi detectado o isômero R de efavirenz. Portanto, pode-se concluir que as amostras estão enantiomericamente puras.

#### 6.2.4 Solventes Residuais

O teste de solventes residuais é conduzido para avaliar a quantidade de solvente orgânico presente em um determinado IFA ou formulação, segundo concentração permitida pela legislação. Estes testes não são, geralmente, mencionados em monografias específicas, pois os solventes empregados variam de um fabricante a outro (USP, 2013b). No Brasil, o teste de solventes residuais tornou-se obrigatório através da Resolução RDC nº 57/2009, que visa regulamentar o registro de insumos farmacêuticos ativos.

Uma das técnicas mais utilizadas para analisar a presença ou ausência de solventes residuais é a de cromatografia gasosa de alta resolução empregando um amostrador automático (*headspace*). Esta técnica é suficientemente sensível para detectar a presença ou não destes solventes residuais (JACQ et al., 2008).

Como cada fabricante utiliza um tipo de solvente na rota de síntese, os resultados foram analisados separadamente para cada fabricante, tendo como base o certificado de análise de cada lote fornecido pelo fabricante.

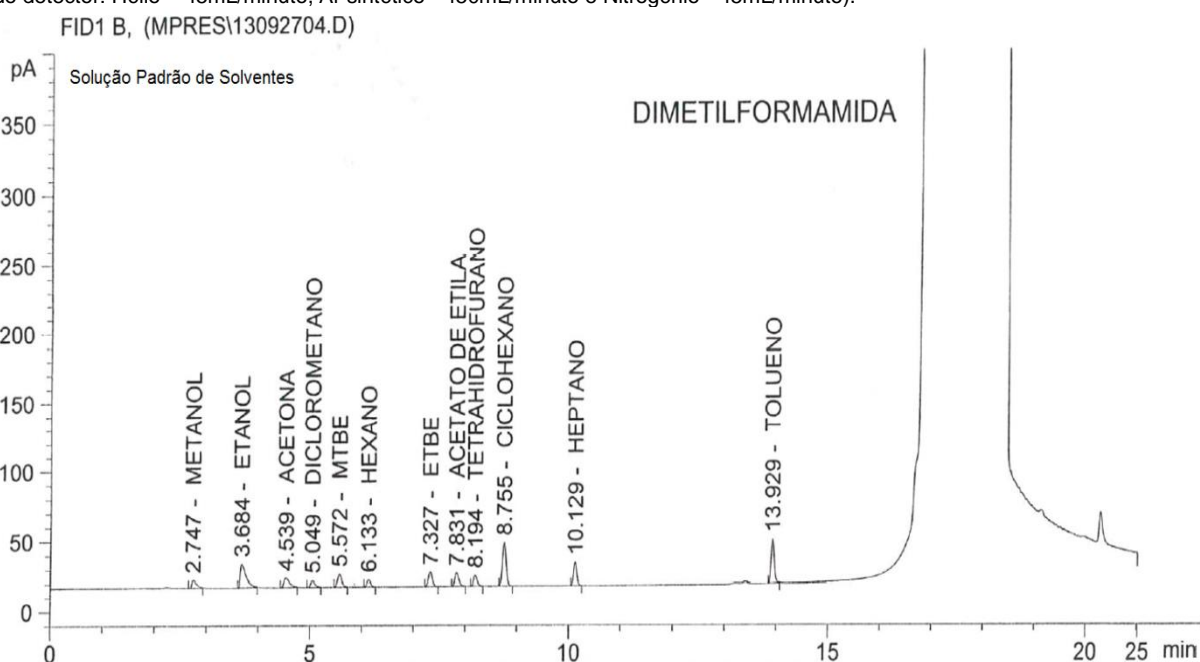
Nas análises das amostras do fabricante A foram investigados os seguintes solventes: cicloexano, t-butil-etil-éter e isopropanol; nenhum dos solventes foi detectado, estando dentro da especificação do fabricante (máximo de 3880ppm para cicloexano e máximo de 0,5% para t-butil-etil-éter e para o isopropanol).

O fabricante B tem como solventes de síntese o etanol, t-butil-metil-éter (MTBE), heptano e tolueno e nas três amostras analisadas nenhum desses solventes foi detectado, estando o resultado dentro da especificação do fabricante (máximo de 2400ppm para o etanol, máximo de 2000ppm para o MTBE, máximo de 5000ppm para o heptano e máximo de 890ppm para o tolueno).

Os solventes de síntese do fabricante C são o hexano e o tolueno, e suas especificações são máximo de 290ppm e máximo de 890ppm, respectivamente. O único solvente detectado foi o tolueno (109ppm) presente somente na amostra C – 9 (Figura 36, página 126). Como todas as outras amostras não tiveram nenhum dos solventes detectados, conclui-se que os resultados dos lotes do fabricante C também foram inferiores à especificação.

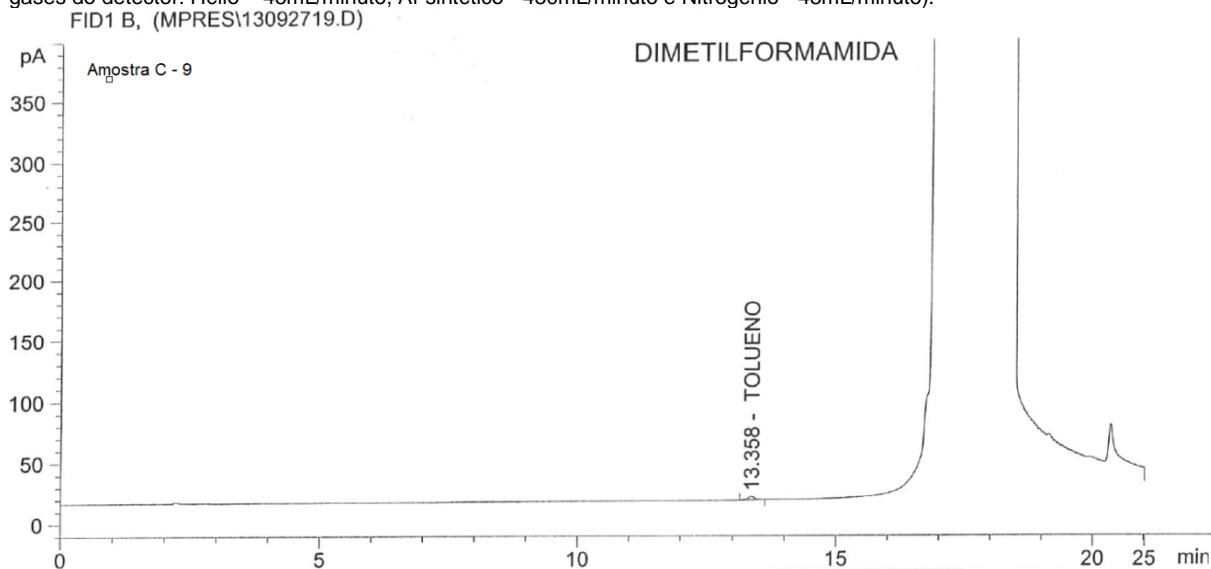
**Figura 35: Cromatograma da solução padrão do teste de solventes residuais.**

(condições cromatográficas – coluna: DB-624 - 30m x 0,32mm x 1,8 $\mu$ m; gás de arraste: Hélio; gradiente isocrático; fluxo: 1,8 ml/minuto; temperatura do forno: Isoterma de 40°C por 5 minutos - rampa 1: 5°C/minuto até 120°C - rampa 2: 20°C/minuto até 200°C, isoterma de 3 minutos e detector: Ionização em chama a 200°C; programação dos fluxos de gases do detector: Hélio – 45mL/minuto, Ar sintético - 450mL/minuto e Nitrogênio - 45mL/minuto).



### Figura 36: Cromatograma da solução amostra C – 9 do teste de solventes residuais.

(condições cromatográficas – coluna: DB-624 - 30m x 0,32mm x 1,8µm; gás de arraste: Hélio; gradiente isocrático; fluxo: 1,8 ml/minuto; temperatura do forno: Isoterma de 40°C por 5 minutos - rampa 1: 5°C/minuto até 120°C - rampa 2: 20°C/minuto até 200°C, isoterma de 3 minutos e detector: Ionização em chama a 200°C; programação dos fluxos de gases do detector: Hélio – 45mL/minuto, Ar sintético - 450mL/minuto e Nitrogênio - 45mL/minuto).



## 6.3 Análises Físico-químicas

### 6.3.1 Teor de água

Muitos insumos farmacêuticos encontram-se na forma hidratada ou contêm água adsorvida, tornando-se relevante sua determinação por métodos específicos como o método titulométrico por Karl Fischer.

A monografia do efavirenz na Farmacopeia Brasileira (2010a) determina que a matéria-prima pode apresentar no máximo 0,5% de teor de água por titulação de Karl Fischer. Todas as amostras apresentaram resultados abaixo do especificado para o referido ensaio. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 23 (página 127).

Tabela 23: Resultados de teor de água por titulação de Karl Fischer, em todos os tempos de análise, das amostras de efavirenz acondicionadas em dessecador e geladeira.

Amostras	Acondicionamento	Inicial (%)	1º mês (%)	3º mês (%)	6º mês (%)	9º mês (%)	12º mês (%)
A - 1	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
	Geladeira		0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
A - 2	Dessecador	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
	Geladeira		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
A - 3	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
B - 4	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
B - 5	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	Geladeira		0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
B - 6	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C - 7	Dessecador	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Geladeira		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C - 8	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C - 9	Dessecador	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Geladeira		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Analisando a tabela 23, observa-se que as amostras acondicionadas em geladeira tiveram valores de teor de água superiores aos encontrados nas amostras do dessecador, exceto as amostras do fabricante C que tiveram o mesmo comportamento nas duas condições de armazenamento. Portanto, pode-se supor que a geladeira, por ser um ambiente úmido, pode estar favorecendo a adsorção de água na amostra.

### 6.3.2 Rotação específica a 20°C

Muitas substâncias farmacêuticas são opticamente ativas, logo desviam a luz plano-polarizada de modo que a luz transmitida é desviada em um determinado ângulo em relação à incidente. Um dos enantiômeros desvia a luz plano-polarizada para a direita (+) e é chamado de dextrógiro; o antípoda desvia para a esquerda (-) e é conhecido como levógiro. O ângulo desse desvio é igual em módulo para os enantiômeros, porém com sinais opostos (Farmacopeia Brasileira, 2010b).

A polarimetria é a medição do poder rotatório de uma substância e é um dos métodos mais práticos para distinguir os enantiômeros e, portanto, é um importante critério de identificação, caracterização e de determinação de pureza enantiomérica dos fármacos. O poder rotatório varia com a temperatura, o comprimento de onda da luz incidente, o solvente utilizado, a natureza da substância e sua concentração (Farmacopeia Brasileira, 2010b).

De acordo com a esta mesma referência, o teste de rotação específica do efavirenz tem como especificação a faixa de  $-86^{\circ}$  a  $-98^{\circ}$ . Todas as amostras analisadas estão dentro do limite especificado e os resultados estão apresentados na tabela 24.

Tabela 24: Resultados da rotação específica a 20°C de todos os lotes analisados.

<b>Fabricante A</b>		<b>Fabricante B</b>		<b>Fabricante C</b>	
<b>Lote</b>	<b>Resultado (°)</b>	<b>Lote</b>	<b>Resultado (°)</b>	<b>Lote</b>	<b>Resultado (°)</b>
1	- 94	4	- 95	7	- 94
2	- 95	5	- 96	8	- 96
3	- 89	6	- 88	9	- 95

Os resultados do teste de rotação específica confirmam que só se tem um enantiômero nas amostras, assim como já foi verificado no teste de excesso enantiomérico, os lotes analisados encontram-se enantiomericamente puros.



### 6.3.3 Cinzas sulfatadas

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico, conforme a técnica especificada. Em geral, o ensaio visa a determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidos em substâncias orgânicas (Farmacopeia Brasileira, 2010b).

Em todos os lotes analisados dos diferentes fornecedores não foram encontradas nenhuma cinzas, sendo o resultado de zero para todos os IFAs, estando de acordo com a especificação de no máximo 2,0% que é o limite preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010a).

### 6.3.4 Metais pesados

O ensaio limite de metais pesados consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações amostra e padrão em tubo de Nessler. O ensaio é semiquantitativo e possibilita inferir se a amostra passa ou não no teste.

Todas as amostras analisadas foram preparadas segundo o teste de ensaio limite de metais pesados proposto pela Farmacopeia Brasileira (2010a), os resultados foram satisfatórios uma vez que apresentaram limite inferior a 0,02%, como o especificado na referência utilizada (máximo 0,02% - 20ppm).

## **6.4 Avaliação da estabilidade das soluções**

A estabilidade das soluções foi avaliada com a análise da solução-mãe do padrão de referência de efavirenz e a solução padrão diluída. Estas soluções foram analisadas segundo os métodos de teor e substâncias relacionadas, descritos no item 5.3.2.1 (Página 73). As soluções dos padrões foram injetadas imediatamente após seu preparo e 24 horas depois da estocagem à temperatura ambiente e em

geladeira. A diferença percentual entre as áreas médias do efavirenz nas soluções foram avaliadas e, caso a diferença fosse menor que  $\pm 2\%$ , seria realizada uma verificação diária até que a diferença ultrapassasse esse limite. Esse procedimento foi realizado tanto para soluções padrões do teste de teor como para as soluções padrões do teste de substâncias relacionadas.

#### 6.4.1 Soluções diluídas do teste de teor

Nas tabelas 25 e 26 encontram-se os resultados das diferenças percentuais das áreas após análise da solução diluída, à temperatura ambiente (18 a 25°C) e em geladeira (2 a 8°C), do padrão de teor do efavirenz, respectivamente.

Tabela 25: Resultados do teste de estabilidade da solução padrão diluída do teste de teor armazenada à temperatura ambiente (18 a 25°C).

Injeções	Resultados (Áreas)			
	0h	24h	48h	72h
1	4073222	4106462	4138757	4147894
2	4052858	4100488	4120029	4161101
3	4053203	4105774	4132976	4149235
<b>Média</b>	4059761	4104241	4130587	4152743
<b>DPR (%)</b>	0,29	0,08	0,23	0,18
<b>Diferença (%)</b>	xxx	1,10	1,74	2,29

Tabela 26: Resultados do teste de estabilidade da solução padrão diluída do teste de teor armazenada em geladeira (2 a 8°C).

Injeções	Resultados (Áreas)			
	0h	24h	48h	72h
1	4109273	4144725	4170484	4201683
2	4102700	4137950	4170864	4209866
3	4105314	4142799	4170456	4208435
<b>Média</b>	4105762	4141825	4170601	4206661
<b>DPR (%)</b>	0,08	0,08	0,01	0,10
<b>Diferença (%)</b>	xxx	0,88	1,58	2,46

Após avaliar os dados das tabelas 25 e 26 (Página 130), pode-se afirmar que para as duas soluções avaliadas as diferenças percentuais entre as áreas médias obtidas foi inferior a  $\pm 2\%$  até o tempo de 48 horas. Esse limite de  $\pm 2\%$  foi adotado a partir do procedimento de validação de métodos analíticos do laboratório de controle de qualidade de Farmanguinhos.

Portanto, as soluções analíticas diluídas de efavirenz teor podem ser analisadas em até 48 horas (2 dias) após seu preparo, quando guardadas em geladeira (2 a 8°C) ou sob temperatura ambiente (18 a 25°C).

#### 6.4.2 Solução-mãe do teste de teor

Após uma semana de preparo da solução-mãe, foi avaliada a estabilidade dessa solução armazenada em geladeira, o teste decorreu diariamente após sete dias, até a diferença percentual das áreas da solução estar dentro do limite de  $\pm 2\%$ . Os resultados são observados na tabela 27.

Tabela 27: Resultados do teste de estabilidade da solução padrão mãe do teste de teor armazenada em geladeira (2 a 8°C).

Injeções	Resultados (Áreas)			
	0h	7 dias	8 dias	9 dias
1	4109273	4143955	4189762	4190417
2	4102700	4145681	4183004	4193387
3	4105314	4137390	4187427	4191869
<b>Média</b>	4105762	4142342	4186731	4191891
<b>DPR (%)</b>	0,08	0,11	0,08	0,04
<b>Diferença (%)</b>		0,89	1,97	2,10

As soluções analíticas concentradas do teste de teor podem ser analisadas em até oito dias após seu preparo, desde que acondicionadas em geladeira (2 a 8°C).

### 6.4.3 Soluções do teste de substâncias relacionadas

Como a solução diluída do padrão de efavirenz no teste de substâncias relacionada tem uma concentração baixa (0,00125mg/mL), sua estabilidade foi avaliada a 1, 3, 6, 9, 12 e 15h após seu preparo. Já a solução-mãe foi armazenada em geladeira e após 24h foi diluída e analisada. Na tabela 28 encontram-se os resultados das diferenças percentuais das áreas das soluções padrão do teste de substâncias relacionadas.

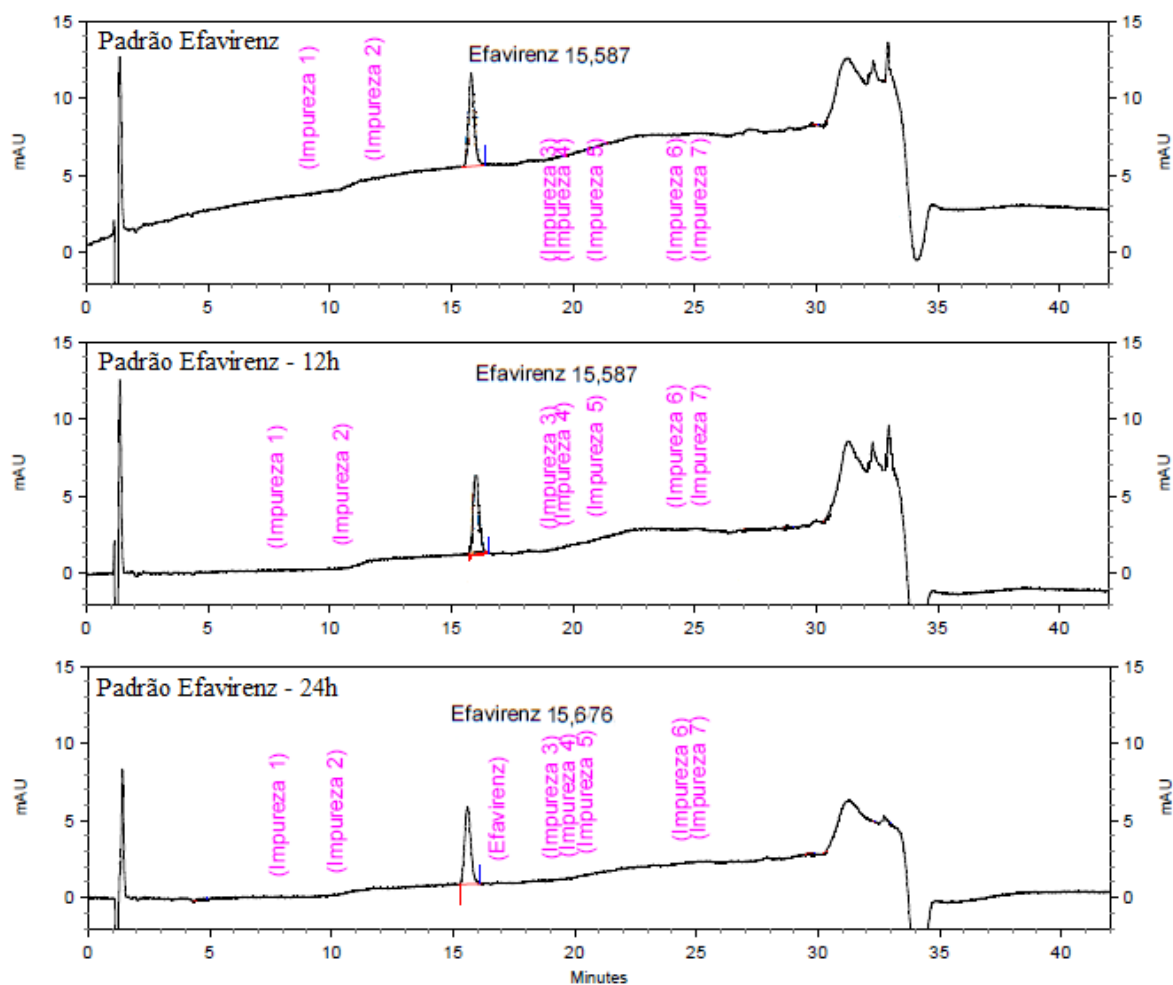
Tabela 28: Resultados do teste de estabilidade das soluções padrão do teste de teor substâncias relacionadas.

Injeções	Resultados (Áreas)							
	Mesma diluição							Nova diluição
	0h	1h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
1	451392	459328	450710	450875	449973	447668	432727	385169
2	467917	448410	441139	450922	448736	446905	428238	384781
3	449116	449865	450987	440813	446809	447226	439606	397625
<b>Média</b>	456141	452534	447612	447537	448506	447266	433524	389191
<b>DPR (%)</b>	2,25	1,31	1,25	1,30	0,36	0,09	1,32	1,88
<b>Diferença (%)</b>		-0,79	-1,87	-1,89	-1,67	-1,95	-4,96	-14,68

Foi relatado por Montgomery, em 2001, que as soluções padrão de compostos relacionados de efavirenz foram estáveis por até nove dias e a mudança na resposta da área do pico efavirenz para os padrões de ensaio com mais de 216 horas foi maior que 2,0%. Porém, Ribeiro e colaboradores (2007) verificaram que as soluções preparadas para o ensaio de efavirenz substâncias relacionadas devem ser analisadas imediatamente após preparação.

Nesse mesmo trabalho, os autores relatam que embora as áreas dos picos de efavirenz e das impurezas SR695, SP234 e SE563 não sofreram alterações, as áreas dos picos de álcool amino e quinolina aumentaram significativamente durante 24 horas. Porém, na solução padrão analisada não houve alteração no padrão de impurezas (Figura 37, página 133).

Figura 37: Perfil de impurezas ao longo da estabilidade da solução padrão de substâncias relacionadas.



Com base nos resultados da tabela 28 (Página 132) e no trabalho de Ribeiro e colaboradores (2007) pode-se concluir que as soluções analíticas do teste de substâncias relacionadas, tanto as concentradas como as diluídas, só podem ser analisadas até 12 horas após seu preparo.

## 7 Considerações Finais

O trabalho realizado propôs uma lógica de avaliação da estabilidade de IFAs candidatos a padrão secundários satisfatória, uma vez que além das análises exigidas pela literatura de referência foram utilizadas técnicas complementares que colaboraram para as conclusões tomadas.

Segundo a RDC nº 17 de 2010, os procedimentos analíticos utilizados para caracterizar um padrão de referência não se devem basear apenas em testes de comparação a um padrão de referência anteriormente caracterizado. Esses procedimentos devem ser qualitativamente e quantitativamente mais extensos do que os utilizados para controlar a identidade, teor, qualidade, pureza e potência do fármaco ou medicamento.

Apesar de ser um trabalho extenso e demorado, é extremamente vantajoso para o laboratório uma vez que pode garantir resultados de alta confiabilidade analítica, somado ao conhecimento mais aprofundado de todo o seu portfólio de trabalho.

## 8 CONCLUSÃO

Diante de todos os resultados obtidos neste trabalho, muitas conclusões puderam ser tomadas em relação à matéria-prima efavirenz candidata a padrão secundário e foi possível avaliar as nuances entre os três fabricantes avaliados, além das duas condições de armazenamento (dessecador e geladeira).

Para a caracterização da matéria-prima foram utilizadas técnicas termoanalíticas, espectroscópicas e difração de raios X de pó. Nas análises espectroscópicas todos os IFAs foram confirmados frente ao padrão de referência, comprovando a identidade química das moléculas e nenhum espectro no IV indicou formação de ligações de hidrogênio. Os resultados encontrados na difratometria de raios X e com DSC, confirmam que as amostras são do polimorfo I, o mais estável. Além disso, a análise por termogravimetria confirma que as amostras correspondem a materiais anidros, eliminando a existência de formas solvatadas.

As análises cromatográficas das dezoito amostras analisadas apresentaram resultados dentro das especificações da matéria-prima, exceto as duas condições de armazenamento da amostra C – 7 que, no 15º mês, apresentou resultado de teor fora do especificado na Farmacopeia Brasileira (2010a).

Com relação ao teste de teor, nenhum dos fabricantes apresentou resultado para todas as amostras dentro da proposta descrita na fundamentação teórica, que é uma variação máxima de DPR de 0,5% para teores acima de 98%. Com isso, todas as amostras do fabricante A devem ser repadronizadas antes de um ano, assim como as amostras B – 4 (dessecador), B – 6 (geladeira), C – 7 (dessecador e geladeira) e C – 9 (dessecador) dos outros dois fabricantes.

Ao longo do estudo de estabilidade de substâncias relacionadas todas as amostras (dessecador e geladeira), apresentaram um total de impurezas de aproximadamente 0,1%, exceto as amostras B – 4 (dessecador) e C – 7 (dessecador e geladeira), cujo total foi de aproximadamente 0,3%. Para a amostra B – 4 esse aumento é resultado do aumento das impurezas 2 e 4. Já a amostra C – 7 apresenta uma soma de impurezas alta devido à presença da quinolina, com um teor de 0,15% desde o início do estudo, o que não foi observado nas outras amostras analisadas.

O teste de substâncias relacionadas foi importante não só pelo caráter quantitativo como pelo qualitativo, no qual foi possível verificar as diferenças entre cada fabricante, uma vez que são sintetizadas de maneiras diferentes e apresentam impurezas diferentes entre si. Ao compararmos as impurezas presentes nos três fabricantes avaliados, nenhum dos lotes apresentou a impureza principal mencionada no método da Farmacopeia Brasileira (2010a), que é o trans-alqueno. Considerando as outras duas impurezas mais conhecidas, a quinolina está presente em todos os fabricantes enquanto o amino álcool só não está presente no fabricante B. Em relação às demais impurezas, cada fabricante tem sua particularidade, como no caso do fabricante A que é o único que apresenta todas as impurezas descritas na literatura. Já a impureza 4 só está presente no IFA do fabricante B.

Com os resultados do teste de estabilidade de solução padrão, conclui-se que as soluções diluídas do teste de teor só podem ser utilizadas em até 48 horas após seu preparo, quando guardadas em geladeira (2 a 8°C) ou sob temperatura ambiente (18 a 25°C). Já as soluções concentradas desse mesmo teste podem ser analisadas em até oito dias após seu preparo, desde que acondicionadas em geladeira. Para as soluções do teste de substâncias relacionadas, tanto as concentradas como as diluídas, o tempo máximo de utilização é de 12 horas após seu preparo.

Em relação ao acondicionamento da matéria-prima candidata a padrão foram poucas as variações observadas nos testes de perda por secagem e no teste de titulação de Karl Fischer.

No teste de perda por secagem, ao se comparar as amostras do dessecador com as da geladeira, observa-se que das nove amostras do dessecador somente duas, do fabricante C, apresentaram percentual de perda de massa maior que 0,1%. As nove amostras de geladeira tiveram o resultado de 0,2%, exceto a amostra A – 2 que, ao final dos 12 meses, apresentou 0,1% de perda de umidade. O mesmo foi observado na análise titulométrica por Karl Fischer, as amostras acondicionadas em geladeira tiveram valores de teor de água superiores aos encontrados nas amostras do dessecador, exceto as amostras do fabricante C que tiveram o mesmo comportamento nas duas condições de armazenamento.

Além disso, não houve grande diferença nos testes de teor e de substâncias relacionadas quando comparadas as duas condições de armazenamento. Portanto,



a melhor condição de armazenamento do IFA de efavirenz é em dessecador (18 a 25°C e UR < 75%).

Como conclusão final do trabalho, frente a todos os resultados obtidos, o fabricante B é o melhor candidato a padrão secundário, pois foi o que apresentou menor teor de impurezas totais e individuais e menores variações no teor e na perda por secagem. Além disso, todas as amostras do fabricante A devem ser repadronizadas antes de um ano, o que não é vantajoso para o laboratório de controle de qualidade. O fabricante C, apesar de ter só quatro impurezas, apresenta teores maiores quando comparado ao fabricante B. Segundo a ANVISA (2010), um padrão de referência não adquirido de uma farmacopeia reconhecida deve ser do mais elevado grau de pureza possível e cuidadosamente caracterizado, a fim de garantir identidade, teor, qualidade, pureza e potência.

Após a escolha do melhor fabricante do IFA para padrão secundário e com base nos resultados obtidos dessas amostras, pode-se determinar que o prazo de validade do Efavirenz do fabricante B potencialmente selecionado como padrão secundário é de um ano, podendo ser estendido com a continuação do trabalho.

O trabalho deixa ainda como perspectivas o possível desenvolvimento de um protocolo de avaliação da estabilidade de substâncias candidatas a padrão que poderá servir como base para os demais IFAs do portfólio de Farmanguinhos, com a finalidade de garantir cada vez mais a confiabilidade analítica dos testes realizados pelo controle de qualidade. O conhecimento adquirido com o teste de impurezas relacionadas pode servir como ajuda para o grande desafio que o laboratório de controle de qualidade tem em relação ao estudo de degradação forçada exigido pela ANVISA para todos os produtos registrados. Além disso, o trabalho apresenta dados que podem ser utilizados no estudo de estabilidade de frascos abertos de padrões que também foi exigido pela Vigilância Sanitária na última inspeção realizada.

## 9 BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, N.; BYARD, S. J. Photostability Testing: Design and Interpretation of Tests on New Drug Substances and Dosage Forms. **Photostability of Drugs and Drug Formulations**, p.137, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Consulta Pública nº 68**, de 29 de agosto de 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº58**, de 20 de dezembro de 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 45**, de 9 de agosto de 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 17**, de 16 de abril de 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 57**, de 17 de novembro de 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RE nº 01**, de 29 de julho de 2005.

ANVISA. **Substâncias químicas de referência – Breve histórico das SQR no Brasil**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira.htm> - Acessado em 10/10/2013.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. Taylor & Francis, 2005.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods — critical review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.28, n.6, p.1011–1040, 2002.

BLACHÉRE, J. R.; BRITAIN, H. G. X-Ray Diffraction Methods for the Characterization of Solid Pharmaceutical Materials. In: ADEYEYE, M. C.; BRITAIN, H. G. **Preformulation in Solid Dosage Form Development**. Cap. 3.4. New York: Informa Helthcare Usa Inc., p.229-254, 2008.

BOND, E. W.; SAGGI, K. Compulsory licensing, price controls, and access to patented foreign products. **Journal of Development Economics**, v.109, p.217–228, 2014.

BRASIL. Decreto nº 7.723/2012. **Diário Oficial da União** de 05 de abril de 2012.

BRITAIN, H. G. Spectroscopic Methods for the Characterization of Drug Substances. In: ADEYEYE, M. C.; BRITAIN, H. G. **Preformulation in Solid Dosage Form Development**. Cap. 3.5. New York: Informa Helthcare Usa Inc., p. 253-277, 2008.

BRITO, M. A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.2, p.159–168, 2011.

BROWNE, D. Reference-standard material qualification. **Pharmaceutical Technology**, v.33, n.4, p.66, 2009.

CAPUCHO, H. C.; MOSTROIANNI, P. C.; CUFFINI, S. Farmacovigilância no Brasil: a relação entre polimorfismo de fármacos, efetividade e segurança dos medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.3, p.277-283, 2008.

CHADHA, R.; ARORA, P.; SAINI A.; BHANDARI S. Crystal Forms of Anti-HIV Drugs: Role of Recrystallization. In: SZTWIERTNIA, K. **Recrystallization**. Cap.19. p.447-464, 2012a.

CHADHA, R.; ARORA, P.; SAINI A.; JAIN, D. S. An Insight into Thermodynamic Relationship Between Polymorphic Forms of Efavirenz. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.2, p.234-251, 2012b.

CHAVES, G.C. **Perguntas e Respostas Sobre o Licenciamento Compulsório do Medicamento Efavirenz no Brasil**. 2007. Disponível em: <[http://www.abiaids.org.br/\\_img/media/EFAVIRENZ.pdf](http://www.abiaids.org.br/_img/media/EFAVIRENZ.pdf)>. Acessado em: 23/11/2014.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, n.4, p.618-644, 2011.

COLOMBRINI, M. R. C.; LOPES, M. H. B. M.; FIGUEIREDO, R. M. Adesão à Terapia Antirretroviral para HIV/AIDS. **Revista da Escola de Enfermagem USP**, São Paulo, v.40, n.4, p.576-581, 2006.

COSTA, C.C.P.; BOECHAT, N.; SILVA, F.C.; ROSARIO, S.L.; BEZERRA, T.C.; BASTOS, M.M. O Efavirenz: Relação estrutura-atividade e métodos de síntese. **Revista Virtual de Química**. v.XX, n.XX (no prelo), 2015.

COUNCIL OF EUROPE. **The European Pharmacopoeia**, General Text 5.12. 5th ed. Strasbourg, 2008.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.1, p.42-57, 2004.

DE CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v.10, p.507-515, 2010.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of clinical virology**, v.30, p.115-133, 2004.

DE CLERCQ, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1587, p.258-275, 2002.

DESIRAJU, G. Polymorphism: The Same and Not Quite the Same. **Crystal Growth & Design**, v.8, n.1, p.3-5, 2008.

DESHMUKH, V.; MULIK, S.; DESHMUKH, T.; KASAT, K. Solubility Enhancement of Efavirenz Hydrochloride by Hot Melt Technique. **Current Pharma Research**, v. 1, n. 4, p. 320-336, 2011.

DOLAN, J. W. Stability-indicating assays. **LC GC North America**, v.20, n.4, p.346-349, 2002.

DOMINGOS, H. Efeitos Metabólicos Associados à Terapia Antirretroviral Potente em Pacientes com AIDS. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Convenio Rede Centro-Oeste UnB/UFMG/UFMS, Campo Grande, MS.

DONNELLY, J.R.; DREWES, L.A.; JOHNSON, R.L.; MUNSLOW, W.D.; KNAPP, K.K. Purity and heat of fusion data for environmental standards as determined by differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**. v.167, p.155-187, 1990.

DOOREN, A. A.; MÜLLER, B. W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC) - a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.20, p.217-233, 1984.

FAN, B.; STEWART, J. T. Determination of Stavudine/ Didanosine/ Saquinavir and Stavudine/Didanosine/Efavirenz in Human Serum By Micellar Electrokinetic Chromatography (Mekc). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.25, p.937-947, 2002.

FANDARUFF, C.; ARAYA-SIBAJA, A. M.; PEREIRA, R. N.; CAMPOS, C. E. M.; ROCHA, H. V. A.; MONTI, G. A.; MALASPINA, T. Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties. **Crystal Growth & Design**, v.14, n.10, p.4968-4975, 2014.

Farmacopéia Brasileira. **Efavirenz**. Volume: 2 – 5ª Edição, Brasília, 2010a.

Farmacopéia Brasileira. **Métodos Gerais**. Volume: 1 – 5ª Edição, Brasília, 2010b.

Farmacopéia Brasileira. **Substâncias Químicas de Referência**. Volume: 1 – 5ª Edição, Brasília, 2010c.

FDA - Food and Drug Administration. **FDA approves Efavirenz: Treatment information**. **SF AIDS Foundation**, 1999. Disponível em: [http://www.sfaf.org/treatment/efavirenz\\_approved.html](http://www.sfaf.org/treatment/efavirenz_approved.html). Acessado em: 10/10/2013.

FENG, W.; LIU, H.; CHEN, G.; MALCHOW, R.; BENNETT, F.; LIN, E.; PRAMANIK, B.; CHAN, T. Structural characterization of the oxidative degradation products of an antifungal agent SCH 56592 by LC-NMR and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.25, n.3-4, p.545-557, 2001.

FLORENCE A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**. 3ª Edição. São Paulo: Edusp; 2003.

FORD, N., WILSON, D., COSTA CHAVES, G., LOTROWSKA, M., KIJTIWATCHAKUL, K. sustaining access to antiretroviral therapy in the less-developed world: lessons from Brazil and Thailand. **AIDS**, v.21 n.4, p.S21-S29, 2007.

FORSYTH, R.; IP, D. Determination of imipenem and cilastatin sodium in Primaxin® by first order derivative ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.12, n.10, p.1243-1248, 1994.

GAO, J.; DING, L.; HU, C. A comparative uncertainty study of the purity assessment of chemical reference substances using differential scanning calorimetry (DSC) and mass balance method. **Thermochimica Acta**, v.525, n.1-2, p.1-8, 2011.

GIBSON, M. **Pharmaceutical Preformulation in Formulation**. 2<sup>a</sup> Ed., v. 199. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 541p., 2009.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, n.2, p.247-253, 2008.

Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. Disponível em: <<http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>>. Acessado em 17/10/2013.

HAMRAPURKAR, P.; PHALE, M.; SHAH, N. Quantitative estimation of Efavirenz by high performance thin layer chromatography. **Journal of Young Pharmacists**, 1: 359-363, 2009.

HAMRAPURKAR, P. D.; PATIL, P. S.; PHALE, M. D.; SHAH, N.; PAWAR, S. B. Optimization and Validation of RP-HPLC Stability-Indicating Method for Determination of Efavirenz and its Degradation Products. **International Journal Of Applied Science And Engineering**, v.2, n.8, p.155-165, 2010.

HOFER, J. D.; OLSEN, B. A.; RICKARD, E. C. Is HPLC assay for drug substance a useful quality control attribute? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, n.4, p.906-913, 2007.

HOIRISCH, C. Licença compulsória para medicamentos como política pública: o caso do antirretroviral Efavirenz. 2010. 184p. Dissertação (Mestrado em Gestão Empresarial) - Escola Brasileira de Administração Pública e de Empresas da Fundação Getúlio Vargas, Rio de Janeiro.

HUGHES, A.; BARBER, T.; NELSON, M. New treatment options for HIV salvage patients: An overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. **Journal of Infection**, p.1-10, 2008.

ICH. The International Conference on Harmonisation. **Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products**. Disponível em:

<[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1F/Stability\\_Guideline\\_WHO.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1F/Stability_Guideline_WHO.pdf)>. Acessado em 13/12/2014.

ICH-Q1A(R2). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products**, 2003.

ICH-Q1F. The International Conference on Harmonisation. **ICH Q1F guideline stability data package for registration in climatic zones III and IV**, 2003.

JACQ, K., DAVID, F., SANDRA, P. A generic method for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals using static headspace-GC-FID/MS. **Agilent Technologies publication**, 5989-9726EN, 2008.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in Stability Testing, with emphasis on stability drug distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.25, n.7, p.857 – 868, 1999.

LACHMAN, L.; DE LUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1277-1355, 2001.

LAGMANN, P.; SCHIRMER, D.; VATH, T.; ZILLY, M.; KLINKER, H. High-performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor Efavirenz in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.755, p.151-156, 2001.

LAVRA, Z. M. M. Obtenção Tecnológica de Antirretroviral Dose-Fixa Combinada à Base de Zidovudina, Lamivudina e Nevirapina. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LEITE, E. G. Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. 2005. 199p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

LEMMER, P.; SCHNEIDER, S.; SCHUMAN, M.; OMES, C.; ARENDT, V.; TAYARI, J. C. Determination of nevirapine and Efavirenz in plasma using GC/MS in selected ion monitoring mode. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.27, p.521-525, 2005.

LEVER, A. M. HIV: the virus. **Medicine**, v.33, n.6, p.1-3, 2005.

LIMA, S. A. Licença compulsória e acesso a medicamentos essenciais. In: *Lumen Juris* – Rio de Janeiro. ISBN 978-85-375-2326-1, p.153-169, 2013.

LOVDAHL, M. J.; PRIEBE, S. R. Characterization of clinafloxacin photodegradation products by LC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, n.2-3, p.521-534, 2000.

MA, K.; WANG, H.; ZHAO, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v.650, n.2, p.227-233, 2009.

MARTINS, E.M.O. Direito Internacional Sanitário: Licença Compulsória de Medicamentos Usados no Combate ao Vírus HIV/AIDS. Disponível em: <[http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n\\_link=revista\\_artigos\\_leitura&artigo\\_id=6841](http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=6841)> Acessado em: 23/11/2014.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, D.; MIN, D.; MARKOVICH, A.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, n.3, p.627-631, 2009.

MELO, A. C. C.; AMORIM, I. F.; CIRQUEIRA, M.L.; MARTINS F.T. Toward Novel Solid-State Forms of the Anti-HIV Drug Efavirenz: From Low Screening Success to Cocrystals Engineering Strategies and Discovery of a New Polymorph. **Crystal Growth & Design**, v.13, n.4, p.1558-1569, 2013.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p.16-22, 2001.



Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico 2014**. Ano III nº1. ISSN: 1517-1159. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/publicacao/2014/boletim-epidemiologico-2014>>. Acessado em 08/01/2015.

Ministério da Saúde. **Brasil renova licenciamento compulsório do Efavirenz - Desde 2009, a apresentação farmacêutica mais utilizada do Efavirenz passou a ser produzida no Brasil, na forma de genérico**. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/noticia/2012/brasil\\_renova\\_licenciamento\\_compulsorio\\_do\\_efavirenz](http://www.aids.gov.br/noticia/2012/brasil_renova_licenciamento_compulsorio_do_efavirenz)>. Acessado em: 23/11/2014a.

Ministério da Saúde. <<http://www.aids.gov.br>>. Acessado em: 09/04/2014b.

MOORE, D.E. Photochemistry of diuretic drugs in solution. In: ALBANI, A.; FASANI, E. **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, pp.100-115, 2006.

MONTGOMERY, E. R.; EDMANSON A. L.; COOK, S. C.; HOVSEPIAN, P. K. Development and validation of a reverse-phase HPLC method for analysis of Efavirenz and its related substances in the drug substance and in a capsule formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.25, n.2, p.267–284, 2001.

MORISSETTE, S. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.3, p.275-300, 2004.

MURAKAMI, F. S.; MENDES, C.; PEREIRA, R. N.; VALENTE, B. R.; FRANCHI, S. M.; SILVA, M. A. S. Estudo de estabilidade de comprimidos gastro-resistentes contendo 20 mg de omeprazol. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.5, p.645-652, 2009.

MURPHY, D. K; RABEL, S. Thermal Analysis and Calorimetric Methods for the Characterization of New Crystal Forms. In: ADEYEYE, M. C.; BRITAIN, H. G. **Preformulation in Solid Dosage Form Development**. Cap. 3.5. New York: Informa Healthcare Usa Inc., p.253-277, 2008.

NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v.33, n.3, p.335-377, 2003.

NIAZI, S.K. Handbook of Preformulation Chemical, Biological and Botanical Drugs. 1ªEd. New York: Informa Healthcare USA Inc., 445p., 2007.

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

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

OMS - Organização Mundial de Saúde - WHO HIV/AIDS Programme. Guia consolidado do uso de fármacos antirretrovirais para tratamento e prevenção do HIV. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85322/1/WHO\\_HIV\\_2013.7\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85322/1/WHO_HIV_2013.7_eng.pdf)>. Acessado em: 24/01/2015.

ORIQUI, L. R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P. Guia para determinação da estabilidade de produtos químicos. **Química Nova**, v.36, n.2, p.340–347, 2013.

PAVLA, D. L.; LAMPAM, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Ultraviolet Spectroscopy. In: PAVLA, D. L.; LAMPAM, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4ª Edição. Belmont: Books/cole, cap. 7., p. 381-417, 2009.

PENG, S. X. Hyphenated HPLC-NMR and its applications in drug discovery. **Biomedical Chromatography**, v.14, n.6, p.430-441, 2000.

PIERCE, M. E.; PARSONS, R. L. Jr.; RADESCA, L. A.; LO, Y. S.; ISLAM, Q.; SILVERMAN, S.; MOORE, J. R.; CHOUDHURY, A.; FORTUNAR, J. M. D.; NGUYEND, D.; LUO, C.; MORGAN, S. J.; WAYNE, P. D.; CONFALONE, P. N.; Practical Asymmetric Synthesis of Efavirenz (DMP 266), an HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor. **The Journal of Organic Chemistry**, v.63, n.23, p.8536–8543, 1998.

POMBAL, R.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R. Estabilidade dos medicamentos manipulados. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v.7, p.322-333, 2010.

PONTES. International Centre for Trade and Sustainable [homepage na internet]. **A primeira licença compulsória de medicamento na América Latina**, 2007. Disponível em: <<http://www.ictsd.org/bridges-news/pontes/news/a-primeira-licen%C3%A7a-compuls%C3%B3ria-de-medicamento-na-am%C3%A9rica-latina>> Acessado em: 23/11/2014.

Portal dos Fármacos. Disponível em:  
<[http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/atualidades\\_cristalia.html](http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/atualidades_cristalia.html)>. Acessado em:  
15/10/2013.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A.; RESENDE, J. A. L. C.; FERREIRA, G. B.; TEIXEIRA, A. M. R. F. An insight into carvedilol solid forms: effect of supramolecular interactions on the dissolution profiles. **Royal Society of Chemistry**, v.16, n.15, p.3168-3179, 2014.

PRADO, L. D. **Informe Pessoal**, 2014.

PUJERI, S. S.; KHADER, A. M. A.; SEETHARAMAPPA, J. Chiral Separation of Non-Nucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz by HPLC on Cellulose-Based Chiral Stationary Phase. **Journal of Food And Drug Analysis**, v.1, n.21, p.93-100, 2013.

QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G. **Developing Solid Dosage Forms**. 1ª Edição. New York: Elsevier Inc., 921p., 2009.

RADESCA, L.A.; MAURIN, M.B.; RABEL, S.R.; MOORE, J.R.; Bristol-Myers Squibb Pharma Company (US). **Crystalline Efavirenz**. US6,673,372 B1, 2004.

RAFFANTI, S.; HAAS, D. W.; **Antimicrobianos - Agentes Antirretrovirais**. In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª Edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p.1011-1033.

RARAS-NACENTA, M. S.; LOPZ-PUA, Y. L.; CORTES, L. F. L.; MALLOLAS, J.; GATELL, J. M.; CARNE, X. Determination of Efavirenz in human Plasma by high-performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.763, p.53-59, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, J. A.; CAMPOS, L. M. M.; ALVES, R. J.; LAGES, G. P.; PIANETTI, G. A. Efavirenz related compounds preparation by hydrolysis procedure: Setting reference standards for chromatographic purity analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.1, p.298–303, 2007.

RODRIGUES, E.C.V.; SOLER, O. Licença compulsória do Efavirenz no Brasil em 2007: contextualização. **Revista Panamericana de Saúde Pública**, v.26, n.6, p. 553-9, 2007.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.3, n.24, p.383-387, 2005.

ROY, Jiben. Pharmaceutical Impurities: A Mini-Review. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.2, n.3, article 6, p.1-8, 2002.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D. L.; RANGARI, V. K.; FASINA, O.; BABU, R. J. Physicochemical Characterization of Efavirenz–Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Aaps Pharmscitech**, v.10, n.1, p.81-87,2009.

SESHACHALAM, V.; NARASIMHA RAO, D. V. L.; CHANDRASEKHAR, K. B. Validated enantioespecific LC method for determination of (R)-enantiomer impurity in (S)-Efavirenz. **Pharmazie**, v.63, p.107-109, 2008.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography**, v.987, p.57–66, 2003.

SILVA, K. E. R. ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.7, p.12, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7ª Edição. Hoboken, New Jersey:John Wiley & Sons, Inc., 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. John Wiley & Sons, 1997.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

SOUZA, M. V. N. Fármacos inibidores de fusão: uma nova estratégia no combate à replicação do vírus HIV. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24, n.2, p.291, 2005.

STOEF, P. R.; GUZZI, S.; CARLETTO, M. S. LOBO, V. S.; ROSA, M. F. Caracterização e qualificação de diclofenaco de sódio como padrão secundário. **Acta Scientiarum Technology**, v.34, n.1, p.89–95, 2011.

USP – The United States Pharmacopeia, the national formulary – **General Chapter, 11. Reference Standards**. USP 36. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p.38-39, 2013a.

USP – The United States Pharmacopeia, the national formulary – **General Chapter, 467. Residual Solvents**. USP 36. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p.185, 2013b.

USP – The United States Pharmacopeia, the national formulary – **Official Monographs / Efavirenz**. USP 38. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p.3265 - 3268, 2015.

VELDKAMP, A. I.; HEESWIJK, R. P.; MEENHORST, P. L.; MULDER, J. W.; LANGE, J. M.; BEIJNEN, J. H.; HOETELMANS, R. M. Quantitative determination of Efavirenz (DMP 266), a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.734, p.55-61, 1999.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of drugs and dosage forms**. New York: Kluwer Academic: 268 p., 2002.

WEISSBURG, R. P.; MONTGOMERY, E. R.; JUNNIER, L. A.; SEGRETARIO, J.; COOK, S.; HOVSEPIAN, P. K. . Investigation of critical factors for the resolution of SR695, a key impurity, from Efavirenz in the reversed-phase assay of Efavirenz dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, n.1, p.45–56, 2002.

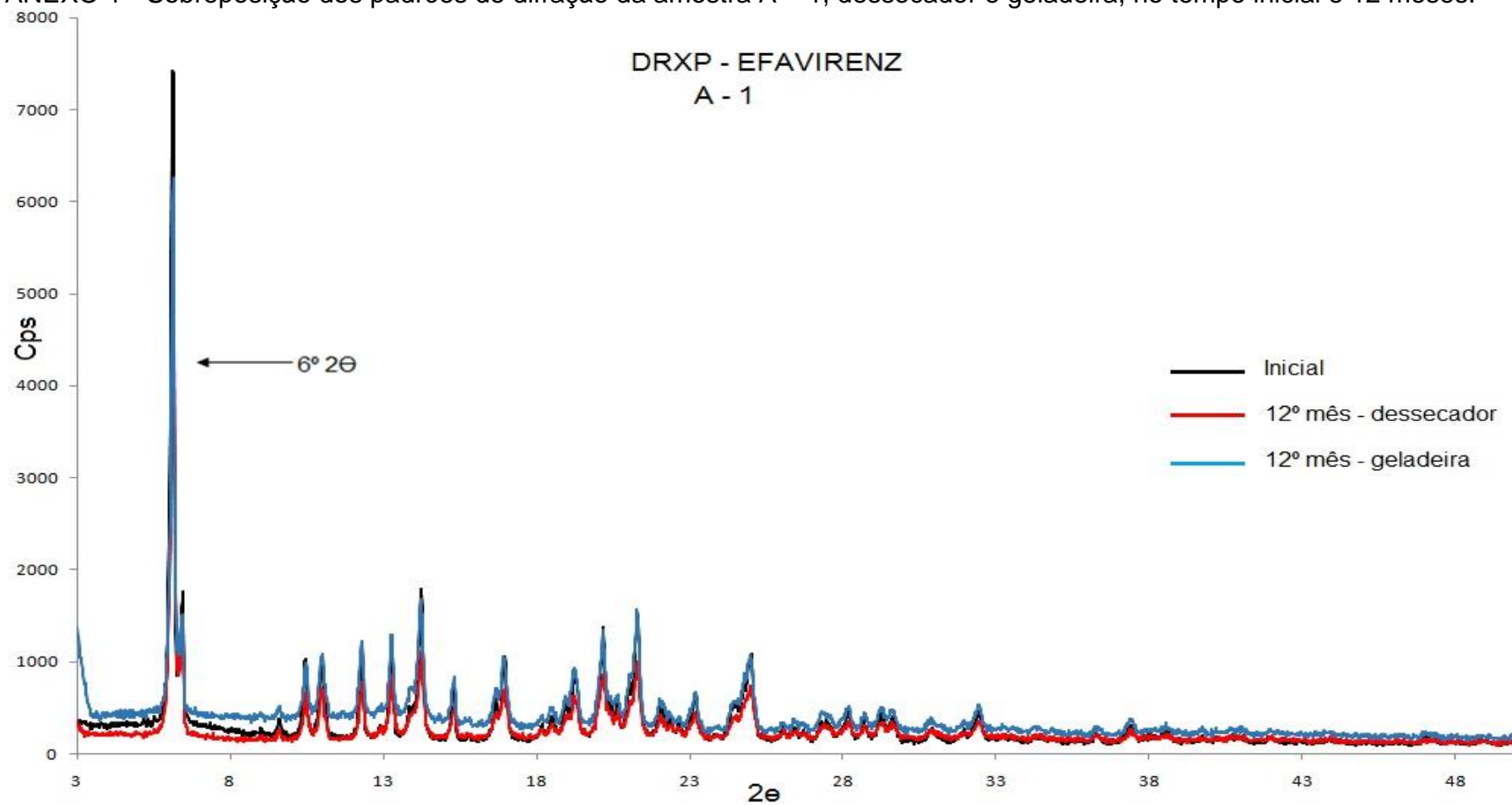
WHO-World Health Organization. **General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical references substances**. WHO Technical Reports Series, n. 885, Part A, 5. Genebra: World Health Organization, 1999.

WILLIAMS, R. L.; Project Team 4; Official USP reference Standards: metrology concepts, overview and scientific issues and opportunities (Review). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.3-15, 2006.

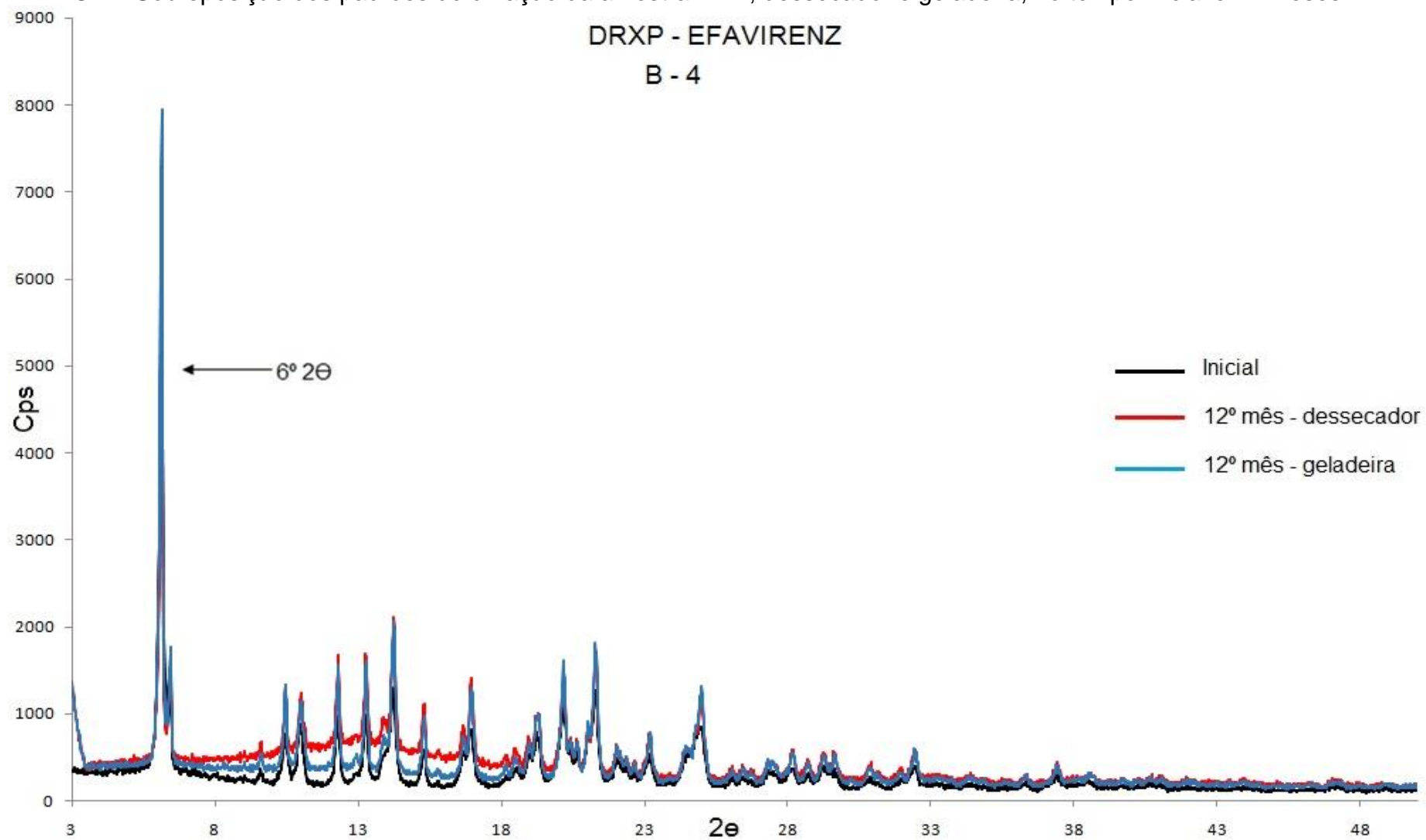
WOOLF, E. J.; MATHEWS, C. Z.; MAZENKO R. S.; WIENER, H.; ENG, C. M.; CONSTANZER, M.L.; DOSS, G. A.; MATUSZEWSKI, B.K. Determination of Efavirenz, a selective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using HPLC with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 28:925 - 934, 2002.

**ANEXOS**

ANEXO 1 - Sobreposição dos padrões de difração da amostra A – 1, dessecador e geladeira, no tempo inicial e 12 meses.

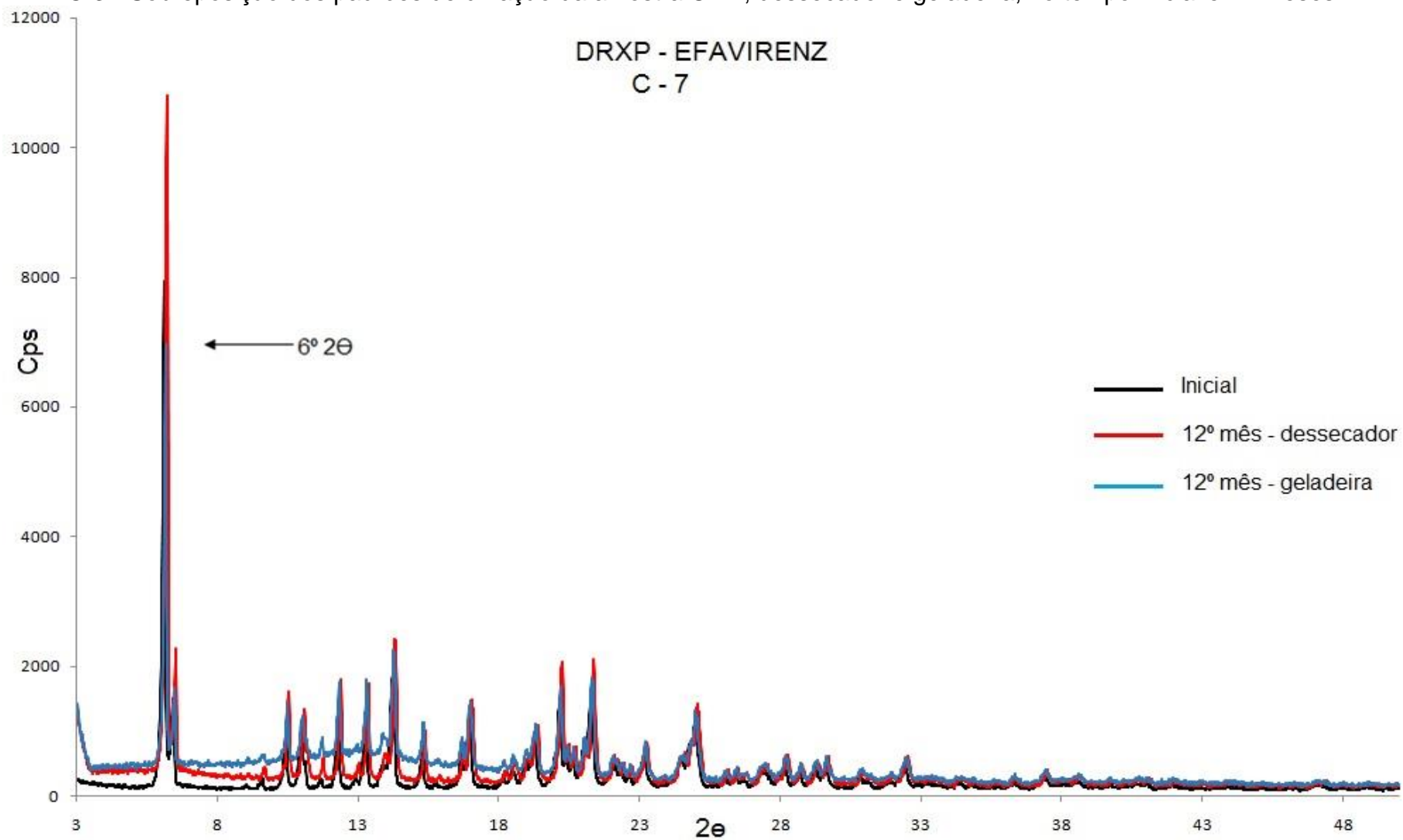


ANEXO 2 - Sobreposição dos padrões de difração da amostra B - 4, dessecador e geladeira, no tempo inicial e 12 meses.

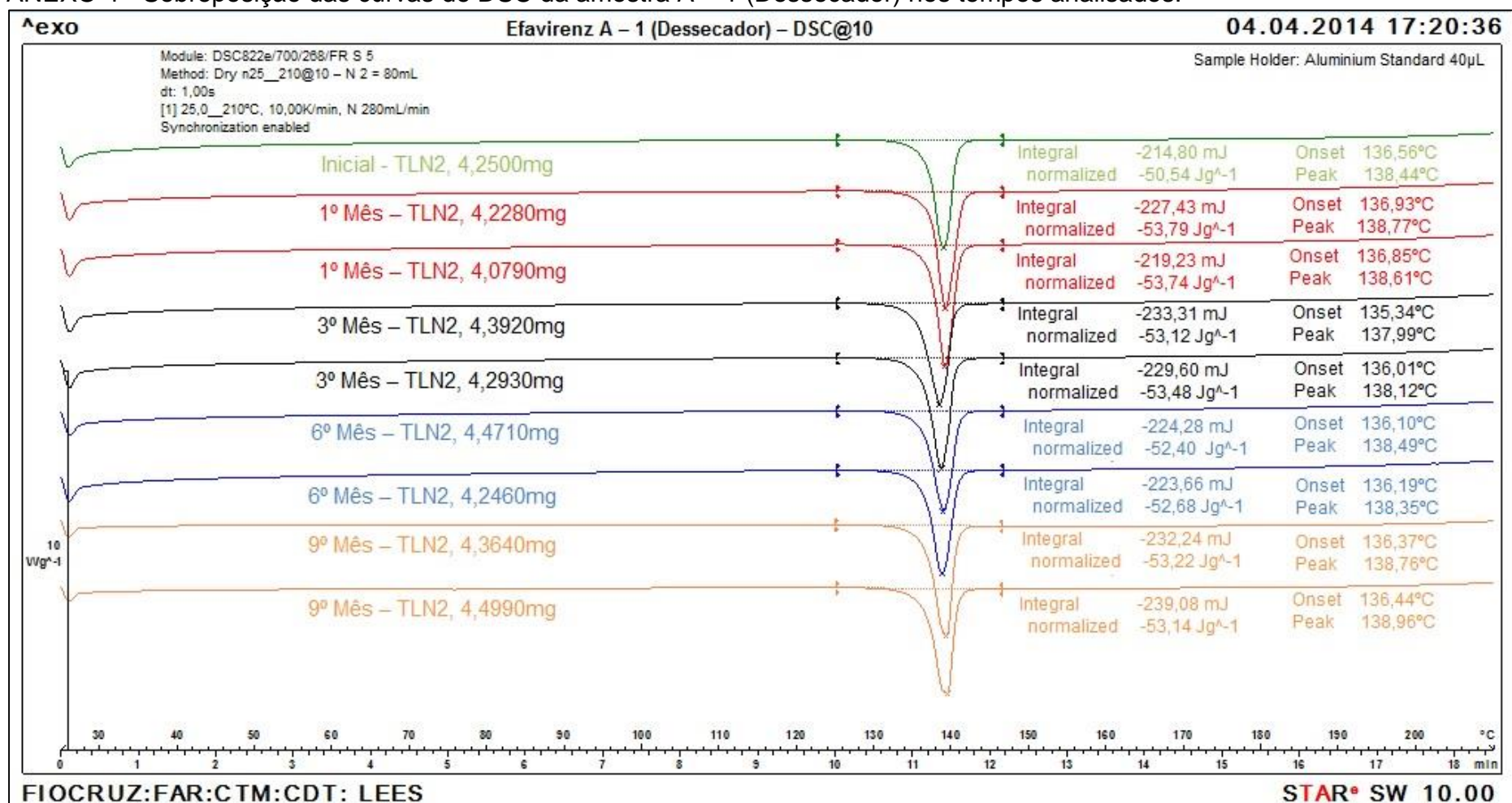




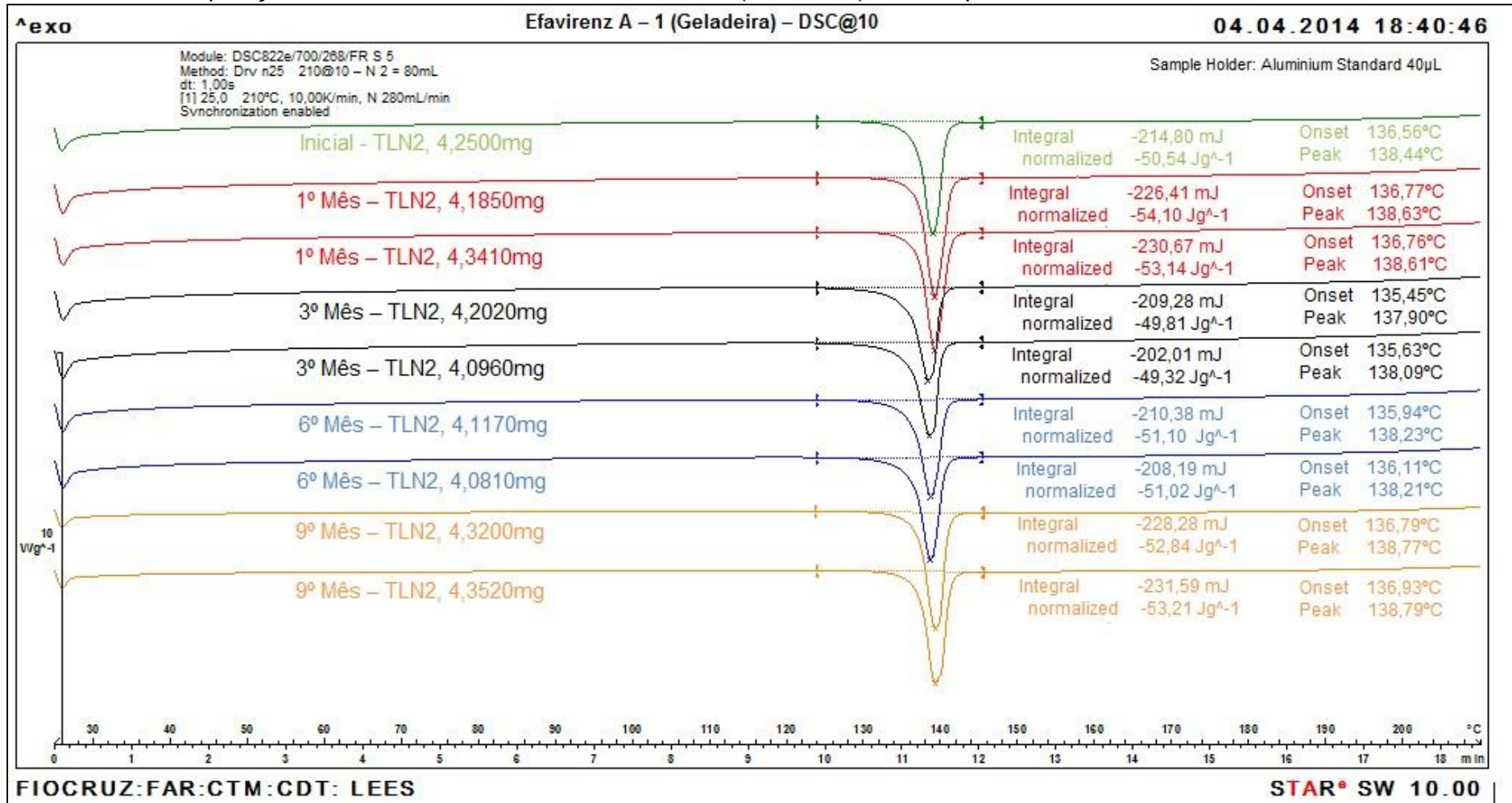
ANEXO 3 - Sobreposição dos padrões de difração da amostra C - 7, dessecador e geladeira, no tempo inicial e 12 meses.



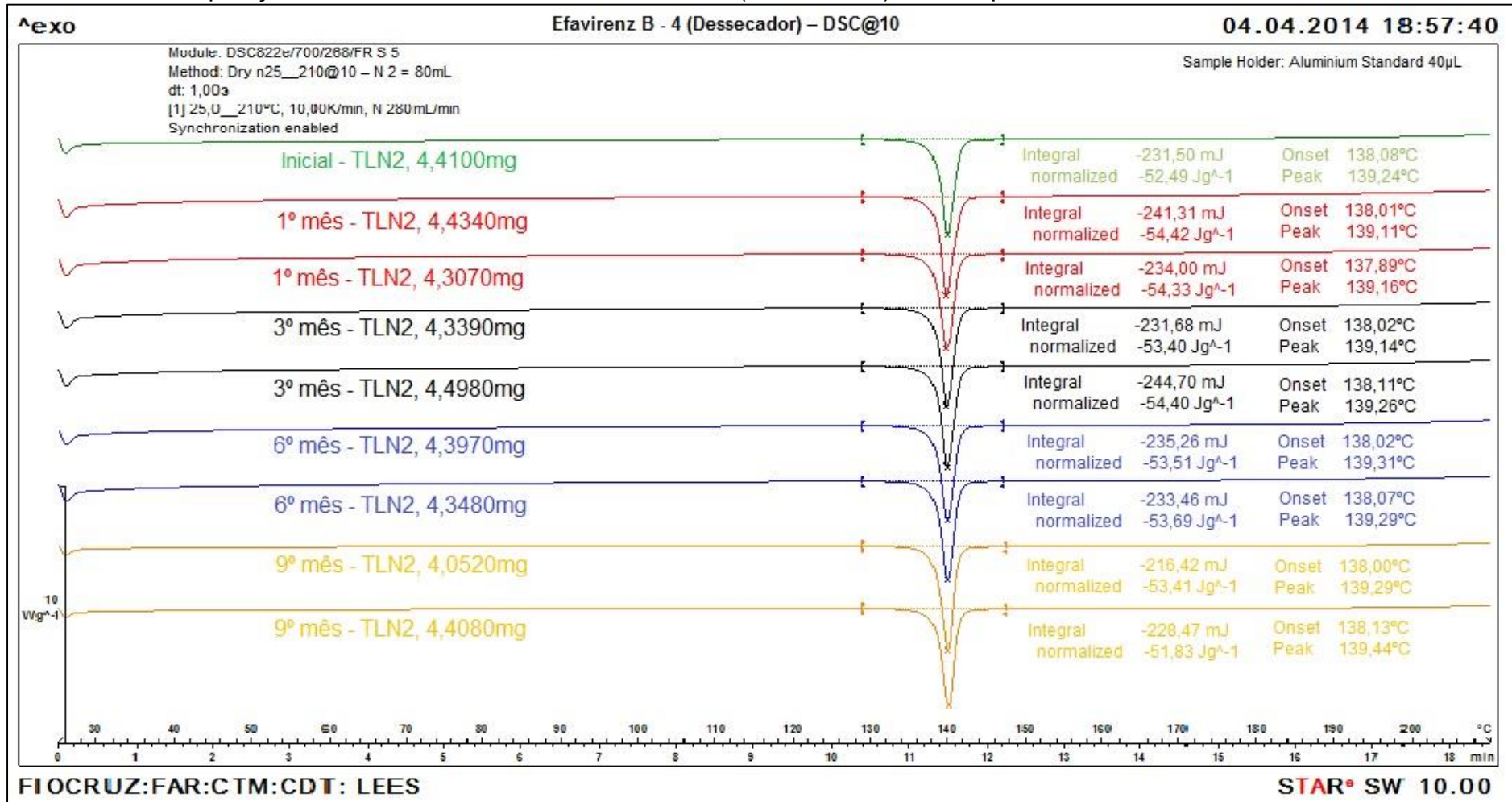
## ANEXO 4 - Sobreposição das curvas de DSC da amostra A – 1 (Dessecador) nos tempos analisados.



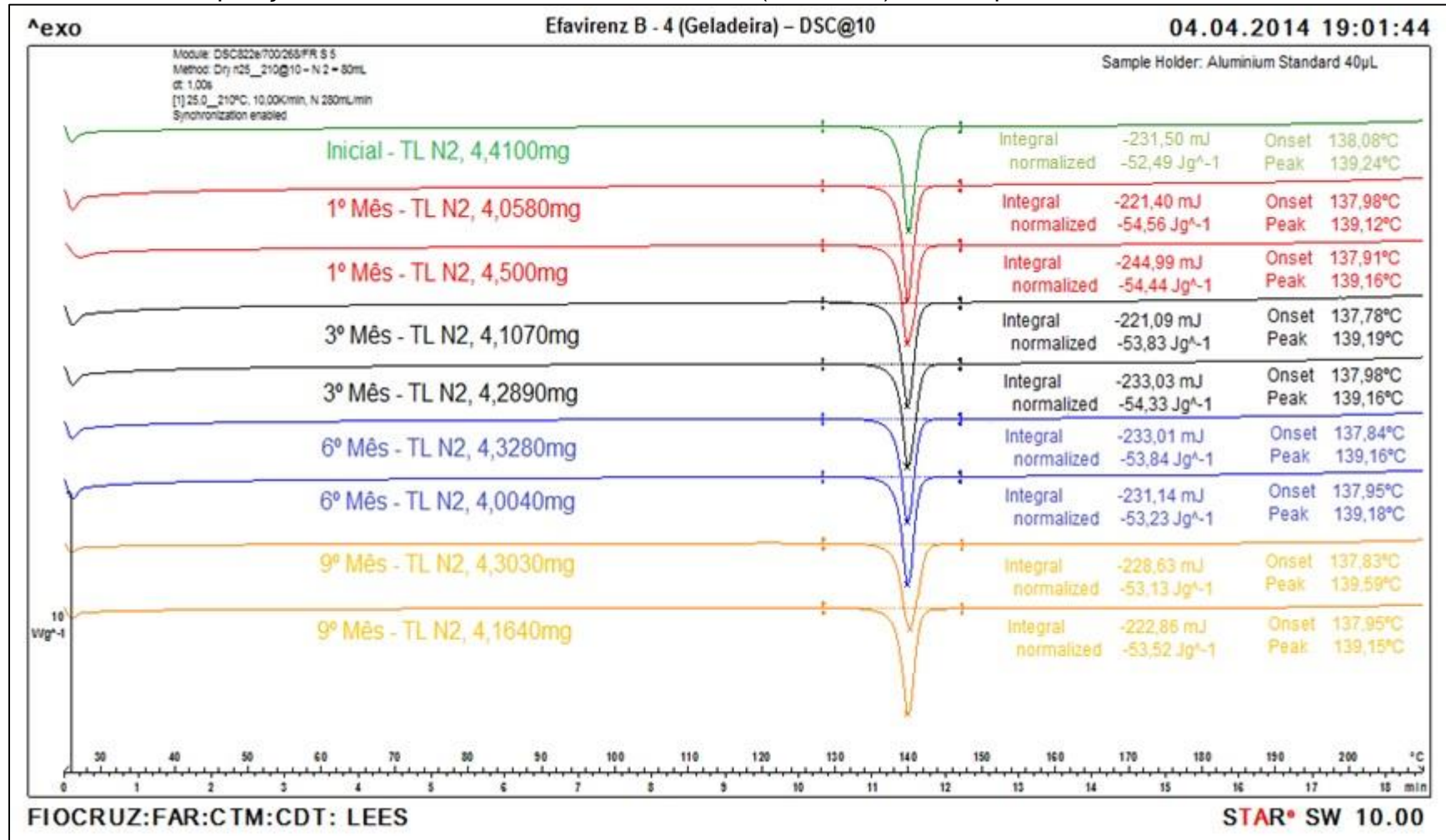
ANEXO 5 - Sobreposição das curvas de DSC da amostra A – 1 (Geladeira) nos tempos analisados.



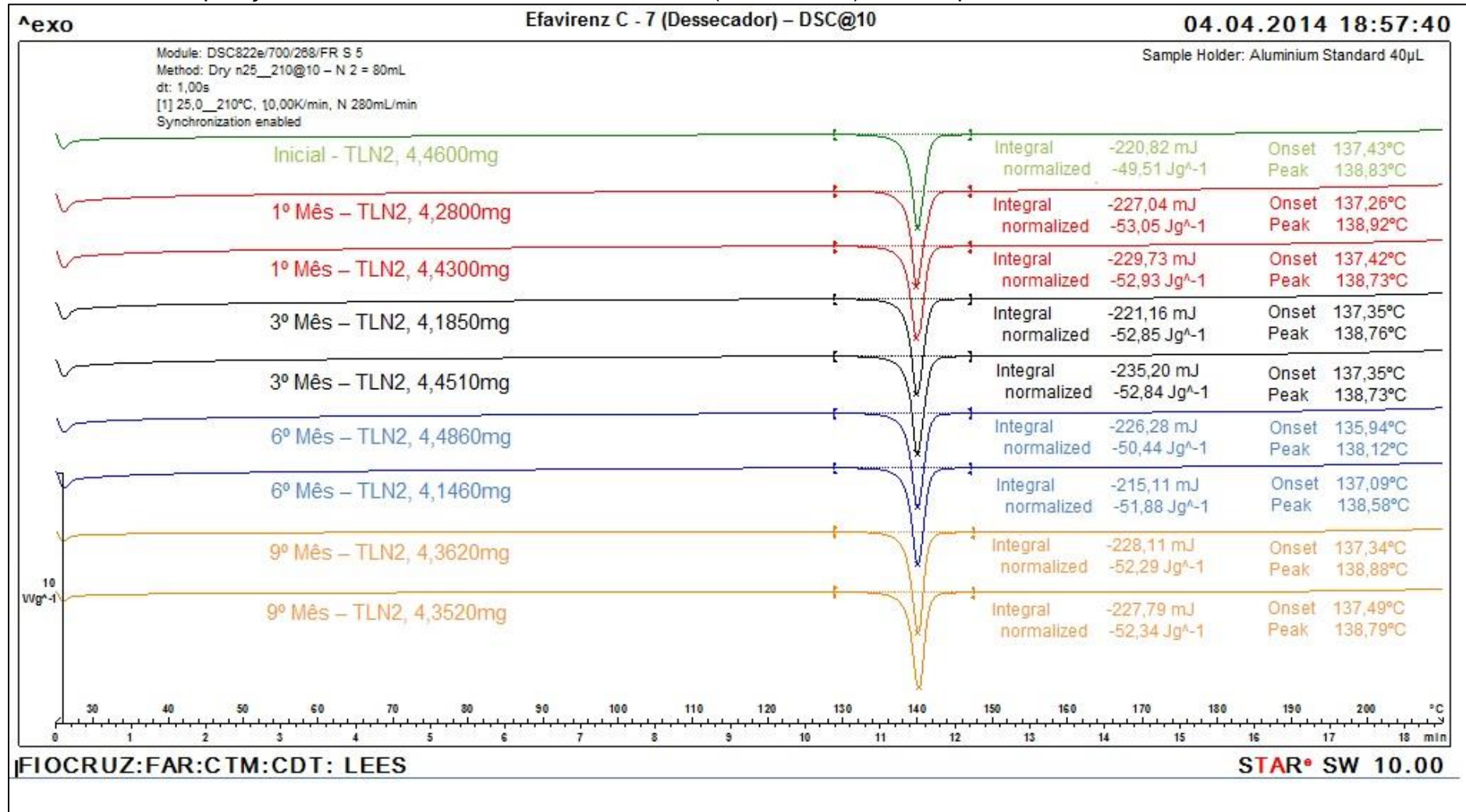
ANEXO 6 - Sobreposição das curvas de DSC da amostra B – 4 (Dessecador) nos tempos analisados.



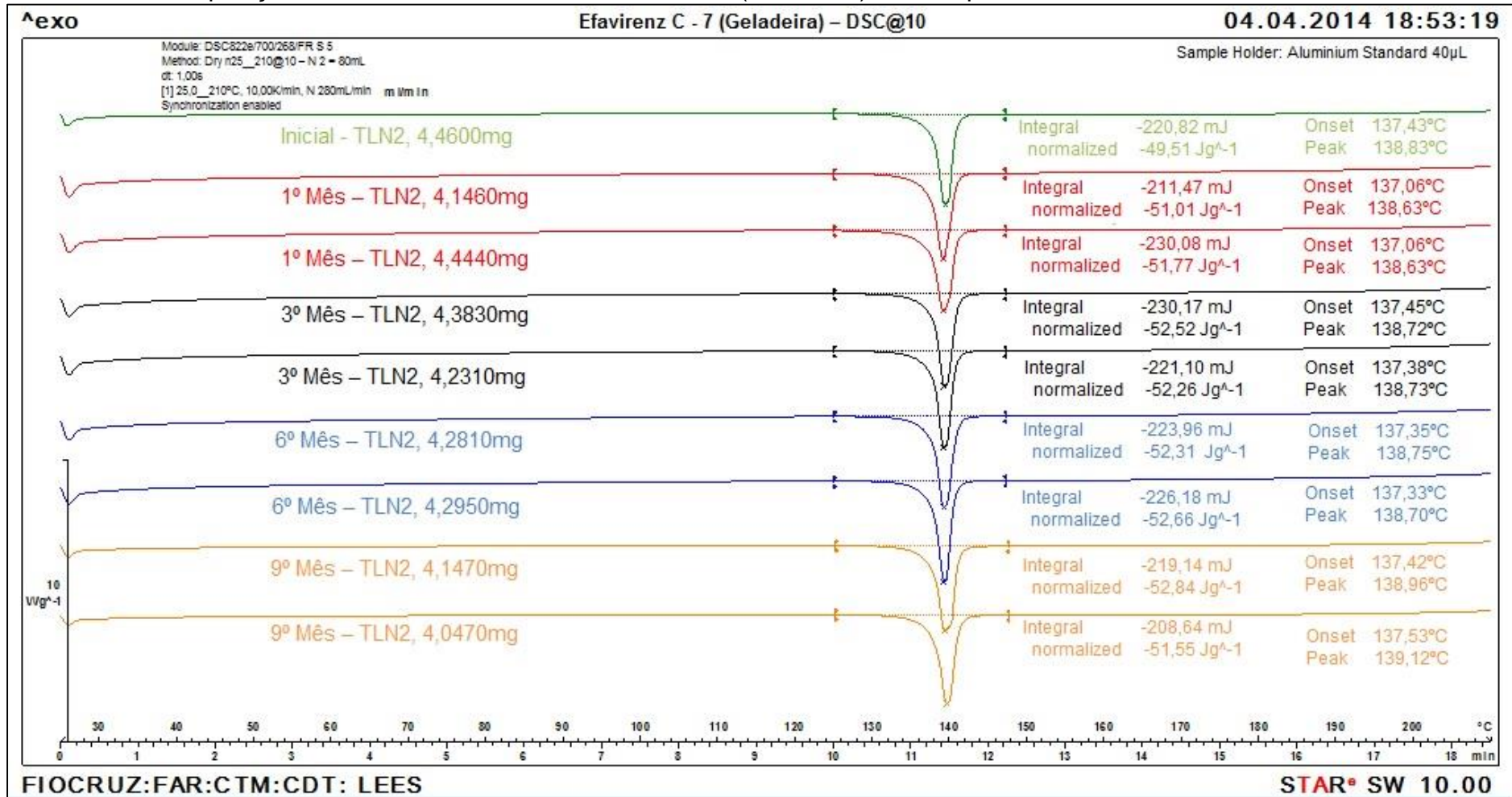
## ANEXO 7 - Sobreposição das curvas de DSC da amostra B - 4 (Geladeira) nos tempos analisados.



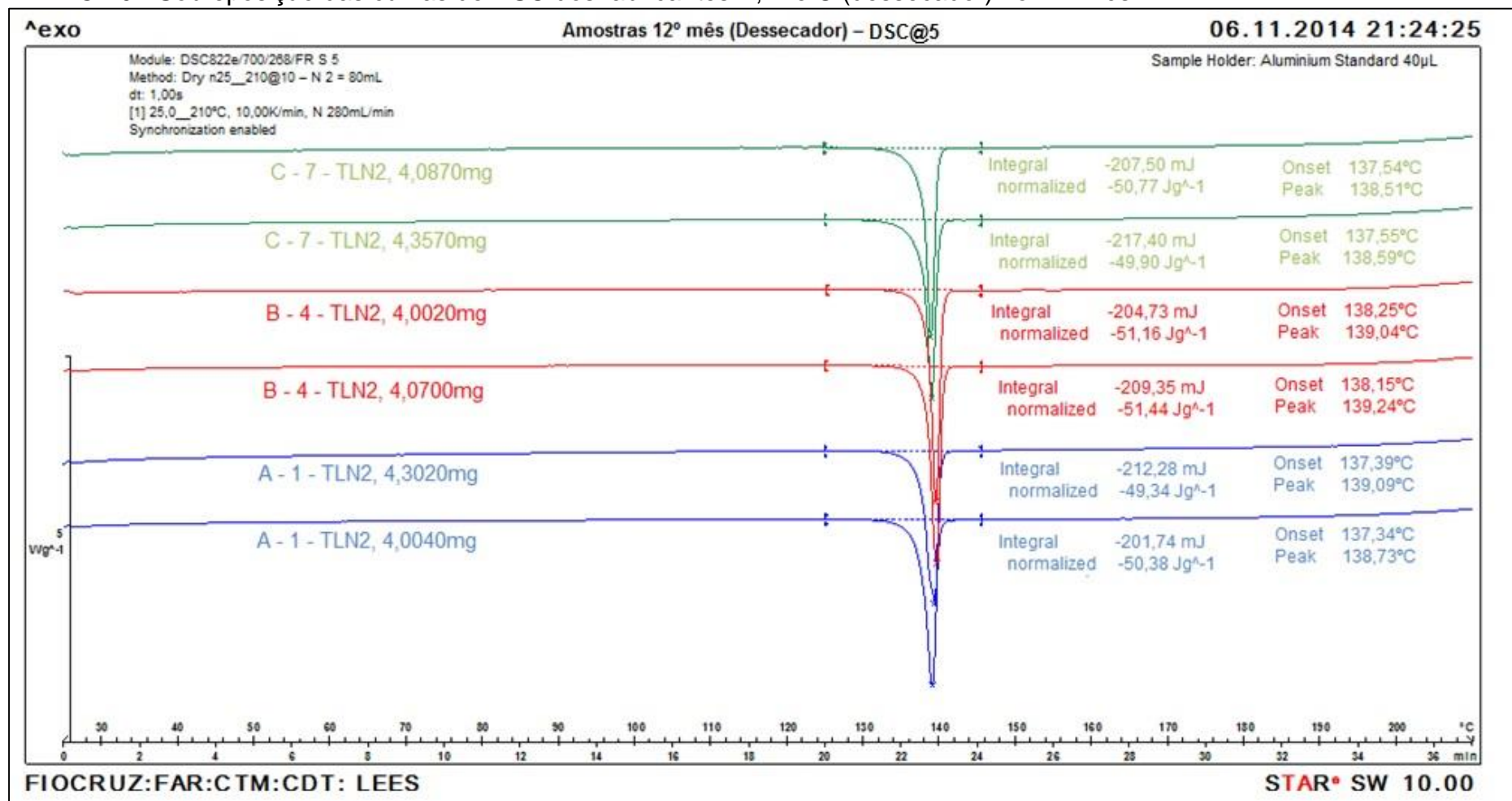
## ANEXO 8 - Sobreposição das curvas de DSC da amostra C - 7 (Dessecador) nos tempos analisados.



ANEXO 9 - Sobreposição das curvas de DSC da amostra C – 7 (Geladeira) nos tempos analisados.

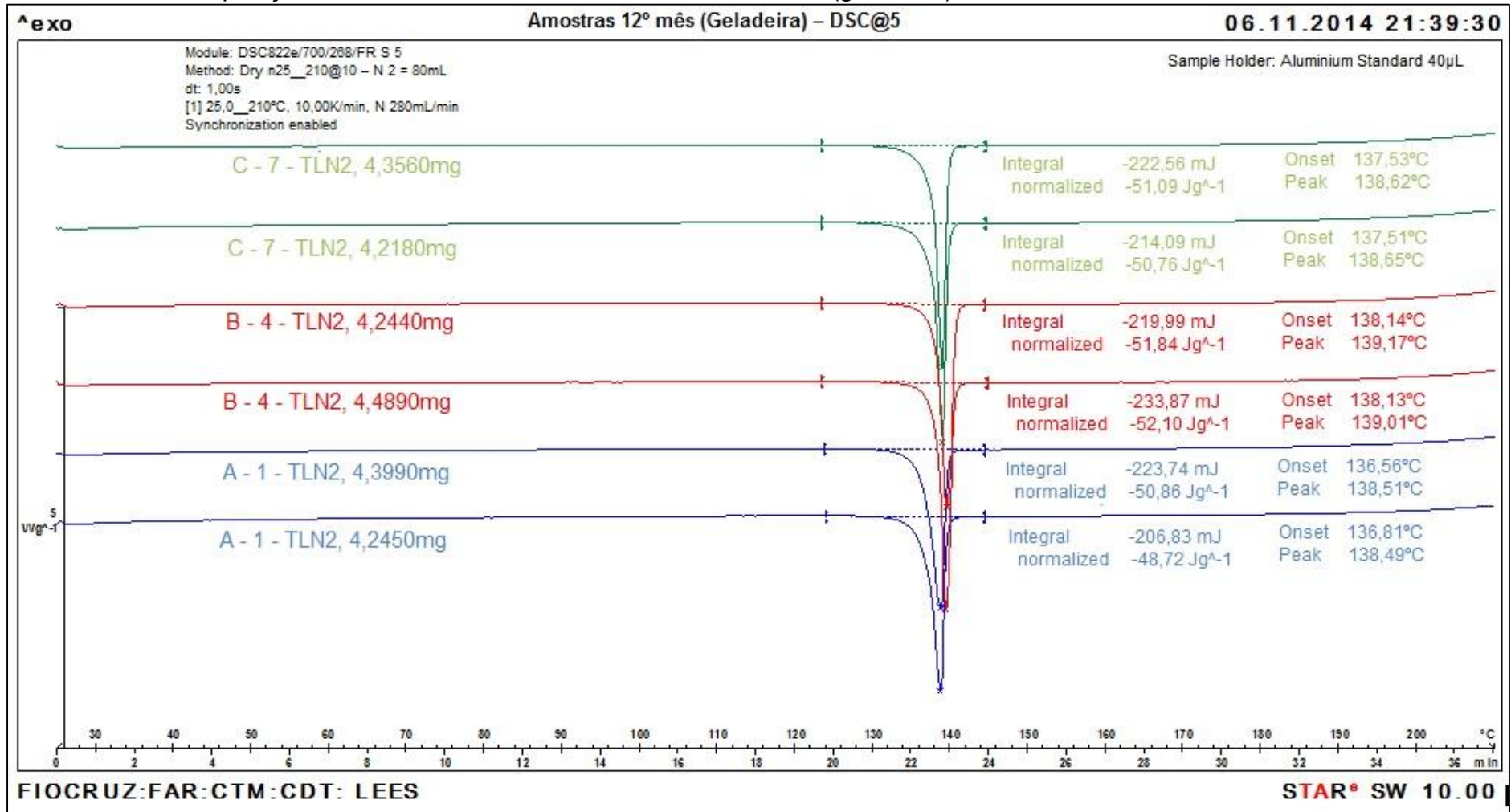


ANEXO 10 - Sobreposição das curvas de DSC dos fabricantes A, B e C (dessecador) no 12º mês.

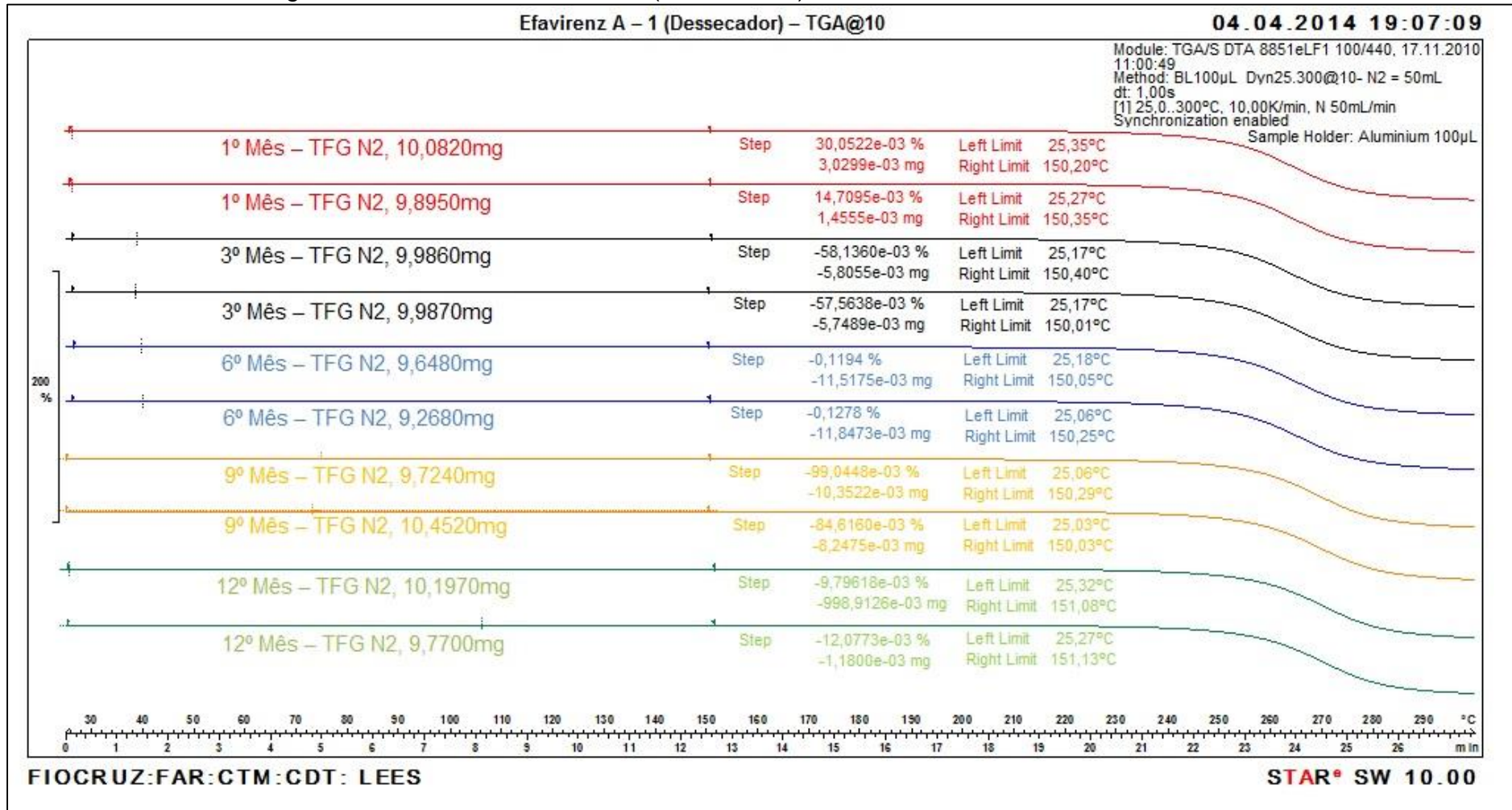




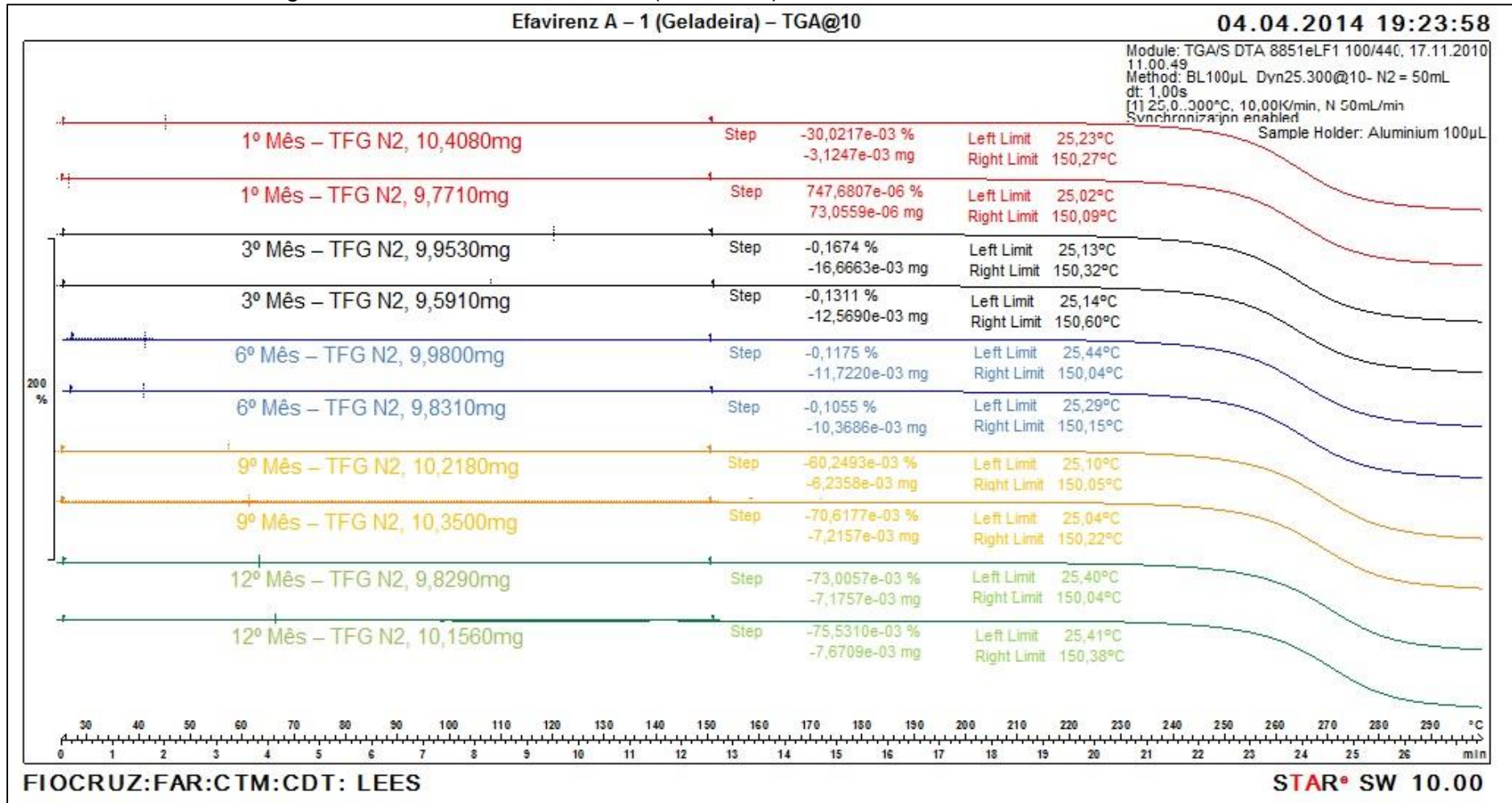
ANEXO 11 - Sobreposição das curvas de DSC dos fabricantes A, B e C (geladeira) no 12º mês.



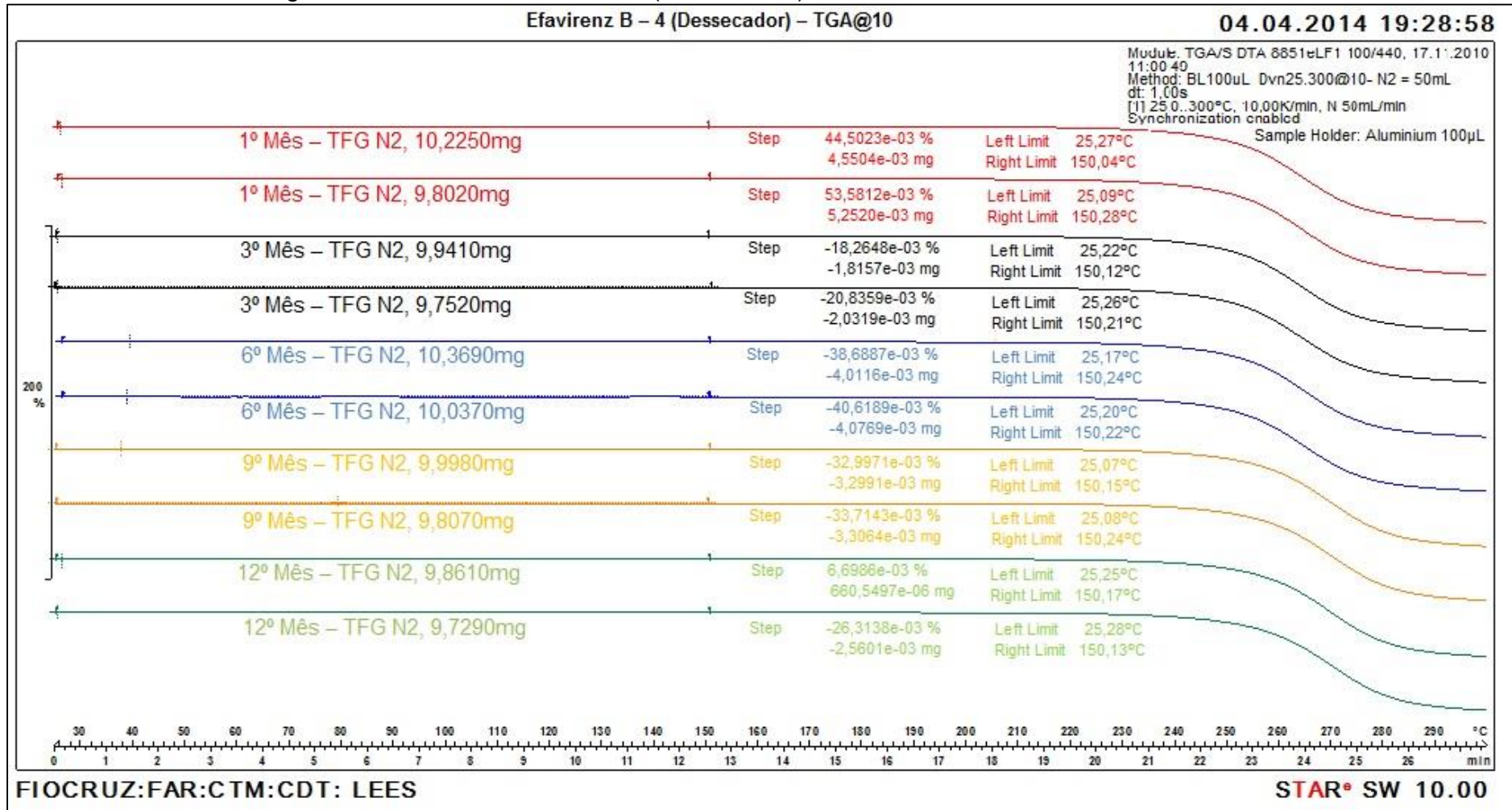
ANEXO 12 - Perfil termogravimétrico do fabricante A - 1 (Dessecador).



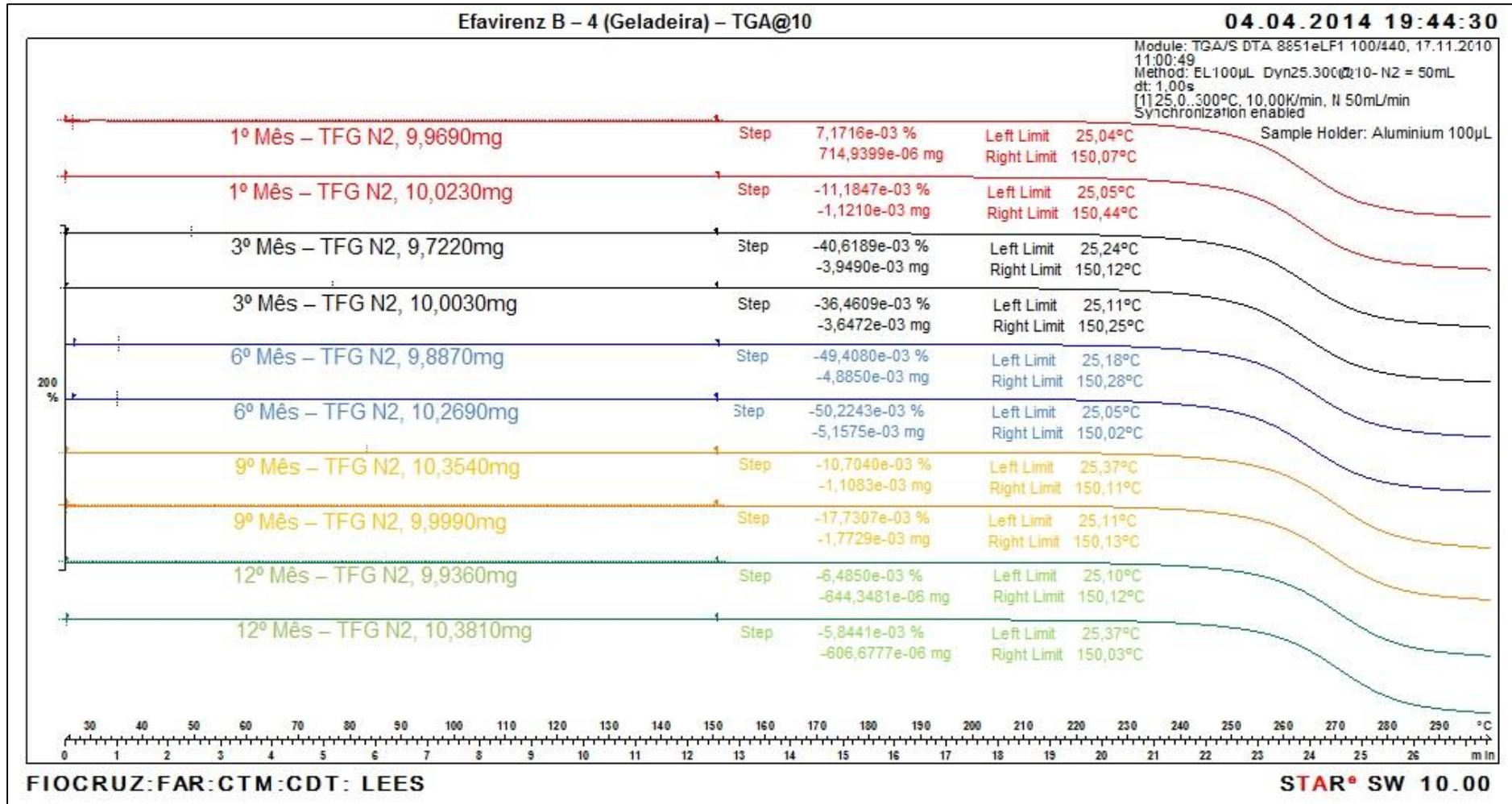
ANEXO 13 - Perfil termogravimétrico do fabricante A - 1 (Geladeira).



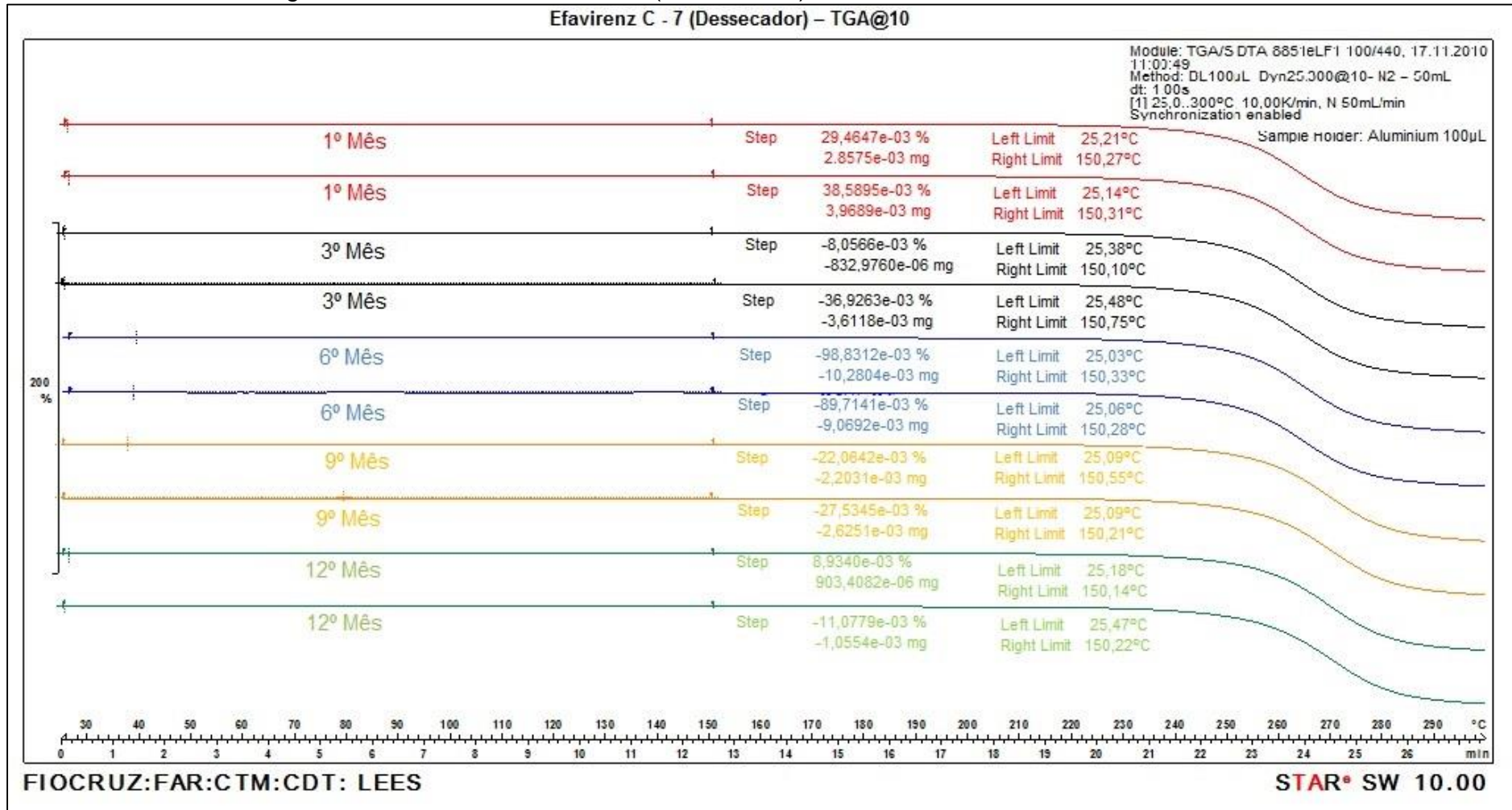
ANEXO 14 - Perfil termogravimétrico do fabricante B - 4 (Dessecador).



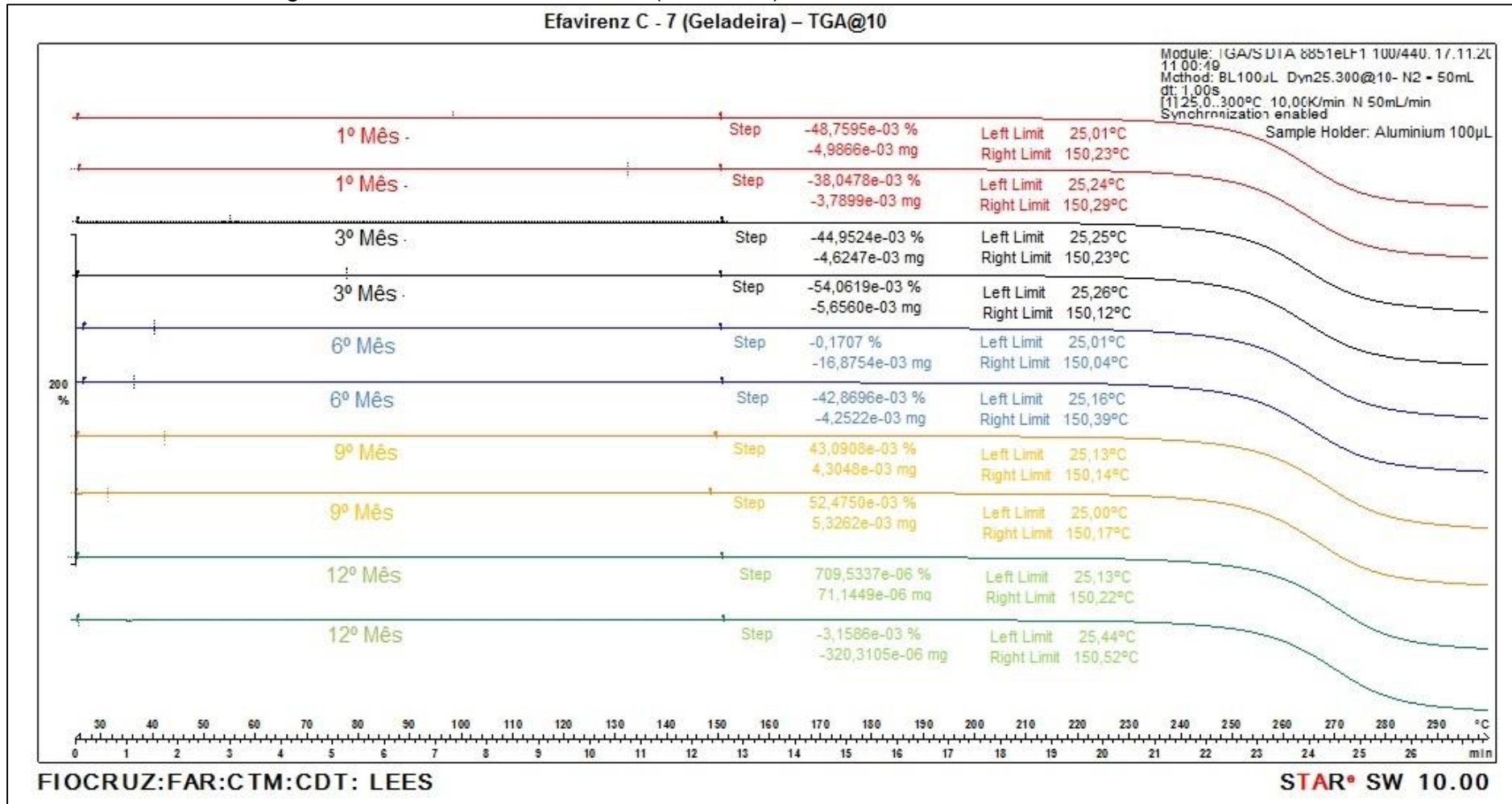
ANEXO 15 - Perfil termogravimétrico do fabricante B - 4 (Geladeira).



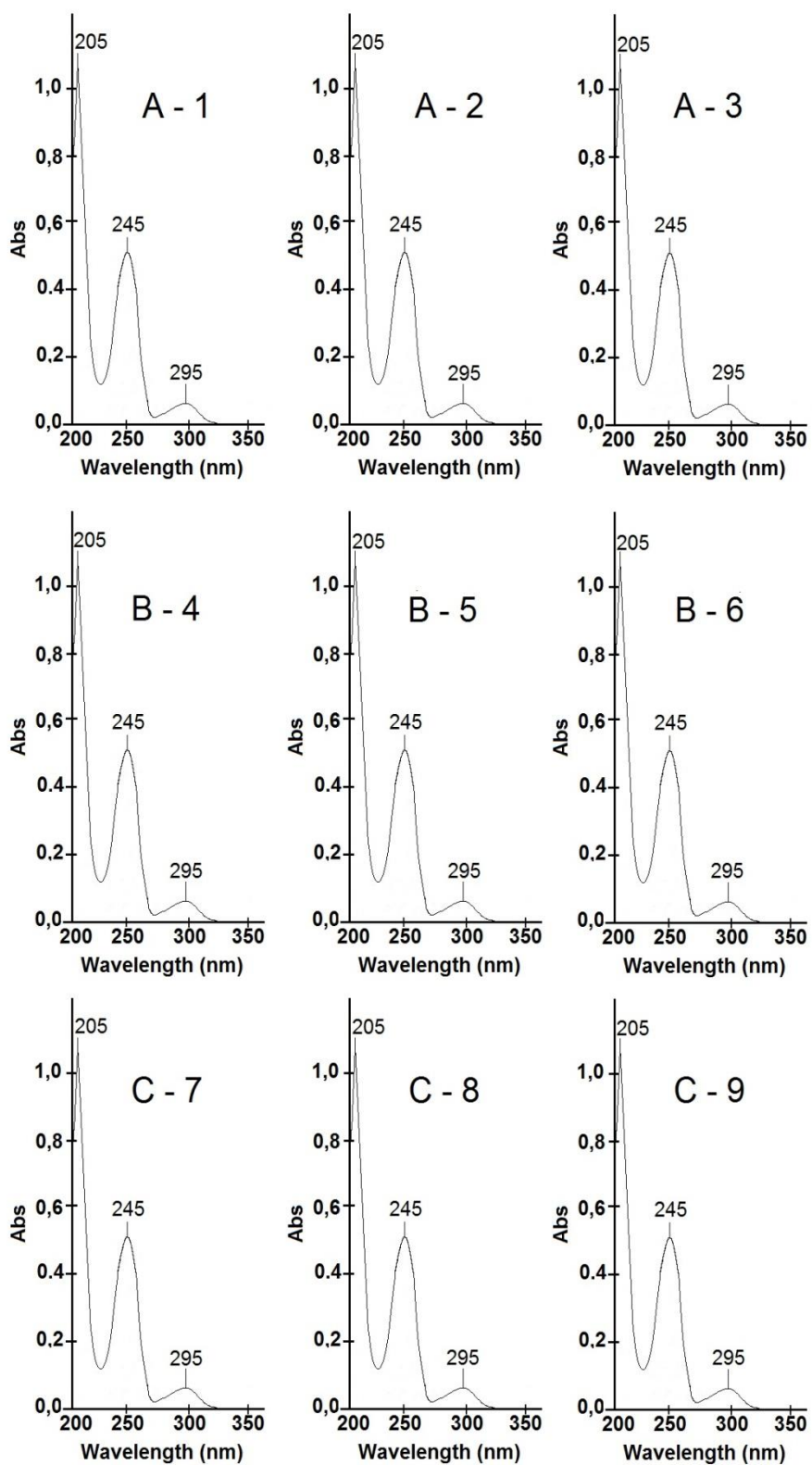
ANEXO 16 - Perfil termogravimétrico do fabricante C - 7 (Dessecador).



ANEXO 17 - Perfil termogravimétrico do fabricante C - 7 (Geladeira).

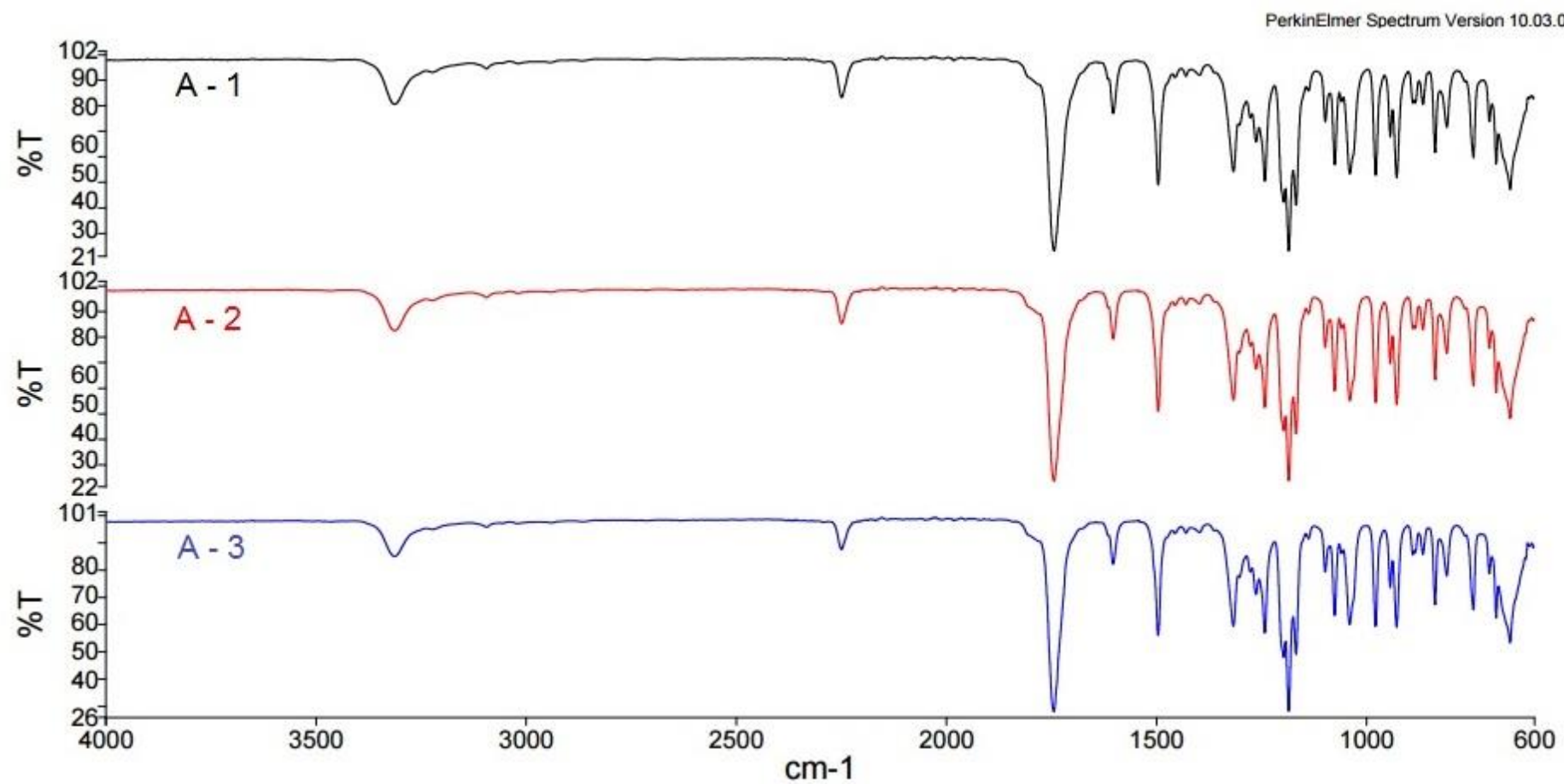


## ANEXO 18 - Espectros no UV de todas as amostras analisadas.

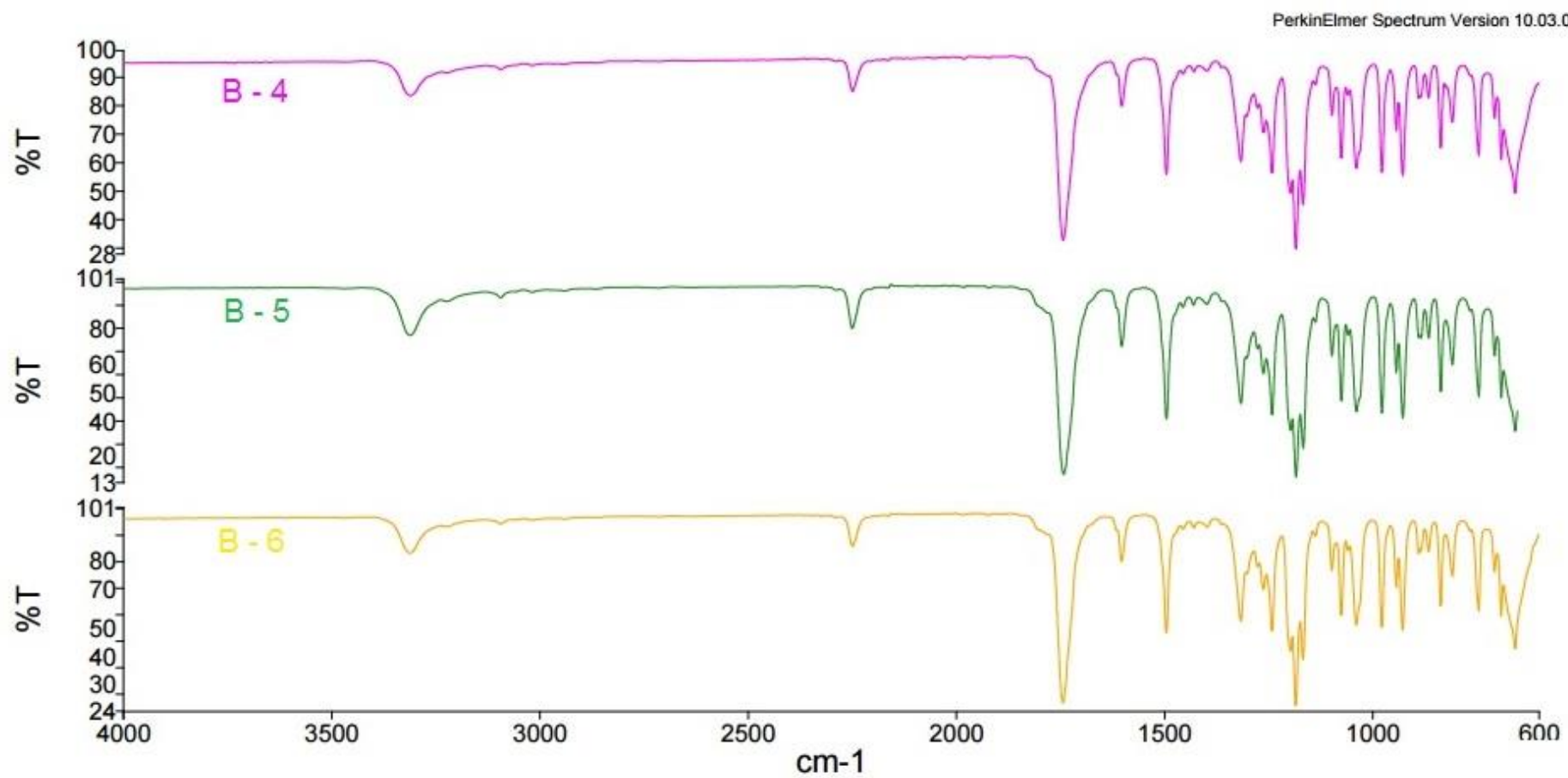




ANEXO 19 - Espectro de absorção no IV das amostras do fabricante A.



ANEXO 20 - Espectro de absorção no IV das amostras do fabricante B.



ANEXO 21 - Espectro de absorção no IV das amostras do fabricante C.

