

Desenvolvimento e validação de metodologia para a certificação da pureza enantiomérica do Efavirenz

CECÍLIA SUMIE FUZITA WATANABE^{1*}
QUEZIA B. CASS¹
NÚBIA BOECHAT²
MARÍLIA S. COSTA²
PAULA M. SÁ²
MARIA L. G. AZEVEDO²
LEANDRO S. BARBOSA²

RESUMO

Uma metodologia simples, por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) quiral, foi desenvolvida e validada para a determinação da pureza enantiomérica do efavirenz. A metodologia foi desenvolvida utilizando-se uma coluna quiral com fase tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose, no modo reverso de eluição utilizando ACN/H₂O (53:47 v/v) como fase móvel. A metodologia desenvolvida pode ser utilizada na indústria farmacêutica para análises de rotina e certificação de matéria-prima e produto acabado.

Palavras Chave: Efavirenz. Validação.

INTRODUÇÃO

O efavirenz é o S(-)-6-cloro-4-ciclopropil-etinil-4-trifluormetil-1,4-diidro-2H-3,1-benzoxanzin-2-ona, também conhecido como DMP-266 ou Sustiva[®] (Figura 1). Foi aprovado pelo FDA em 1998, para uso em combinação com outros anti-retrovirais, para o tratamento da infecção por HIV-tipo1 (LANGMANN *et al*) e faz parte do “coquetel” de medicamentos distribuídos pelo SUS para o tratamento da AIDS.

¹ Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos, Cx. Postal 676, CEP :13560-970, São Carlos, SP – Brasil *csfwatanabe@uem.br. Professora da disciplina “Química Orgânica”, da Faculdade Uningá – Maringá – PR.

² FIOCRUZ - Unidade Far-Manguinhos – Laboratório de Síntese Orgânica - Rua Sizenando Nabuco,100, CEP: 21041-250, Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

Este trabalho descreve o desenvolvimento, validação e aplicação de uma metodologia enantiosseletivo, por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), para a determinação da pureza enantiomérica do efavirenz.

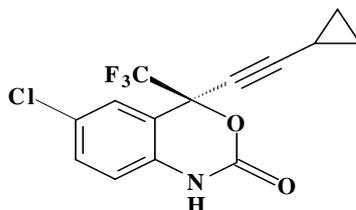


Figura 1. Estrutura do Efavirenz

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma metodologia simples, por CLAE, foi desenvolvida e validada para a determinação da pureza enantiomérica do efavirenz. As análises foram realizadas no modo isocrático e a coluna que apresentou melhor performance, com valores adequados de fator de retenção, separação e resolução, para o desenvolvimento da metodologia pretendida, foi a coluna de polissacarídeo com fase tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose.

Excelentes separações do efavirenz e seu enantiômero foram obtidas tanto no modo normal quanto no modo reverso de eluição, com a coluna quirais tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose. Considerando a aplicação do método para o controle de qualidade do efavirenz, a eluição, no modo reverso usando ACN/H₂O (53:47 v/v) como fase móvel, foi selecionada. O cromatograma da separação obtida ($\alpha = 3,64$ e $R_s = 6,31$) está apresentado na Figura 2. Nestas condições, o efavirenz é o primeiro enantiômero a eluir.

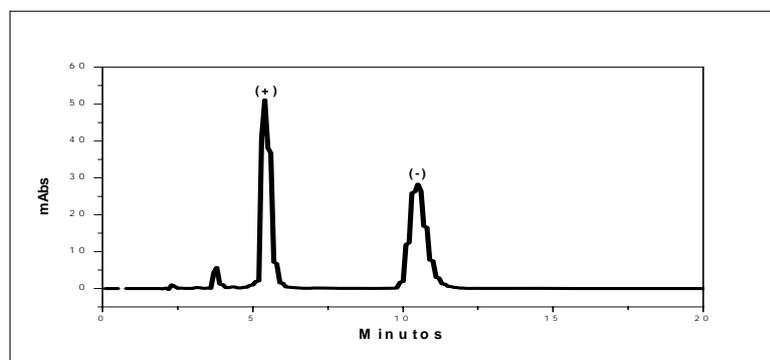


Figura 2: Cromatograma da separação do efavirenz e seu enantiômero. Condições: coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose, fase móvel: ACN/H₂O (57:43 v/v), fluxo: 1,0 mL/min e $\lambda = 252$ nm.

Os parâmetros de performance analítica avaliados foram: exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção e quantificação e seletividade. Os critérios de aceitação considerados foram os descritos na USP 24^a ed. (2000) e ICH (1996).

A curva analítica foi obtida através do método de adição de padrão. Foram analisadas soluções padrões do enantiômero do efavirenz, num intervalo de concentração de 0,02 – 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Todas as determinações foram realizadas em presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de efavirenz, Figura 3.

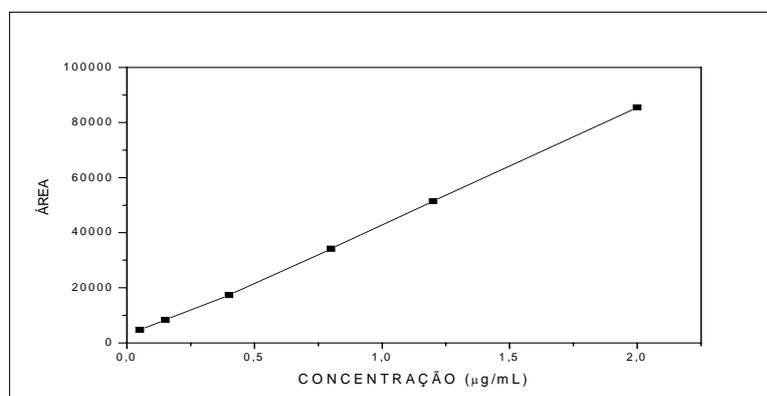


Figura 3. Curva analítica do enantiômero do efavirenz, intervalo de concentração de 0,02-2,0 $\mu\text{g/mL}$, em presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de efavirenz

A curva analítica apresentou linearidade no intervalo estudado. O coeficiente de correlação foi de 0,9998 e a equação da reta $y = -148,499x + 42964,827$.

Tabela 1- Precisão e exatidão obtidas nas análises das soluções controles do enantiômero do efavirenz, intra-dia (n=5) e inter-dia (n=3)

Conc. (µg/ml)	Primeiro dia		Segundo dia		Terceiro dia	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,25	1,63	99,2	0,97	99,1	0,97	99,3
1,00	1,25	98,8	0,87	98,1	0,48	98,2
1,60	0,49	99,6	0,26	99,8	0,71	99,6

A precisão e a exatidão foram excelentes, calculadas através das análises de três soluções padrões, analisadas em quintuplicata, em três dias não-consecutivos. A precisão nas análises intra- e interdias apresentou um coeficiente de variação (CV) menor que 2% e a exatidão variou de 98,2 a 99,7%.

O limite de detecção e quantificação para o (+) enantiômero foi de 0,010 µg/mL e de 0,015 µg/mL, respectivamente.

A seletividade foi verificada através do teste de pureza das bandas cromatográficas com detector de arranjo de fotodiodos, não tendo sido observada nenhuma substância co-eluído com o enantiômero do efavirenz.

A estabilidade das amostras, mantidas à temperatura ambiente, foi avaliada em períodos de tempo de 0, 24, 48 e 72 horas. As amostras mantiveram-se estáveis, não tendo sido observada nenhuma decomposição das amostras, no período e condições avaliadas.

O teste de duplo cego também foi realizado, sendo um teste importante para se evitar tendenciosidade nas análises Tabela 2. Foram analisadas duas soluções em triplicata, com concentrações desconhecidas do analista. O coeficiente de variação nas análises foi inferior a 2% e a exatidão foi em torno de 99%, sendo mais um indicativo da exatidão da metodologia empregada.

Tabela 2: Teste de duplo cego

Concentração Teórica (µg/ml)	Concentração Obtida (µg/ml)	CV (%)	Exatidão (%)
0,035	0,035	1,190	99,6
1,200	1,197	0,300	99,8

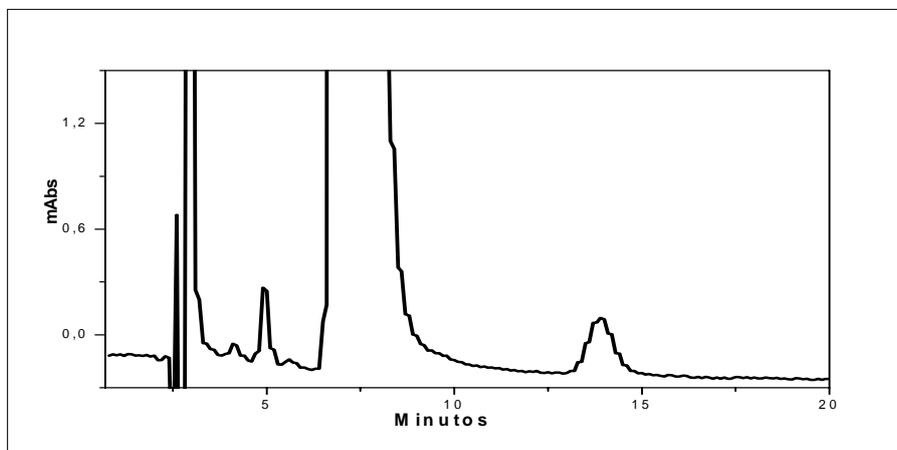


Figura 4- Cromatograma da análise de cápsulas de efavirenz. Condições: coluna tris[(S)-1-feniletilcarbamat] de amilose em APS-Nucleosil, fase móvel: ACN/H₂O (57:43 v/v), fluxo: 1,0 mL/min e $\lambda= 252$ nm.

A metodologia desenvolvida foi aplicada para análise de uma amostra de cápsulas de efavirenz, Figura 4, tendo sido encontrada a presença de 0,11% do (+) enantiômero.

CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida e validada apresentou-se eficiente para determinação da pureza enantiomérica do efavirenz. Todos os parâmetros avaliados na validação apresentaram-se dentro das especificações, demonstrando a confiabilidade da metodologia, podendo ser utilizada na indústria farmacêutica para certificação do efavirenz como matéria-prima e como produto acabado.

REFERÊNCIAS

ICH Guidance for Industry. Q 2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, Rockville:ICH, 1996. 31 p.

LANGMANN, P. et al. *Chromatogr. B*, 755:151-156, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 24 ed. Rockville, US: Pharmacopeial Convention, 2000.

