

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL**

AMANDA MARIA DE SOUSA PAITER

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DO PADRÃO AZITROMICINA UTILIZADO NA ROTINA DO
CONTROLE DE QUALIDADE**

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO

TOLEDO
2019

AMANDA MARIA DE SOUSA PAITER

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DO PADRÃO AZITROMICINA UTILIZADO NA
ROTINA DO CONTROLE DE QUALIDADE**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Especialização em análise instrumental - Câmpus Toledo como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski.

TOLEDO

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE ESTABILIDADE DO PADRÃO AZITROMICINA UTILIZADO NA ROTINA DO CONTROLE DE QUALIDADE

AMANDA MARIA DE SOUSA PAITER

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia sete de junho de dois mil e dezanove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise Instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski (Orientador)

Prof. Dr. RENATO EISING (Membro – UTFPR)

Prof^a. Dra. KELEN M. F. ROSSI DE AGUIAR (Membro – UTFPR)

*Aos meus amados pais, Elias e Ivani,
meus irmãos Anderson e Andrey,
meu namorado Vinícius, familiares e amigos,
dedico.*

RESUMO

A indústria farmacêutica é responsável por produzir medicamentos seguros e eficazes para a saúde, contribuindo com a qualidade de vida da população. Para que o produto chegue ao consumidor final, o controle de qualidade é etapa imprescindível no processo de manufatura de medicamentos. Nesse sentido, a utilização de padrões de qualidade e que garantem resultados confiáveis é de suma importância. Atrelado a isso e visando redução de custo, saber analiticamente até quando e em que condições de armazenamento são ideais para otimizar o processo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o estudo de estabilidade da substância química de trabalho azitromicina, obtida da Indústria Farmacêutica Prati-Donaduzzi. Armazenou-se o padrão na condição de geladeira (2 – 8°C) e estufa (30°C) e ao longo do tempo foi avaliada a recuperação por cromatografia líquida de alta eficiência frente a dois métodos analíticos, respectivos às duas formas de liberações de produto acabado da empresa. Foram avaliados para o método de azitromicina comprimido dois estudos, um de menor tempo 20 horas e outro até 117 horas. Ao avaliar a recuperação constatou-se que o armazenamento na condição estufa foi o mais eficaz, pois a recuperação do padrão ficou dentro da especificação de 98,5% a 101,5% em até 117 horas. Em relação ao ativo avaliado pela metodologia analítica pó para suspensão oral, a condição geladeira até 113 horas foi mais eficaz em relação à condição estufa.

Palavras chaves: Estabilidade, azitromicina, HPLC.

ABSTRACT

The pharmaceutical industry is responsible for producing safe and effective medicines for health, contributing to the quality of life of the population. In order for the product to reach the final consumer, quality control is an essential step in the drug manufacturing process. In this sense, the use of quality standards and that guarantee reliable results is of paramount importance. Linked to this and aiming at cost reduction, analytically know when and when storage conditions are ideal to optimize the process. In this context, the objective of this work was the stability study of the chemical substance azithromycin, obtained from the Pharmaceutical Industry Prati-Donaduzzi. The standard was stored in the refrigerator (2 - 8 ° C) and oven (30 ° C) condition and over time the recovery by high performance liquid chromatography was evaluated against two analytical methods, corresponding to the two forms of releases of the finished product company. Two studies were evaluated for the compressed azithromycin method, one with the shortest time 20 hours and the other with up to 117 hours. When evaluating the recovery, it was reported that storage in the greenhouse condition was the most efficient, since the recovery of the standard was within the specification from 98.5% to 101.5% in up to 117 hours. Regarding the active evaluated by the analytical methodology powder for oral suspension, the refrigerator condition up to 113 hours was more effective in relation to the greenhouse condition.

Keywords: Stability, azithromycin, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático adaptado de instrumentação do HPLC.....	13
Figura 2: Ilustração adaptada do cálculo de pratos teóricos conforme USP	16
Figura 3: Ilustração do cálculo de fator de cauda conforme USP.....	17
Figura 4: Estrutura da azitromicina.....	19
Figura 5: Zitromax® - Medicamento referência de azitromicina. Forma de apresentação comprimido e forma de apresentação suspensão	20
Figura 6: Ilustração do delineamento experimental.....	23
Figura 7: : Cromatograma de azitromicina comprimido	28
Figura 8: Perfil cromatográfico comparativo de 0 a 3 minutos para avaliar a impureza na condição estufa do experimento 2. (A) Injeção padrão no tempo zero da análise. (B) Injeção do padrão no tempo 4 horas e (C) injeção do padrão no tempo 117 horas	31
Figura 9: Perfil cromatográfico comparativo de 0 a 3 minutos para avaliar a impureza na condição geladeira do experimento 2. (A) Injeção padrão no tempo zero da análise. (B) Injeção do padrão no tempo 4 horas e (C) injeção do padrão no tempo 117 horas	32
Figura 10: Espectro comparativo de absorção UV da impureza no experimento 2. (A) Injeção estufa no tempo 4 horas; (B) Injeção estufa no tempo 117 horas e (C) Injeção geladeira no tempo 117 horas.....	32
Figura 11: Espectro de absorção UV-VIS da azitromicina avaliado no tempo zero da análise.....	33
Figura 12: Espectro de absorção UV da azitromicina na condição estufa. (A) Tempo 4 horas e (B) Tempo 117 horas.....	33
Figura 13: Cromatograma de azitromicina suspensão	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Equipamentos utilizados.....	21
Tabela 2: Colunas cromatográficas utilizadas no estudo de estabilidade	22
Tabela 3: Reagentes utilizados nos estudos de estabilidade de azitromicina	22
Tabela 4: Parâmetros cromatográficos avaliados nas curvas dos diferentes experimentos.....	29
Tabela 5: Avaliação da estabilidade em horas do padrão de azitromicina na condição de estufa para os experimentos E1 e E2	30
Tabela 6: Avaliação da estabilidade em horas do padrão de azitromicina na condição de geladeira (2- 8°C).....	31
Tabela 7: Comparativo dos experimentos E1 e E2 na condição estufa em relação à área do ativo e área da impureza bem como suas respectivas intensidades de absorção no espectro UV	34
Tabela 8: Análise das replicatas do padrão 1 e recuperação do padrão 2.....	35
Tabela 9: Recuperação do padrão azitromicina diidratada frente à condição de estufa e geladeira ao longo do tempo, avaliada pelo método de pó para suspensão oral...	36

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DPR – Desvio Padrão Relativo

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ICH – International Conference on Harmonization

IFA – Insumos Farmacêuticos Ativos

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

MBPC – Manual de Boas Práticas Cromatográficas

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SQF – Substância Química de Referência Farmacopeica

SQT – Substância Química de Trabalho

US-FDA – United States Food and Drug Administration

UV/Vis – Ultravioleta - Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo geral	12
1.1.2 Objetivo específico	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 IMPORTÂNCIA DA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	13
2.2 LEGISLAÇÃO, PARÂMETROS ANALÍTICOS E CROMATOGRÁFICOS	14
2.3 ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES	17
2.4 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO – AZITROMICINA	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DA ANÁLISE	21
3.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA – PRIMA	21
3.3 EQUIPAMENTOS	21
3.4 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	22
3.5 REAGENTES	22
3.6 METODOLOGIA ANALÍTICA E PROTOCOLO DE ESTUDO DE ESTABILIDADE	23
3.6.1 Soluções	24
3.6.2 Sistema cromatográfico	24
3.6.3 Soluções analíticas	24
3.6.4 Procedimento experimental	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO FRENTE AO MÉTODO DE AZITROMICINA COMPRIMIDO	27
4.1.1 Detecção de impureza	31
4.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO FRENTE O MÉTODO AZITROMICINA SUSPENSÃO	34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica é responsável por produzir medicamentos seguros e eficazes para a saúde, contribuindo para melhorar a qualidade de vida da população. Para que o produto chegue ao consumidor final, o controle de qualidade é etapa imprescindível no processo de manufatura de medicamentos, nele são realizadas análises físicas, químicas, microbiológicas e instrumentais, das quais deverão estar de acordo, principalmente, com as normas nacionais que regem na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Dentre os medicamentos produzidos, têm-se os agentes antimicrobianos que são fármacos utilizados para o tratamento de diversos tipos de infecções causadas por micro-organismos. Com grandes avanços na indústria farmacêutica, as infecções que eram em muitos casos letais, podem ser tratadas de forma rápida e seguras em poucos dias. Como exemplo desta classe de medicamentos, existe a azitromicina que é um antimicrobiano que tem efeito bactericida e bacteriostático, demonstrando eficácia tanto em bactérias gram-positivas como gram-negativas (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). Este antibiótico é utilizado principalmente no tratamento de doenças respiratórias e infecções dermatológicas e suas formas de apresentação mais conhecidas são em pó para suspensão oral de 600 mg e comprimidos revestidos de 250, 500 ou 600 mg e cápsula de gelatina de 250 mg (Zithromax Product Information, 2017).

Neste contexto, a fim de garantir resultados mais rápidos, confiáveis e rastreáveis, comumente é utilizada a cromatografia líquida para identificação e quantificação e separação de compostos (RIBANI *et al.*, 2004; MALDANER e JARDIM, 2009; SKOOG *et al.* 2007, KUMAR *et al.*, 2016). Para esta técnica é de suma importância à utilização de padrões de qualidade, podendo ser, por exemplo, substância química de trabalho (SQT) ou Substância Química de Referência Farmacopeica (SQF) (RDC 166, 2017).

Com intuito de gerar resultados confiáveis e reproduzíveis e visando uma possível utilização a médio ou longo prazo dessas substâncias químicas, bem como os reagentes utilizados, faz-se necessário avaliar analiticamente a estabilidade do padrão de azitromicina diidratada, frente a condições de temperatura ao longo do tempo, a fim de otimizar o processo de análise e reduzir custos com analista, equipamento e materiais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar um estudo analítico de estabilidade do padrão de azitromicina utilizados na rotina do controle de qualidade

1.1.2 Objetivo específico

Avaliar a estabilidade de uso da substância química de trabalho frente à metodologia analítica de azitromicina comprimido revestido.

Avaliar a estabilidade de uso da substância química de trabalho frente à metodologia analítica de azitromicina pó para suspensão oral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Desde o início da cromatografia líquida (CL) até os dias atuais, muitas pesquisas foram realizadas como, por exemplo, o aprimoramento da instrumentação a fim de garantir resultados mais rápidos, confiáveis e rastreáveis. Nas últimas cinco décadas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *high performance liquid chromatography* (HPLC) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, empregada e difundida em laboratórios de análises de indústrias farmacêuticas e químicas, amostras forenses e matrizes ambientais e em muitas áreas da ciência, devido a sua capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes em qualquer amostra que possa ser dissolvida em um líquido (RIBANI *et al.*, 2004; MALDANER e JARDIM, 2009; SKOOG *et al.* 2007, KUMAR *et al.*, 2016).

O equipamento HPLC, conforme representado esquematicamente na figura 1, consiste em uma coluna com uma determinada fase estacionária, uma força motriz que impulsiona o solvente através da coluna (bomba), um sistema de injeção para injetar a amostra na coluna, um sistema que avalia a propriedade do analito analisado (detector) e um sistema que grava os sinais do detector, convertendo-os em cromatogramas ou gráficos (MORENO – ARRIBAS e POLO, 2003, COLLINS *et al.*, GIL, 2007).

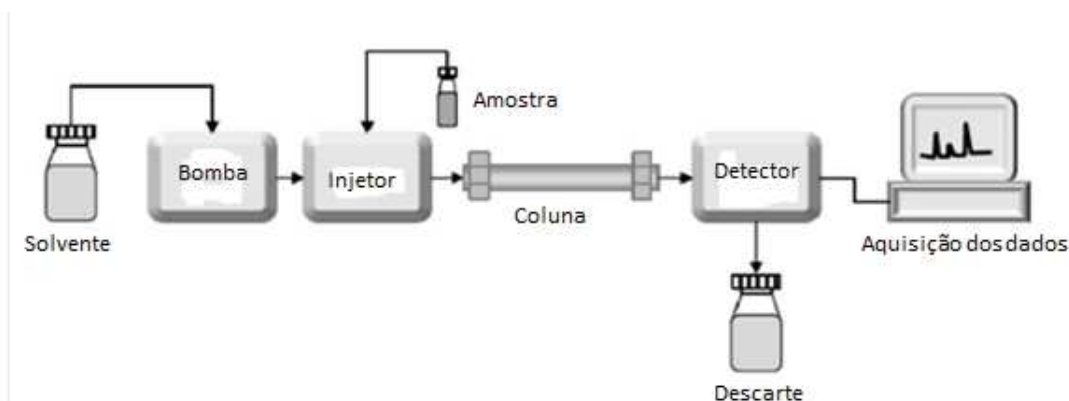


Figura 1: Diagrama esquemático adaptado de instrumentação do HPLC
Fonte: LaboratoryInfo (2015)

A técnica está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis; a fase móvel com característica líquida e a fase estacionária com característica sólida (MORENO – ARRIBAS e POLO, 2003; LINDE, 2018).

A eficiência desse método de cromatografia atribui ao uso de suportes com partículas diminutas e uso de bombas de alta pressão para eluição da fase móvel. Para realizar a separação dos analitos utilizam-se colunas cromatográficas de aço inoxidável ou de plástico com comprimento de 5 a 30 cm e diâmetro interno de 1 a 5mm. Devido à movimentação da fase móvel continuamente através da coluna contendo a fase estacionária, pode haver interação por adsorção por adsorção (separação solido-liquido), partição (separação liquido-liquido), exclusão molecular ou troca iônica. O suporte mais comumente utilizado é a sílica. A atividade ou a polaridade da superfície da sílica pode ser modificada a grupos funcionais menos polares (fase ligada). As fases assim obtidas são chamadas de quimicamente ligadas. Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos (WATERS, 2018).

Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Considerando a fase reversa, quando ocorre eluição da fase móvel pela coluna cromatográfica, acontece à movimentação do analito entre a fase móvel e fase estacionária, dessa forma, as moléculas hidrofílicas ficam menos retidas comparadas com moléculas hidrofóbicas, e o quanto mais tempo o soluto fica retido na fase estacionária, conseqüentemente maior será o tempo de retenção (WATERS, 2018; Schlüter, 2000).

2.2 LEGISLAÇÃO, PARÂMETROS ANALÍTICOS E CROMATOGRÁFICOS

A indústria farmacêutica é responsável por produzir medicamentos seguros e eficazes para a saúde, contribuindo para melhorar a qualidade de vida da população. Conforme consta na RDC 17 (2010), as Boas Práticas de Fabricação (BPF) é a parte da Garantia da Qualidade que os produtos são produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para uso pretendido e requerido pelo registro.

Para o registro do produto, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica. Por definição da ANVISA (2003): “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método

atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

No Brasil, há credenciadas duas agências para verificar a competência dos laboratórios de ensaio, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Internacionalmente, por exemplo, tem-se a IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”), US-FDA (“United States Food and Drug Administration”) e ICH (“International Conference on Harmonization”) (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a avaliação de cada ativo é utilizado um método de análise, em algumas vezes atribuído a alguma técnica, por exemplo, cromatografia líquida. Por definição, método de análise é um conjunto detalhado de direções (protocolo), inicia-se desde o preparo da amostra de ensaio até a compilação dos dados, nos quais deverão ser seguidos para que os resultados sejam satisfatórios (AOAC, 2013).

Normalmente os parâmetros analíticos encontrados para validação de método de separação são: precisão; exatidão; limite de detecção e limite de quantificação; robustez, seletividade; linearidade e faixa de aplicação. Dentre os parâmetros citados, na robustez é sugerido realizar o estudo de estabilidade. Em um método cromatográfico, é avaliada a sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise, por exemplo, pela variação fatores como a concentração de solvente orgânico, pH, programação da temperatura, entre outros. (RIBANI *et al.*, 2004; DE PAULA e SENA, 2007; LUO *et al.*, 2018).

Seja na etapa de pesquisa e desenvolvimento do produto ou na liberação do produto acabado pelo controle de qualidade, o método de análise por cromatografia líquida inclui alguns parâmetros cromatográficos que validam o teste, ou seja, validam o “System suitability”. Para monitorar a operação, a aquisição, processamento e relatório de dados, utilizam-se, por exemplo, o software Empower™. O software determina o desempenho analisando a capacidade do sistema em separar componentes. Nesse sentido, executa cálculos estatísticos dos testes laboratoriais nos resultados e apresentam as informações em formato de tabela ou gráficos, baseando-se, por exemplo, na adequação do sistema *United States Pharmacopeia* (USP). (Empower System Suitability Quick Reference Guide, 2002).

Neste contexto, são apresentadas a seguir algumas definições importantes que garantem a conformidade do sistema cromatográfico.

O tempo de retenção é o tempo necessário de eluição de um analito desde a sua injeção no equipamento, passando pela coluna e atingindo seu ponto mais alto de detecção (SHIMADZU, 2019). Assim como a área e altura do pico, por exemplo, o tempo de retenção avalia a reprodutibilidade do sistema, analisando injeção a injeção.

O número de pratos teóricos (N) é um parâmetro que indica a eficiência da coluna com base em cálculos nos quais quanto maior o número de pratos teóricos, maior o número de interações com a coluna e mais nítidos serão os picos. Segue abaixo a equação (1):

$$N = 16(t/w)^2 \quad (1)$$

Onde:

- w = largura do pico base.
- t: tempo de retenção da substância (SHIMADZU, 2019).

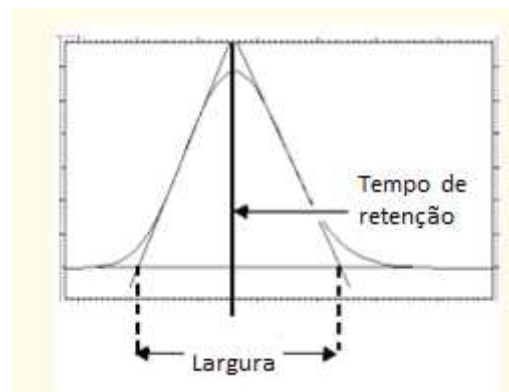


Figura 2: Ilustração adaptada do cálculo de pratos teóricos conforme USP
Fonte: Empower System Suitability Quick Reference Guide (2002)

O fator de cauda é um coeficiente que mostra o grau de simetria do pico. E é calculado de acordo com a equação (2).

$$A_s = W_{0,05}/2f \quad (2)$$

Onde:

- $W_{0,05}$ = largura do pico a 5%.
- f = distância a partir do valor cume do pico para a borda inicial do pico, à distância a ser medida em um ponto de 5% da altura do pico a partir da linha de base (SHIMADZU, 2019).

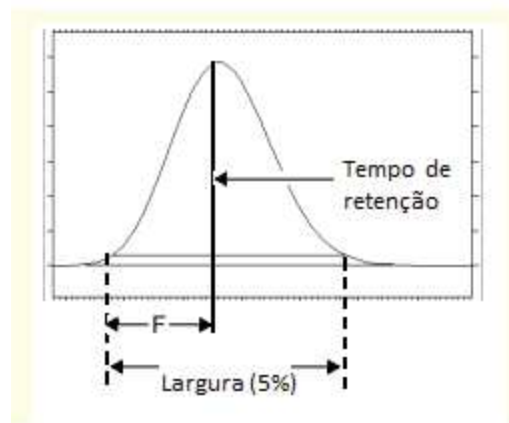


Figura 3: Ilustração do cálculo de fator de cauda conforme USP
Fonte: Empower System Suitability Quick Reference Guide (2002)

A precisão do sistema se dá pela repetibilidade de quantificação de um único padrão, a variação aceitável do método analítico engloba o desvio padrão relativo (DPR) < 2%. A simetria de pico < 2% e pratos teóricos > 2000 (MADHURI *et al.*, 2016).

2.3 ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES

Para melhor aproveitamento do funcionamento do laboratório, frequentemente, as análises cromatográficas são realizadas o tempo todo. Dependendo do fluxo de produção, um produto a ser analisado pode ficar horas no equipamento ou semanas. Nesse sentido, para gerar resultados satisfatórios e reprodutíveis, as amostras, padrões e reagentes devem ser estáveis por um período adequado (Ribani *et al.*, 2004).

A Resolução 45 da ANVISA de 2012 dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade em insumos farmacêuticos ativos (IFA), que é denominada como qualquer substância introduzida na formulação de uma forma farmacêutica, exercendo atividade farmacológica, por exemplo. O teste de estabilidade tem por objetivo, determinar ou acompanhar a data de reteste ou prazo de validade, avaliando possíveis degradações químicas e/ ou mudanças físicas, vinculadas ao teor do insumo farmacêutico.

Segundo a RDC 166 (2017) a substância química de trabalho ou a Substância Química de Referência Farmacopeica, são utilizadas para fins de quantificação e identificação do analito de interesse em uma amostra, por

cromatografia líquida de alta eficiência. A SQT possui um custo menor, pois é padronizada a partir de uma SQF que possui um alto grau de pureza que reflete em um custo mais elevado, pois sua aquisição demanda tempo, pois, na maioria das vezes é importado de outros países.

Mediante a esse fator, a aplicabilidade de um estudo de estabilidade direcionado a um padrão, como temperatura ao longo do tempo, por exemplo, teria a vantagem de redução de custo e tempo de preparo, pois, comprovando analiticamente que o padrão é estável a uma determinada condição, poderá ser reutilizado sem o comprometimento da análise.

Uma das avaliações analíticas que indicam a estabilidade do ativo é avaliar a sua recuperação ao longo do tempo. Alguns fatores como repetibilidade, ou seja, condições mantidas constantes, analista, soluções e equipamentos, devem ser levados em consideração para a confiabilidade dos resultados.

2.4 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO – AZITROMICINA

A azitromicina base possui a fórmula molecular $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ e estrutural apresentada na figura 4. Possui a nomenclatura IUPAC: (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimeilamino) 3-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-2-etil-3,4,10-trihidroxi-13-[(2R,4R,5S,6S)-5 hidroxi-4-methoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-1 oxa-6-azaciclopentadecan-15-ona. A fórmula molecular da azitromicina diidratada é $C_{38}H_{72}N_2O_{12} + 2H_2O$ e apresenta-se a forma de um pó branco cristalino. Em relação à solubilidade é considerada muito pouco solúvel em água, solúvel em clorofórmio, facilmente solúvel em etanol e metanol. (BUDAVARIS, 1996; FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003; PubChem, 2018).

A azitromicina tem sido amplamente utilizada desde meados dos anos 80. Segundo Timoumi e colaboradores (2010), este fármaco possui uma alta ação bacteriostática diante de um amplo espectro de bactérias patogênicas e é usado principalmente para o tratamento de doenças respiratórias e infecções dermatológicas. Mais recentemente as atividades imunomoduladoras foram evidenciadas para esta droga expandindo assim, na terapia em longo prazo, seu uso para patologias pulmonares crônicas (KANOH e RUBIN, 2010).

A azitromicina apresenta-se como um pó branco, pouco solúvel em água. O estado sólido da azitromicina depende do solvente utilizado no processo de cristalização (Montejo-Bernardo *et al.*, 2006). Se o antibiótico é cristalizado em uma mistura de água e acetona, o produto obtido (azitromicina) é o di-hidrato (Djokic *et al.*, 1988). Se o antibiótico é cristalizado em uma mistura de álcool de água a forma de azitromicina obtida é a mono-hidrato (Montejo-Bernardo *et al.*, 2006).



Figura 5: Zitromax® - Medicamento referência de azitromicina. Forma de apresentação comprimido e forma de apresentação suspensão
Fonte: Google Imagens

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DA ANÁLISE

O trabalho foi realizado no laboratório Instrumental – Controle de qualidade, localizado na Indústria Farmacêutica Prati – Donaduzzi, na cidade de Toledo – PR.

3.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA – PRIMA

Para a realização das análises foi disponibilizado todos os insumos necessários pela indústria Farmacêutica Prati – Donaduzzi, incluindo a substância química de trabalho azitromicina diidratada, com teor declarado de 94,42%. Sendo que a identidade e o teor foram devidamente comprovados experimentalmente, no laboratório da empresa.

3.3 EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos que foram utilizados para realizar o estudo de estabilidade estavam com suas respectivas calibrações vigentes. Os equipamentos CL_030 e CL_036 foram usados na avaliação do método de azitromicina comprimido e o CL_029, no método de azitromicina suspensão. Segue a tabela 1 com os dados dos mesmos.

Tabela 1: Equipamentos utilizados

Equipamento	Código de Identificação	Validade
HPLC Shimadzu Prominence® LC-20A	CL_036	03/19
HPLC Shimadzu Prominence® LC-20A	CL_029	12/19
HPLC Shimadzu Prominence® LC-20A	CL_030	12/19

Fonte: Autor

3.4 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Todas as colunas cromatográficas utilizadas no estudo de estabilidade são colunas dedicadas ao produto e utilizadas na rotina do laboratório desde que atendem as especificações solicitadas no método.

Segue a Tabela 2 com as colunas cromatográficas utilizadas no estudo e suas respectivas informações e a fotografia de uma das colunas sendo utilizadas durante a análise do estudo de estabilidade.

Tabela 2: Colunas cromatográficas utilizadas no estudo de estabilidade

Coluna Cromatográfica	Serial Number	Finalidade
Akzo – Nobel Kromasil C8 150 mm x 4,6 mm x 5µm	L204724	Uso na análise de doseamento do método de azitromicina comprimido no experimento 1.
Akzo – Nobel Kromasil C8 150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm	L204725	Uso na análise de doseamento do método de azitromicina comprimido no experimento 2.
Akzo Nobel Kromasil C8 150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm	E187966	Uso na análise de doseamento do método de azitromicina suspensão.

Fonte: Autor

3.5 REAGENTES

Os reagentes que foram utilizados no estudo de estabilidade são de fornecedores confiáveis e em sua maioria são reagentes de grau de pureza para análise em HPLC. Dessa forma, na tabela 3 são apresentados os reagentes.

Tabela 3: Reagentes utilizados nos estudos de estabilidade de azitromicina

Reagente	Fabricante	Pureza (%)	Validade	Lote
Água	Milli-Q®	Tipo 1 – Ultra pura	Variado ¹	Variado ¹
Acetonitrila	Biograde	99,9	31/03/2023	18030282
Hidróxido de sódio	Synth	Grau PA	05/06/2021	0141026
Fosfato de potássio monobásico	Fluka	99,5	10/03/2020	995795

Fonte: Autor

Nota:

- 1 – A validade e o lote da água utilizada para análise alteram diariamente.

3.6 METODOLOGIA ANALÍTICA E PROTOCOLO DE ESTUDO DE ESTABILIDADE

Primeiramente, realizou-se a pesagem na balança analítica de dois padrões por método avaliado (Item 3.6.3), foi deixado no ultrassom até a completa solubilização do ativo, aproximadamente 20 minutos, atentando-se ao aquecimento máximo de 40°C. Ao finalizar o preparo, foi realizada a etapa de fracionamento para vials que foram armazenados em geladeira de 2 – 8°C e em estufa a uma temperatura de 30°C, simulando a condição máxima permitida dentro do laboratório. As análises das soluções padrões foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (FIGURA 6).

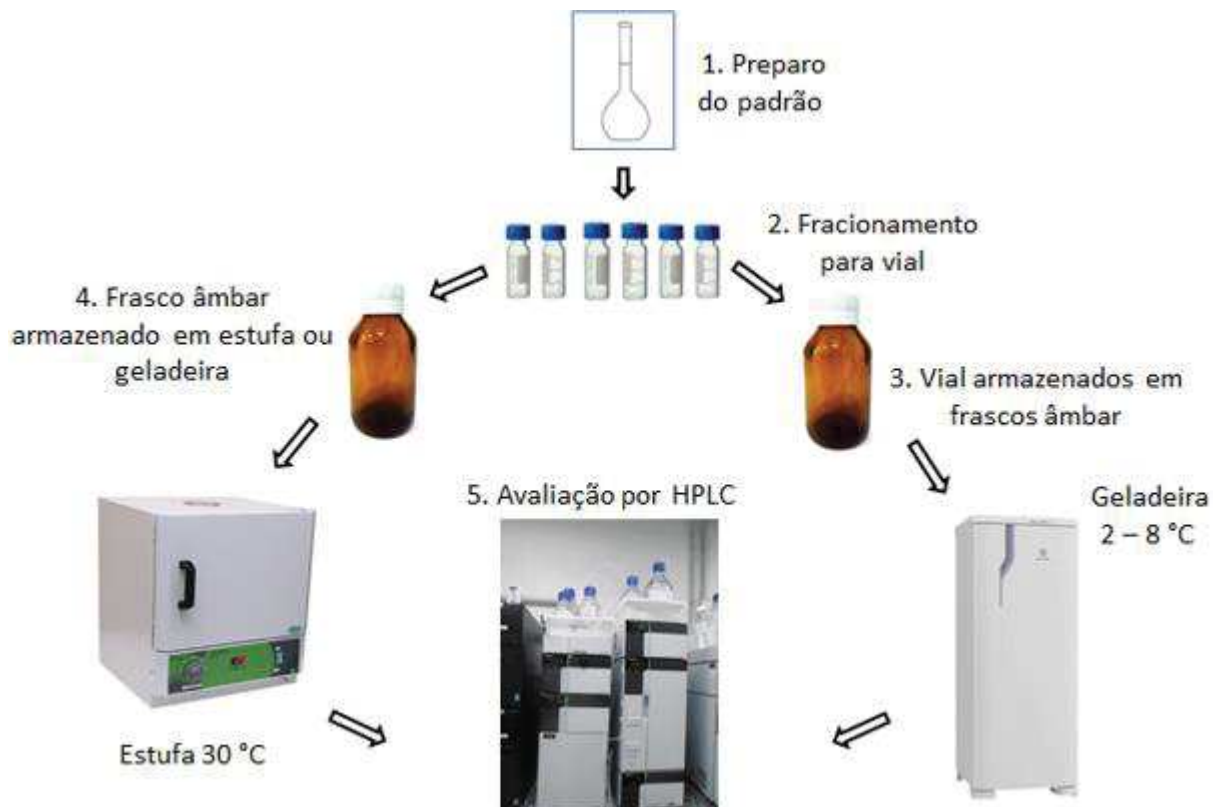


Figura 6: Ilustração do delineamento experimental
Fonte: Autor

Após o preparo do padrão (0 hora) e injetados em tempos distintos e em diferentes condições de armazenamento, a fim de determinar se nesse período haverá a recuperação do ativo. O autor Shabir (2003), sugere que a variação entre o padrão em estudo comparado a um padrão recém preparado seja de até 2%. Diante disso optou-se em adaptar essa variação para 1,5%, ou seja, 98,5% – 101,5%, com o intuito de restringir a faixa de aceitação a fim de evitar possíveis desvios analíticos.

3.6.1 Soluções

- Solução tampão fosfato de potássio monobásico 30mol L⁻¹ pH 7.5: dissolveu-se 4,08 g de fosfato de potássio monobásico em 1000mL de água purificada (Milli-Q) e o pH foi ajustado para 7,5 com hidróxido de sódio 50%.
- Hidróxido de sódio a 50%: pesou-se 50 g de hidróxido de sódio, transferiu-se para um béquer de 100mL, dissolvendo-o em 50mL de água purificada. Foi resfriado a temperatura ambiente. Na sequência, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e completou-se com o mesmo solvente.
- Fase móvel – tampão fosfato de potássio monobásico: Acetonitrila (35: 65).
- Solução diluente: misturou-se acetonitrila e água purificada na proporção 1:1 (v/v).

3.6.2 Sistema cromatográfico

- Fluxo: 1mL/ min.
- Detector: UV/Vis 220nm para análise de azitromicina diidratada – Pó para suspensão oral e UV/Vis 210nm análise de azitromicina comprimido.
- Volume injetado - 50µL.
- Temperatura do forno: 40°C.
- Coluna: Akzo – Nobel Kromasil, C8, 150mm de comprimento x 4,6mm de diâmetro x 5µm de tamanho de partícula.
- Tempo de retenção aproximado: 7 minutos para azitromicina diidratada – Pó para suspensão oral e 8 minutos para azitromicina comprimido.
- Tempo de corrida aproximado: 1,5 vezes o tempo de retenção do ativo para azitromicina diidratada – Pó para suspensão oral e 15 minutos para azitromicina comprimido.

3.6.3 Soluções analíticas

- Solução padrão de Azitromicina Diidratada – Pó para suspensão oral: pesou-se 40mg de padrão de azitromicina diidratada para balão volumétrico de 20mL. Adicionou-se cerca de 15mL de solução diluente e levou ao ultrassom

(aquecimento máximo de 40°C) até completa solubilização. Resfriou-se a temperatura ambiente e completou-se o volume com diluente. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana de PVDF de 0,45µL. [Azitromicina diidratada] = 2,0mg/mL.

- Solução padrão de Azitromicina comprimido revestido: pesou-se o equivalente a 20,0mg de padrão de azitromicina diidratada para balão volumétrico de 10mL. Adicionou-se 5mL de fase móvel e levou ao ultrassom com aquecimento (máximo de 40°C) até completa solubilização. Resfriou-se a temperatura ambiente e completou-se o volume com fase móvel. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana hidrofílica de 0,45µL de abertura de poro. [Azitromicina diidratada] = 2,0mg/mL.

3.6.4 Procedimento experimental

3.6.4.1 Avaliação do sistema

Após a estabilização do sistema cromatográfico, conforme metodologia analítica, os padrões foram injetados imediatamente após o preparo, para verificar se atendiam a recuperação de 2,0%, conforme o manual de boas práticas cromatográficas (MBPC) da empresa. Neste contexto, confirmou-se a exatidão do sistema e seguiu-se com o protocolo de 6 injeções do padrão 1, registrando o tempo zero da análise.

Foram avaliados também os seguintes parâmetros para validar o sistema:

- A DPR para a área do pico do ativo nas replicatas não deve ser superior a 2%.
- A eficiência da coluna, quando determinada para o pico da azitromicina comprimido revestido não deve ser inferior a 2000 pratos teóricos.
- O valor de fator de cauda para o pico da azitromicina não deve ser superior a 2.

Após a avaliação do sistema, em intervalos de tempo os padrões foram retirados simultaneamente de suas condições e foram injetados.

A obtenção dos cromatogramas foi feita pelo software Empower 3, onde foi avaliado e calculado o fator resposta, que é a razão entre o sinal produzido pelo analito e a quantidade de analito que gerou o sinal entre as soluções padrão 1 e 2 e também as recuperações dos controles ao longo das injeções para avaliação da estabilidade

das soluções. As equações (3), (4) e (5) são utilizadas para avaliação do sistema, sendo elas:

$$FR = (A_p \times FD_p \times 100) / (m_p \times T_p \times V_{inj}) \quad (3)$$

Onde:

- A_p = área do pico da solução padrão;
- FD_p = fator de diluição (mL);
- m_p = massa do padrão (mg);
- T_p = teor do padrão (%);
- V_{inj} = volume de injeção (μ L).

Para avaliar a recuperação, foi utilizado a equação (4):

$$\text{Recuperação} = (T_0/T_x) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

- T_0 : tempo inicial;
- T_x : tempo final de cada etapa de análise.

O desvio padrão relativo das replicatas injeções do padrão 1, foi calculado de acordo com a equação (5):

$$DPR_{INJ} = (S_{inj}/\bar{A}) \times 100 \quad (5)$$

Onde:

- S_{inj} = desvio padrão;
- \bar{A} = média das áreas do pico de azitromicina nas múltiplas injeções da Solução padrão 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas guias internacionais e artigos abordam a importância do estudo de estabilidade de padrões e soluções na etapa de robustez da validação do método analítico com intuito de garantir a confiabilidade dos resultados. (Linda L., 1994; Rodrigues Oriqui, 2012; Shabir, 2003).

Dessa forma, cada ativo é avaliado por um método de análise e dependendo da sua forma de apresentação, para um mesmo produto, o método é diferente. Para estes estudos foram utilizadas as metodologias vigentes da análise de doseamento de produto acabado de azitromicina comprimido e azitromicina diidratada pó para suspensão oral da empresa Prati- Donaduzzi. Essas metodologias são baseadas na Farmacopeia Brasileira e na Farmacopeia Americana (USP). Nesta seção serão discutidos os resultados de ambos os métodos avaliando o ativo azitromicina.

4.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO FRENTE AO MÉTODO DE AZITROMICINA COMPRIMIDO

O estudo foi realizado durante a rotina do laboratório, dessa forma, foram realizados dois experimentos, experimento 1 (E1) avaliando em até 20 horas e experimento 2 (E2) avaliando em até 117 horas. Para cada experimento seguiu-se com o preparo de novo diluente, fase móvel e trocou-se de coluna e cromatógrafo. Foi efetuada a pesagem de dois padrões para cada experimento, conforme item 3.6.3.

A massa obtida das respectivas pesagens pode ser verificada na Tabela 4. Para cada experimento com o sistema cromatográfico estável, injetou-se o padrão 2 (P2) e avaliou-se a sua recuperação frente à primeira injeção do padrão (P1), que segundo o manual de boas práticas cromatográficas da Prati-Donaduzzi deve estar entre 98,0 a 102,0%. Neste primeiro momento preconizou-se avaliar os parâmetros de pratos teóricos, fator de cauda e tempo de retenção solicitado em metodologia. Confirmando os parâmetros, seguiu-se com as réplicas do P1. A partir da primeira injeção do padrão 1, contabilizou-se o tempo zero da análise.

Segundo Kalakuntla e Kumar, 2009 e Guia de Validação de método Bioanalítico, 2012 da Agência Europeia de Medicina, recomenda-se um a injeção do padrão em sextuplicata (n =6) para que possa ser avaliada a estabilidade.

A figura 7 apresenta o cromatograma de uma injeção do padrão azitromicina avaliado no início da análise. Este cromatograma refere-se ao experimento 2 e apresenta o tempo de retenção em 7,74 minutos, para o outro experimento o tempo de retenção ficou em torno de 7,23 minutos, portanto, ambos estão de acordo com o tempo estipulado em metodologia que é de aproximadamente 8 minutos.

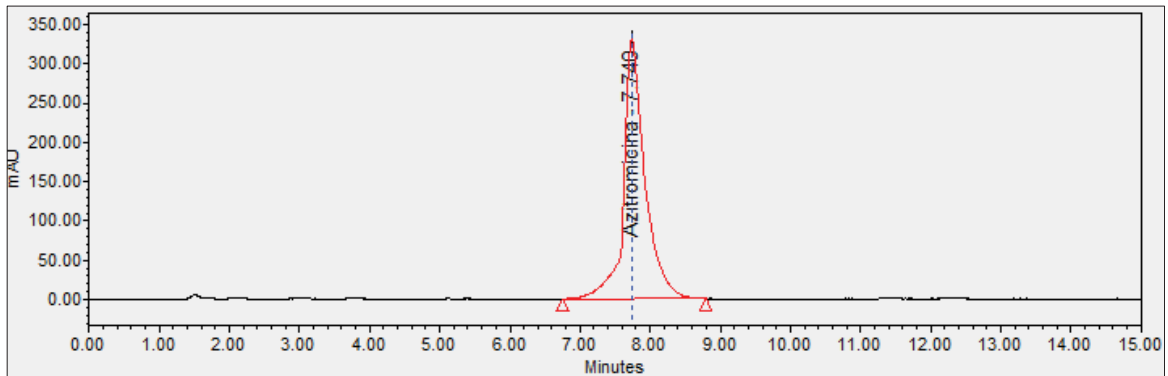


Figura 7: : Cromatograma de azitromicina comprimido
Fonte: Empower 3

A tabela 4 apresenta as médias das replicatas do P1 e do P2 frente aos dois experimentos, com as suas respectivas áreas, fator de cauda, pratos teóricos e também o resultado da DPR para o pico do ativo nas replicatas do P1 que segundo a metodologia não deve ser superior a 2% e para ambos os testes estão de acordo, confirmando assim a exatidão do sistema.

Posteriormente, observa-se o valor da média do fator de cauda (USP), no primeiro estudo é de 1,59 e no segundo 1,12, a metodologia estabelece que não deve ser superior a 2. Vale ressaltar que quanto mais próximo de 1 mais simétrico é o pico. A eficiência da coluna quando determinada para o pico do ativo não deve ser inferior a 2000 pratos teóricos, assim sendo, para o experimento 1 a média ficou 7323 e para o experimento 2, 4095 pratos teóricos.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos avaliados nas curvas dos diferentes experimentos

Parâmetros	Experimento 1	Experimento 2
Pureza do padrão (%):	94,42	94,42
Massa pesada do padrão 1 (mg):	20,49	19,96
Massa pesada do padrão 2 (mg):	20,80	20,38
Área das replicatas:		
Média da injeção padrão 1	8115664	6993659
Injeção padrão 2	8195059	7098946
Média fator de cauda (USP):	1,59	1,12
Média pratos teóricos (USP):	7323	4095
DPR (%) padrão 1:	0,11	0,19
Recuperação do padrão 2 (%):	99,47	99,41

Fonte: Autor

Diante da avaliação de todos os resultados ao longo das curvas, foi possível dar continuidade no estudo de estabilidade. Ribani *et al.*, (2004), sugere que os parâmetros devem ser monitorados ao longo das injeções para garantir a conformidade do sistema (“system suitability”).

Segundo Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2013), a porcentagem do analito recuperado quando a amostra de teste é conduzida através de todo o método é a recuperação.

Dessa forma, num primeiro momento será abordada a condição de estufa à 30°C dos dois experimentos avaliados (TABELA 5). O primeiro experimento (E1) foi avaliado durante um período de 20 horas e o segundo experimento (E2), 117 horas. Durante todo o estudo os parâmetros de fator de cauda e pratos teóricos permaneceram de acordo com a metodologia. Após cerca de 4 horas do início da análise, retirou-se simultaneamente das suas condições de armazenamento e realizaram-se as injeções dos padrões. Para E1 a recuperação foi de 100,36% e para E2 101,11%.

Para E1 no tempo 12 horas foi detectada que havia uma bolha no *vial* após a injeção, sendo assim, este teste não será considerado como um resultado válido.

Diante dos resultados, é possível verificar que o padrão azitromicina avaliado na condição de estufa está na faixa de aceitação de 98,5% a 101,5%, sendo, portanto, estável em até 117 horas. Para verificar a possibilidade de utilização a partir das 117 é necessário realizar um tempo de estudo maior. Vale ressaltar que a o diluente utilizado para a solubilização deste ativo é a fase móvel e está seguindo o protocolo laboratorial tem estabilidade de 10 dias.

Tabela 5: Avaliação da estabilidade em horas do padrão de azitromicina na condição de estufa para os experimentos E1 e E2

	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Fator de cauda	Pratos Teóricos	Recuperação (%)	Tempo (\cong horas)
E1	8144707	1,54	7157	100,36	4
	7906763	1,50	6915	97,43*	12
	8058612	1,43	6733	99,30	17
	8027402	1,32	6600	98,91	20
E2	7071279	1,15	3954	101,11	4
	7047655	1,18	3671	100,77	24
	7053601	1,18	3590	100,86	28
	7060750	1,19	3519	100,96	50
	7059406	1,21	3311	100,94	75
	7089908	1,21	3272	101,38	84
	7005773	1,10	3674	100,17	117

Fonte: Autor

Nota:

(*) Resultado desconsiderado.

Neste momento, serão abordados os resultados dos padrões armazenados em geladeira que abrange a faixa de temperatura entre 2- 8°C. O padrão aguardou um tempo de estabilização à temperatura ambiente de aproximadamente 15 minutos após ter sido retirado da geladeira. Conforme apresentado na Tabela 6, o E1 avaliado em 20 horas e o E2 avaliado em 117 horas. Em 4 horas após a primeira injeção do P1 foi injetado o padrão e para ambos os experimentos os resultados ficaram dentro do limite preconizado 98,5% a 101,5%.

Para o E1, foi injetado nos tempos 12, 17 e 20 horas e os resultados atenderam a especificação. No E2, passado 24 horas, o padrão ficou com um resultado de recuperação do controle de 106,59% com uma área 7454512 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$, observou-se que em relação à média das áreas do padrão 1 (6993659 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$), obteve um aumento de aproximadamente 7% de sua área e nos próximos tempos injetados os resultados permaneceram acima de 101,5%. Por se tratar de uma avaliação delicada, uma possibilidade de aumento de área seria a precipitação do ativo em temperaturas baixas e a agulha teria injetado o precipitado de uma solução não homogênea. Nesse sentido, o padrão apresentou estabilidade de até 20 horas

armazenado na condição de geladeira e após este período os resultados não foram satisfatórios.

Tabela 6: Avaliação da estabilidade em horas do padrão de azitromicina na condição de geladeira (2- 8°C)

	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Fator de Cauda	Pratos Teóricos	Rec. (%)	Tempo (\cong horas)
E1	8152971	1,55	7110	100,46	4
	8138868	1,51	6947	100,29	12
	8232856	1,42	6696	101,44	17
	8112366	1,29	6537	99,96	20
E2	7031521	1,13	4128	100,54	4
	7454512	1,15	3953	106,59	24
	7348201	1,16	3752	105,07	28
	7608389	1,18	3662	108,79	50
	7161915	1,20	3328	102,41	75
	7143589	1,23	3237	102,14	84
	7468303	1,10	3521	106,79	117

Fonte: Autor

4.1.1 Detecção de impureza

Ao longo dos estudos mencionados acima, observou-se a presença de um pico no tempo de retenção em aproximadamente 2,3 minutos e foi nomeado como impureza 1. As figuras 8 e 9 estão relacionadas ao experimento 2, nelas são comparadas o perfil cromatográfico no tempo zero de análise (A), no tempo 4 horas (B) e no tempo 117 horas (C).

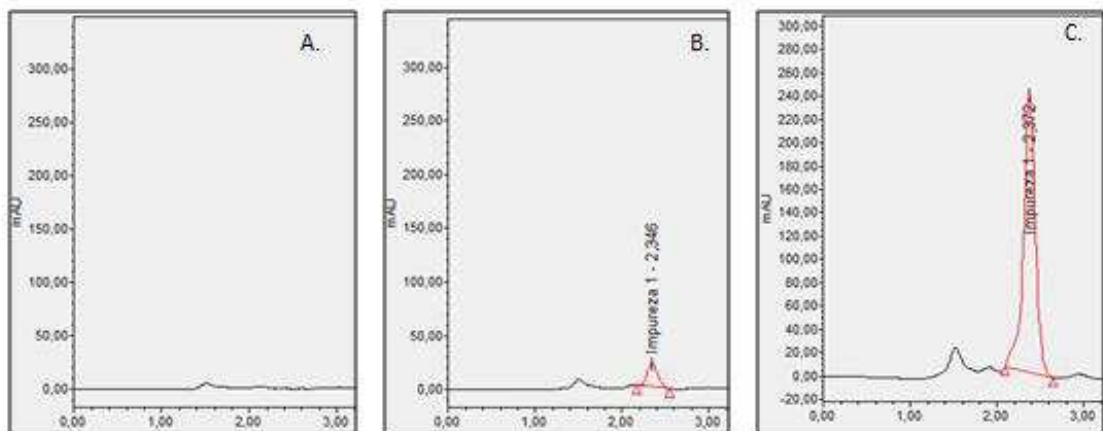


Figura 8: Perfil cromatográfico comparativo de 0 a 3 minutos para avaliar a impureza na condição estufa do experimento 2. (A) Injeção padrão no tempo zero da análise. (B) Injeção do padrão no tempo 4 horas e (C) injeção do padrão no tempo 117 horas

Fonte: Autor

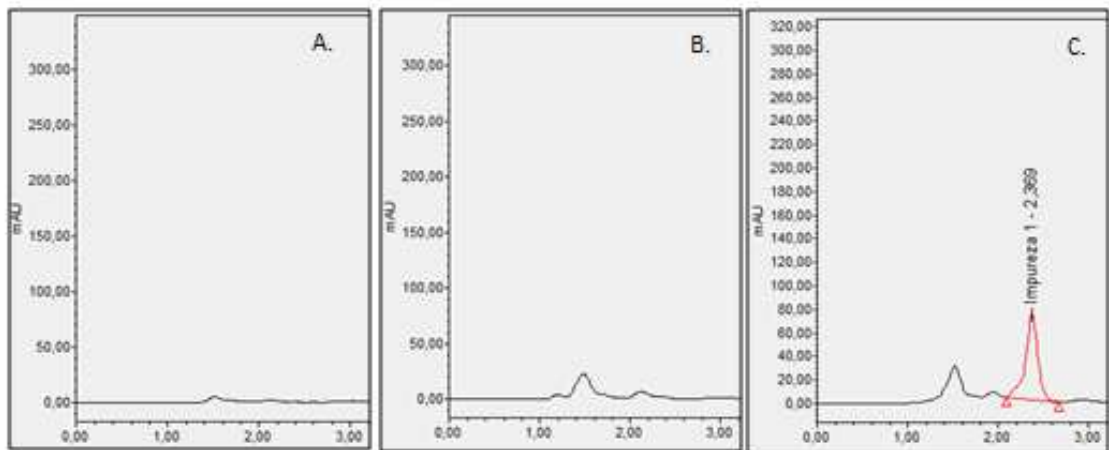


Figura 9: Perfil cromatográfico comparativo de 0 a 3 minutos para avaliar a impureza na condição geladeira do experimento 2. (A) Injeção padrão no tempo zero da análise. (B) Injeção do padrão no tempo 4 horas e (C) injeção do padrão no tempo 117 horas
 Fonte: Autor

No tempo zero de análise (A) não foi detectada a impureza 1. No tempo 4 horas para a condição estufa a impureza é detectada com uma área de 182527 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ e após 117 horas sua área está em 2264973 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$, 12 vezes superior à primeira. Em contrapartida, para a condição geladeira houve detecção em 4 horas e em 117 horas o pico apresentou uma área de 695436 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$. Dessa forma, é possível evidenciar uma relação direta entre tempo e aumento da área da impureza para o presente método cromatográfico.

Na figura 10 pode-se observar os espectros de absorção UV da impureza 1 extraído ao longo do E1 por um detector de arranjos de diodos (DAD) modelo SPD –M20A SHIMADZU, acoplado ao HPLC. Observa-se que as bandas apresentam formas semelhantes, variando em sua intensidade de absorção.

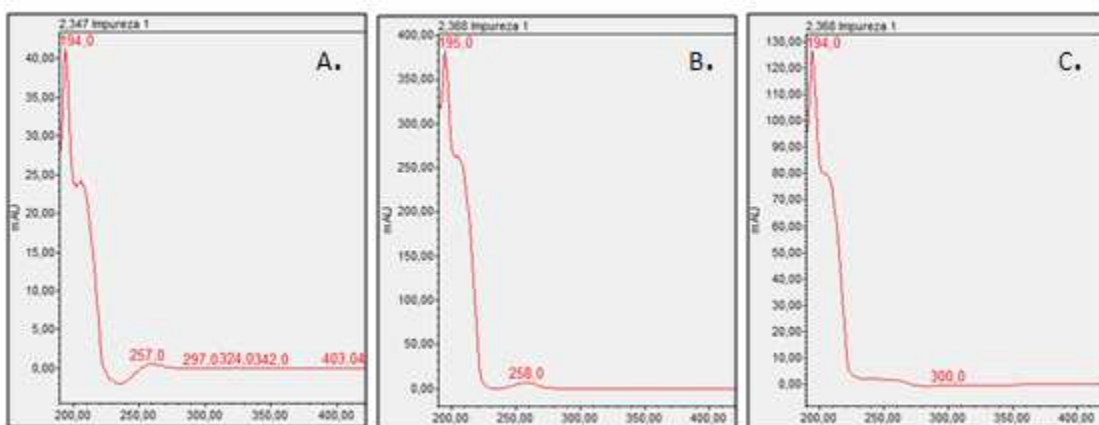


Figura 10: Espectro comparativo de absorção UV da impureza no experimento 2. (A) Injeção estufa no tempo 4 horas; (B) Injeção estufa no tempo 117 horas e (C) Injeção geladeira no tempo 117 horas
 Fonte: Autor

Para ilustrar o perfil de absorção, espectro do padrão de azitromicina foram escaneados entre 190 a 800nm e a absorbância máxima obtida foi em 198 nm, conforme figura 11. Sendo também representada na condição estufa nos tempos 4 e 117 horas (FIGURA 12).

Para que determinado fármaco possa ser analisado por esta técnica, o mesmo deve possuir grupamentos cromóforos e ter absorvidade em dado solvente. Nesse sentido, a molécula de azitromicina contém um grupamento amina, que tem por característica a formação de uma única banda abaixo de 220nm com intensidade de média a baixa (YANG *et al.*, 2009).

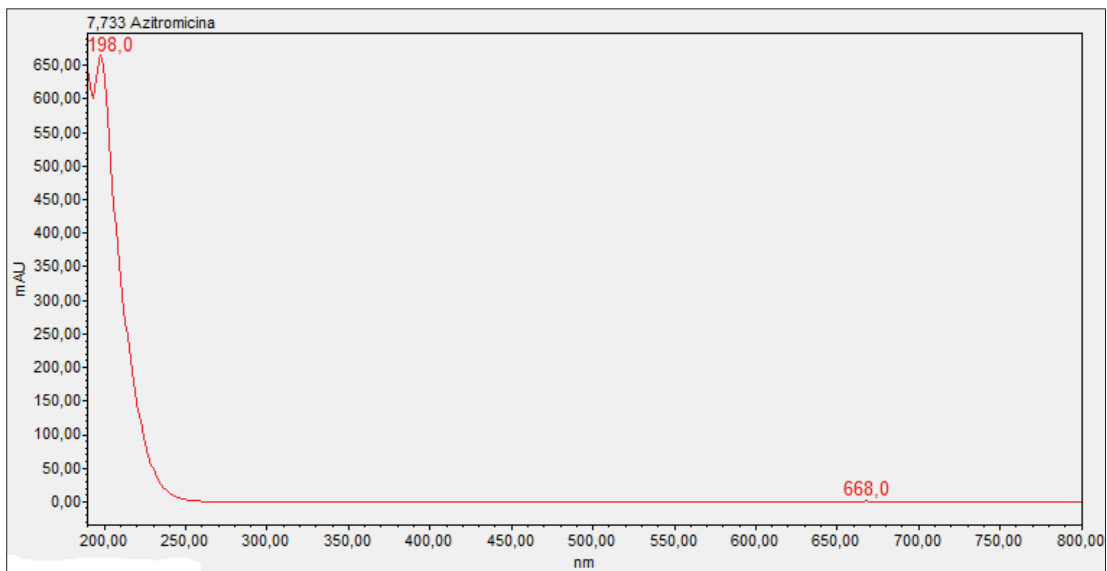


Figura 11: Espectro de absorção UV-VIS da azitromicina avaliado no tempo zero da análise
Fonte: Autor

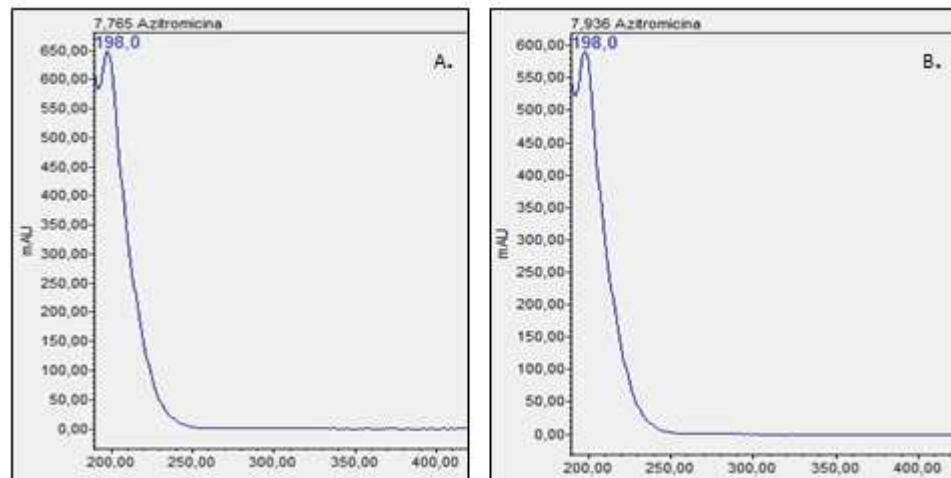


Figura 12: Espectro de absorção UV da azitromicina na condição estufa. (A) Tempo 4 horas e (B) Tempo 117 horas
Fonte: Autor

De acordo com a literatura, espera-se que o espectro de absorção para um átomo seja composto de linhas muito agudas, em conformidade com um processo quantizado em uma transição eletrônica. No entanto, para as moléculas, como há várias possíveis transições envolvidas devido aos muitos modos excitados de vibração e rotação, o equipamento fornece o espectro de absorção de UV como uma banda larga traçada sobre as transições envolvidas. Conseqüentemente, a absorção máxima da banda encontra-se centrada próximo ao comprimento de onda da transição principal da molécula. Nesse sentido, pode-se correlacionar à intensidade da banda máxima e o número de moléculas, ou seja, com o aumento do número de moléculas capazes de absorver em um mesmo comprimento de onda é esperado que haja um aumento na intensidade da banda. Outro fator importante no aumento da intensidade de absorção é a eficiência de absorção que a molécula neste dado comprimento de onda apresenta. (Vaz *et al.*, 2015).

A tabela 7 apresenta dados referentes aos experimentos da condição estufa a qual apresentou um maior aumento da impureza 1. Nota-se que a área da impureza aumenta conforme o tempo de estudo, aumentando também a intensidade de absorção e em contrapartida, a área do padrão tendência a diminuir assim como a intensidade de absorção do ativo. É importante evidenciar que o método utilizado é específico para análise de doseamento, nesse sentido, sugere-se análises relacionadas à degradação do ativo.

Tabela 7: Comparativo dos experimentos E1 e E2 na condição estufa em relação à área do ativo e área da impureza bem como suas respectivas intensidades de absorção no espectro UV

	Área ativo ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)	Área imp. ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)	Intensidade de abs. ativo	Intensidade abs. Impureza	Tempo (\cong horas)
E1	8100218	-	898,36	-	0
	8144707	70052	891,91	18,66	4
	8027402	604082	823,99	168,54	20
E2	6998762	-	664,60	-	0
	7071279	182527	647,97	41,27	4
	7005773	2264973	589,99	382,28	117

Fonte: Autor

4.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO FRENTE O MÉTODO AZITROMICINA SUSPENSÃO

O estudo foi realizado durante a rotina do laboratório, dessa forma, o experimento foi avaliado em até 113 horas. Primeiramente foi efetuada a pesagem de

dois padrões, conforme item 3.6.3. A massa obtida da primeira pesagem (P1) foi de 40,60 mg e a massa obtida da segunda pesagem (P2) foi de 40,94 mg. Com o sistema cromatográfico estável, injetou-se o P2 e avaliou-se a sua recuperação frente à primeira injeção do P1 que ficou entre 98,5% e 101,5% (TABELA 8), dessa forma seguiu-se com as réplicas do P1. A partir da primeira injeção do padrão 1 às 14:47 horas, contabilizou-se o tempo zero de análise.

Tabela 8: Análise das replicatas do padrão 1 e recuperação do padrão 2

Análise do padrão de Azitromicina suspensão	
Pureza do padrão (%):	94,42
Massa pesada do padrão P1 (mg):	40,60
Massa pesada do padrão P2 (mg):	40,94
Área das replicatas:	
Injeção P1.1	3336005
Injeção P1.2	3338772
Injeção P1.3	3337725
Injeção P1.4	3344578
Injeção P1.5	3330648
Injeção P1.6	3322331
Injeção P2.1	3340156
Média das injeções P1:	3340156
DPR (%) P1:	0,23
Recuperação do P2 (%):	99,61

Fonte: Autor

A figura 13 apresenta o cromatograma de uma injeção do padrão azitromicina avaliado no início da análise. O tempo de retenção do ativo iniciou em 6,41 minutos e na última injeção avaliado estava em 6,75, estando, portanto, dentro do estipulado em metodologia que é de aproximadamente 7 minutos. A eficiência da coluna não é solicitada como parâmetro avaliativo para este método, porém, está acima de 2000 pratos teóricos (USP), conforme é preconizado de modo geral (MADHURI *et al.*, 2016).

O fator de cauda (USP) para o pico de azitromicina nas replicatas do P1 ficou na média de 1,01 e no decorrer das injeções foi aumentando e na última injeção avaliada ficou em 2,07. Para este parâmetro o método solicita que não deve ser superior a 2, neste caso, o resultado está de acordo.

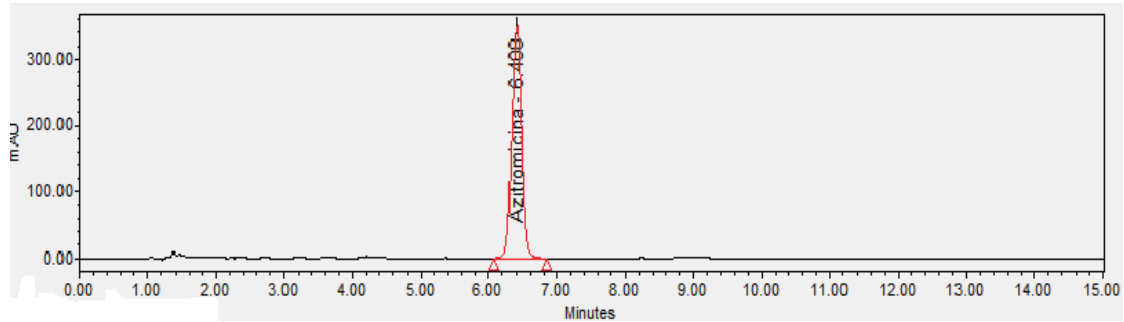


Figura 13: Cromatograma de azitromicina suspensão
Fonte: Empower 3

A tabela 9 apresenta a recuperação do padrão 1 e suas respectivas áreas ao longo aproximadamente 113 horas, nas duas condições avaliadas. Após cerca de 6 horas do início da análise, retirou-se simultaneamente das suas condições de armazenamento e realizaram-se as injeções dos padrões. Para a condição estufa a recuperação foi de 98,84% e para a condição geladeira 100,92%.

Depois de 11 horas injetou-se às duas condições e ambas ficaram dentro do limite especificado. No tempo de 22 horas, o padrão estufa obteve uma recuperação de 99,57% e nos tempos 40, 72 e 113 horas, os resultados foram 88,32%, 83,05% e 86,66%, respectivamente. Dessa forma, considerou-se para esta condição a estabilidade em temperatura ambiente de até 22 horas. Pois, a partir desse tempo, os resultados não foram reprodutíveis.

Para a situação geladeira, os resultados dos controles a partir do tempo 12 horas até 72 horas, se mantiveram dentro da faixa de 98,5% à 101,5%, com média de 100,36%. O resultado para análise 113 horas ficou com recuperação de 100,51%.

Tabela 9: Recuperação do padrão azitromicina diidratada frente à condição de estufa e geladeira ao longo do tempo, avaliada pelo método de pó para suspensão oral

Condição	Área (µV*sec)	Fator de Cauda	Pratos Teóricos	Rec. (%)	Tempo (≅ horas)
Estufa	3295938	1,13	10791	98,84	6
	3308214	1,23	10909	99,21	11
	3320230	1,40	10753	99,57	22
	2945256	1,68	10177	88,32	40
	2769382	2,01	9153	83,05	72
	2889843	2,01	9527	86,66	113
Geladeira	3365309	1,14	10824	100,92	6
	3331551	1,24	10833	99,91	12
	3352827	1,41	10855	100,54	22
	3338527	1,70	10192	100,11	40
	3345292	2,04	9101	100,32	72
	3351549	2,07	9359	100,51	113

Fonte: Autor

Segundo Ribani *et al.* (2004), se uma solução não for estável em temperaturas ambientes, a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade das amostras e padrões, conforme pode ser observado neste experimento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliar a estabilidade de uso do padrão frente à metodologia analítica de azitromicina comprimido revestido, o padrão na condição estufa apresentou estabilidade de até 117 horas e o de geladeira até 20 horas.

Em relação a estabilidade de uso do padrão frente à metodologia analítica de azitromicina pó para suspensão oral, o padrão na condição estufa apresentou estabilidade de até 22 horas e em geladeira de até 113 horas.

Vale ressaltar que embora o ativo seja o mesmo nas duas metodologias avaliadas, os diluentes utilizados na solubilização são diferentes, assim como o comprimento de onda.

Sugere-se à realização de estudos analíticos voltados ao produto de degradação da azitromicina.

REFERÊNCIAS

A. Kumar, S.R. Devineni, S.K. Dubey, P. Kumar, V. Srivastava, G. Ambulgekar, M. Jain, D.K. Gupta, G. Singh, R. Kumar, Identification, synthesis and structural characterization of process related and degradation impurities of acrivastine and validation of HPLC method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* Pg. 133, 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.

AOAC. Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. Appendix K, p.2. **Official Methods of Analysis**, 2013.

BUDAVARIS. The Merck Index. 12. Ed. London: **Merck**, 1996.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. Fundamentos da cromatografia. 1 ed. Campinas: **Editora da UNICAMP**, 2006.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE. **Guideline on bioanalytical method validation**. v. 44, 2012.

DE PAULA, N. K. e SENA, M. M. Validação de metodologia analítica para o doseamento simultâneo de mebendazol e Tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, 1359-1361, 2007.

Djokic, S., Kobrehel, G., Lopotar, N., Kamenar, B., Nagl, A., Mrvos, D., *J. Chem. Res. (M)*, pg. 1239–1261, 1988.

Empower System Suitability Quick Reference Guide. . [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.instrumentalia.si/iawww/images/manuals/Empower_SST_Quick_Reference_Guide_71500031605r.pdf>. Acesso em: 18/05/2019.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed., São Paulo, **Atheneu**, 2003.

G. Foulds, R.M. Shepard, R.B. Johnson, The pharmacokinetics of azithromycin
GIL, E.S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. in human serum and tissues, *J. Antimicrob. Chemother.* 25 pg. 73–82, 1990.

KATZUNG, B.G.; MASTERS, S.B; TREVOR, A.J. Farmacologia Básica e Clínica.12. ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, pg 1228, 2014.

LaboratoryInfo, 2015. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications, Disponível em: <<http://laboratoryinfo.com/hplc/>>, Acesso em: 02/10/2018.

LINDA L., N. Validation of Chromatographic Methods. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>>. Acesso em: 23/04/2019.

Linde, 2017. High performance liquid chromatography. Disponível em: <http://hiq.lindegas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html>, Acesso em: 02/10/2018.

LUO, Z.; LIU, A.; LIU, Y.; WANG, G.; CHEN, X.; WANG, H.; LI, M.; ZHANG, H.; QIU, Y.; ZHAI, H.; Development of a stability– indicating HPLC method for simultaneous determination of ten related substances in vonoprazan fumarate drug substance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. ed 149, pg 133–142, 2018.

MADHURI, A. H.; BHAVSAR, M. M.; SINGH, R. D.; CHAVDA, R. N.; PATEL, E. S.; PATEL, D. R. Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Cefpodoxime Proxetil and Azithromycin Dihydrate in Pharmaceutical formulation. **Pharmaceutical Methods**, Vol 7, 2016.

MALDANER, L., JARDIM, I.C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência . **Química Nova**. Vol. 32, No. 1, 214 – 222, 2009.

Ministério da Saúde. Azitromicina. **Nota Técnica N° 243/2013**. Brasília, 2013.

MONTENEJO-BERNARDO, J.; RNARDO, J.; GARCIA – GRANDA, S.; BAYOD – JASANADA, M., LLORENTE, I.; LLOVANA, L. J. **Appl. Cryst.** 39 (6), pg. 826–830, 2006.

MORENO – ARRIBAS, M. V; POLO, M. C. High-performance Liquid Chromatography, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid, Spain Copyright 2003, Elsevier Science Ltd. All Rights Reserved, in **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 ed. p 1274-1280, 2003.

PubChem, 2018. National Center for Biotechnology Information. Azithromycin. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043#section=Top>>. Acesso em: 05/10/2018.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 586, 2001.

RDC nº 166 de 25/07/2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

RDC nº 17 de 19/04/2010. Dispõe sobre as Boas práticas de fabricação de medicamentos.

RDC nº 45 de 09/08/2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.

RIBANI, M.; BATTOLI, C. B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RODRIGUES ORIQUI, L. **Guia de Estabilidade para a Indústria Química - Definição de Prazo de Validade e Proposição de Prazo**. p. 143, 2012.

S. Kanoh, B.K. Rubin Clin, **Microbiol. Rev.** (2010) 590–615.

SCHLÜTER, H. Reversed-Phase Chromatography. In: [s.l: s.n.]. p. 147–234. JAIN, R. DANZIGER, L.H. The Macrolide Antibiotics: A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Overview. **Current Pharmaceutical Design**. V.10, p. 3045 – 3053,2004;

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 2003.

SHIMADZU. HPLC. Disponível em:
<https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/theoretical_plate.html>, Acesso em: 15/05/2019.

Skoog, D.A.; Holler, F.J. & Crouch, S.R. Principles of Instrumental Analysis, **Thomson Brooks/Cole**, 6ª edição, 2007.

TIMOUMI, S.; MANGIN, D.; PECZALSKI, R.; ZAGROUBA, F.; ANDRIEU, J. Stability and thermophysical properties of azithromycin dehydrate. **Arabian Journal of Chemistry**. King Saud University, 2010.

VAZ, R. *et al.* Preparation of Carbon Dots and Their Optical Characterization: an Experiment of Nanoscience for Undergraduate Course. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1366–1373, 2015.

WATERS. The Science of what's possible. Disponível em:
<http://www.waters.com/waters/pt_BR/HPLC-SeparationModes/nav.htm?cid=10049076&locale=pt_BR>. Acesso em 25/09/18.

YANG, Zi Yi; WANG, Lin; TANG, X. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 49 Ed. p 811-815, 2009.

Zithromax Consumer Medicine Information (CMI). West Ryde, NSW: **Pfizer Australia Pty Ltd**. 2016.

Zithromax Product Information (PI). West Ryde, NSW: **Pfizer Australia Pty Ltd**. 2017.