

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS TOLEDO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES PADRÕES DE AMOXICILINA
E CLAVULANATO DE POTÁSSIO UTILIZADOS NA ROTINA DO CONTROLE DE
QUALIDADE**

JULIANA ROCHA RIBEIRO

TOLEDO – PR

2019

JULIANA ROCHA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES PADRÕES DE AMOXICILINA
E CLAVULANATO DE POTÁSSIO UTILIZADOS NA ROTINA DO CONTROLE DE
QUALIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada a Pós-Graduação em Análise Instrumental, *Campus* de Toledo, UTFPR, como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL

ORIENTADOR: RICARDO SCHNEIDER

TOLEDO – PR

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES PADRÕES DE AMOXICILINA E CLAVULANATO DE POTÁSSIO UTILIZADOS NA ROTINA DO CONTROLE DE QUALIDADE

Por

JULIANA ROCHA RIBEIRO

Monografia apresentada às 8:30 do dia 05 de maio de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de “Especialista em Análise Instrumental”, da Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após a deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Ricardo Schneider, Dr. (UTFPR)

Rafael Admar Bini, Dr. (UTFPR)

Guilherme Felipe Lenz, MSc. (UTFPR)

***A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da Especialização.**

À minha família pelo amor, confiança e principalmente pelo apoio, pois sempre me encorajaram e me incentivaram nas minhas escolhas. Principalmente à Ciomara, minha mãe e conselheira, sem você nada disso seria possível.

Á Prati-Donaduzzi pela oportunidade e apoio financeiro;

Aos Professores da UTFPR pela colaboração e qualidade no ensino;

**“Que as dificuldades que eu experimentar ao longo da jornada
não me roubem a capacidade de encanto.”**

Ana Jácomo

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

RESUMO

A lei de medicamento Genérico no Brasil foi sancionada em 10 de fevereiro de 1999, tendo grande importância para a ampliação do acesso da população carente ou de baixa renda ao tratamento de qualidade com baixo custo. Neste contexto, existem inúmeros medicamentos disponíveis no mercado dentre eles a amoxicilina associada ao clavulanato de potássio que pertencem a classe farmacológica dos β -lactâmicos, que representa cerca de 30 % do *market share* da indústria farmacêutica, além do mais é amplamente utilizada como opção terapêutica para o tratamento de infecções do trato respiratório. Diante destes fatos, a indústria farmacêutica necessita garantir a qualidade dos fármacos comercializados e para isso existem inúmeras resoluções de órgãos reguladores, por exemplo, a RDC 166 da Anvisa, que aborda como deve ser realizado a validações de métodos analíticos com o intuito de garantir a qualidade dos medicamentos, entretanto esta resolução não aborda o estudo de estabilidade das soluções como obrigatório, sendo esta apenas uma etapa do estudo de robustez. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a estabilidade da solução padrão do método de doseamento de amoxicilina e clavulanato de potássio da indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi. Desta maneira, foram escolhidas duas condições de armazenamento estufa e geladeira para os padrões que foram injetados ao longo do tempo em cromatógrafo líquido para a avaliação da recuperação dos controles em relação a curva inicial que deveriam atender a faixa de 98,5 – 101,5% de recuperação para serem considerados estáveis. Além do mais, foram realizados testes de identificação adicionais, como por exemplo, avaliação dos espectros UV e Raman com o intuito de comprovar a degradação dos padrões nos tempos em que o estudo de estabilidade demonstrou que os padrões não eram mais estáveis. Os resultados encontrados foram que os padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio possuem estabilidade de 5 horas na condição estufa e de 47 horas para a condição geladeira. Neste contexto, ao longo do estudo em cromatografia líquida foram observadas duas impurezas que para a condição estufa foram aumentando suas áreas com o tempo. Além do mais, os espectros UV sugeriram que para a condição estufa houve degradação do clavulanato, em contrapartida para a técnica Raman não foi possível avaliar os espectros dos ativos possivelmente devido a diluição deles. Assim, conclui-se que os padrões em estudo apresentam maior estabilidade na condição de armazenamento em geladeira.

Palavras-chave: Amoxicilina, Clavulanato de potássio, Estabilidade e HPLC.

ABSTRACT

ABSTRACT

Generic-drug law in Brazil was enacted on February 10, 1999, having great importance for increasing access of low-income population to quality treatment with low cost. In this context, there are innumerable drugs available on market, such as amoxicillin associated with potassium clavulanate, which belongs to the pharmacological class of β -lactams. This represents about 30% of the pharmaceutical industry's market share, having been widely used as a therapeutic option for treatment of respiratory tract infections. Faced with these facts, the pharmaceutical industry needs to guarantee the quality of drugs, for this reason are numerous resolutions from regulatory agencies, for example, Anvisa's RDC 166 in Brazil, which suggest how to carry out analytical method validation with the purpose of guaranteeing drug's quality. However, this resolution does not address the study of solution's stability as mandatory, being this only one step in the study of robustness. Thus, the aim of the present study is to evaluate the stability of the standard solution of amoxicillin and potassium clavulanate from Prati-Donaduzzi pharmaceutical industry's dosing method. On this way, two storage conditions were chosen: laboratory oven and refrigerator. In this context, standards were injected over time into a high-pressure liquid chromatograph in order to evaluate controls recovering faced with the initial curve, which should be in the range between 98.5 - 101.5 % to be considered stable. In addition, further identification tests were performed, such as UV and Raman spectra. They were evaluated in order to confirm standard degradation while stability's study showed that they were no longer stable. On the one hand, these results showed that amoxicillin and potassium clavulanate standard were stable at 5 hours at laboratory oven condition and at 47 hours under refrigerator condition. In this context, during of high-pressure liquid chromatography assay were observed two impurities on laboratory oven condition, those were increasing their areas over time. Moreover, the UV spectra suggested they were degradation from potassium clavulanate at laboratory stove condition. In contrast, Raman technique was not possible to evaluate due to standard's dilution. Thus, to sum up standards solution under this study showed greater stability at refrigerator storage than at laboratory oven condition.

Keywords: Amoxicillin, Potassium clavulanate, Stability and HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural da Amoxicilina	22
Figura 2- Fórmula estrutural do Clavulanato de potássio.....	22
Figura 3 - Ilustração do grupo alquila de octadesilsilano (C18) ligado covalentemente ao grupo sinalol presente na sílica.	26
Figura 4 - Eluição de diferentes compostos ao longo de uma coluna cromatográfica em função da afinidade pela fase móvel vs. fase estacionária. O composto rosa apresenta maior afinidade pela fase móvel do que o composto cinza.	27
Figura 5- Eluição de diferentes compostos ao longo de uma coluna cromatográfica. O composto A apresenta maior interação com a coluna e conseqüentemente apresentará um tempo de retenção maior do que o composto B que apresenta menor interação com a coluna cromatográfica.	27
Figura 6 - Representação do espalhamento Raman e Rayleigh.....	29
Figura 7 - Espectros nas regiões Stokes e anti- Stokes.	30
Figura 8 - Equipamento Raman portátil da marca NanoRam®	34
Figura 9 - Delineamento experimental para avaliação das soluções após o período de estabilidade.	35
Figura 10 - Ilustração do cálculo de pratos teóricos conforme a USP	37
Figura 11 - Ilustração do cálculo de resolução entre analitos conforme a USP.	37
Figura 12- Ilustração do cálculo de assimetria do pico cromatográfico.....	38
Figura 13 -Ilustração do delineamento experimental.	40
Figura 14 - Cromatograma do padrão contendo os picos de amoxicilina e clavulanato de potássio no experimento 3.	41
Figura 15 - Pico de clavulanato de potássio no experimento 3.	42
Figura 16 - Pico de amoxicilina.....	42
Figura 17 - Gráfico demonstrando a correlação entre recuperação e tempo dos ativos amoxicilina e clavulanato de potássio na condição estufa.	45

Figura 18 - Gráfico demonstrando a correlação entre recuperação e tempo dos ativos amoxicilina e clavulanato de potássio na condição geladeira.	47
Figura 19 - Picos das impurezas encontradas no padrão de amoxicilina e clavulanato de potássio do experimento 3. A. Perfil da impureza 1 e B. Perfil da impureza B obtidas do cromatograma da solução padrão.	47
Figura 20 – Ilustração das impurezas detectadas na condição estufa do experimento 3 para os tempos de 46 e 47 horas.	48
Figura 21- Espectros de absorção UV-VIS obtidos pelo detector de arranjo de diodos no experimento 3 para a condição estufa.....	51
Figura 22 -Espectro de absorção UV comparativo da amoxicilina na condição inicial e estufa.	52
Figura 23 - Espectro de absorção UV comparativo da amoxicilina na condição inicial e geladeira.....	52
Figura 24- Espectro de absorção UV comparativo do clavulanato de potássio na condição inicial e estufa.....	52
Figura 25 - Espectro de absorção UV comparativo do clavulanato de potássio na condição inicial e geladeira.....	53
Figura 26 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 1 na condição inicial e estufa.	53
Figura 27 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 1 na condição inicial e geladeira	54
Figura 28 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 2 na condição inicial e estufa.	54
Figura 29 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 2 na condição inicial e geladeira	54
Figura 30 - Espectros Raman nas condições estufa e geladeira dos ativos amoxicilina e clavulanato de potássio.....	56
Figura 31 - Espectros Raman nas condições estufa e geladeira do ativo amoxicilina.	56
Figura 32 - Espectros Raman nas condições estufa e geladeira do ativo clavulanato de potássio.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos avaliados nas curvas dos diferentes experimentos. ...	43
Tabela 2- Avaliação da estabilidade em horas dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio na condição de estufa (30°C).....	44
Tabela 3- Avaliação de estabilidade em horas dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio na condição de geladeira (2-8°C).	46
Tabela 4 - Avaliação das impurezas identificadas nos padrões ao longo do experimento 3....	49
Tabela 5 - Avaliação do balanço de massa do experimento 3.....	50

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1. Importância do estudo	21
1.2. Amoxicilina	21
1.3. Clavulanato de Potássio.....	22
1.4. Amoxicilina + Clavulanato de potássio.....	23
1.5. Medicamento Genérico.....	23
1.6. Validação de Método Analítico.....	23
1.6.1. ANVISA – RDC N°166 / ICH Q2.....	23
1.7. Estabilidade de Soluções	24
1.8. Cromatografia Líquida de Alta Performance	25
1.9. Detector de Arranjo de Diodo (DAD).....	27
1.10. Raman	28
2. Objetivo	32
2.1 Geral	32
2.2 Específicos.....	32
3. Matérias e Método	34
3.1 Soluções utilizadas	34
3.2 Obtenção das amostras	34
3.3 Raman.....	34
3.4 Cromatografia Líquida (HPLC)	35
3.4.1. Software.....	35
3.4.2. Sistema Cromatográfico	35
3.4.3. Parâmetros Cromatográficos	36
3.4.3.1. <i>System suitability</i>	36
3.4.3.2. Precisão do sistema.....	36

3.4.3.3. Cálculos	36
3.4.4. Balanço de massa (BM).....	38
3.5. Protocolo de estudo de estabilidade.....	39
3.6. Análise estatística	40
4. Resultados e Discussão.....	41
4.1. Avaliação dos padrões nas replicas	41
4.2. Avaliação dos padrões na temperatura ambiente	43
4.3. Avaliação dos padrões na temperatura (2 - 8 °C).....	45
4.4. Detecção de Impurezas	47
4.4.1. Balanço de massa.....	49
4.4.2. Perfil de Absorção UV-VIS.....	50
4.4.3. Raman.....	55
5. Conclusão	59
6. Referência Bibliográfica.....	61

1. Introdução

1.1. Importância do estudo

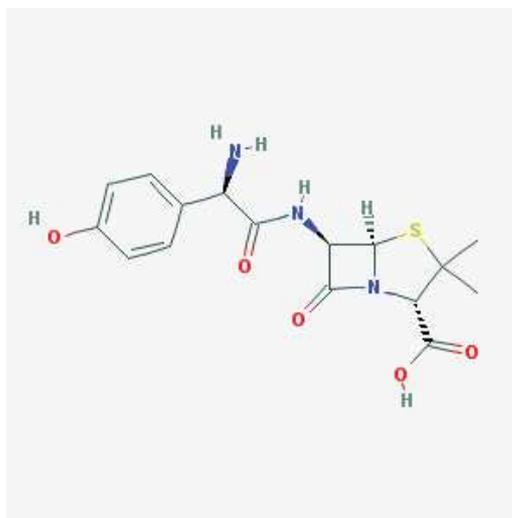
A importância de se determinar a estabilidade dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio é necessária para que se possa comprovar a qualidade dos resultados de teor dos medicamentos analisados no controle de qualidade. Neste contexto, esta etapa normalmente é realizada ao longo da validação de método analítico pelo setor de Pesquisa e Desenvolvimento, entretanto não são todos os produtos que apresentam este estudo. Por esta razão, houve a necessidade de realizar o estudo no controle de qualidade. Além do mais, ao saber o tempo de estabilidade é possível garantir a qualidade dos resultados e economizar tempo de analistas ao postergar preparos de novos padrões sem a real necessidade e assim otimizar a rotina laboratorial. Concomitantemente, ao realizar o estudo estabilidade é possível observar alguns produtos de degradação associados aos ativos de interesse que também serão abordados neste estudo.

1.2. Amoxicilina

A Amoxicilina (Figura 1) é uma molécula com propriedades farmacológicas amplamente utilizada em ambientes ambulatoriais, principalmente no tratamento de infecções respiratórias. Concomitantemente, junto com a penicilina V, são os antibióticos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *Streptococcus pyogenes*. Além disso, é combinado com outros medicamentos para a erradicação do *Helicobacter pylori* (Felmingham, Washington e Group, 1999; Huchon *et al.*, 1996; Selgrad e Malfertheiner, 2008).

Este antibiótico pertence a classe dos β -lactâmicos, que interferem na síntese de peptidoglicano, um componente importante da paredes das células bacterianas Gram-positivas. O mecanismo de ação que já foi elucidado resume-se a ação dos β -lactâmicos na fase final da biossíntese do peptidoglicano. Nesta fase há a ação das autolisinas bacterianas que quebram as ligações covalentes do peptidoglicano existente, para que haja a inserção nos novos peptidoglicanos à parede celular, assim, os antibióticos beta-lactâmicos conseguem inibir irreversivelmente as D-D-carboxitranspeptidases, conhecidas por proteínas ligantes a penicilina, impedindo desta maneira a formação das ligações entre as cadeias peptídicas de peptidoglicano “*cross-linking*” (Azevedo, 2014; Goodman *et al.*, 2011)

Figura 1- Fórmula estrutural da Amoxicilina

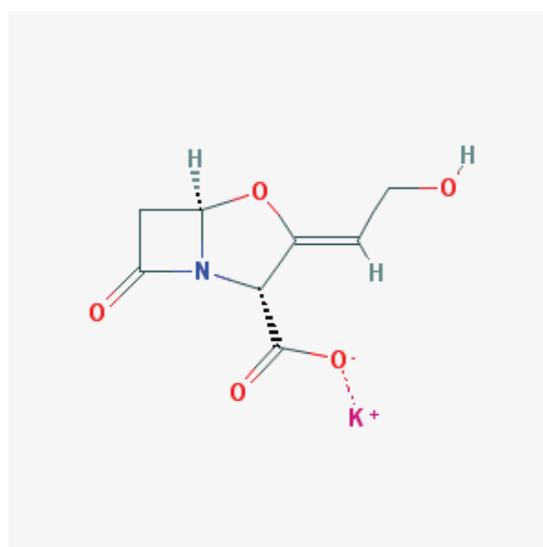


Fonte: *NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem database.* Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amoxicillin>>. Acesso em 05 de maio de 2019.

1.3. Clavulanato de Potássio

O clavulanato de potássio (Figura 2) liga-se irreversivelmente à β -lactamase, impedindo-a de inativar antibióticos β -lactâmicos. Consequentemente, quando combinada, amplia a gama de atividades da amoxicilina para incluir linhagens bacterianas produtoras de β -lactamase (Finlay, 2003; Kerč e Opara, 2007).

Figura 2- Fórmula estrutural do Clavulanato de potássio



Fonte: *NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem database.* Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Potassium-clavulanate>>. Acesso em 05 de maio de 2019.

1.4. Amoxicilina + Clavulanato de potássio

A amoxicilina associada ao clavulanato de potássio (*Augmentin*[®]) foi introduzida no mercado farmacêutico em 1981 pela companhia *GlaxoSmithKline*[®], ou seja, há mais de 30 anos este fármaco está disponível como uma opção terapêutica eficaz e amplamente utilizada na clínica ao tratamento de infecções do trato respiratório. Desta maneira, os fatos anteriores ilustram o sucesso comercial alcançado pelo desenvolvimento de um antibiótico β -lactâmico associado a uma classe de inibidor da enzima β -lactamase. Além do mais, o mercado de β -lactâmicos representa aproximadamente 30% do *market share* da indústria farmacêutica demonstrando a importância deste fármaco para a indústria farmacêutica (Hubschwerlen, 2007; White, 2004).

1.5. Medicamento Genérico

A lei de medicamento Genérico no Brasil foi sancionada em 10 de fevereiro de 1999, sendo de grande importância para a ampliação do acesso da população carente ou de baixa renda a tratamento de qualidade com baixo custo. Não menos importante, o mercado de medicamento genérico no Brasil no ano de 2012 representou 25% das vendas. Em contrapartida, em países desenvolvidos a participação dos medicamentos genéricos é mais expressiva, por exemplo, nos Estados Unidos: 90% dos medicamentos prescritos eram genéricos no ano de 2017. Neste contexto, observa-se o potencial de crescimento das indústrias farmacêuticas de genéricos no Brasil e a importância das mesmas para que o acesso ao medicamento de qualidade atinja um maior número de brasileiros (Lionberger, 2019; Lionberger e Uhl, 2019; Martich, 2013; Valente, 2006).

1.6. Validação de Método Analítico

A validação de um método analítico com aplicação na indústria farmacêutica brasileira precisa atender as exigências estipuladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que se baseia em diretrizes de organizações internacionais, por exemplo, o *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

1.6.1. ANVISA – RDC N°166 / ICH Q2

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) separa a validação de metodologia analítica em compendial e não compendial. A primeira refere-se à validação de método analítico

presente em farmacopeia internacional, por exemplo: a *USP – U.S. Pharmacopeia*, a *European Pharmacopeia* dentre outras. Neste contexto, somete é solicitado a realização parcial das análises (especificidade, exatidão e precisão). A segunda refere-se a uma validação de método que não se baseia em farmacopeia, ou seja, será realizado um desenvolvimento *in loco*, por esta razão há a necessidade de realizar todos os testes descritos na RDC N°166.

Importante ressaltar que tanto a RDC N°166 quanto o ICH/Q2 solicitam a realização das seguintes etapas ao longo de uma validação de método vigente:

- Especificidade;
- Linearidade;
- Faixa de Trabalho;
- Exatidão;
- Precisão;
- Limite de Quantificação;
- Limite de Detecção;
- Robustez;

Ambas as organizações citadas acima abordam a validação de método analítico de uma maneira abrangente. Entretanto existem outros órgãos internacionais como, por exemplo, a Agência Europeia de Medicina separa a validação de método analítico convencional da validação de método bioanalítico. Assim, se compararmos os métodos de uma maneira resumida e superficial estes são diferentes quanto ao estudo de estabilidade das soluções. O método convencional sugere que a o estudo de estabilidade seja realizado junto ao teste de robustez. Em contrapartida, o guia de validação bioanalítico sugere que a avaliação de estabilidade das soluções deve ser realizada para assegurar cada etapa da análise da amostra e as condições de armazenamento não impactam na concentração do analito (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017; Committee for Medicinal Products for Human Use., 2012).

1.7. Estabilidade de Soluções

Com o intuito de gerar resultados confiáveis e reproduzíveis as amostras, os padrões e os reagentes usados ao longo das análises precisam ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). Além do mais, frequentemente em laboratórios que tenham equipamento automatizados, as corridas cromatográficas são

realizadas durante a noite ou ao longo do final de semana para melhor aproveitamento do tempo potencial de análise. Outro ponto de vista pouco abordado é a otimização do tempo e do custo ao longo da análise caso os padrões sejam utilizados por maior tempo sem a necessidade de um novo preparo (Ribani *et al.*, 2004; Shabir, 2003).

Neste contexto, para a utilização dos padrões por um maior tempo há a necessidade de uma maior estabilidade das soluções de modo geral, tanto os padrões quanto fase móvel. Assim, em linha com este raciocínio sabe-se que a estabilidade das amostras e padrões envolve dois aspectos: temperatura e tempo. Para a primeira condição, se uma solução não for estável em temperatura ambiente, geralmente a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade tanto das amostras quanto dos padrões. Para a segunda condição, o tempo, a estabilidade de dias ou meses seria o mais desejável. Entretanto, em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que forem realizadas as análises (Green, 1996; Ribani *et al.*, 2004).

Desta maneira, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem das amostras e/ou padrões, pois longos tempos de estocagem de amostras podem aumentar a probabilidade de degradação dos compostos de interesse, com subsequente formação de metabólitos. Assim, conhecendo a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação sem o comprometimento dos resultados (Lau, 2001; Ribani *et al.*, 2004; Snyder, Kirkland e Glajch, 1997).

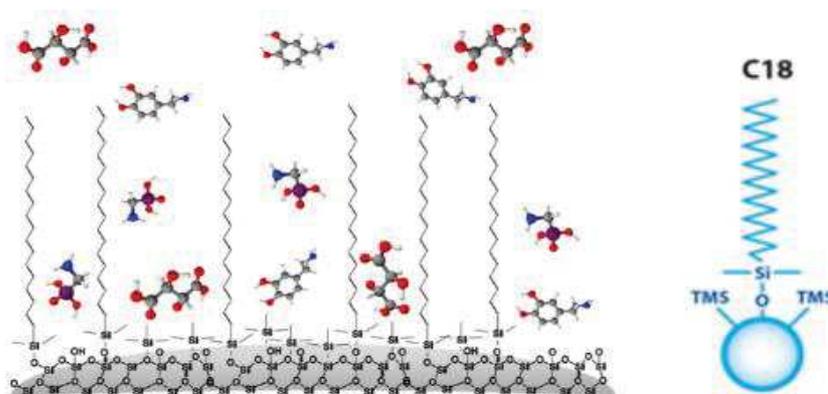
1.8. Cromatografia Líquida de Alta Performance

Na indústria farmacêutica, a cromatografia líquida de alta eficiência é a ferramenta de análise mais utilizada. Por esta razão, é aplicada em todos os estágios de pesquisa, desenvolvimento e produção de fármacos. Diante desta importância, é necessário compreender os princípios que envolvem esta técnica. Assim, por definição a cromatografia líquida é um processo físico-químico de separação em que os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel líquida e outra estacionária (Kazakevich e LoBrutto, 2006; SILVA, 2012).

Primeiramente, a fase estacionária pode ser sólida - sendo porosa ou na forma de pequenas partículas. Além do mais, a tecnologia de fabricação de partículas esféricas porosas, de tamanho e porosidade controlados, já está bem desenvolvida devido ao fato de há anos as propriedades da sílica serem estudadas. Neste contexto, pode-se introduzir as fases estacionárias mais comuns que são divididas pelos seus grupamentos que podem ser polares ou apolares. Para a primeira, pode-se citar os grupos: amino, ciano, diol e para a segunda os grupos:

octadecil, octil e fenil. Desta maneira, a escolha da fase estacionária está diretamente associada as características químicas das substâncias químicas de interesse. Por esta razão, o enfoque será na fase estacionária apolar que é usualmente um grupo alquil ligado a um suporte de sílica, o qual é preparado através da ligação covalente do grupo alquil ao grupo silanol superficial da sílica (Figura 3) (Kazakevich e LoBrutto, 2006; Schlüter, 2000).

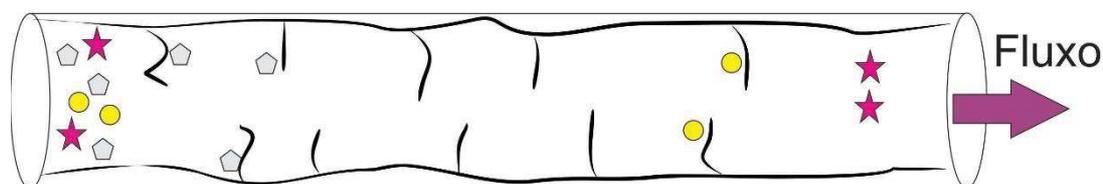
Figura 3 - Ilustração do grupo alquila de octadesilsilano (C18) ligado covalentemente ao grupo silanol presente na sílica.



Fonte: CHROMABLOGGRAPHY. **ChromaBLOGraphy: Restek's Chromatography Blog.** Disponível em: <<https://blog.restek.com/>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

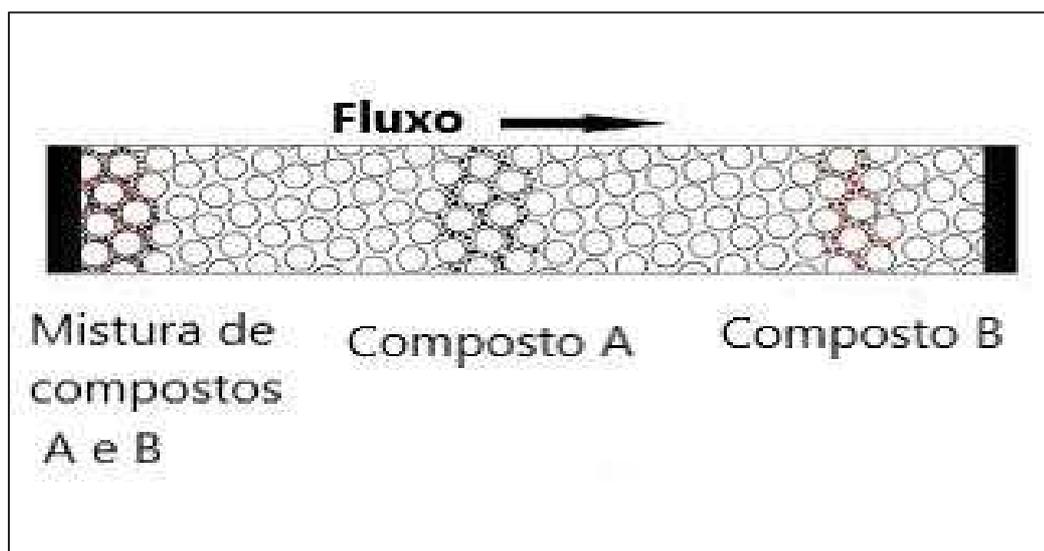
Neste contexto, além da fase estacionária na cromatografia há a fase móvel que pode ser composta por solventes de diferentes polaridades. O sistema composto de fase estacionária mais apolar em relação à fase móvel é classificado como cromatografia líquida em fase reversa. Neste sistema, as moléculas são separadas por partição entre a fase móvel e a fase estacionária. Esta partição é regida por um equilíbrio específico entre a interação do soluto com as fases: móvel e estacionária. Desta maneira, com a movimentação da fase móvel através da coluna cromatográfica observa-se uma constante de movimentação do analito entre a fase móvel e a fase estacionária (Figura 4). Assim, moléculas hidrofílicas ficam menos retidas em uma coluna de fase reversa comparadas a moléculas hidrofóbicas, e quanto mais tempo o soluto fica retido na fase estacionária, maior será o tempo de retenção (Figura 5). Como consequência, as moléculas com diferentes constantes de equilíbrio eluem com diferentes tempos sendo assim separadas. Sendo assim, o tempo de retenção é o tempo que o analito leva para atravessar a coluna e ser detectado (Meyer, 2013; Schlüter, 2000; SILVA, 2012).

Figura 4 - Eluição de diferentes compostos ao longo de uma coluna cromatográfica em função da afinidade pela fase móvel vs. fase estacionária. O composto rosa apresenta maior afinidade pela fase móvel do que o composto cinza.



Fonte: Autoria própria.

Figura 5- Eluição de diferentes compostos ao longo de uma coluna cromatográfica. O composto A apresenta maior interação com a coluna e conseqüentemente apresentará um tempo de retenção maior do que o composto B que apresenta menor interação com a coluna cromatográfica.



Fonte: Adaptado de CHOUDHARY, A. **Pharmaceutical Guidelines: Total Pharmaceutical Solution**. Disponível em: <<https://www.pharmaguideline.com/>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

Além do mais, sistemas em fase reversa são os mais comumente utilizados, sendo quase 90% das análises de amostras de baixo peso molecular. Neste contexto, um dos principais impulsionadores de sua enorme popularidade é a capacidade de discriminar compostos intimamente relacionados, a facilidade de variação de retenção e seletividade. (Kazakevich e LoBrutto, 2006).

1.9. Detector de Arranjo de Diodo (DAD)

O Detector de Arranjo de Diodo (DAD) estende a utilidade do detector UV pois fornece espectros dos picos de interesse, assim, estes podem ser utilizados para elucidar na identificação e para monitorar coeluição (homogeneidade ou pureza do pico), desta maneira apresentam grande importância durante o desenvolvimento de métodos analíticos. Além do mais, apresentam a funcionalidade de poderem servir como um detector multi-comprimento de onda

UV-VIS. Neste contexto, os espectros coletados no ápice do pico cromatográfico podem ser usados para criar uma biblioteca que pode, por sua vez, ser usada na comparação de espectros subsequentes para fins de identificação, e os espectros coletados em todo o pico em cada ponto de dados podem ser comparados para avaliar o pico homogeneidade ou pureza (Swartz, 2010).

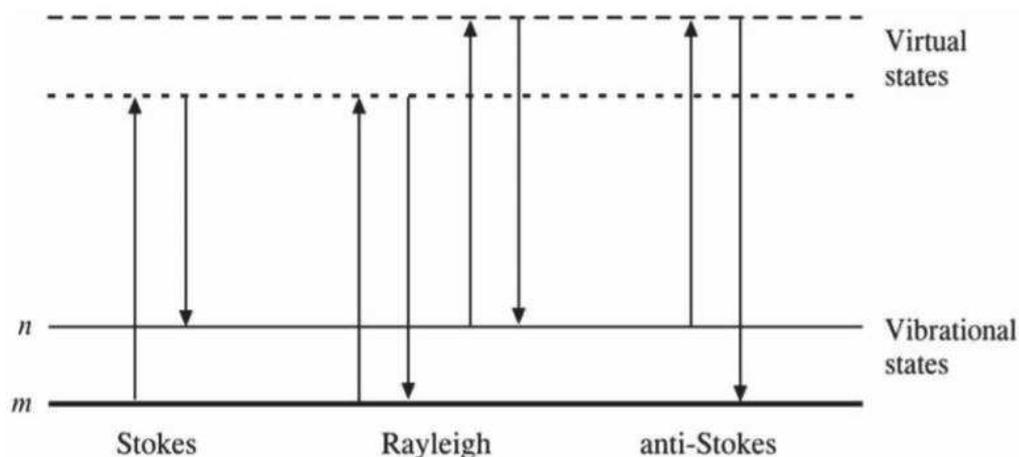
1.10. Raman

Espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia baseada na dispersão inelástica de luz monocromática usualmete proveniente de uma fonte de laser. Dispersão inelática significa que a frequência de fótons provenientes da luz monocromática muda após a interação com a amostra. Estes fótons provenientes da luz laser são absorvidos pela amostra e então são reemitidos. A frequência de reemissões dos fótons é deslocada para cima ou para baixo em comparação com a frequência monocromática original, no qual é chamada de efeito Raman. Essa mudança fornece informações sobre as transições vibracionais, rotacionais e outras de baixa frequência nas moléculas. Neste contexto, uma mudança na polarizabilidade durante a vibração molecular é um requisito essencial para obter o espectro Raman de uma amostra. (Bumrah e Sharma, 2016; Luna, 2017).

Normalmente podemos observar que há uma representação do espalhamento Raman e Rayleigh (Figura 6) no qual demonstra um estado virtual ou estado intermediário, que é quando a radiação eletromagnética interage com a matéria através do seu campo elétrico elevando a molécula até esse estado virtual. O estado virtual pode ter sua energia relaxada de dois modos: pode retornar ao estado vibracional original (espalhamento elástico da luz ou espalhamento Rayleigh) ou pode retornar em um estado diferente de energia (espalhamento inelástico ou espalhamento Raman) (Hofelmann, 2013).

Os espalhamentos de luz inelásticos (Raman) são classificados em: Stokes e Anti-Stokes (Figura 6). O espalhamento Raman Stokes envolve transições de níveis vibracionais de baixa para alta energia sendo estas mais intensas que o espalhamento anti-Stokes e são medidas em espectroscopia Raman convencional, enquanto que as bandas anti-Stokes são medidas com amostras fluorescentes pois a magnitude dos desvios Raman não depende do comprimento de onda da radiação incidente (Bumrah e Sharma, 2016).

Figura 6 - Representação do espalhamento Raman e Rayleigh

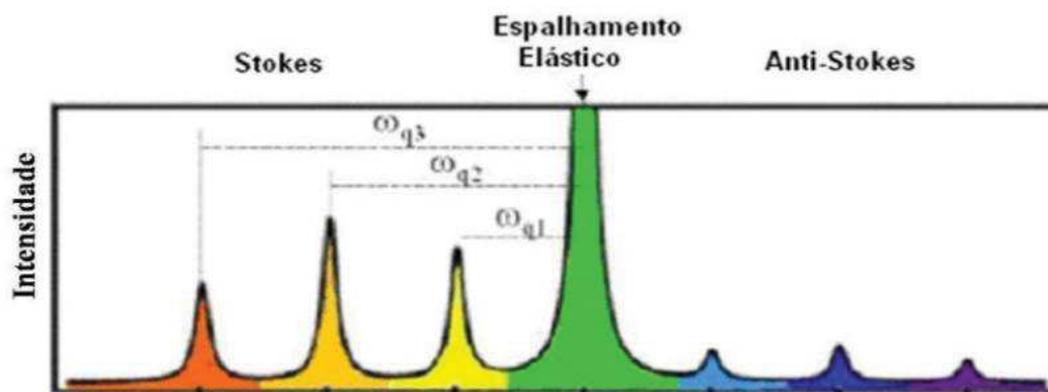


Fonte: D. PATEL, B.; J. MEHTA, P. *An Overview: Application of Raman Spectroscopy in Pharmaceutical Field*. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 6, n. 2, p. 131–141, 2010.

Neste contexto, conforme abordado anteriormente os espectros nas regiões Stokes e anti-Stokes apresentam intensidades diferentes (Figura 7), pois o espalhamento anti-Stokes possui uma menor intensidade em relação ao espalhamento Stokes. Tal fato ocorre, pois, há um decaimento na população de moléculas devido à lei de distribuição de Boltzman, já que existe um número máximo de moléculas que já estão vibracionalmente excitadas (Hofelmann, 2013).

Além disso, esta técnica não é destrutiva e requer pouca ou nenhuma preparação de amostra. Desta maneira, uma amostra pode ser analisada na forma sólida, pó, solução aquosa, líquida ou gasosa e inclusive armazenada em diferentes recipientes de vidro. Além do mais, considerando que o espalhamento Raman frente à água é baixo, esta torna-se excelente solvente para a dissolução de amostras (Hofelmann, 2013; Lau, 2001; Luna, 2017).

Figura 7 - Espectros nas regiões Stokes e anti- Stokes.



Fonte: HOFELMANN, K. C. G. **Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier e análise de molhabilidade nos filmes finos de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier e análise de molhabilidade nos filmes finos de carbono amorfo hidrogena.** [s.l.] Universidade do Estado de Santa Catarina, 2013.

A espectroscopia Raman é sensível à anisotropia das amostras, o que significa que os espectros podem depender das condições de orientação e polarização. Além disso, a espectroscopia Raman fornece informações sobre a estrutura cristalina, formas polimórficas e transições de fase. Além do mais, o feixe de laser pode ser focado em pontos de difração limitada da ordem de $0,5 \mu\text{m}$, torna-se possível combinar informações moleculares / cristalinas com alta resolução espacial, permitindo analisar propriedades locais de amostras em escalas que variam de micrômetros a dezenas de nanômetros (Lewandowska e Liu, 2016; Pevelen, Le e Tranter, 2017).

A espectroscopia Raman está se tornando uma das mais populares ferramentas de medição analítica para aplicações farmacêuticas, desde a verificação de matérias-primas até o processo de monitoramento da produção de medicamentos até o controle de qualidade dos produtos. Neste contexto, a qualidade dos medicamentos começa desde a verificação da pureza das matérias-primas e termina com a qualidade do produto. Este último, requer a garantia de que o produto, tais como cápsula e comprimido, contenham a quantidade correta de substância ativa e excipiente (D. Patel e J. Mehta, 2010; Stuart-Farquharson, 2014; Vankeirsbilck *et al.*, 2002).

2. Objetivo

2.1 Geral

Com base nas informações apresentadas o presente projeto tem como objetivo avaliar a estabilidade de soluções padrões de Amoxicilina e Clavulanato de Potássio utilizados na rotina do controle de qualidade em relação ao tempo e temperatura de estocagem.

2.2 Específicos

- Elaborar um protocolo de estudo de estabilidade para soluções padrão;
- Identificar os compostos por Raman;
- Avaliar a recuperação dos padrões obtidos com a técnica de quantificação por HPLC;

3. Matérias e Método

3.1 Soluções utilizadas

- Solução fosfato de sódio pH 4,4 – Pesar 7,8 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado e transferir para balão volumétrico de 1000 mL e ajustar o menisco com água purificada, após esta etapa ajustar o pH com ácido fosfórico para 4,4.

-Água purificada - MiliQ;

-Metanol – Grau HPLC;

- Fase Móvel: Tampão fosfato sódio pH 4,4: Metanol na proporção 95:5 (v/v).

3.2 Obtenção das amostras

Amostras padrão referência secundários serão utilizadas em solução e foram cedidas pela empresa farmacêutica Prati-Donaduzzi. A amoxicilina tri-hidratada apresenta pureza de 85,13% e o clavulanato de potássio apresenta pureza de 51,52%.

3.3 Raman

A técnica de Raman será utilizada para a identificação (Análise qualitativa) dos padrões de referência secundários em solução.

- A leitura ocorreu com a solução padrão condicionada em sacola plástica.

Figura 8 - Equipamento Raman portátil da marca NanoRam®

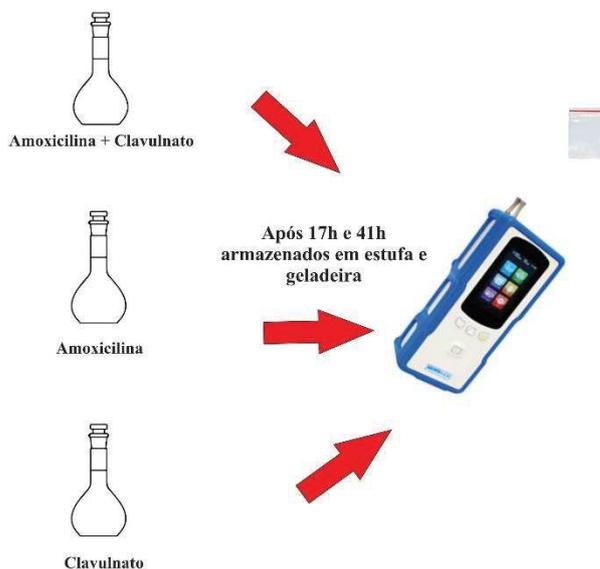


Fonte: Bwtek, 2019 – Disponível em bwtek.com; Acesso em: 19/05/2019.

- Comprimento de onda excitatório: 785 nm;

- Com o intuito de avaliar as soluções após o período de estabilidade foi proposto o seguinte delineamento experimental demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Delineamento experimental para avaliação das soluções após o período de estabilidade.



Fonte: Autoria própria.

3.4 Cromatografia Líquida (HPLC)

A avaliação da estabilidade dos padrões foi realizada através da metodologia vigente para a avaliação do teor do produto acabado de Amoxicilina + Clavulanato de potássio da empresa Prati-Donaduzzi.

3.4.1. Software

A obtenção e interpretação dos dados foi realizada pelo software *EMPOWER*[®] 3.

3.4.2. Sistema Cromatográfico

- Fase Móvel – Solução fosfato de sódio pH 4,4 e metanol na proporção 95:5 (v/v);
- Fluxo - 2,0 mL/minuto;
- Detector DAD - 220 nm;
- Temperatura do forno - Ambiente;
- Volume de injeção - 20 μ L;
- Coluna Cromatográfica: Thermo Hypersil ODC (C18) 250mm X 4,6mm; 5 μ m.

- Numeração interna das colunas utilizadas nas análises: CQ-C18-1077 e CQ-C18-1081;
- Tempo de retenção aproximado clavulanato de potássio – 2,5 minutos;
- Tempo de retenção aproximado da amoxicilina – 4,2 minutos;
- Tempo de corrida: 15 minutos;

3.4.3. Parâmetros Cromatográficos

3.4.3.1. *System suitability*

- Resolução entre os picos de amoxicilina e o ácido clavulânico deve ser maior que 3,5 obtido na injeção da solução padrão.
- O fator de cauda para o ácido clavulânico não deve ser maior que 1,5.

3.4.3.2. Precisão do sistema

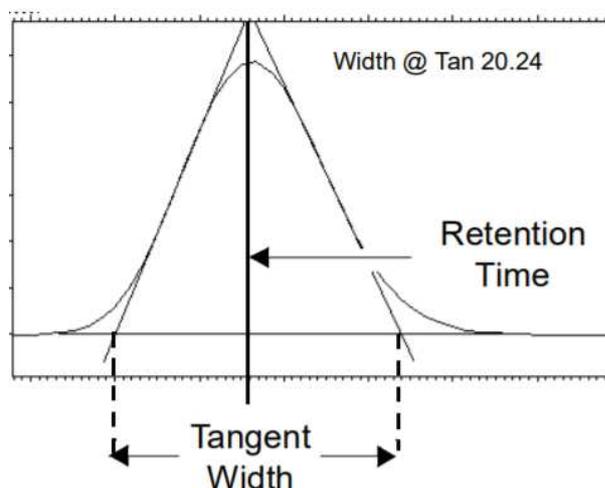
- O desvio padrão relativo entre as réplicas deve ser menor que 2%.

3.4.3.3. Cálculos

Os pratos teóricos (N), segundo a USP (Figura 10), é a mensuração da eficiência da coluna cromatográfica, e para picos gaussianos o cálculo é realizado da seguinte maneira:

$$N = 16x \left(\frac{\text{Tempo de retenção}}{\text{Largura do pico na base}} \right)^2$$

Figura 10 - Ilustração do cálculo de pratos teóricos conforme a USP.

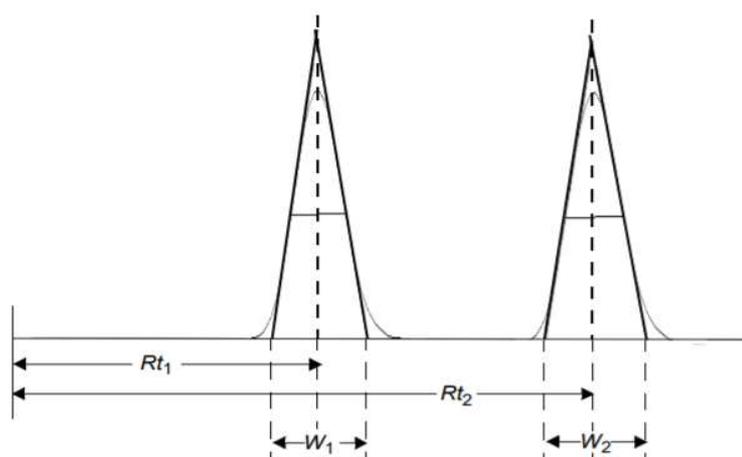


Fonte: **Empower System Suitability Quick Reference Guide**. . [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.instrumentalia.si/iawww/images/manuals/Empower_SST_Quick_Reference_Guide_71500031605r.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2019.

A resolução (R), Figura 11, é a separação de dois compostos ou mais de uma mistura sendo calculada da seguinte maneira:

$$R = \frac{2x(\text{Tempo de retenção 2} - \text{Tempo de retenção 1})}{(\text{Largura do pico 1} - \text{Largura do pico 2})}$$

Figura 11 - Ilustração do cálculo de resolução entre analitos conforme a USP.



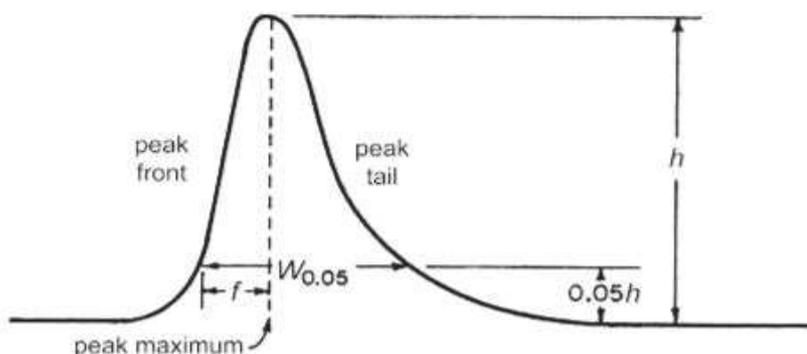
Fonte: **Empower System Suitability Quick Reference Guide**. . [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.instrumentalia.si/iawww/images/manuals/Empower_SST_Quick_Reference_Guide_71500031605r.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2019.

O fator de assimetria, também é conhecido como fator de cauda do pico que conforme a *USP* é calculado da seguinte maneira:

$$\text{Fator de assimetria} = \frac{\text{Altura } 0.05}{2f}$$

Assim, considerar a largura 0,05 ($W_{0.05}$) é a largura do pico a 5% e f é a distância do centro do pico até a sua ponta inicial na altura de 0.05 (Figura 12).

Figura 12- Ilustração do cálculo de assimetria do pico cromatográfico.



Fonte: THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **CHROMATOGRAPHY**. 40. ed. [s.l.] United States Pharmacopeial, 2017.

O fator resposta, é a razão entre o sinal produzido pelo analito e a quantidade de analito que gerou o sinal, assim a fórmula utilizada para este cálculo é representada abaixo:

$$FR = \frac{(A_p \times FD_p \times 100)}{(m_p \times T_p)}$$

No qual, Área do pico da solução padrão é o A_p , o fator de diluição em ml é o FD_p , o teor do padrão é o T_p e a massa em mg é o m_p .

A recuperação é utilizada para a avaliação da estabilidade dos padrões pelo seguinte cálculo:

$$\text{Recuperação} = \frac{S_x}{S_o} \times 100$$

No qual, a solução inicial é o S_o e a Solução em estudo é o S_x de cada etapa da análise.

3.4.4. Balanço de massa (BM)

Conforme sugerido por Hong, Phoebe e Jones,(2017) o cálculo de balanço de massa foi realizado pela seguinte equação abaixo:

$$BM = \frac{\text{Área da soma de todos os picos presentes no padrão em estabilidade}}{\text{Área da soma de todos os picos presentes no padrão no início da análise}} \times 100$$

3.5. Protocolo de estudo de estabilidade

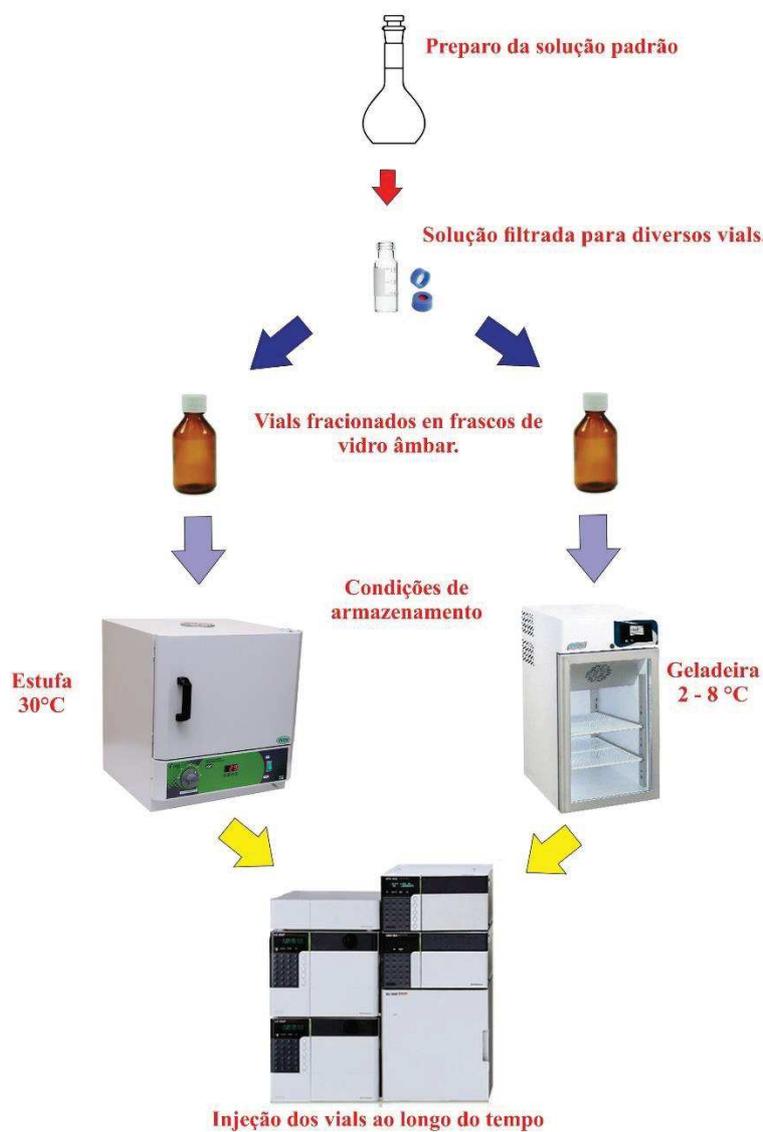
Na literatura pode-se encontrar diversos artigos e guias internacionais que abordam a importância do estudo de estabilidade de soluções e padrões ao longo de uma validação de método analítico com o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados (Committee for Medicinal Products for Human Use., 2012; Green, 1996; Linda L., 1994; Ribani *et al.*, 2004; Rodrigues Oriqui, 2012; Shabir, 2003).

Neste contexto, Shabir (2003) sugere que a variação aceitável entre o padrão em estudo comparado a um padrão recém preparado seja de até 2%. Diante deste fato, optou-se por adaptar a variação para no máximo 1,5% com o intuito de restringir a faixa de aceitação para evitar possíveis desvios analíticos.

Além do mais, sabe-se que a temperatura pode ser determinante, como foi observado pelo estudo de Leite, Facchini e Faria (2003). Assim, estima-se que a estabilidade das amostras e padrões envolva dois aspectos: temperatura e tempo. (Green, 1996; Leite, Facchini e Faria, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

Desta maneira, foi proposto o seguinte (Figura 13) delineamento experimental avaliando as soluções padrão em duas condições de temperatura (ambiente e refrigerada) ao longo do tempo. Primeiramente, foram pesados os padrões e realizada a diluição para balão de 25 ml, após esta etapa a solução foi filtrada com filtro PVDF 0,45 e condicionada em *vials*. Estes, foram armazenados em frascos âmbar apenas para evitar o contato com luz e otimizar no momento de injetar no equipamento. Desta maneira, os frascos foram armazenados em duas condições estufa e geladeira.

Figura 13 -Ilustração do delineamento experimental.



Fonte: Autoria própria.

3.6. Análise estatística

Considerando que são duas variáveis recuperação do padrão e tempo e fato dos dados serem quantitativos foi utilizado a correlação linear de Pearson com p significativo $\leq 0,05$.

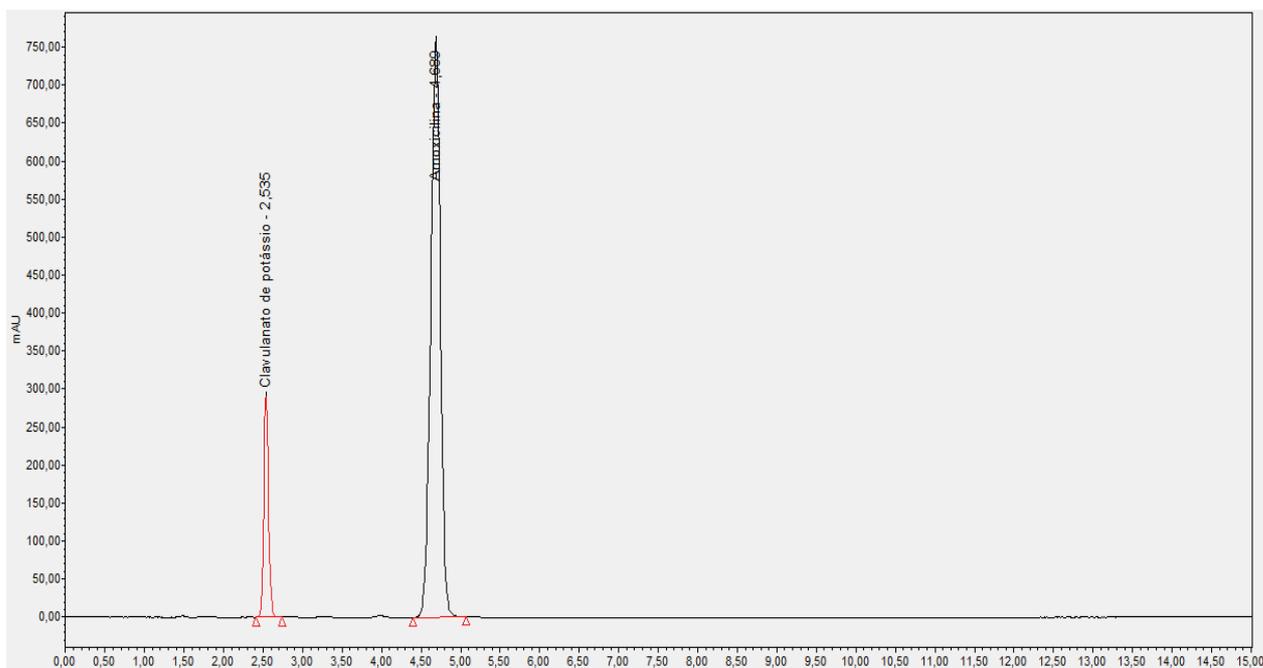
4. Resultados e Discussão

Com base nos objetivos do presente estudo, os resultados são apresentados em termos de se verificar a estabilidade do padrão de amoxicilina e clavulanato de potássio da etapa de doseamento por HPLC da metodologia CQ-PA-371 da empresa Prati – Donaduzzi, assim foram realizados três experimentos com o intuito de investigar a estabilidade dos padrões.

4.1. Avaliação dos padrões nas replicas

Primeiramente, foram avaliados alguns parâmetros cromatográficos dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio, pois a metodologia preconiza que alguns parâmetros sejam atendidos para que o teste de estabilidade pudesse ser realizado. Desta maneira, na Figura 14 pode-se observar o tempo de retenção dos analitos amoxicilina (4,69 min) e clavulanato de potássio (2,54 min) que podem variar em até 20% do tempo de retenção ideal conforme avaliado na validação de metodologia analítica. Além do mais, foi possível observar a resolução entre eles que foi de aproximadamente 12, assim, atendendo a exigência da metodologia de que este deve ser superior a 3,5.

Figura 14 - Cromatograma do padrão contendo os picos de amoxicilina e clavulanato de potássio no experimento 3.

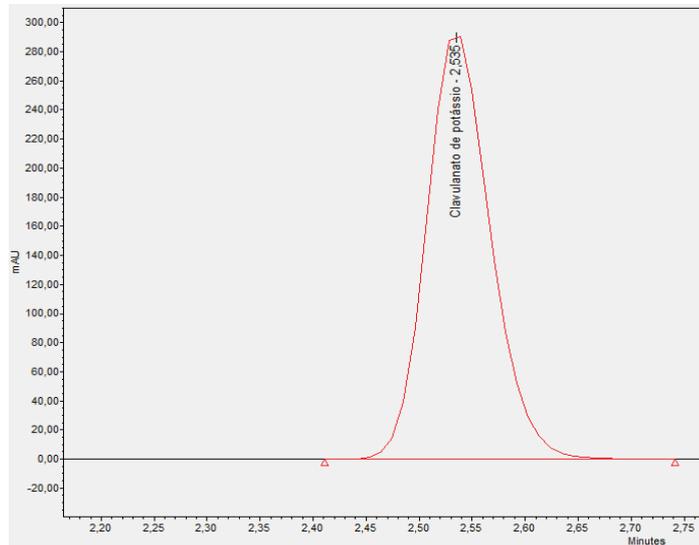


Fonte: Autoria própria.

Neste contexto, o fator de cauda do pico de clavulanato de potássio foi de 1,16, sendo permitido pelo método até 1,5. Adicionalmente, foi possível verificar os pratos teóricos que

ficaram em 8316, validando a eficiência da coluna. Ainda é possível verificar o perfil integração do pico na Figura 15 e a área do pico que na tabela 1.

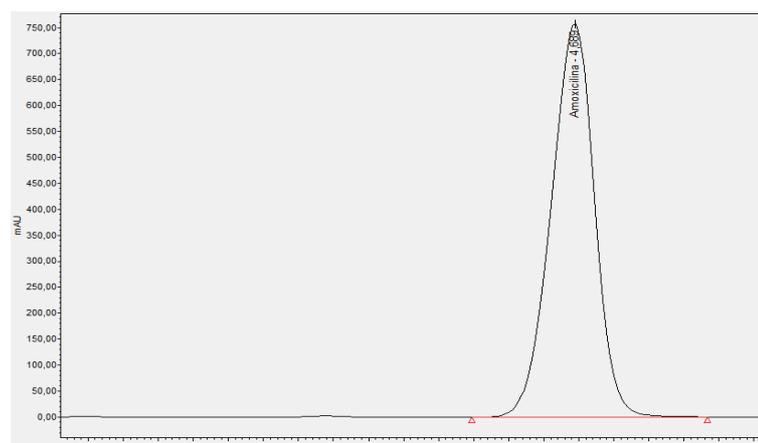
Figura 15 - Pico de clavulanato de potássio no experimento 3.



Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, observa-se que o fator de cauda do pico de amoxicilina foi de 0,94, que não apresenta restrição estipulada pelo método, entretanto quanto mais próximo de 1,0 mais simétrico é o pico. Ainda é possível verificar os pratos teóricos que ficaram em 7400, validando a eficiência da coluna. Adicionalmente, verifica -se o perfil integração do pico na Figura 16 e a área do pico que na Tabela 1.

Figura 16 - Pico de amoxicilina



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos avaliados nas curvas dos diferentes experimentos.

		Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Fator de Cauda	Pratos teóricos	Recuperação %
Experimento 1	Clavulanato de Potássio 1	1263835,99	1,14	8561	--
	Clavulanato de Potássio 2	1294938,98	1,14	8593	100,66
	Amoxicilina 1	6512479,81	0,97	7430	--
	Amoxicilina 2	6429134,92	0,97	7443	98,80
Experimento 2	Clavulanato de Potássio 1	1305182.79	1,25	6182	--
	Clavulanato de Potássio 2	1268733.00	1,25	6256	100,36
	Amoxicilina 1	6883387.21	1,04	6180	--
	Amoxicilina 2	6738697.27	1,04	6255	99,28
Experimento 3	Clavulanato de Potássio 1	1209520.83	1,16	8316	--
	Clavulanato de Potássio 2	1259222.33	1,15	8368	100,58
	Amoxicilina 1	6686358.83	0,94	7430	--
	Amoxicilina 2	6532842.73	0,95	7756	100,07

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cromatográficos como já abordado anteriormente e a recuperação do padrão 2 frente ao padrão 1 que avalia a exatidão do sistema. Neste contexto, para a recuperação os valores aceitáveis para testes de doseamento segundo o manual de boas práticas cromatográficas da Prati-Donaduzzi abrangem a faixa entre 98,0-102,0%. Diante destes fatos, foi possível observar que todas as injeções atenderam a especificação sendo, assim, possível dar sequência nos estudos de estabilidade delas.

4.2. Avaliação dos padrões na temperatura ambiente

Após a avaliação das réplicas do padrão 1 foram iniciadas as injeções dos padrões nas condições de armazenamento estufa e geladeira. Primeiramente, será abordado os resultados do estudo dos padrões em estufa a 30°C, que mimetiza a condição ambiente máxima permitida no laboratório. Neste contexto, foram realizados 3 experimentos distintos com o intuito de verificar a estabilidade máxima dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio (Tabela 2).

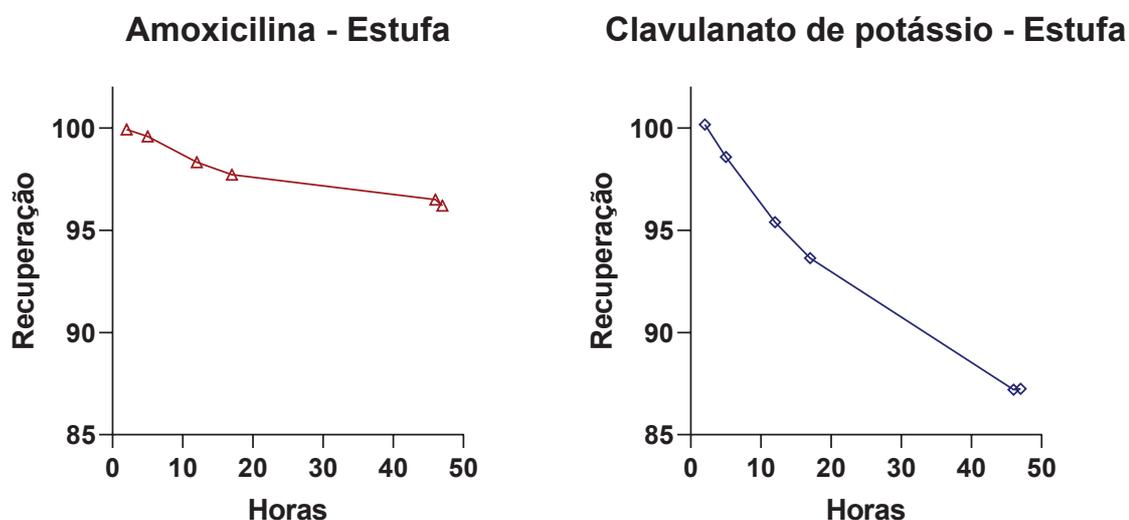
Tabela 2- Avaliação da estabilidade em horas dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio na condição de estufa (30°C).

		Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Fator de Cauda	Pratos teóricos	Recuperação %	Tempo
Experimento 1	Clavulanato de Potássio	1265783,68	1,13	8352	100,16	2h
	Amoxicilina	6507115.50	0,97	7180	99,92	
	Clavulanato de Potássio	1245917.79	1,13	8349	98,58	5h
	Amoxicilina	6485793.68	0,97	7094	99,59	
Experimento 2	Clavulanato de Potássio	1245052.71	1,26	6220	95,39*	12h
	Amoxicilina	6767757.73	1,05	6340	98,32*	
	Clavulanato de Potássio	1222145.87	1,24	6229	93,64*	17h
	Amoxicilina	6726437.68	1,04	6108	97,72*	
Experimento 3	Clavulanato de Potássio	1055286.73	1,14	8428	87,21*	46h
	Amoxicilina	6447761.78	0,94	7378	96,50*	
	Clavulanato de Potássio	1055632.47	1,14	8123	87,24*	47h
	Amoxicilina	6428050.20	0,93	6517	96,20*	

Fonte: Autoria própria.

Conforme demonstrado na Tabela 2, o experimento 1 indica que há estabilidade para ambos os ativos no tempo de 5h, pois a faixa de aceitação é de 98,5% - 101,5% de recuperação. Em contrapartida, nos experimentos 2 e 3 a condição estufa a partir de 12h até 47h apresenta recuperação abaixo da faixa de aceitação, sendo assim um indicativo de uma possível degradação dos ativos. Além do mais, ao empregar o teste estatístico de correlação linear de Pearson é possível observar que para ambos os ativos houve uma correlação negativa entre recuperação e tempo (Figura 17), sendo que para o clavulanato de potássio o $r = 0,9861$ com significância $p \leq 0,001$ e para a amoxicilina o $r = 0,9578$ com significância $p \leq 0,01$.

Figura 17 - Gráfico demonstrando a correlação entre recuperação e tempo dos ativos amoxicilina e clavulanato de potássio na condição estufa.



Fonte: Autoria própria.

Neste contexto, é interessante ressaltar a importância de determinar o tempo de estabilidade para a utilização do padrão, pois há a necessidade de assegurar a confiabilidade dos resultados das análises realizadas no controle de qualidade, assim, pode-se padronizar o tempo de utilização dos padrões.

4.3. Avaliação dos padrões na temperatura (2 - 8 °C)

Como mencionado anteriormente, após a avaliação da curva foram iniciadas as injeções dos padrões nas condições estufa e geladeira. Neste momento, será abordado os resultados dos estudos com armazenamento dos padrões em geladeira que abrange a faixa de temperatura entre 2-8°C. Neste contexto, foram realizados 3 experimentos distintos com o intuito de verificar a estabilidade máxima dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio (Tabela 3).

Conforme demonstrado na Tabela 3, todos os experimentos indicam que há estabilidade para ambos os ativos até 47h, pois a faixa de aceitação é de 98,5% - 101,5% de recuperação. Em contrapartida, no experimento 2 no tempo de 17h foi detectado que havia uma bolha no *vial* após a injeção, desta maneira este dado não será considerado como resultado válido. Diante destes resultados, foi possível observar que ambos os ativos na condição refrigeração estão na faixa de aceitação de estabilidade em linha com o esperado e conforme demonstrado por Leite, Facchini e Faria, 2003 em seu estudo de estabilidade de padrão de bilirrubina.

A importância de determinar este tempo de utilização do padrão torna-se importante para assegurar a confiabilidade dos resultados das análises realizadas no controle de qualidade, pois desta maneira é possível padronizar e indicar o armazenamento dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio em geladeira ao longo das análises em campanhas de produto acabado evitando, assim, a necessidade de preparo de novos padrões sem a real necessidade e melhorando o fluxo do laboratório.

Tabela 3- Avaliação de estabilidade em horas dos padrões de amoxicilina e clavulanato de potássio na condição de geladeira (2-8°C).

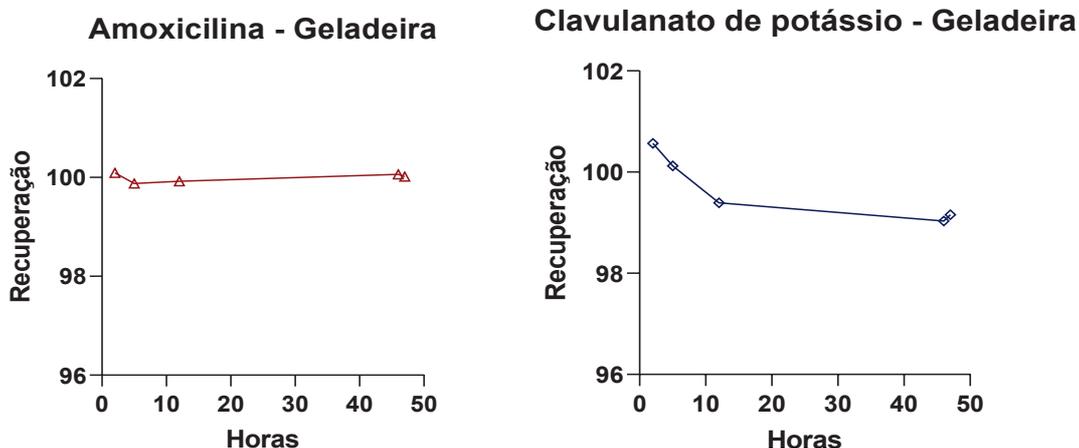
		Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Fator de Cauda	Pratos teóricos	Recuperação %	Tempo
Experimento 1	Clavulanato de Potássio	1270966,56	1,13	8338	100,57	2h
	Amoxicilina	6518621,80	0,97	7136	100,09	-----
	Clavulanato de Potássio	1265361,70	1,13	8187	100,12	5h
	Amoxicilina	6504621,44	0,97	7129	99,88	-----
Experimento 2	Clavulanato de Potássio	1297280,46	1,26	6200	99,39	12h
	Amoxicilina	6877783,75	1,04	6288	99,92	-----
	Clavulanato de Potássio	1072665,62	1,24	6173	82,19*	17h
	Amoxicilina	6673820,18	1,05	6163	96,96*	-----
Experimento 3	Clavulanato de Potássio	1198378,98	1,15	8196	99,03	46h
	Amoxicilina	6685825,13	0,93	6973	100,06	-----
	Clavulanato de Potássio	1199907,52	1,15	8257	99,16	47h
	Amoxicilina	6683009,19	0,92	6517	100,02	-----

Fonte: Autoria própria.

Além do mais, ao empregar o teste estatístico de correlação linear de Pearson é possível avaliar se há uma relação entre tempo e recuperação (Figura 18). Assim, observa-se que para o clavulanato houve uma correlação negativa entre recuperação e tempo, pois o $r = 0,8609$ ($p \geq 0,05\%$). Em contrapartida, para a amoxicilina esta correlação foi positiva com $r = 0,3709$ ($p \geq 0,05\%$).

0.05%). Neste contexto, a correlação linear de Pearson não foi significativa para ambos os ativos.

Figura 18 - Gráfico demonstrando a correlação entre recuperação e tempo dos ativos amoxicilina e clavulanato de potássio na condição geladeira.

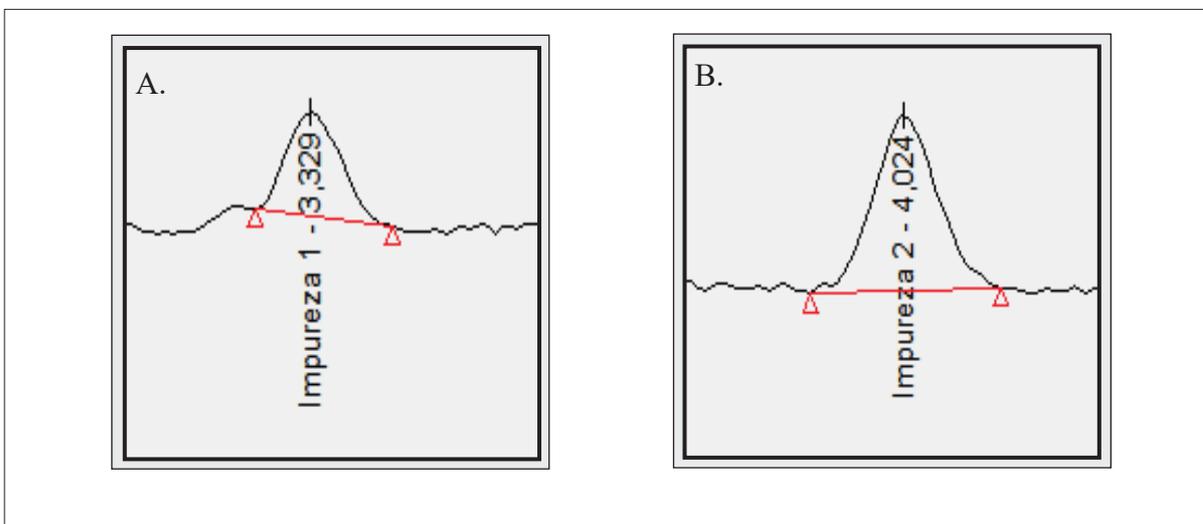


Fonte: Autoria própria.

4.4. Detecção de Impurezas

Conforme os experimentos mencionados acima observou-se a presença de duas impurezas no início da análise que foram nomeadas como impureza 1 e impureza 2. Entretanto, devido ao experimento 3 ter abordado maior tempo de estudo dos ativos será dado maior ênfase ao mesmo conforme dados apresentados nas Figuras 19-20 e na Tabela 4.

Figura 19 - Picos das impurezas encontradas no padrão de amoxicilina e clavulanato de potássio do experimento 3. A. Perfil da impureza 1 e B. Perfil da impureza B obtidas do cromatograma da solução padrão.

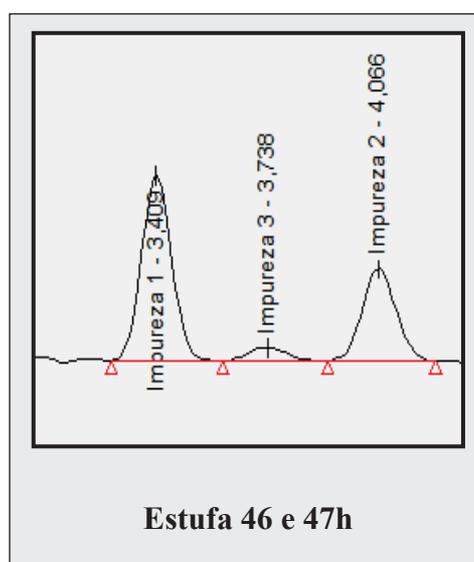


Fonte: Autoria própria.

Neste contexto, foi possível verificar que a área da impureza 1 no início do experimento (tempo zero) foi de 6381,11 e após a etapa de acondicionamento em estufa a mesma impureza apresentou uma área de 90167,44 para o estudo com 46h e 90565,54 para o estudo de 47h, o que representa aproximadamente 14 vezes superior a primeira. Em contrapartida, ao comparar a mesma impureza 1 nos tempos de 46h e 47h na condição geladeira não é possível observar um aumento na área desta impureza com o decorrer do tempo. Além do mais, esta relação também foi detectada para a impureza 2 que apresentou um aumento de aproximadamente 4 vezes nos estudos na condição estufa nos tempos de 46h e 47h.

No experimento 3, ainda foi possível observar a aparecimento de um pico interferente em ambas as injeções com o padrão armazenado em estufa que foi nomeado como impureza 3. Em contrapartida, esta impureza não foi detectada na condição geladeira conforme abordado na Figura 20 e na Tabela 4.

Figura 20 – Ilustração das impurezas detectadas na condição estufa do experimento 3 para os tempos de 46 e 47 horas.



Fonte: Autoria própria.

Diante dos resultados apresentados é possível sugerir uma relação inversa entre tempo e faixa de recuperação e uma relação direta entre tempo e aumento de impurezas para o presente método cromatográfico. Além do mais, os possíveis produtos de degradação possivelmente são decorrentes de interações das hidroxilas com o anel β -lactâmico presente na estrutura molecular de ambos os ativos. Nestes contexto, segundo Alexandra Ribeiro Freitas *et al.*, (2008) os possíveis produtos de degradação podem ser: ácido amoxicilóico, ácido amoxilóico e amoxicilina dicetopiperazina. Adicionalmente, os possíveis produtos de degradação do

clavulanato de potássio poderiam ser derivados de pirazina segundo Haginaka *et al.*, (1985). Por esta razão, foram realizadas outras análises adicionais que pudessem corroborar com esta hipótese que serão discutidos adiante.

Tabela 4 - Avaliação das impurezas identificadas nos padrões ao longo do experimento 3.

		Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Fator de Cauda	Pratos teóricos
Início	Impureza 1	6381,11	1,24	7656
	Impureza 2	12840,02	1,05	7362
	Impureza 3	-	-	-
Estufa 46h	Impureza 1	90167,44	1,07	6781
	Impureza 2	50972,31	1,06	7354
	Impureza 3	8534,42	1,07	5074
Estufa 47h	Impureza 1	90565,54	1,07	6472
	Impureza 2	50871,59	1,07	7359
	Impureza 3	5344,04	1,29	8022
2-8 °C – 46h	Impureza 1	5285,38	1,06	7900
	Impureza 2	15663,96	1,12	7769
	Impureza 3	-	-	-
2-8 °C – 47h	Impureza 1	5690,43	0,94	8088
	Impureza 2	16590,97	1,08	6937
	Impureza 3	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

4.4.1. Balanço de massa

Geralmente o balanço de massa é empregado na avaliação dos produtos de degradação ao longo de uma validação analítica de um método quantitativo. Assim, o intuito deste é correlacionar matematicamente a perda aparente do princípio ativo como o aumento dos produtos de degradação. Desta maneira, o balanço de massa funciona como um controle de qualidade nestes métodos, pois demonstra que os produtos de degradação foram corretamente detectados e que os mesmos não interferem na quantificação dos ativos de interesse (Lukulay e Hokanson, 2006).

No presente estudo, o balanço de massa apenas foi proposto com o intuito de evidenciar que as condições de armazenamento interferem na estabilidade do padrão. Por esta razão, na Tabela 5 pode-se observar o balanço de massa do experimento 3 para ambas as condições de armazenamento geladeira e estufa. Assim, para a primeira condição de armazenamento nos tempos de 46h e 47h o balanço de massa manteve-se próximo de 100%. Em contrapartida, para a condição estufa o balanço de massa manteve-se em 96%, fato este que evidencia que nesta condição, possivelmente houve degradação dos ativos de interesse e que nem todos os produtos de degradação puderam ser detectados pela técnica cromatográfica e no comprimento de onda de 220 nm empregado no método.

Tabela 5 - Avaliação do balanço de massa do experimento 3.

	Soma das áreas dos picos	Balanço de massa
Início da análise	7918618	-
Estufa 46h	7655973	96,68 %
Estufa 47h	7625120	96,29 %
2-8 °C – 46h	7915797	99,96 %
2-8 °C – 47h	7918630	100,00 %

Fonte: Autoria própria.

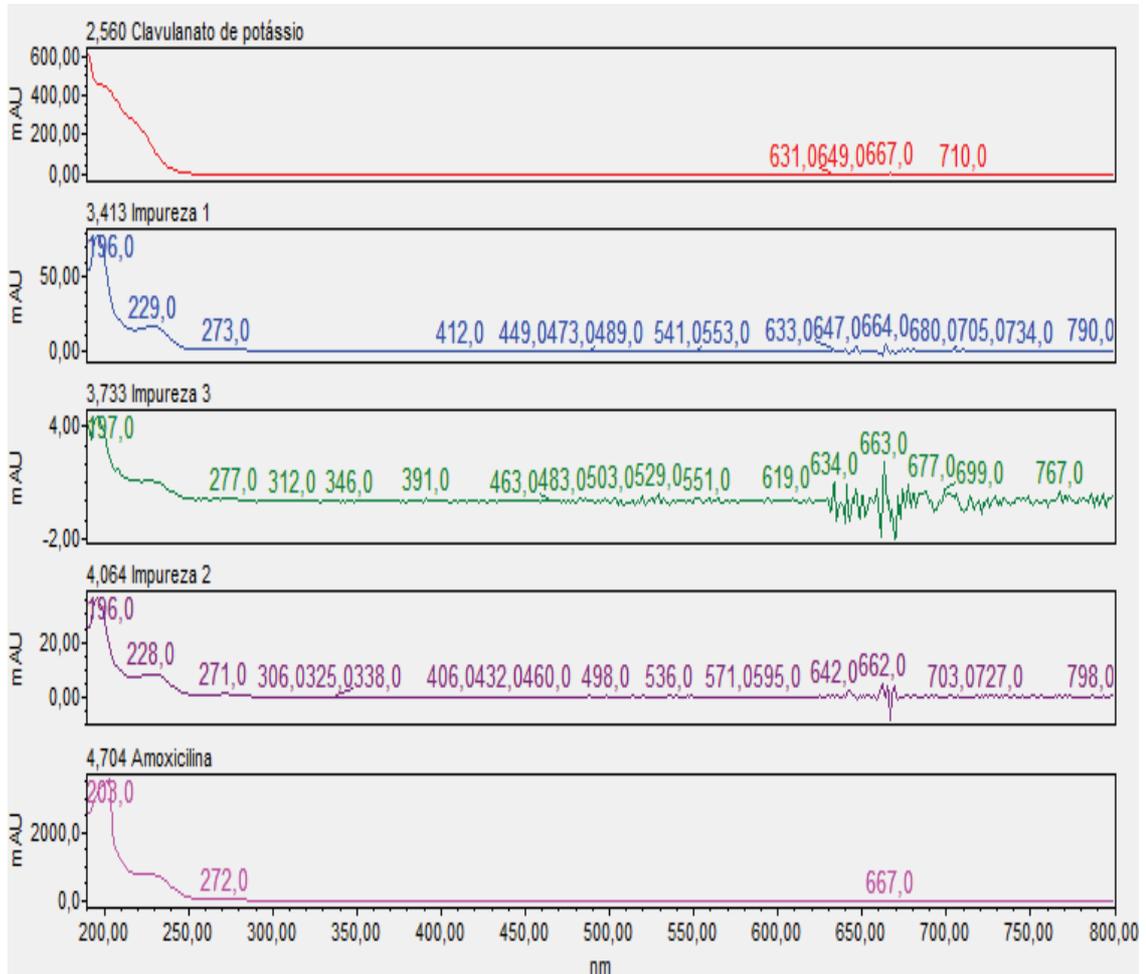
4.4.2. Perfil de Absorção UV-VIS

Na Figura 21 pode-se observar os espectros de absorção UV-VIS que foram extraídos ao longo do experimento 3 por um detector de arranjo de diodos (DAD) acoplado ao HPLC. Assim, é possível observar os espectros de absorção dos ativos de interesse clavulanato de potássio e amoxicilina, como também das impurezas 1, 2 e 3.

De acordo com a literatura, espera-se que o espectro de absorção para um átomo seja composto de linhas agudas, em conformidade com um processo quantificado em uma transição eletrônica. Entretanto, ao considerar moléculas que apresentam várias transições envolvidas, devido aos muitos modos excitados de vibração e rotação o espectro de absorção de UV é interpretado pelo equipamento como uma banda alargada traçada sobre as transições envolvidas. Desta maneira, a absorção máxima da banda encontra-se próximo ao comprimento de onda da transição principal da molécula. Por esta razão, é possível relacionar a intensidade da banda máxima ao número de moléculas presentes, pois com o aumento do número de

moléculas capazes de absorver em um mesmo comprimento de onda espera-se que o aumento na intensidade da banda seja proporcional (Vaz *et al.*, 2015).

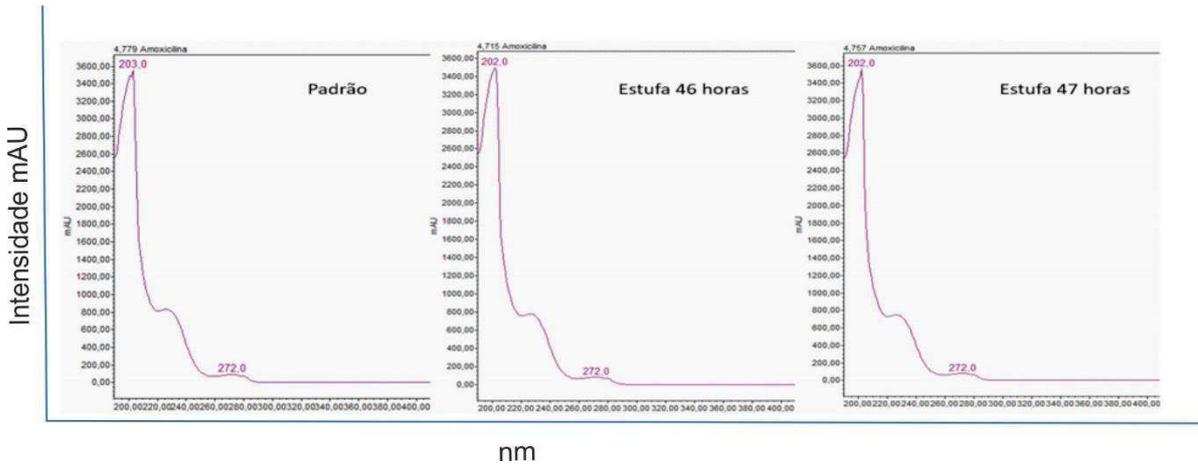
Figura 21- Espectros de absorção UV-VIS obtidos pelo detector de arranjo de diodos no experimento 3 para a condição estufa.



Fonte: Autoria própria.

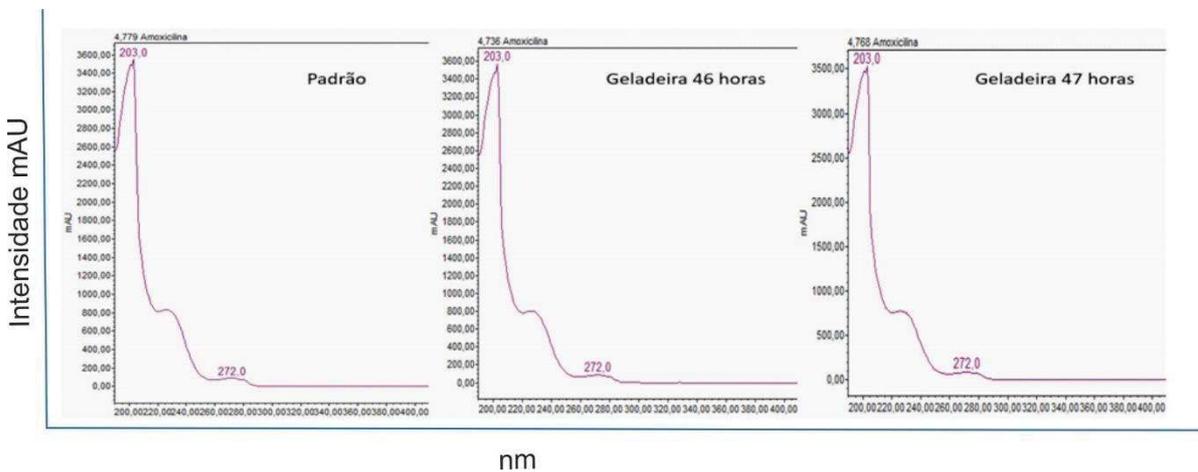
Neste contexto, Bariccatti *et al.*, (2008) sugere que a degradação da amoxicilina possa ser observada pela redução da intensidade da absorção na região de 195 nm e um aumento na intensidade na região de 225 nm. Por esta razão, realizou-se a comparação dos espectros dos gráficos de absorção da amoxicilina como observado na Figura 22. Em contrapartida, não foi possível observar uma alteração relevante entre os espectros de absorção da amoxicilina conforme evidenciado nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 -Espectro de absorção UV comparativo da amoxicilina na condição inicial e estufa.



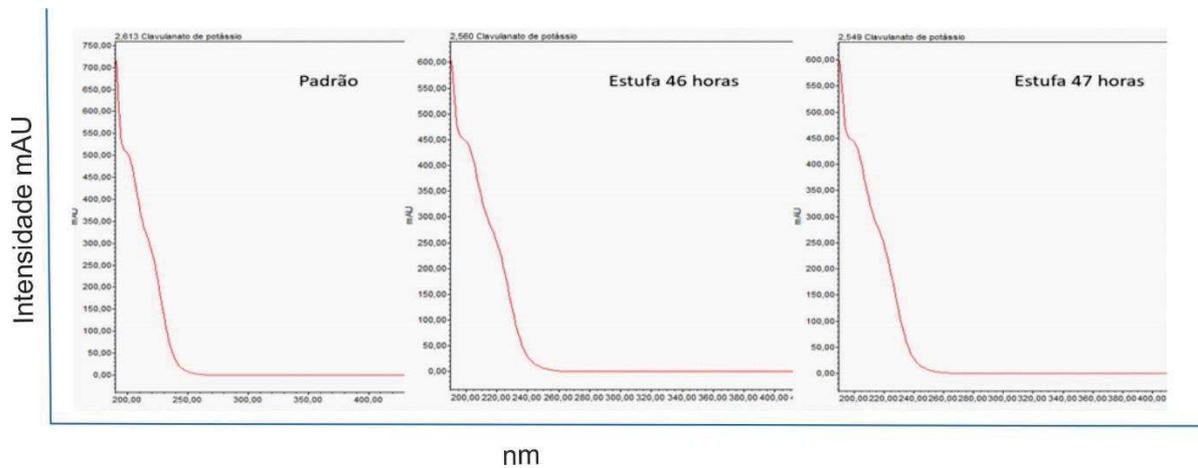
Fonte: Autoria própria.

Figura 23 - Espectro de absorção UV comparativo da amoxicilina na condição inicial e geladeira.



Fonte: Autoria própria.

Figura 24- Espectro de absorção UV comparativo do clavulanato de potássio na condição inicial e estufa.



Fonte: Autoria própria.

O estudo de Haginaka, Nakagawa e Uno, (1981) demonstrou que o perfil de absorção UV do clavulanato em solução modifica-se ao longo do tempo, possivelmente devido a

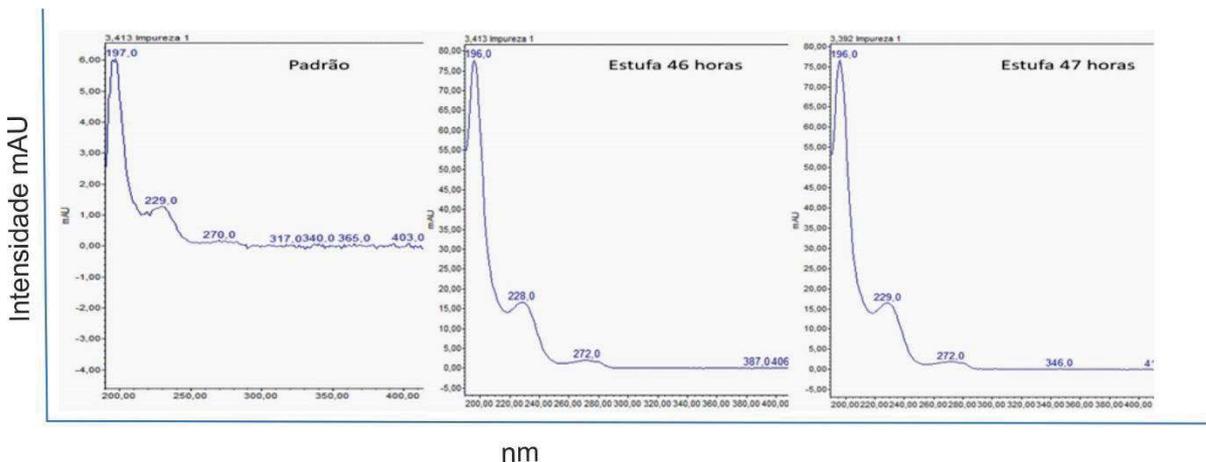
formação de um produto de degradação. Por esta razão, avalia-se na Figura 24 os espectros de UV do clavulanato de potássio ao longo do experimento 3, o que possibilitou observar que para as injeções de 46 h e 47 h na condição estufa houve uma redução na intensidade da banda na faixa de 190-200 nm. Desta maneira, esta diminuição da banda pode ser um indicativo da degradação do ativo, pois sabe-se que a intensidade da banda está diretamente relacionada a quantidade de moléculas que emitem o sinal em determinado comprimento de onda. Em contrapartida, na Figura 25 com a condição geladeira a intensidade da banda manteve-se constante.

Figura 25 - Espectro de absorção UV comparativo do clavulanato de potássio na condição inicial e geladeira.



Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 1 na condição inicial e estufa.

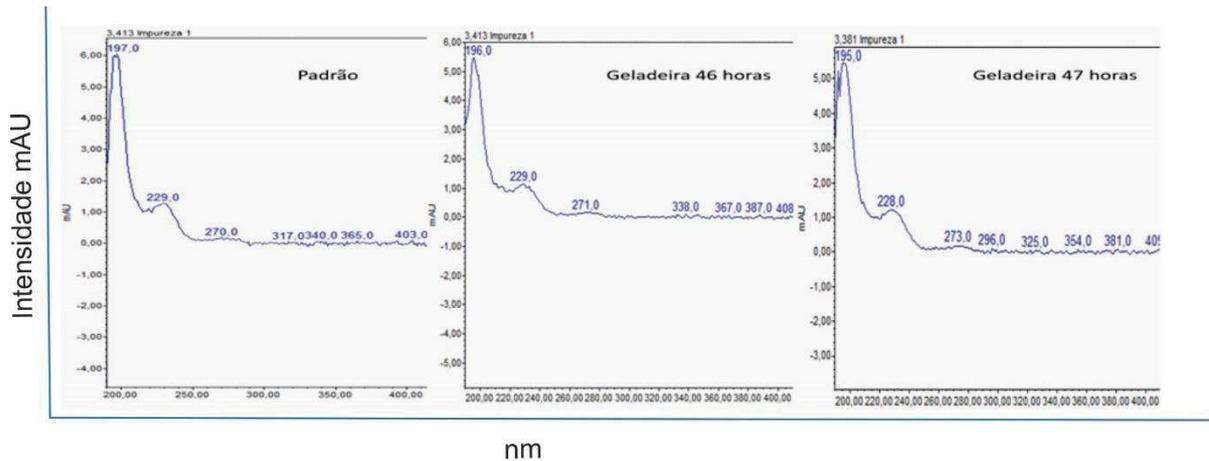


Fonte: Autoria própria.

Além do mais, ao longo do estudo em estufa foi possível observar um aumento na intensidade das bandas em 196 nm e 228 nm nos espectros UV conforme demonstrado na Figura 26. Assim, este fato está em linha com o esperado já que há indícios da degradação do ativo e

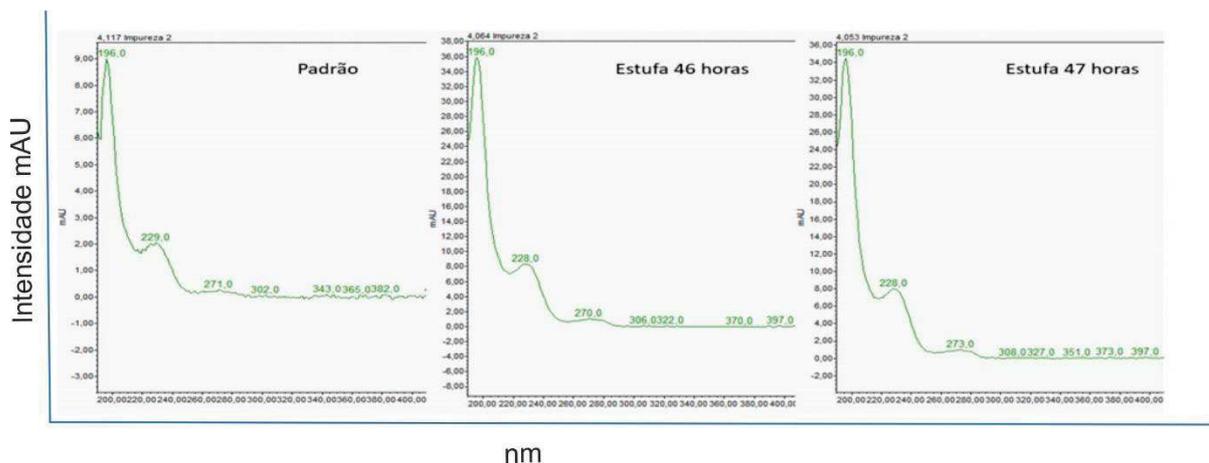
formação das impurezas. Em contrapartida, para a condição geladeira (Figura 27) a intensidade das bandas de absorção UV se mantiveram constantes ao longo do tempo.

Figura 27 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 1 na condição inicial e geladeira



Fonte: Autoria própria.

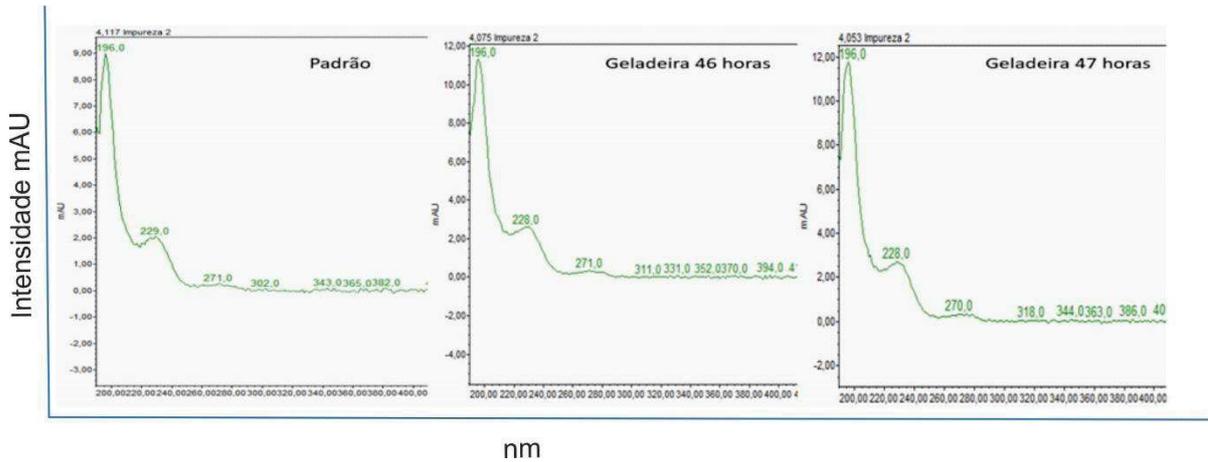
Figura 28 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 2 na condição inicial e estufa.



Fonte: Autoria própria.

Conforme observado para a impureza 1 ao longo do estudo em estufa, também foi possível observar para a impureza 2 um aumento na intensidade das bandas em 196 nm e 228 nm nos espectros UV conforme demonstrado na Figura 28. Assim, este fato está em linha com o esperado já que há indícios da degradação do ativo e formação das impurezas. Em contrapartida, para a condição geladeira (Figura 29) a intensidade das bandas de absorção UV manteve-se constante ao longo do tempo.

Figura 29 - Espectro de absorção UV comparativo da impureza 2 na condição inicial e geladeira.

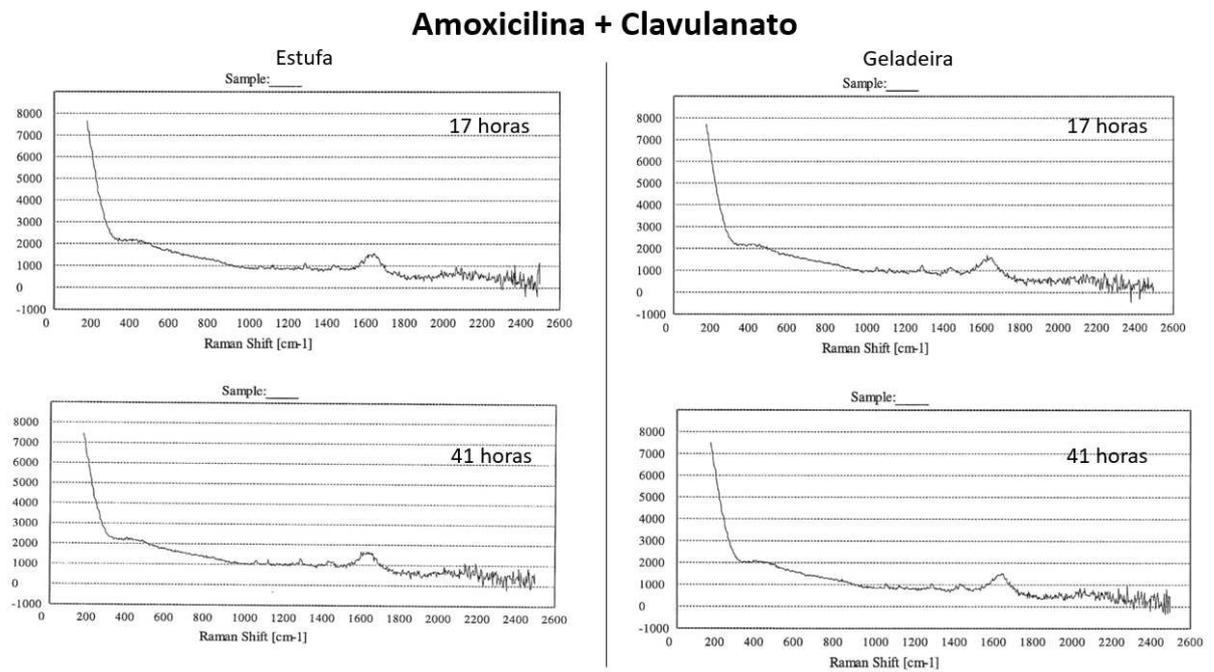


Fonte: Autoria própria.

4.4.3. Raman

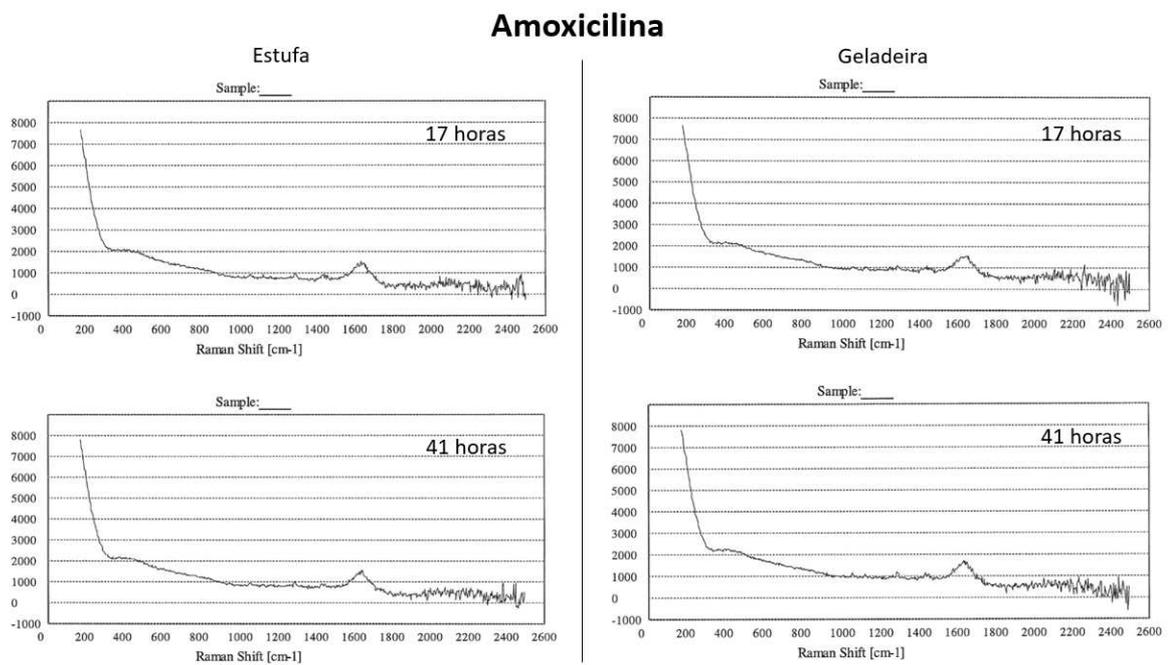
Cielecka-Piontek et al., (2015) observou que no estado sólido é possível observar diferenças nas bandas Raman características do clavulanato não degradado e do clavulanato degradado por exposição ao ar e a umidade. Diante desta premissa, avaliou-se a solução padrão de clavulanato de potássio e amoxicilina por espectroscopia Raman após o tempo de estabilidade da solução com o intuito de evidenciar a degradação dos ativos. Entretanto, conforme demonstrado nas Figuras 30-32, o modelo proposto de avaliação da solução de clavulanato e amoxicilina na mesma concentração do método de doseamento não foi eficaz, pois os espectros somente captaram ruídos, possivelmente devido à baixa concentração dos ativos.

Figura 30 - Espectros Raman nas condições estufa e geladeira dos ativos amoxicilina e clavulanato de potássio.



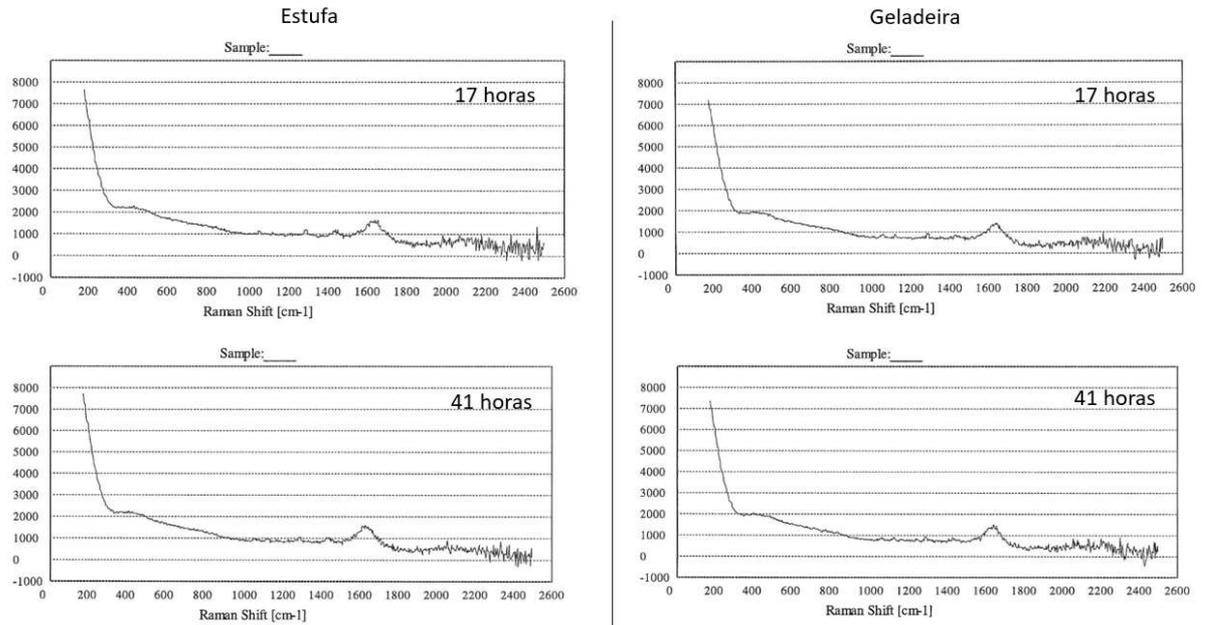
Fonte: Autoria própria.

Figura 31 - Espectros Raman nas condições estufa e geladeira do ativo amoxicilina.



Fonte: Autoria própria.

Figura 32 - Espectros Raman nas condições estufa e geladeira do ativo clavulanato de potássio.

Clavulanato

Fonte: Autoria própria.

CONCLUSÃO

5. Conclusão

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente estudo, podemos apresentar as seguintes conclusões abaixo.

Em relação ao desenvolvimento de um protocolo de estudo de estabilidade verificou-se que a condição de armazenamento interfere no tempo de estabilidade da solução e pode ser aplicado para outros princípios ativos.

A solução de amoxicilina e clavulanato de potássio sob a condição geladeira apresentou estabilidade por 47 horas. Em contrapartida, a mesma solução sob a condição de armazenamento estufa apresentou estabilidade de apenas 5 horas.

A técnica de cromatografia líquida possibilitou a detecção de impurezas decorrentes da degradação dos ativos principais e a observação de alterações nas áreas dos ativos e das impurezas.

Os espectros de absorção UV sugeriram que para a condição estufa houve a degradação do clavulanato ao longo do tempo.

O modelo proposto para a avaliação das soluções por espectroscopia Raman não foi eficaz.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

6. Referência Bibliográfica

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 166**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

ALEXANDRA RIBEIRO FREITAS, A. *et al.* **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção e quantificação da Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS** Dissertação para obtenção do grau de mestre em Química. [s.l: s.n.].

AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa, 2014.

BARICCATTI, R. A. *et al.* Degradação hidrolítica e fotoquímica da amoxicilina na presença de β -ciclodextrina. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 79–84, 2008.

BUMBRAH, G. S.; SHARMA, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 6, n. 3, p. 209–215, 2016.

BWTEK. **BWTEK**. Disponível em: <<http://bwtek.com/>>. Acesso em: 19 maio. 2019.

CIELECKA-PIONTEK, J. *et al.* Solid-state stability and compatibility studies of clavulanate potassium. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 2, p. 146–152, 2015.

CHOUDHARY, A. **Pharmaceutical Guidelines: Total Pharmaceutical Solution**. Disponível em: <<https://www.pharmaguideline.com/>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

CHROMABLOGGRAPHY. **ChromaBLOGraphy: Restek's Chromatography Blog**. Disponível em: <<https://blog.restek.com/>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE. Guideline on bioanalytical method validation. **EMA Rev. 1 Corr. 2**, v. 44, n. July 2011, p. 1–23, 2012.

D. PATEL, B.; J. MEHTA, P. An Overview: Application of Raman Spectroscopy in Pharmaceutical Field. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 131–141, 2010.

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: 12 maio. 2019.

FELMINGHAM, D.; WASHINGTON, J.; GROUP, T. A. P. Trends in the Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Respiratory Tract Pathogens - Findings of the Alexander Project 1992-1996. **Journal of Chemotherapy**, v. 11, n. sup1, p. 5–21, 1999.

FINLAY, J. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 18–23, 2003.

GOODMAN, L. S. (LOUIS S. *et al.* **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. [s.l.] McGraw-Hill, 2011.

GREEN, J. M. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical**

Chemistry, v. 68, n. 9, p. 305A-309A, maio 1996.

HAGINAKA, J. *et al.* Degradation of Clavulanic Acid in Aqueous Alkaline Solution : Isolation and Structural Investigation of Degradation Products. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 218–224, 25 jan. 1985.

HAGINAKA, J.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in aqueous solutions. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 3334–3341, 1981.

HOFELMANN, K. C. G. **Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier e análise de molhabilidade nos filmes finos de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier e análise de molhabilidade nos filmes finos de carbono amorfo hidrogena.** [s.l.] Universidade do Estado de Santa Catarina, 2013.

HONG, P.; PHOEBE, A. D.; JONES, M. D. Study of relative response factors and mass balance in forced degradation studies with liquid chromatography/photo-diode array detector/evaporative light scattering detector/mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, p. 61–70, 2017.

HUBSCHWERLEN, C. β -Lactam Antibiotics. *In: Comprehensive Medicinal Chemistry II.* [s.l.] Elsevier, 2007. v. 7p. 479–518.

HUCHON, G. J. *et al.* Initial antibiotic therapy for lower respiratory tract infection in the community: a European survey. **European Respiratory Journal**, v. 9, n. 8, p. 1590–1595, 1996.

ICH/Q2. **ICH Topic Q 2 - Validation of Analytical Procedures.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. Introduction. *In: HPLC for Pharmaceutical Scientists.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 1–24.

KERČ, J.; OPARA, J. A new amoxicillin/clavulanate therapeutic system: Preparation, in vitro and pharmacokinetic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 335, n. 1–2, p. 106–113, 2007.

LAU, E. **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis: Preformulation studies.** [s.l: s.n.]. v. 3

LEITE, C.; FACCHINI, F. P.; FARIA, E. C. DE. Avaliação laboratorial da estabilidade do padrão calibrador de bilirrubina Laboratorial evaluation of standard bilirubin stability. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 21–25, 2003.

LEWANDOWSKA, R.; LIU, J. Raman Microscopy: Analysis of Nanomaterials. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, p. 1–6, 2016.

LINDA L., N. **Validation of Chromatographic Methods.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

LIONBERGER, R. A. Innovation for Generic Drugs: Science and Research Under the Generic Drug User Fee Amendments of 2012. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 2019.

LIONBERGER, R.; UHL, K. Generic Drugs: Expanding Possibilities for Clinical Pharmacology. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 105, n. 2, p. 278–281, 2019.

LUKULAY, P.; HOKANSON, G. Reconciling mass balance in forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, p. 2005–2007, 2006.

LUNA, A. S. **Raman Spectroscopy, Soil Analysis Applications**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017.

MARTICH, E. V. **A política de medicamentos genéricos e o mercado farmacêutico na Argentina e no Brasil**. [s.l.] Escola Nacional de Saúde Pública, 2013.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. [s.l.] Wiley, 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Pubchem database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin>>. Acesso em: 05 de maio de 2019.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Pubchem database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Potassium-clavulanate>>. Acesso em 05 de maio de 2019.

PEVELEN, D. D. LE; TRANTER, G. E. **FT-IR and Raman Spectroscopies, Polymorphism Applications**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017.

RIBANI, M. *et al.* Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES ORIQUI, L. **Guia de Estabilidade para a Indústria Química - Definição de Prazo de Validade e Proposição de Prazo**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2012.

SCHLÜTER, H. Reversed-Phase Chromatography. *In*: **Protein Liquid Chromatography**. [s.l.: s.n.], p. 147–234.

SELGRAD, M.; MALFERTHEINER, P. New strategies for Helicobacter pylori eradication. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 593–597, 2008.

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.

SILVA, L. M. DA. **Desenvolvimento e Validação De Metodologia Analítica e Estudo de Estabilidade de Tigecilina em Produto Farmacêutico**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. (JOSEPH J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. [s.l.] Wiley, 1997.

STUART-FARQUHARSON. **Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology**. Disponível em: <<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/158839-Pharmaceutical-Applications-of-Raman-Spectroscopy/>>. Acesso em: 4 out. 2018.

SWARTZ, M. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 9–12, p. 1130–1150, 13 jul. 2010.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **CHROMATOGRAPHY**. 40. ed. [s.l.] United States Pharmacopeial, 2017.

VALENTE, V. Generics in Latin America: An analysis of the Brazilian experience. **Journal of Generic Medicines**, v. 4, n. 1, p. 30–36, 2006.

VANKEIRSBILCK, T. *et al.* Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 869–877, 2002.

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.

WHITE, A. R. Augmentin(R) (amoxicillin/clavulanate) in the treatment of community-acquired respiratory tract infection: a review of the continuing development of an innovative antimicrobial agent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 90001, p. 3i – 20, 1 fev. 2004.