

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Wellerson Wagner Barbetto Silva

**Determinação de alguns produtos de degradação da Azitromicina por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência UV-vis em formas farmacêuticas
comprimido revestido**

Juiz de Fora/MG

2023

Wellerson Wagner Barbeta Silva

**Determinação de alguns produtos de degradação da Azitromicina por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência UV-vis em formas farmacêuticas
comprimido revestido**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Sintéticos.

Orientador: Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Dra. Paula Rocha Chellini

Juiz de Fora/MG

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Barbeto Silva, Wellerson Wagner .

Determinação de alguns produtos de degradação da Azitromicina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência UV-vis em formas farmacêuticas comprimido revestido / Wellerson Wagner Barbeto Silva. -- 2023.

118 p. : il.

Orientador: Marcone Augusto Leal Oliveira

Coorientadora: Paula Rocha Chellini

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. CLAE UV-vis. 2. Impureza Orgânica. 3. Degradação de Fármacos. 4. Validação Analítica. 5. Estabilidade de Medicamentos. I. Leal Oliveira, Marcone Augusto , orient. II. Chellini, Paula Rocha, coorient. III. Título.

Wellerson Wagner Barbeta Silva

Determinação de alguns produtos de degradação da Azitromicina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência UV-vis em formas farmacêuticas comprimido revestido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 21 de dezembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Paula Rocha Chellini - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Lucas Mattos Duarte

Universidade Federal Fluminense

Dra. Juliana de Carvalho da Costa

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 05/12/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Marcene Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 28/12/2023, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Rocha Chellini, Professor(a)**, em 28/12/2023, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a)**, em 02/01/2024, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Mattos Duarte, Usuário Externo**, em 09/01/2024, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1611030** e o código CRC **2403D7EF**.

Dedico este trabalho a minha esposa
e as minhas filhas que sempre me
incentivaram na concretização de
um sonho que foi concluir esta
etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, autor da minha vida, por me conceder sabedoria, por me encorajar e me sustentar dia após dia.

A minha esposa Cassiane Garcia e as minhas filhas, Larissa e Giovanna, pelo apoio, incentivo e cumplicidade.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, por aceitar trabalhar comigo neste projeto, por dividir comigo suas experiências e por todo o suporte.

À minha coorientadora, Professora Dr^a Paula Rocha Chellini, pela parceria, dedicação e por todas as contribuições que me ajudaram no desenvolvimento do trabalho.

Ao colega de mestrado Luís Henrique Cantarino pela ajuda na etapa do planejamento de experimento.

Aos colegas de trabalho Pablo Herreira, Mariana Maciel, Leonardo Carvalho, Lucas Rosa, Luiz Novaes, Naiara de Oliveira, Rafael Machado e Vitor Antipoff, pelas contribuições na realização das atividades laboratoriais, revisão do trabalho e tratamento estatístico.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Farmacêuticas, da UFJF, por me dar todo suporte necessário para realização do curso.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, por contribuir com meu crescimento profissional.

“Pensar é o trabalho mais difícil que existe. Talvez por isso tão poucos se dediquem a ele.”

Henri Ford

RESUMO

A Azitromicina (AZM) é um antibiótico de amplo espectro, semissintético, da família dos macrolídeos, utilizado há décadas para o tratamento de infecções causadas por bactérias, como faringite e amigdalite. Durante a pandemia foi muito divulgado seu possível reposicionamento contra o novo coronavírus (SARS-Cov-2) porém, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomenda para essa terapêutica. Os fármacos podem apresentar impurezas, as quais, são inevitavelmente produzidas durante a sua rota de síntese, como também, podem ser originadas ao longo da vida de prateleira (*shelf life*) do medicamento, como produtos de degradação. No caso da AZM essas impurezas podem reduzir a atividade antibacteriana e aumentar a toxicidade do fármaco. Portanto, as autoridades regulatórias descrevem que o perfil de impureza de um medicamento é um atributo crítico de qualidade (ACQ) e segurança e assim, vem despertando maior rigor técnico e diretrizes globais nesse controle. As impurezas que excedem a 0,1% devem ter suas estruturas confirmadas para estar em conformidade com os limites propostos pelo ICH (Conferência Internacional sobre harmonização de Requisitos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano). Portanto, é importante identificar as impurezas da AZM, as quais são suas análogas estruturais e monitorar sua presença e quantidade no medicamento. Este trabalho propôs avaliar os métodos analíticos disponíveis em compêndios oficiais e realizar os ajustes necessários para a adequabilidade analítica por CLAE UV-vis em um indústria farmacêutica multinacional (uma vez que não foi alcançada anteriormente), com consequente validação do método analítico para avaliação das impurezas orgânicas conhecidas e desconhecidas oriundas da degradação da AZM no medicamento (produto acabado), demonstrando sua seletividade, precisão, exatidão, linearidade e robustez, de acordo com as especificações contidas na RDC nº 166/17. Finalmente monitorar a qualidade de seis lotes oriundos de cinco detentores de registro distintos disponíveis no mercado brasileiro.

Palavras chave: CLAE UV-vis, Impureza Orgânica, Degradação de Fármacos, Validação Analítica, Estabilidade de Medicamentos.

ABSTRACT

Azithromycin (AZM) is a broad-spectrum, semi-synthetic antibiotic from the macrolide family, used for decades to treat infections caused by bacteria, such as pharyngitis and tonsillitis. During the pandemic, its possible repositioning against the new coronavirus (SARS-Cov-2) was widely publicized, however, the World Health Organization (WHO) does not recommend this therapy. Drugs may contain impurities, which are inevitably produced during their synthesis route, but may also originate throughout the shelf life of the drug, as degradation products. In the case of AZM, these impurities can reduce the antibacterial activity and increase the toxicity of the drug. Therefore, regulatory authorities describe that the impurity profile of a medicine is a critical attribute of quality (CQA) and safety and thus, it has been triggering greater technical rigor and global guidelines in this control. Impurities that exceed 0.1% must have their structures confirmed to comply with the limits proposed by ICH (International Conference on Harmonization of Requirements for Registration of Pharmaceutical Products for Human Use). Therefore, it is important to identify AZM impurities, which are its structural analogues, and monitor their presence and quantity in the medicine. This work proposed to evaluate the analytical methods available in official compendia and make the necessary adjustments for the analytical suitability by HPLC UV-vis detector in a multinational pharmaceutical industry (since it had not been achieved previously), with consequent validation of the analytical method for evaluating the known and unknown organic impurities arising from the degradation of AZM in the medicine (finished product), demonstrating its selectivity, precision, accuracy, linearity and robustness, in accordance with the specifications contained in RDC nr. 166/17. Finally, monitor the quality of six batches from five different registration holders available on the Brazilian market.

Keywords: HPLC UV-vis, Organic Impurity, Drug Degradation, Analytical Validation, Drug Stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estrutura da Azitromicina diidratada	19
FIGURA 2	Estrutura da Eritromicina	20
FIGURA 3	Evolução do número de unidades comercializadas de AZM comp. 500 mg .	22
FIGURA 4	Transformação da Eritromicina em Azitromicina	26
FIGURA 5	Estruturas químicas das 23 impurezas orgânicas conhecidas da AZM	27
FIGURA 6	Teste de estabilidade.....	32
FIGURA 7	Formações de AZM e Impureza P a partir da Eritromicina A	33
FIGURA 8	Perfil cromatográfico padrão referência identif. de picos de AZM - EP.....	34
FIGURA 9	CLAE - Cromatograma de um produto Azitromicina Comercial	35
FIGURA 10	Separação a três valores de resolução $R_s = 2\Delta Z / (W_A + W_B)$	50
FIGURA 11	Cálculo da pureza de pico	51
FIGURA 12	Figura ilustrativa de pureza de pico	51
FIGURA 13	Ilustração do preparo da solução padrão de trabalho da AZM	57
FIGURA 14	Fórmula para cálculo das concentrações	71
FIGURA 15	Análise de regressão polinomial múltipla	74
FIGURA 16	Gráficos de Efeito para variáveis cromatográficas x CRS	74
FIGURA 17	Eluição do padrão EPCRS de AZM – 0,9mL min ⁻¹ e 55 °C	75
FIGURA 18	Cromatogramas Soluções de <i>System</i> – Seletividade	77
FIGURA 19	Cromatogramas Imp. Orgânicas – Seletividade – Amostra Fortificada e Amostra Íntegra.....	78
FIGURA 20	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Hidrólise Ácida.....	80
FIGURA 21	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletividade - Hid. Ácida ...	80
FIGURA 22	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletividade - Hid. Alcalina	82
FIGURA 23	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Hidrólise Alcalina ...	82
FIGURA 24	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Oxidação	84
FIGURA 25	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletividade - Oxidação	85
FIGURA 26	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletiva. - Íons Metálicos ...	86
FIGURA 27	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Íons Metálicos	86
FIGURA 28	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Umidade	88
FIGURA 29	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletiv. - Umidade	88
FIGURA 30	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletiv. - Aquecimento	90

FIGURA 31	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Aquecimento	90
FIGURA 32	Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Fotoexposição	92
FIGURA 33	Pureza de Pico – AZM, Imp. M e F de AZM – Seletiv. - Fotoexposição	92
FIGURA 34	Cromatogramas dos Padrões de Impurezas Orgânicas Conhecidas Individuais	94
FIGURA 35	Varredura espectral da AZM em DAD – intervalo 190 nm – 400 nm	113
FIGURA 36	Cromatograma da AZM em 210 nm	113
FIGURA 37	Cromatograma <i>EPCRS batch 5</i> - padrão referência identificação de picos de AZM e Diluente/ branco.....	114
FIGURA 38	Cromatogramas dos padrões P ₁ e P ₂ (rec.) da AZM e Diluente/ branco	115
FIGURA 39	Cromatograma da solução de sensibilidade	115
FIGURA 40	Cromatograma do Placebo A, Produto A e Diluente/branco	116
FIGURA 41	Cromatograma do Placebo B, Produto B ¹ e Diluente/branco.....	116
FIGURA 42	Cromatograma do Placebo B, Produto B ² e Diluente/branco	117
FIGURA 43	Cromatograma do Placebo C, Produto C e Diluente/branco.....	117
FIGURA 44	Cromatograma do Placebo D, Produto D e Diluente/branco	118
FIGURA 45	Cromatograma do Placebo E, Produto E Seletiva Diluente/branco	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Impurezas orgânicas conhecidas para AZM, oriundas de degradação do medicamento	24
TABELA 2	Comparativo de padrões impurezas orgânicas conhecidas da AZM disponíveis	25
TABELA 3	Estimativa de meia-vida a 25 °C e 40 °C AZM em Fosfato de Potássio pH=6,3	30
TABELA 4	Método por CLAE, detecção UV em 210 nm	35
TABELA 5	Impurezas orgânicas conhecidas para AZM, Tempo de Retenção Relativo e Fator Resposta	36
TABELA 6	Rotâmeros impureza M e composto relacionado F da AZM.....	37
TABELA 7	Potenciais impurezas listadas pelo fabricante do IFA – Alfa	38
TABELA 8	Potenciais impurezas listadas pelo fabricante do IFA – Beta	39
TABELA 9	Relação das SQFs e SQCs, Fornec., dados variáveis do lote e potência	42
TABELA 10	Relação dos medicamentos e respectivos dados variáveis do lote	43
TABELA 11	Relação dos medicamentos e respectivos fabricantes do IFA	43
TABELA 12	Composição e proporção das fases móveis - eluição por gradiente	45
TABELA 13	Crítérios de aceitação - impurezas de degradação na AZM	45
TABELA 14	Composição do Placebo do medicamento A	46
TABELA 15	Composição do Placebo do medicamento B ¹ / B ²	47
TABELA 16	Composição do Placebo do medicamento C	47
TABELA 17	Composição do Placebo do medicamento D	47
TABELA 18	Composição do Placebo do medicamento E	47
TABELA 19	Planejamento de experimento utilizando modelo fatorial 3 ²	48
TABELA 20	Condições cromatográficas	49
TABELA 21	Condições de estresse e tempo de exposição utilizadas na amostra.....	52
TABELA 22	Faixa de Linearidade avaliada	60
TABELA 23	Preparo das soluções - verificação da faixa linear para as impurezas	63
TABELA 24	Preparo das soluções para verificação da faixa linear para a AZM	64
TABELA 25	Parâmetros de Precisão (repetibilidade e intermediária) e Exatidão	66
TABELA 26	Valores de CRS previstos pelo modelo de regressão polinomial múltiplo	75
TABELA 27	Resultados das Amostras Fortificadas e Íntegra	78

TABELA 28	Resultados Seletividade - Hidrólise Ácida	81
TABELA 29	Resultados Seletividade - Hidrólise Alcalina	83
TABELA30	Resultados Seletividade - Oxidação	85
TABELA31	Resultados Seletividade - Íons Metálicos.....	87
TABELA 32	Resultados Seletividade - Umidade	89
TABELA 33	Resultados Seletividade - Aquecimento	91
TABELA 34	Resultados Seletividade - Fotoexposição	93
TABELA 35	Resultados da Recuperação	93
TABELA 36	Resultado dos parâmetros cromatográficos de LD e LQ	94
TABELA 37	Resultados obtidos para a Linearidade	96
TABELA 38	Valores ajustados de Tempo de Retenção Relativo e Fator Resposta para as impurezas orgânicas conhecidas de AZM	97
TABELA 39	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza L - (Analista 1)	98
TABELA 40	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza L	99
TABELA 41	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza M - (Analista 1)	99
TABELA 42	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza M	99
TABELA 43	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza E – (Analista 1)	100
TABELA 44	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza E	100
TABELA 45	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Comp. relac. F de AZM (Analista 1) .	100
TABELA 46	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Comp. relac. F de AZM	101
TABELA 47	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza J - (Analista 1)	101
TABELA 48	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza J	101
TABELA 49	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza I - (Analista 1)	102
TABELA 50	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza I	102
TABELA 51	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza N - (Analista 1)	102
TABELA 52	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza N	103
TABELA 53	Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Imp. desconhecida (Analista 1)	103
TABELA 54	Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impurezas desconhecidas	104
TABELA 55	Resultados encontrados para os seis lotes avaliados	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ALCOA: Attributable; Legible; Contemporaneous; Original; Accurate

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AZM - Azitromicina

BP - British Pharmacopeia

CLAE –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CRS – Chromatographic Resolution Statistic ou Estatística de Resolução Cromatográfica

DoE – Design of Experiment ou Planejamento de Experimento

DMF – Drug Master File

DPR - Desvio padrão relativo

EP –European Pharmacopeia

EPCRS batch 5– Ph. European Standard – Azithromycin for peak identification ou padrão referência de identificação de picos de Azitromicina

FB – Farmacopeia Brasileira

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

ICH -International Conference on Harmonisation

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

LD – Limite de detecção

LE – Limite de especificação

LQ – Limite de quantificação

MeOH – Metanol

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RT - *Retention Time* ou tempo de retenção

RRT – *Relative Retention Time* ou tempo de retenção relativo

Rs– Resolução

S/N – Sinal ruído

SQR - Substância Química de Referência

SQC - Substância Química de referência Caracterizada

SQF - Substância Química de referência Farmacopeica

USP –United States Pharmacopeia

UV-vis–Espectroscopia no Ultravioleta e visível

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	AVALIAÇÃO DA ROTA DE SÍNTESE E IMPUREZAS ORGÂNICAS	37
2.1.1	Fabricante do IFA – Alfa	37
2.1.2	Fabricante do IFA Beta	39
3.	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4.	MATERIAL E MÉTODO	42
4.1	SUBSTÂNCIA QUÍMICA REFERÊNCIA (SQR/SQC/SQF)	42
4.2	LOTES DOS MEDICAMENTOS	42
4.3	FABRICANTES DOS IFAs	43
4.4	SOLVENTES E REAGENTES	43
4.5	EQUIPAMENTOS.....	43
4.6	MÉTODO.....	44
4.6.1	Otimização e Adequação do Método Analítico	44
4.6.2	Preparo das soluções cromatográficas	45
4.6.3	Preparo da solução EPCRS batch 5 - padrão referência de identificação de picos de azitromicina	46
4.6.4	Placebos	46
4.6.5	Planejamento de Experimento	48
4.6.6	Validação do Método Analítico	50
<i>4.6.6.1</i>	<i>Seletividade</i>	<i>51</i>
4.6.6.1.1	Preparo da solução (impurezas orgânicas) do IFA AZM diidratada	53
4.6.6.1.2	Preparo da solução do placebo (impurezas orgânicas) do comp. revestido	53
4.6.6.1.3	Preparo da solução (impurezas orgânicas) do medicamento AZM 500 mg comp. revestido	54
4.6.6.1.4	Preparo da solução do placebo do comprimido revestido acrescido do IFA AZM no LQ	54
4.6.6.1.5	Preparo da solução de trabalho do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas no LQ – (0,1%)	54

4.6.6.1.6	Preparo da solução de trabalho do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas no LE	55
4.6.6.1.7	Preparo das soluções padrão estoque das imp. L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I e N	55
4.6.6.1.8	Preparo da solução (impurezas orgânicas) do placebo e do medicamento AZM 500 mg comp. revestido – ensaio de degradação.....	56
4.6.6.1.9	Preparo da solução branco para a condição de estresse	56
4.6.6.1.10	Preparo da solução amostra do IFA AZM diidratada para a condição de estresse	57
4.6.6.1.11	Preparo da solução padrão de trabalho de AZM	57
4.6.6.1.12	Preparo da solução padrão de sensibilidade	57
4.6.6.1.13	Preparo da solução de adequabilidade composta pelas impurezas I, J e Comp. relacionado F de AZM	58
4.6.6.2	<i>Limite de Detecção (LD)</i>	58
4.6.6.3	<i>Limite de Quantificação (LQ)</i>	59
4.6.6.4	<i>Linearidade</i>	59
4.6.6.4.1	Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza L	61
4.6.6.4.2	Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza M	61
4.6.6.4.3	Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza E	61
4.6.6.4.4	Preparo da solução para verificação da faixa linear para o comp. relacionado F de AZM	61
4.6.6.4.5	Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza J	62
4.6.6.4.6	Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza I	62
4.6.6.4.7	Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza N	62
4.6.6.4.8	Preparo da solução para verificação da faixa linear da AZM	64
4.6.6.5	<i>Precisão/ Exatidão</i>	65
4.6.6.5.1	Preparo da solução amostra para verificação da precisão do método de determinação de imp. orgânicas – medicamento AZM 500 mg comp. revest....	67
4.6.6.5.2	Preparo da solução amostra do medicamento AZM 500 mg comp. Revestido acrescido das imp. de AZM no LQ (0,1%) do método (nível baixo)	67
4.6.6.5.3	Preparo da solução amostra do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das imp. no LE do método, nas conc. equivalentes a 1,0%; 1,0%;0,5%, 1,0%, 1,0%, 0,5% e 0,7%, respectivamente (nível médio) .	68

4.6.6.5.4	Solução amostra do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas no LE do método, nas conc. equivalentes a 1,2%; 1,2%; 0,6%, 1,2%, 1,2%, 0,6% e 0,84%, respectivamente (nível alto)	68
4.6.6.5.5	Preparo da solução padrão estoque de AZM para impurezas desconhecidas	69
4.6.6.5.6	Preparo da solução de AZM no LQ do método (0,1% ou 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas	69
4.6.6.5.7	Preparo da solução de AZM no LE do método (0,2% ou 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas	69
4.6.6.5.8	Preparo da solução de AZM a 120% do LE das impurezas desconhecidas (0,24% ou 9,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas	70
4.6.6.5.9	Preparo da solução de AZM a 120% da concentração de trabalho do padrão análise de AZM (2,4% ou 96 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas	70
4.6.6.6	<i>Robustez</i>	70
4.6.7	Monitoramento de seis lotes de medicamento oriundos de cinco detentores de registro disponíveis no mercado	70
4.6.7.1	<i>Preparo da solução amostra do produto AZM 500 mg comprimido revestido ..</i>	71
4.6.7.2	<i>Preparo da solução amostra do placebo do produto comprimido revestido</i>	72
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	OTIMIZAÇÃO E ADEQUAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	73
5.2	RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO – <i>DoE</i>	73
5.3	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	76
5.3.1	Seletividade	76
5.3.1.1	<i>Padrões/ Soluções de System</i>	76
5.3.1.2	<i>Amostra fortificada e amostra íntegra</i>	77
5.3.1.3	<i>Condição de estresse</i>	79
5.3.1.3.1	Hidrólise ácida	79
5.3.1.3.2	Hidrólise alcalina	81
5.3.1.3.3	Oxidação	84
5.3.1.3.4	Íons metálicos	86
5.3.1.3.5	Umidade	88
5.3.1.3.6	Aquecimento	89
5.3.1.3.7	Fotoexposição	91
5.3.1.4	<i>Impurezas individuais</i>	93

5.3.2	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	94
5.3.3	Linearidade	95
5.3.4	Precisão e Exatidão	97
5.3.5	Robustez	105
5.4	RESULTADOS DOS MEDICAMENTOS (PRODUTO ACABADO) MONITORADOS DO MERCADO	105
6.	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICES	113
	APÊNDICE A - Varredura espectral da AZM	113
	APÊNDICE B - Comprimento de onda com maior absorção.....	113
	APÊNDICE C - Cromatogramas das análises dos medicamentos (Produto Acabado) monitorados do mercado	114

1 INTRODUÇÃO

A azitromicina (AZM) é um antibiótico semissintético, derivado da eritromicina, com amplo espectro de atividade contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fármaco descoberto em 1980 pela farmacêutica Pliva, foi aprovada para uso médico em 1988, passando dessa forma a fazer parte da lista de medicamentos essenciais da *WHO* (*World Health Organization*), uma lista com os medicamentos mais seguros e eficazes fundamentais em um sistema de saúde. Tem sido amplamente utilizada desde então, no tratamento clínico de infecções respiratórias e sexualmente transmissíveis, como a clamídia (*Chlamydia trachomatis*) e gonorreia (*Neisseria gonorrhoeae*). Efeitos não antimicrobianos e atividade imunomoduladora também foram evidenciados para essa droga, expandindo seu uso na terapia de longo prazo de patologias pulmonares crônicas. Em associação com outros fármacos, usada no tratamento de malária, sendo administrada por via oral ou endovenosa (*The American Society of Health-System Pharmacists*, 2015).

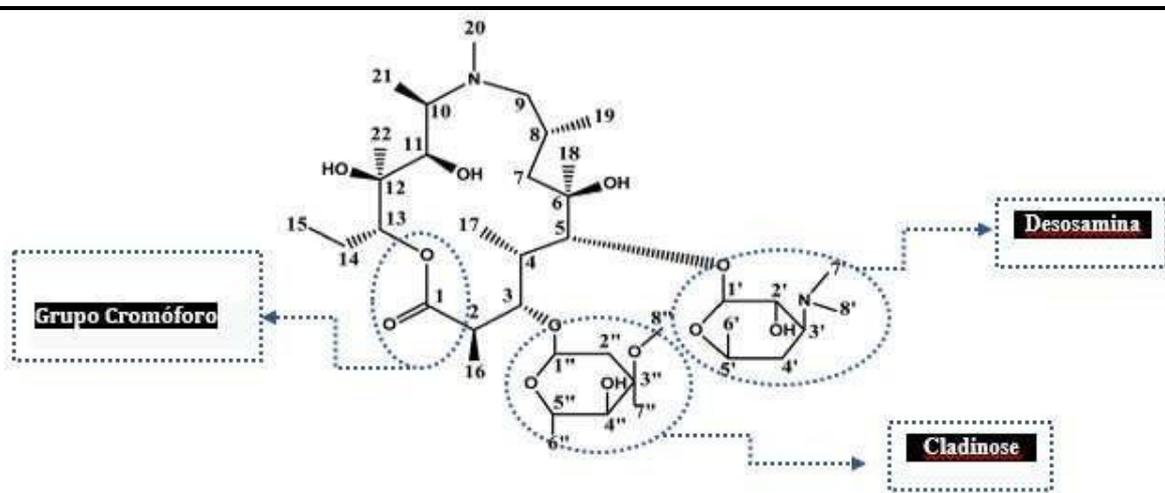
Através do estudo incessante de pesquisadores durante anos, a descoberta de antibióticos macrolídeos, tornou-se uma grande evolução para a ciência, devido a sua ótima eficácia no tratamento de infecções provenientes de germes sensíveis. Como referência, dessa evolução, podemos citar a Eritromicina, a qual, apresenta enorme eficácia no combate de infecções patogênicas. Vale destacar, que devido a segurança e eficácia, muitos estudos foram realizados, levando a própria modificação de sua estrutura, através da inserção de um grupamento nitrogênio metil substituído na eritromicina, viabilizando assim maior estabilidade em meio ácido, culminando melhora em sua ação terapêutica, bem como, na diminuição dos seus efeitos colaterais (Carvalho; Carvalho, 1998). A *World Health Organization* (*WHO*) a classifica como de importância crítica para a medicina humana, estando disponível como medicamento genérico e também como diversas marcas comerciais próprias espalhadas por todo o mundo.

Portanto, através de estudos conduzidos pela farmacêutica Pliva, proporcionou-se a descoberta da AZM, amplamente comercializada, estando disponível em diferentes formas farmacêuticas, tais como comprimidos revestidos, pó para suspensão extemporânea e cápsulas. Dentre os estudos para a avaliação do insumo farmacêutico ativo (IFA) da AZM nos medicamentos (produto acabado), em suas diferentes formas farmacêuticas, destacam-se a CLAE com detector UV-vis, além de métodos espectrofotométricos e microbiológicos (*U. S. Pharmacopeia – USP 43-NF 38*; *Farmacopeia Brasileira*, 6ª edição).

A AZM é classificada como um azalido, uma subclasse de macrolídeos, e é estruturalmente caracterizada por um anel de lactona macrocíclica de 15 membros contendo dois resíduos de açúcares como substituintes: cladinose na posição 3, desosamina na posição 5 e um grupo cromóforo (função éster), na posição 1, conforme **Figura 1** (Saita, M. G.*et al.*, 2018).

Age por inibição da síntese proteica bacteriana através de ligação com a subunidade ribossomal 50S, impedindo a translocação peptídica e replicação no organismo do paciente (Brasil, 2018).

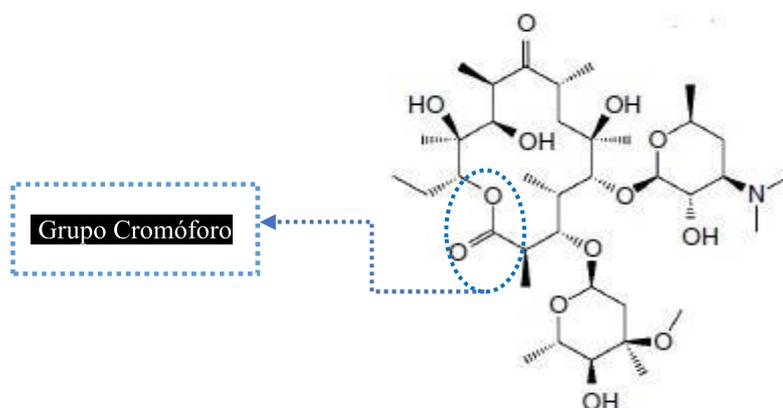
Figura 1- Estrutura da Azitromicina diidratada



Fonte: Saita, M. G.*et al.*, 2018

O anel de lactona resulta em melhor estabilidade ácida e conseqüente maior biodisponibilidade oral comparado com a eritromicina. É esse grupamento que se liga à subunidade ribossomal 50 S de bactérias suscetíveis e suprime a síntese de proteínas. AZM aparece para se ligar ao mesmo receptor que a eritromicina. O mecanismo de ação destes medicamentos pode ser bactericida ou bacteriostático. A AZM representa uma significativa melhora no tratamento de pacientes selecionados com infecções adquiridas na comunidade (L. Miguel; C. Barbas, 2003).

A eritromicina é um antibiótico do grupo dos macrolídeos, que têm um anel central de lactona com 12 a 16 átomos. Ela é habitualmente bacteriostática, mas em alta concentração pode ser bactericida contra microrganismos muito sensíveis. Na eritromicina, conforme **Figura 2**, esse anel contém 14 átomos, e a ele se ligam cetonas e amino-açúcares. Foi descoberta em 1952 por McGuire e sua equipe (GIGUÈRE, 2013).

Figura 2 - Estrutura da Eritromicina

Fonte: Giguère S., 2013

A partir da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999 foi criado o sistema nacional de vigilância sanitária e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual compete “normatizar, controlar e fiscalizar produtos, substâncias e serviços de interesse para saúde”, de acordo com o Art. 2º parágrafo III (Brasil, 1999). Desde então, o Brasil vem avançando significativamente, no asseguramento da qualidade, segurança e eficácia dos produtos sujeitos a vigilância sanitária, principalmente dos medicamentos.

No que tange ao controle de qualidade de medicamentos para uso humano, a adoção dos conceitos das boas práticas de fabricação e boas práticas de laboratório, estão descritos na resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 658/2022 que “Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos” (Brasil, 2022), os testes de equivalência farmacêutica, regulamentados pela RDC nº 31/2010 que “Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo” (Brasil, 2010), os produtos de degradação, regulamentados pela RDC nº 58/2013 que “Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos” (Brasil, 2015) e a bioequivalência regulamentada pela RDC nº 742/2022 que “Dispõe sobre os critérios para a condução de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência (BD/BE) e estudos farmacocinéticos” (Brasil, 2022), consolidam este novo e promissor cenário regulatório nacional.

A validação de um método analítico é pré-requisito para a sua implementação na rotina laboratorial e para isso existem normativas, conforme RDC nº 166/2017 que “Dispõe sobre Validação de Métodos Analíticos e dá outras providências” (Brasil, 2017) e guia internacional

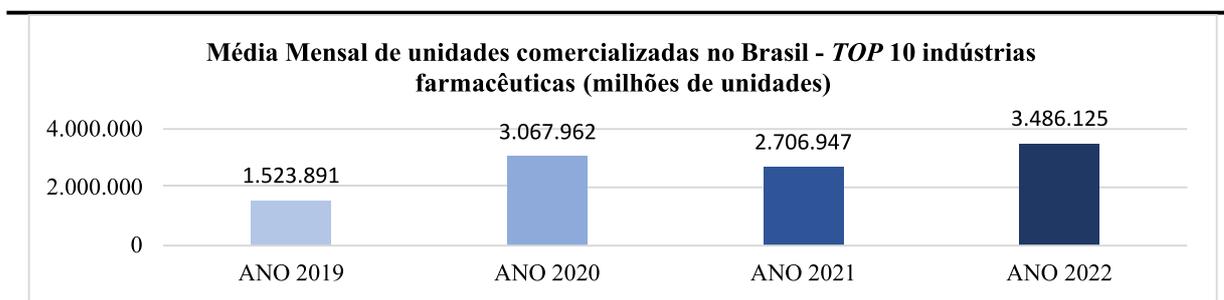
ICH Q2(R2) – Validation of Analytical Procedures (European Medicine Agency, 2022) que suportam as empresas no cumprimento deste requisito.

O perfil de impureza e degradação de drogas significa a detecção, elucidação da estrutura e determinação quantitativa de impurezas e produtos de degradação em materiais durante a síntese do IFA e nas formulações do medicamento (produto acabado). Este é um dos campos de atuação mais importantes da análise química instrumental na área farmacêutica. A razão disso é que as impurezas potencialmente tóxicas não identificadas são perigosas para a saúde e, visando aumentar a segurança da terapia medicamentosa, as impurezas devem ser determinadas por métodos analíticos validados e indicadores de estabilidade. Faz-se necessário ter uma visão clara do perfil de impurezas do material a granel usado para o desenvolvimento de formulações, a fim viabilizar a diferenciação entre impurezas relacionadas à síntese, dos produtos de degradação. O perfil de impurezas de drogas é que fornece dados que podem contribuir diretamente para a segurança da terapia medicamentosa, minimizando os efeitos adversos relacionados a impurezas/degradantes de materiais e preparações de formas farmacêuticas (Görög S, 2018).

A AZM está sujeita a degradação, o que pode ocorrer durante a fabricação e/ou armazenamento. Ela é suscetível à degradação se exposta a temperatura elevada e/ou ar durante os processos de fabricação do medicamento (produto acabado). Um exemplo particular de degradação oxidativa é a oxidação do grupo amina exocíclico, na porção desosamina, da AZM. A suscetibilidade do fármaco à degradação culmina em um desvio dos requisitos de pureza regulamentares, mesmo antes do produto chegar ao paciente. Além disso, uma vez formulada, a AZM tende a se degradar em condições normais de armazenamento, o que pode resultar na presença de níveis inaceitáveis de impurezas no momento de sua administração (COSTA, Sabryna I. G., 2015).

A AZM foi um antibiótico muito difundido ao longo dos últimos anos devido a pandemia de Covid-19, doença infecciosa causada pelo novo coronavírus (*SARS-CoV-2*), que assolou o mundo. Dados da auditoria FMB/IQVIA demonstraram, conforme **Figura 3**, um aumento expressivo, de cerca de 100%, no volume de unidades comercializadas no Brasil quando comparado a um período anterior ao período pandêmico, ainda que essa terapêutica não seja recomendada pela *World Health Organization - (WHO)* e o seu uso indiscriminado pode futuramente trazer outras preocupações como resistência bacteriana.

Figura 3 - Evolução do número de unidades comercializadas de Azitromicina Comp. 500 mg



Fonte: Auditoria FMB (Mercado Farma Brasil) / IQVIA, 2022

Ao utilizar o método analítico descrito em compêndio oficial é necessário que a adequabilidade desse método seja demonstrada (Brasil, 2017). Assim, uma indústria farmacêutica buscou atender aos requisitos regulatórios tendo um de seus produtos a AZM comprimidos revestidos encontrando dificuldades na adequabilidade do método em relação a boa resolução entre os picos da Desosaminilazitromicina (impureza J) e do 3'-(N-Demetil)-3'-N-formilazitromicina (composto relacionado F de AZM), bem como a não reprodutibilidade dos fatores respostas das impurezas: J, composto relacionado F de AZM e N-Demetilazitromicina (impureza I), quando comparados aos valores especificados pela USP.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os fármacos desempenham um papel vital no progresso da civilização humana curando doenças. A maioria destes são de origem sintética, produzidos a granel e utilizados para fins terapêuticos através de formulações farmacêuticas. Substâncias químicas biologicamente ativas geralmente são formuladas em formas de dosagem convenientes, como comprimidos, cápsulas, suspensões, pomadas e injetáveis. Tais formulações entregam o fármaco de forma estável, não tóxica, garantindo sua biodisponibilidade e atividade terapêutica (R, N Rao; V. Nagaraju, 2003).

As impurezas nos medicamentos são oriundas de várias fontes e fases do processo de síntese e preparação de formas farmacêuticas. Diferenciar a origem das impurezas como sendo relacionadas ao processo ou produtos de degradação nem sempre é possível. No entanto, a maioria das impurezas se originam da rota sintética no processo de obtenção do IFA. O monitoramento de impurezas no processo era um campo obscuro e não identificado há cerca de 20 anos. No entanto, tornou-se um fator importante na moderna indústria farmacêutica. Isto se dá, principalmente em virtude da pressão pela qualidade do produto e a demanda por padrões mais elevados de confiabilidade do processo (R. Nageswara Rao; V. Nagaraju, 2003).

Impurezas são inevitavelmente produzidas durante a semissíntese da AZM, o que reduzem a atividade antibacteriana e aumentam a toxicidade da droga. O perfil de impureza de um fármaco é crítico para seu controle de qualidade e avaliação de segurança. As autoridades reguladoras têm prestado atenção crítica ao perfil de impureza. Assim, é importante identificar as impurezas do produto AZM e limitar suas quantidades no medicamento formulado (Guo *et al.*, 2021).

De acordo com Leite, F.; 2009:

“As impurezas podem ser classificadas ou subdivididas, em função de suas origens, como:

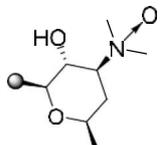
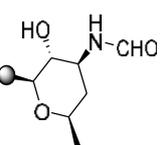
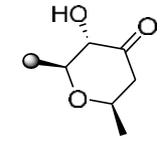
- a) Impurezas provenientes da rota química da síntese de fabricação;
- b) Impurezas residuais de solventes ou os denominados IOV (impurezas orgânicas voláteis);
- c) Impurezas de degradação intrínsecas da reação do produto. Permanecem presentes mesmo depois dos processos de purificação;
- d) Impurezas de degradação por exposição: Algumas dessas impurezas são formadas com o tempo de vida do produto, por meio de oxidação lenta com o ar atmosférico, micro reações de impurezas com o ativo principal, micro reações de impurezas com impurezas, absorção de água originando hidrólises, ambiente de armazenamento interferente ou fora de compatibilidade (como exemplo: próximo a produtos voláteis), luminosidade e temperatura de armazenamento.”

Definiu-se neste trabalho, que o termo “impureza orgânica” se aplica tanto as impurezas de degradação do IFA no medicamento durante sua vida de prateleira – *shelf life*, quanto as

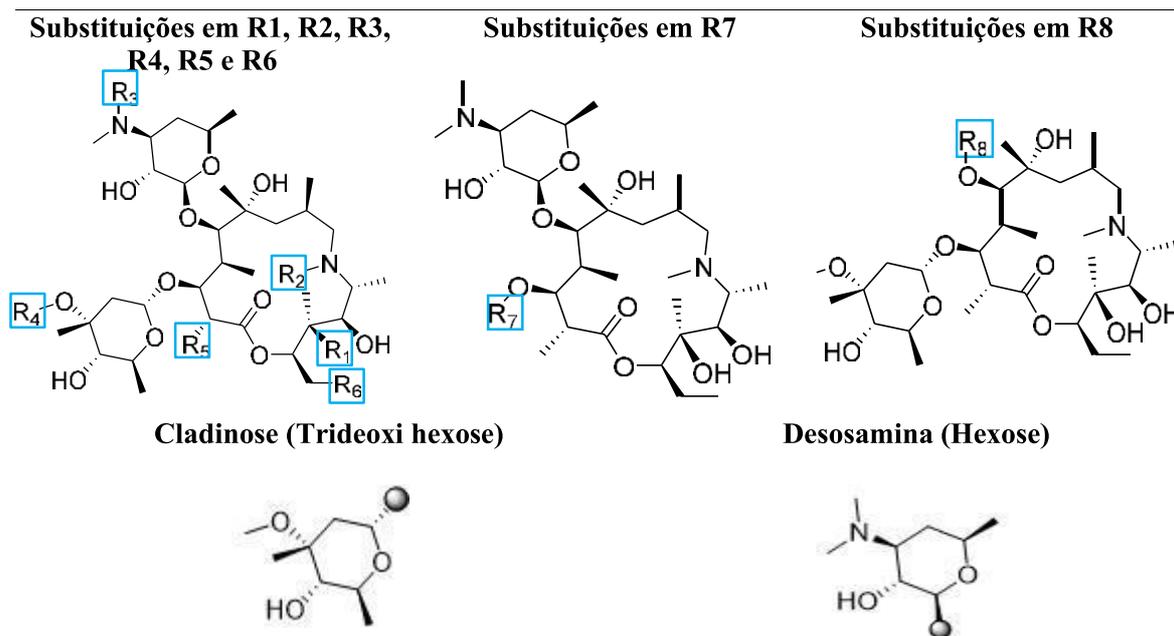
impurezas relatadas ou substâncias relacionadas, oriundas do processo de síntese que são descritas no respectivo *DMF (drug master file)*, emitido pelo fabricante do IFA.

As impurezas orgânicas conhecidas oriundas da degradação da AZM ao longo da vida de prateleira (*shelf life*) do medicamento são: 3'-(N,N-Didemetil) azitromicina (aminoazitromicina) (impureza E), 3'-(N-Demetil)-3'-N-formilazitromicina (composto relacionado F de AZM), N-Demetilazitromicina (impureza I), Desosaminilazitromicina (impureza J), N-óxido de Azitromicina (impureza L), 3'-(N,N-Didemetil)-3'-N-formilazitromicina (impureza M) e 3'-De(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina (impureza N)(*U. S. Pharmacopeia – USP 43-NF 38 – 457 azithromycin tablets*). Na **Tabela 1**, estão relacionados os radicais substituintes, as massas moleculares e suas respectivas fórmulas moleculares.

Tabela 1 - Impurezas orgânicas conhecidas para AZM oriundas da degradação do medicamento

IMPUR	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	MASSA MOLEC.	FÓRMULA MOLEC.
E	–	–	–	–	–	–	cladino- nose	desosa- mina	720,93	C ₃₆ H ₆₈ N ₂ O ₁₂
F	OH	CH ₃	CHO	CH ₃	CH ₃	H	–	–	762,67	C ₃₈ H ₇₀ N ₂ O ₁₃
I	OH	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	–	–	734,96	C ₃₇ H ₇₀ N ₂ O ₁₂
J	–	–	–	–	–	–	H	desosa- mina	590,79	C ₃₀ H ₅₈ N ₂ O ₉
L	–	–	–	–	–	–	cladi- nose		764,98	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₃
M	–	–	–	–	–	–	cladi- nose		748,94	C ₃₇ H ₆₈ N ₂ O ₁₃
N	–	–	–	–	–	–	cladi- nose		719,91	C ₃₆ H ₆₅ NO ₁₃

Sendo os radicais:



Fonte: Guo *et al.*, 2020

Na **Tabela 2**, estão relacionados os padrões de impurezas orgânicas conhecidas elencadas pelas farmacopeias *USP 37*, *USP 43* e as impurezas que compõem o *EPCRS batch 5* – padrão referência de identificação de picos de Azitromicina (*Azithromycin for peak identification*) padrões esses, disponíveis para serem adquiridos. Embora o padrão *EPCRS batch 5* contenha treze impurezas, neste trabalho foram consideradas as sete impurezas orgânicas conhecidas oriundas de degradação do medicamento (produto acabado) além de qualquer outra impureza individual (impureza desconhecida) descritas nos respectivos compêndios farmacopeicos.

Tabela 2 - Comparativo de padrões de impurezas orgânicas conhecidas da AZM disponíveis

Padrão de Impureza Conhecida - USP 37
Impureza A de azitromicina - (Azaeritromicina A)
Padrões de Impurezas orgânicas conhecidas - USP 43
3'-N-Demetil-3'-N-formilazitromicina - (Composto relacionado F de Azitromicina)
3'-N-Demetilazitromicina - (Impureza I)
Desosaminilazitromicina - (Impureza J)
Padrão de Referência de Identificação de Picos de Azitromicina – BP 2022
N-óxido de Azitromicina – (Impureza L)
3'-(N, N-Didemetil) -3'-N-formilazitromicina - (Impureza M)
3'-(N, N-Didemetil) azitromicina (aminoazitromicina) – (Impureza E)
3'-N-Demetil-3'-N-formilazitromicina - (Composto relacionado F de Azitromicina)

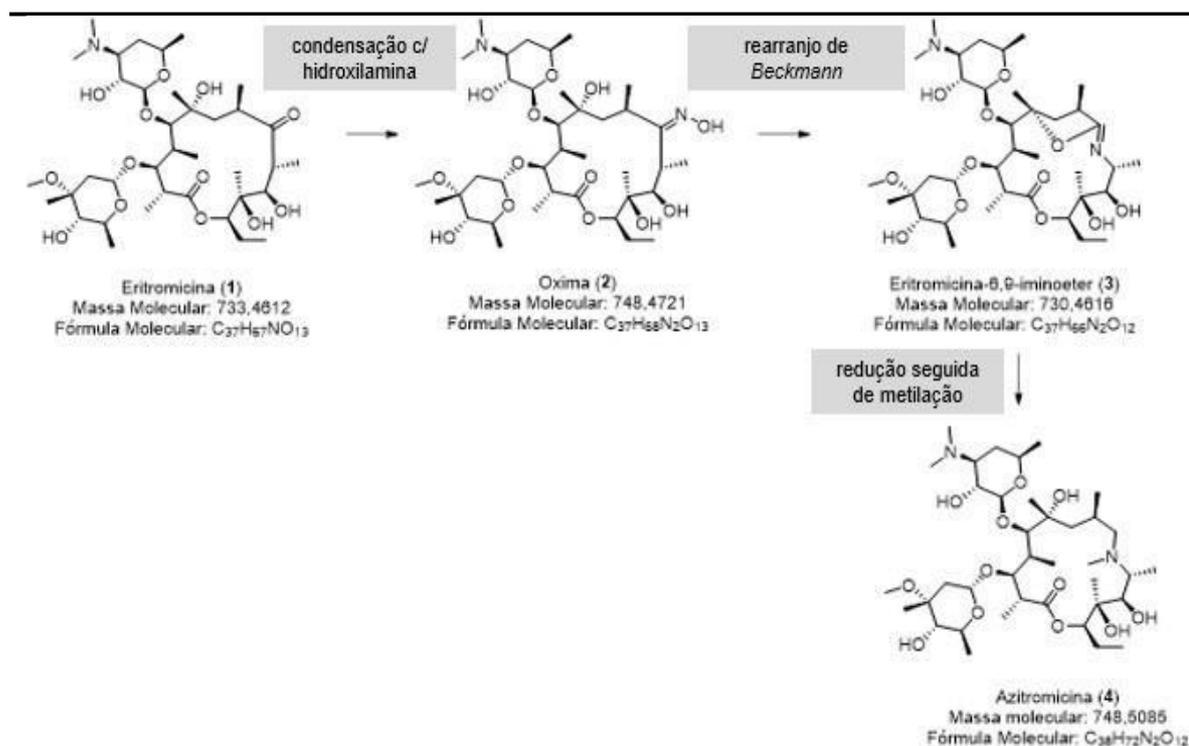
Desosaminilazitromicina - (Impureza J)
 3'-N-Demetilazitromicina - (Impureza I)
 3''-O-Demetilazitromicina - (Impureza C)
 3'-De(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina - (Impureza N)
 Impureza A de azitromicina - (Azaeritromicina A)
 Impureza P de azitromicina - (Impureza P)
 2-Desetil-2-propilazitromicina - (Impureza O)
 3'-N-Demetil-3'-N-[(4-metilfenil) sulfonil] azitromicina - (Impureza G)
 3-Deoxiazitromicina - (Impureza B)

Fonte: *United States Pharmacopeia – USP 37, USP 43 e British Pharmacopeia, 2022*

A AZM é um antibiótico semissintético derivado da eritromicina, no qual um átomo de nitrogênio metilado é incorporado ao anel da lactona. A substituição da carbonila cetônica da eritromicina pelo grupamento N-metila confere à AZM uma melhor estabilidade em meio ácido (Lode *et al.*, 1996).

A AZM semissintética deriva da eritromicina (1) quando submetida a condensação com hidroxilamina formando Oxima (produto intermediário) (2) que então é submetida ao rearranjo de Beckmann formando Eritromicina 6,9 iminoéter (produto intermediário) (3), conforme **Figura 4**. Posteriormente sofre uma redução seguida de metilação formando finalmente o IFA (4), a AZM (Kushwaha *et al.*, 2019).

Figura 4 - Transformação da Eritromicina em Azitromicina



Fonte: Kushwaha *et al.*, 2019

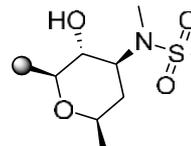
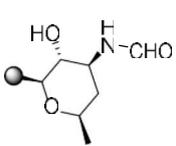
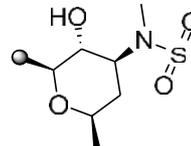
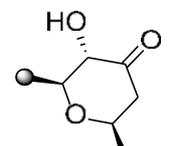
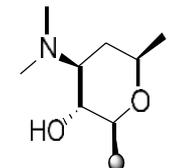
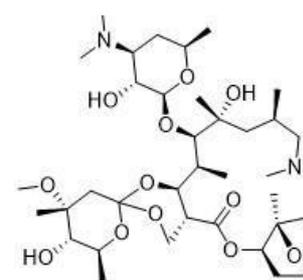
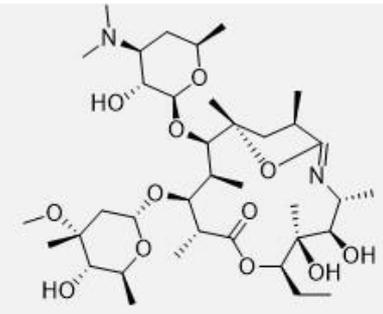
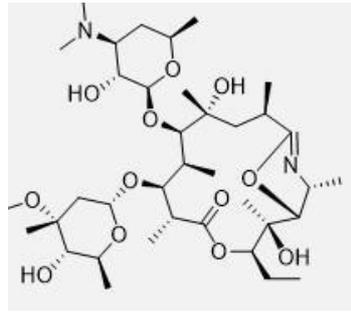
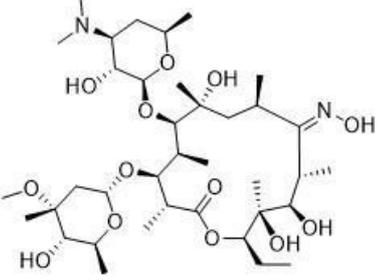
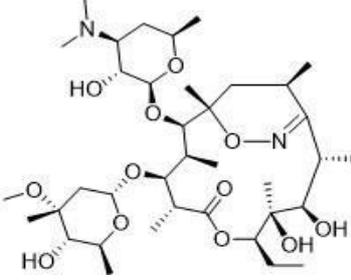
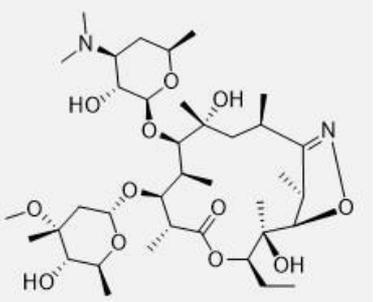
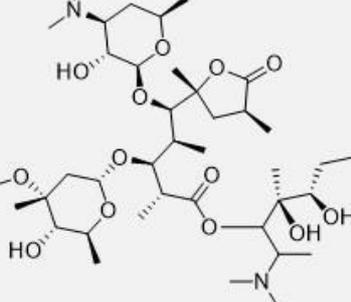
Com base na estrutura química deste, é possível identificar alguns grupamentos funcionais que podem se tornar possíveis alvos de ação de agentes de degradação. Apesar da estrutura química da AZM ser uma alteração na estrutura da eritromicina visando sua maior estabilidade frente à hidrólise ácida, o IFA em questão ainda é propício a tal tipo de degradação (em menor escala), principalmente na ligação glicosídica com o açúcar cladinose (Zhang, *et al.*, 2009; Kwiecien, Krzek & Walczak, 2012).

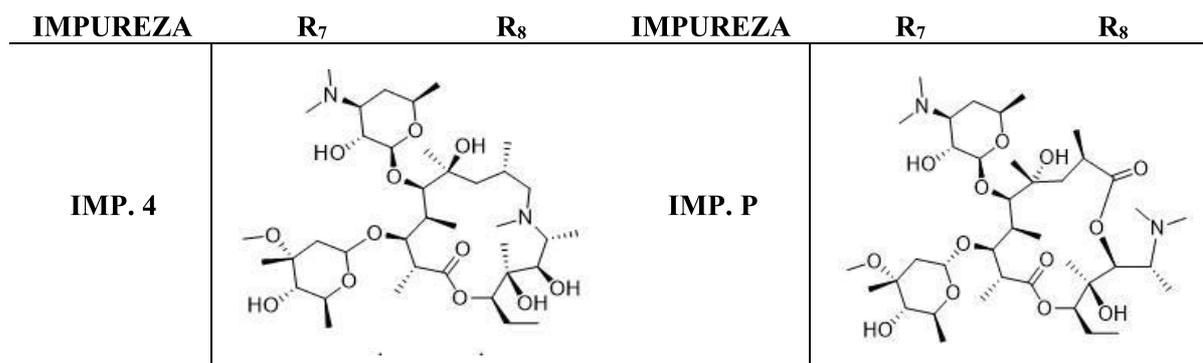
De acordo com as farmacopeias americana (*USP*) e britânica (*BP*), são 15, o total de possíveis impurezas para a AZM, o que torna o método analítico desafiador, uma vez que todas as impurezas devem ser separadas entre elas e também do IFA AZM, dessa forma, o método de análise das impurezas orgânicas por CLAE se torna longo (*USP*, 2018).

A **Figura 5** demonstra todas as estruturas químicas das impurezas orgânicas conhecidas de AZM.

Figura 5 - Estruturas químicas das 23 impurezas orgânicas conhecidas da AZM

Substituições em R1, R2, R3, R4, R5 e R6							Substituições em R7			Substituições em R8		
IMPUREZA	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	IMPUREZA	R ₇	R ₈	IMPUREZA	R ₇	R ₈
A	OH	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H						
B	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H						
C	OH	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H						
D	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	H						
F	OH	CH ₃	CHO	CH ₃	CH ₃	H						
I	OH	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H						
O	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃						
E	cladinose						L	cladinose				

IMPUREZA	R ₇	R ₈	IMPUREZA	R ₇	R ₈
G	cladinose		M	cladinose	
H	cladinose		N	cladinose	
J	H		K		
Q			R		
S			IMP. 1		
IMP.2			IMP. 3		



Fonte: Guo *et al.*, 2020.

A hidrólise na fração cladinose, ligada através de ligação glicosídica à posição C-3 do anel lactona da AZM é favorecida em relação a fração do amino açúcar desosamina, contendo uma hidroxila no carbono β à ligação glicosídica da desosamina à posição C-5 do anel lactona da AZM, o que acaba conferindo uma maior estabilidade ao radical, podendo esse ser atrelado à melhor distribuição eletrônica, maior efeito estérico ao oxigênio da ligação éter e possíveis ligações de hidrogênio entre a hidroxila já mencionada. Tal fato pode ser exemplificado pelos resultados obtidos por Debremaeker *et al.*, (2003), onde os fragmentos de massa da AZM (obtidos via um espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap*), demonstraram inicial clivagem do fragmento referente a cladinose, com consequente, fragmentação da desosamina. Devido à maior labilidade da ligação glicosídica da porção referente a cladinose, é de se esperar que o estresse via hidrólise ácida ocorra de forma favorável nessa porção da molécula (Zhang *et al.*, 2009; Kwiecien, Krzek & Walczak, 2012).

Do ponto de vista da hidrólise alcalina, a AZM tende a ser ligeiramente mais estável do que em meio ácido. Apesar de relatos na literatura comprovarem a susceptibilidade desta à hidrólise alcalina, nenhum mecanismo com profundidade de detalhamento foi encontrado para tal tipo de degradação. No entanto, é de se esperar uma abertura do anel macro cíclico do IFA, após ataque nucleofílico da hidroxila livre à lactona, levando à formação de um grupo carboxilato terminal. Posteriormente, a ocorrência de um processo de formação de uma lactona intramolecular com a hidroxila C-12, ainda pode ser favorecida, sobretudo após aquecimento da solução. Tal processo já foi observado para o IFA precursor da AZM, a eritromicina (Zhang, *et al.*, 2009; Kwiecien, Krzek & Walczak, 2012).

A decomposição da AZM em quatro diferentes tipos de tampão (Fosfato de potássio, fosfato de sódio, citrato e acetato de sódio), ajustado para uma força iônica de 0,3M, foi investigada em pH=6,0 a 80 °C. A AZM foi mais estável no fosfato de sódio, enquanto uma degradação mais rápida do AZM foi encontrada no citrato de sódio. O efeito dos tipos de tampão

na degradação com a taxa de degradação seguiu esta ordem: citrato de sódio > acetato de sódio > fosfato de potássio \geq fosfato de sódio (Zhang *et al.*, 2009)

O processo de oxidação da AZM é, sem dúvida, um dos mais difundidos com relação a degradação deste IFA. A patente EP 1606299 A1 descreve bem os principais produtos de oxidação, sendo todos decorrentes de processos no grupamento amina terciária axial da desosamina (posição C-5 do radical). Partem desse grupamento a formação do óxido nitroso, a formação de um radical formila com conseqüente desmetilação, além da completa eliminação do radical nitrogenado com obtenção de uma carbonila na posição originária C-5 (Berger *et al.*, 2005).

Em relação aos processos de estresse por foto exposição, não foram encontrados relatos de degradação após exposição direta a tal meio. No entanto, estudos conduzidos com exposição do IFA em solução, observa-se a formação de uma série de produtos de degradação, todos eles derivados de processos de desmetilação, seja no grupamento amina da desosamina, ou no grupamento metoxila da cladinose. A clivagem de ambos os açúcares também é reportada, porém, é menos factível de ocorrer no estado sólido, sendo, provavelmente, favorecido pelo fato do IFA estar em solução (Tong *et al.*, 2011).

A influência da temperatura da degradação da AZM em tampão fosfato de potássio 0,05M em pH= 6,3 ($\mu = 0,3$ M) foi investigada na faixa de temperatura de 70° a 100 °C. A influência da temperatura na constante de velocidade de reação (k_{abs}) foi dada pela equação de *Arrhenius*:

$$\ln k_{abs} = \ln A - E_a / RT$$

Onde A é o fator de frequência, E_a a energia de ativação, R a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta.

A relação linear entre $\ln k_{abs}$ e $1/T$ foi construída para descrever os resultados da investigação. A linearidade ($r=0,99$) da linha de regressão neste gráfico foi observada na faixa de temperatura de 70°-100 °C. Os parâmetros termodinâmicos foram elencados na Tabela3. A energia de ativação para degradação foi de 96,8 kJ mol⁻¹. Assim sendo, pode se inferir que se o mecanismo for idêntico a uma temperatura inferior a 70 °C, a meia-vida teórica do AZM a 25 e 40 °C seria prevista de acordo com a energia de ativação e o fator de frequência obtidos, conforme **Tabela 3** (Zhang *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Estimativa de meia-vida a 25 ° e 40 °C AZM em fosfato de potássio pH=6,3

pH	ln A	E _a (kJ mol ⁻¹)	Meia-vida (50% remanescente em meses)	
			25	40
6,0	28,7	96,8	38,2	5,9

Fonte: Zhang *et al.*, 2009

Por não apresentar grupamentos quelantes livres e desimpedidos em sua estrutura, seja na estrutura macrocíclica, ou nos radicais de açúcares, espera-se que o IFA AZM seja estável na presença de íons metálicos. Para testar se a presença de íons metálicos catalisa a degradação da AZM em sistema aquoso, EDTA sódico foi adicionado ao tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH = 6,0) onde observou-se que não houve alteração significativa na taxa de degradação da AZM (Zhang *et al.*, 2009).

O perfil de degradação da AZM em soluções tamponadas foi investigado usando CLAE e encontrado dependente do pH na faixa de 6,0 - 7,2. A impureza J, derivada da perda hidrolítica de cladinose da molécula original, foi o principal produto de degradação em pH 6,0, mas sua quantidade diminuiu progressivamente em direção ao pH 7,2. Dois produtos de degradação adicionais não relatados também foram observados e suas estruturas foram totalmente elucidadas por espectroscopia de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) como sendo associadas à abertura do anel lactona macro cíclico (Saita, *et al.*, 2018).

A AZM possui dois átomos de nitrogênio, o que a torna um composto fracamente básico. Sempre houve problemas na análise de fármacos como a AZM por causa de suas propriedades básicas. Esses compostos irão interagir fortemente com as extremidades polares dos materiais de empacotamento como, por exemplo, grupos silanóis residuais, tornando-se adsorvidos à coluna e não sendo facilmente eluidos pela fase móvel (Zeng, *et al.*, 2014).

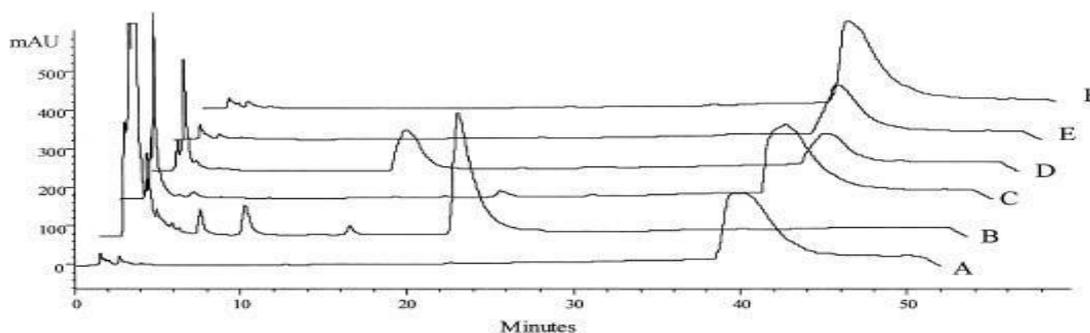
A AZM é um antibiótico com pKa de 8,5 e estável em meio ácido, logo, a dose pode ser administrada com o estômago vazio com 240 mL de água, cuja biodisponibilidade é de 37% onde a glicoproteína P, está envolvida na absorção intestinal dos macrolídeos (Bartra, *et al.*, 2021).

A AZM tem um pKa de 8,5 o que significa que em um pH no valor de 8,5, 50% do medicamento é ionizado e 50% não é ionizado. A forma não ionizada é importante porque pode permear as membranas celulares e entrar na célula contribuindo para as concentrações intracelulares (Kong *et al.*, 2017).

De acordo com Miguel e Barbas (2003): “A Azitromicina foi estável ao longo de 24 h quando tratado com luz ou calor. Foi ligeiramente degradada em meio básico e foi

completamente degradada em meio ácido. Os produtos de degradação não foram identificados, mas os picos em 24 e 25 min podem corresponder a impurezas 1 e 3”, conforme demonstrado na **Figura 6**.

Figura 6 - Teste de estabilidade



Legenda: (A) Amostra em cond. ambientais. (B) Meio ácido: HCl0,2 N; (C) Meio oxidante: H₂O₂ 0,1% m/v. (E) Luz. (F) Calor

Fonte: L. Miguel; C. Barbas, 2003

“A impureza P é uma das impurezas do produto azitromicina, que está registrada nas Farmacopeias da Europa e EUA. Utilizando a cromatografia preparativa, separaram no seu trabalho a impureza P do produto AZM. Eles também foram capazes de elucidar sua estrutura química utilizando várias técnicas analíticas” (Guo *et al.*, 2020). Ainda de acordo com Guo *et al.*; 2020:

“Primeiro, a espectrometria de massa de tempo de voo de armadilha de íons de alta resolução (IT-TOF MS) foi usada para determinar a massa molecular precisa ($[M+H]^+$ m/z 777.5121) e a fórmula química (C₃₉H₇₂N₂O₁₃) de a impureza Em segundo lugar, análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia de absorção ultravioleta-visível (UV-vis) e espectrometria de massa em tandem (MS/MS) foram realizadas para sondar os principais grupos funcionais da impureza para auxiliar a análise de RMN. Finalmente, a estrutura da impureza foi resolvida com sucesso usando RMN multidimensional. Além disso, foi proposto um mecanismo para a formação dessa impureza.”

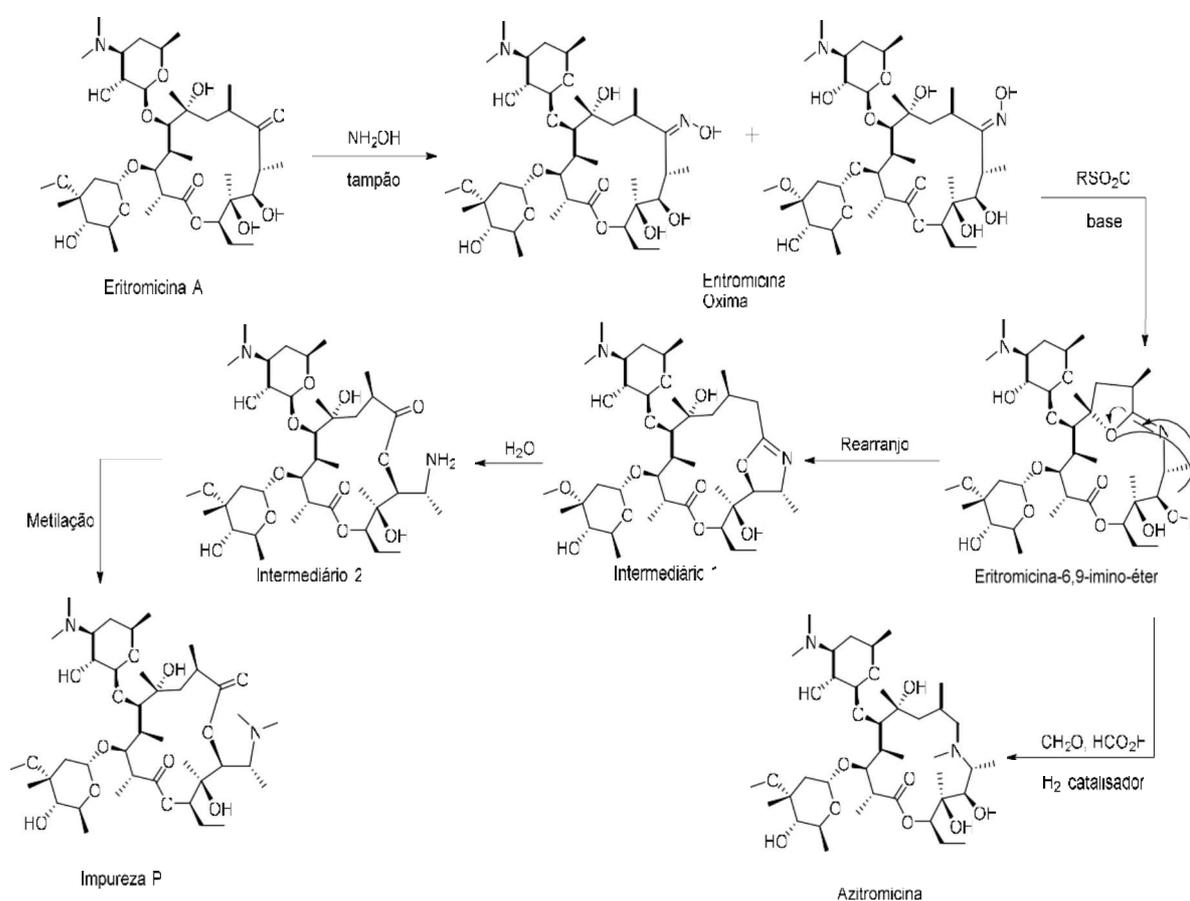
Vinte e três impurezas da AZM foram relatadas, incluindo-se a estrutura da Impureza P, também elucidada. Dentre elas subprodutos sintéticos, compostos intermediários de sua semissíntese e, sete delas, produtos de degradação do IFA no medicamento (produto acabado), objeto deste trabalho, sendo todas essas, análogas estruturais da AZM (Chang *et al.*, 2015; Guo, *et al.*, 2020).

A impureza Q é a eritromicina-6,9-imino-éter, que é um intermediário na síntese da AZM. As impurezas 1 e 2 são duas impurezas encontradas no produto eritromicina-6,9-imino-éter e outras impurezas são encontradas no medicamento (produto acabado) AZM.

Como demonstrado em seu trabalho por Guo *et al.*, 2020:

...A **fig. 7** mostra uma via proposta para a formação de impureza P durante a semissíntese de azitromicina. A eritromicina A reage com a hidroxilamina para formar eritromicina. A oxima de eritromicina formada é então convertida em eritromicina-6,9-imino-éter através do rearranjo de *Beckmann*. A eritromicina-6,9-imino-éter pode ser posteriormente convertida em azitromicina por meio de redução e metilação de *Eschweiler-Clarke*. Enquanto isso, Eritromicina-6,9-imino-éter também pode ser rearranjado no intermediário 1. O intermediário 1 é então hidrolisado para formar o intermediário 2. Finalmente, a metilação do intermediário 2 fornece a impureza P.

Figura 7 - Formações de AZM e Impureza P a partir da Eritromicina A



Fonte: Guo *et al.*, 2020.

Nas farmacopeias brasileira, americana (*USP*) e britânica (*BP*) estão descritas monografias para a AZM, sendo que, dessas, apenas a *USP* e *BP* trazem em sua metodologia análise de teor e impurezas orgânicas por CLAE.

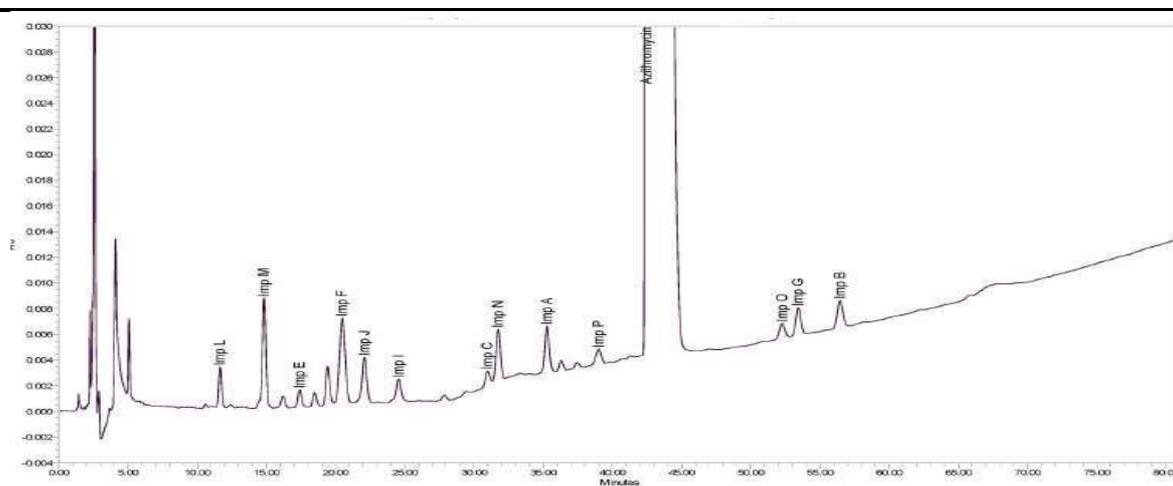
A edição 37 da *USP* descreveu a determinação de impurezas orgânicas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O padrão primário ou substância química

farmacopeica (SQF) da impureza A, (azaeritromicina) e o padrão secundário ou substância química caracterizada (SQC) de AZM compõem a solução de adequabilidade do sistema.

Posteriormente, na edição 43 da *USP*, as SQF adotadas foram alteradas para composto relacionado F de AZM, impureza I e impureza J. A determinação se dá por CLAE e estes três padrões compõem a solução de adequabilidade do sistema.

Da mesma forma, a *BP*, edição 2022, descreve a determinação de impurezas orgânicas através de CLAE. O padrão primário de impurezas, denominado *EPCRS batch 5*, contém 13 impurezas orgânicas conhecidas. São elas: Impureza L, Impureza M, Impureza E, composto relacionado F de AZM, Impureza J, Impureza I, Impureza N, Impureza C (Azitromicina C-3''-O-demetilazitromicina), Impureza P de Azitromicina, Impureza A (Azaeritromicina), Impureza O (2-Desetil-2-propilazitromicina), Impureza G (3'-N-Demetil-3'-N-[(4-metilfenil) sulfonil] azitromicina) e Impureza B (3-Deoxiazitromicina). Conforme demonstrado na **Figura 8**, de um total de 13 impurezas orgânicas conhecidas, sete impurezas são oriundas da degradação do medicamento e as demais oriundas da síntese do insumo farmacêutico ativo (IFA).

Figura 8 - Perfil cromatográfico padrão referência identificação de picos da AZM- EP



Fonte: *Information leaflet –Liquid Chromatography Report - Ph. Eur. Reference Standard, 2021*

Durante o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas, bem como, preparações farmacêuticas, um requisito imprescindível consiste na utilização de padrões de referência chamados de “Substância Química de Referência (SQR)”, devidamente caracterizados, assim como preparações farmacêuticas de qualidade. Entre as substâncias utilizadas como SQR, existem aquelas obtidas de farmacopeias (Americana, Britânica e Europeia) classificadas como “compendiais” que, obviamente não necessitam ser caracterizadas antes do uso. Outra possibilidade é a utilização

de substâncias obtidas de fontes não oficiais, classificadas e conhecidas como “não compendiais”, as quais devem ser cuidadosamente caracterizadas antes do uso, de forma a garantir sua identidade, pureza e potência (Swartz; Krull, 1998).

O método por CLAE com detecção na região do espectro ultravioleta, comprimento de onda de 210 nanômetros foi aplicado por Miguel e Barbas (2003) para determinação de impurezas em comprimidos de AZM. O método por eles desenvolvido utilizou duas fases móveis, conforme apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Método por CLAE, detecção UV em 210 nanômetros

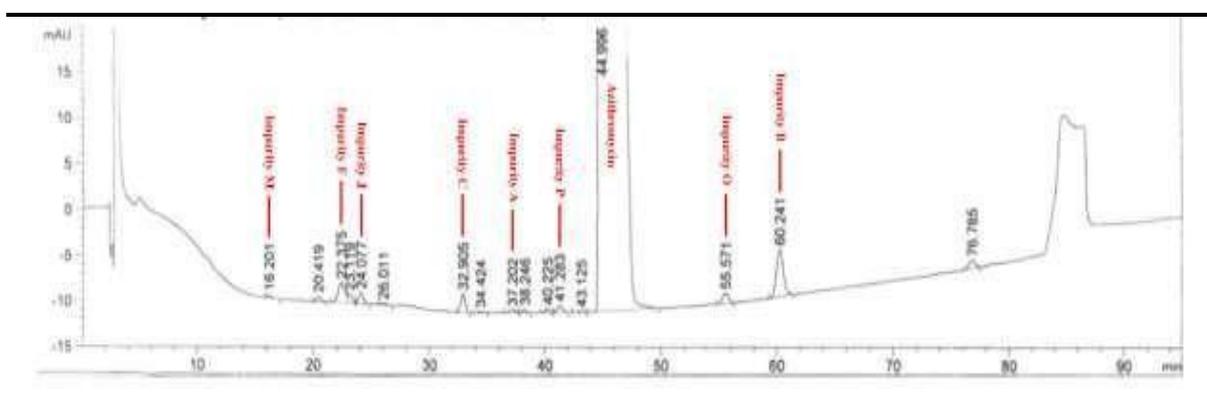
Fase A:	Inorgânica, constituída por Tampão Fosfato de Potássio, pH=7,0		
Fase B:	Orgânica, constituída de uma mistura de ACN: MeOH (1:1, v/v)		
Vazão:	1 mL min ⁻¹	Coluna:	C4
		Temperatura:	Mantida a 50 °C

Fonte: L. Miguel; C. Barbas, 2003

O método proposto, permitiu a separação de seis impurezas relacionadas à AZM. A seletividade sob condições de fase reversa pode ser controlada pela composição da fase móvel, pH, temperatura e química de fase estacionária. Esses parâmetros foram variados para atingir a separação.

A **Figura 9** apresenta um cromatograma de um produto comercial de AZM, com os respectivos tempos de retenção para AZM, Impureza P ($t_r = 41,283$ min.) e outras impurezas orgânicas conhecidas. A impureza P foi isolada do medicamento contendo AZM, e sua estrutura foi elucidada com sucesso usando a técnica de RMN multidimensional, combinada com UV-vis, FT-IR, MS/MS e IT-TOF MS de alta resolução (GUO *et al.*, 2020).

Figura 9 - CLAE - Cromatograma de um produto Azitromicina comercial



Fonte: Guo *et al.*, 2020.

Na **Tabela 5**, estão relacionadas todas as impurezas orgânicas conhecidas elencadas pelas farmacopeias americana e britânica, seus tempos de retenção relativos e respectivos fatores de respostas relativos, utilizadas como referência para o estudo.

Tabela 5 - Impurezas orgânicas conhecidas para AZM, Tempo de Retenção Relativo e Fator Resposta

Descrição/ Analito		T. de retenção relativo	Fator de resposta	T. de retenção relativo	Fator de resposta	T. de retenção relativo	Fator de resposta
		BP 2022		USP 37		USP 43	
N-óxido de Azitromicina	L	0.29	2.30	0.20	0.42	0.20	0.46
3'-(N, N-Didemetil) - 3'-N-formilazitromicina	M	0.37	0.60	0.29	1.7	0.29 0.30	1.7
3'-(N, N-Didemetil) azitromicina (aminoazitromicina)	E	0.43	-	0.34	0.49	0.34	0.44
3'-(N-Demetil) -3'-N-formilazitromicina	F	0.51	0.30	0.42	4.3	0.40 0.46	5.5
14-Demetil-14(hidroxiemetilazitromicina)	D	0.54	-	-	-	-	-
Desosaminilazitromicina	J	0.54	-	0.46	1.1	0.47	1.1
N-Demetilazitromicina	I	0.61	-	0.50	0.54	0.50	0.47
3''-O-Demetilazitromicina	C	0.73	-	-	-	-	-
3'-De(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina	N	0.76	0.70	0.87	1.4	0.87	1.7
3'-N-[(4-(Acetilamino)fenil) sulfonil]3'-N-demetilazitromicina	H	0.79	0.10	-	-	-	-
Azaeritromicina A	A	0.83	-	0.94	-	0.94	-
Impureza P de azitromicina		0.92	-	-	-	-	-
Azitromicina		1.0	-	1.0	-	1.0	-
2-Desetil-2-propilazitromicina		1.23	-	1.10	-	1.10	-
3'-N-Demetil-3'-N-[(4-metilfenil) sulfonil]azitromicina	G	1.26	0.20	1.11	-	1.11	-
3-Deoxiazitromicina	B	1.31	-	1.14	-	1.14	-
Qualquer outra impureza não especificada		-	1.0	-	1.0	-	1.0
Total de impurezas (Desconsiderando as impurezas A, O, G e B de AZM)		-	-	-	-	-	-

Fonte: *United States Pharmacopeia – USP 37, USP 43 e British Pharmacopeia, 2022*

Dentre as 7 impurezas oriundas de degradação da AZM, duas delas possuem rotâmeros, conforme descrito na **Tabela 6**. Os rotâmeros, dado a proximidade de seus tempos de retenção tem suas áreas somadas e são expressos como única impureza.

Tabela 6 - Rotâmeros impureza M e Composto relacionado F da AZM

Nome	Tempo de retenção relativo (<i>RTT</i>)	Fator resposta	Critério de aceitação, <i>NMT</i> (%)
Impureza M	0.29	1.7	1.0
	0.30		
Composto relacionado F de AZM	0.46	5.5	1.0
	0.47		

Fonte: *USP-NF Azithromycin Tablets, 2022*

Em 2001, oito medicamentos (sinvastatina, pravastatina, amoxicilina, ácido clavulânico, claritromicina, azitromicina, ceftriaxona, ciclosporina e paclitaxel) dos 30 medicamentos mais vendidos eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Esses oito medicamentos juntos totalizaram negócios da ordem de US\$ 16 bilhões (S. D. Sarker; L Nahar, 2012).

2.1 AVALIAÇÃO DA ROTA DE SÍNTESE E IMPUREZAS ORGÂNICAS

Avaliou-se a rota de síntese do IFA AZM, conforme demonstrado na **Figura 4**, considerando o material de partida Eritromicina A, através de seu *Drug Master File (DMF)* de dois fabricantes farmoquímicos denominados Alfa e Beta.

2.1.1 Fabricante Alfa

O processo de obtenção do IFA AZM, proveniente de um dos fabricantes disponíveis no mercado, utiliza como material de partida a Eritromicina A (na forma de seu sal tiocianato de eritromicina A), o qual sofre reação de oximação com o cloridrato de hidroxilamina, para a formação da eritromicina A oxima. Através de um rearranjo de *Beckmann*, a eritromicina A oxima é convertida no seu derivado imino-éter, com a utilização de cloreto de benzila. O intermediário imino-éter obtido é reduzido à azaeritromicina com boroidreto de potássio. A azaeritromicina sofre reação de N-metilação com uma mistura ácido fórmico/formaldeído na presença de acetona para gerar a AZM. Sua metodologia analítica é baseada na monografia da *USP*. As impurezas estão descritas na **Tabela 7**.

Tabela 7- Potenciais impurezas listadas pelo fabricante do IFA - Alfa

Identificação adotada pelo fabricante	Identificação da impureza na Farmacopeia Americana	Identificação da impureza na Farmacopeia Europeia	Origem (com base no DMF)	Especificação Farmacopeia Americana
Impureza A ([AZ05])	Azaeritromicina A	Impureza A	Intermediário	≤ 0,5%
Impureza B	3-Deoxiazitromicina (Azitromicina B)	Impureza B	Processo	≤ 1,0%
Impureza C	Azitromicina C (3''-O-demetilazitromicina)	Impureza C	Processo	≤ 0,5%
Impureza J	Desosaminilazitromicina	Impureza J	Degradação	≤ 0,3%
-	3'-N-{[4-(Acetilamino)fenil] sulfonil} -3', 3'-Didemetilazitromicina 3'- (N, N-Didemetil)	Impureza Q	Processo	≤ 0,15%
Impureza E	azitromicina (aminoazitromicina)	Impureza E	Degradação	≤ 0,5%
Impureza F	Composto relacionado F de Azitromicina	Impureza F	Degradação	≤ 0,5%
Impureza G	3'-N-Demetil-3'-N-[(4-metilfenil) sulfonil] azitromicina	Impureza G	Ausente	≤ 0,5%
Impureza I	N-Demetilazitromicina	Impureza I	Degradação / Processo	≤ 0,7%
Impureza H	3'-N-{[4-(Acetilamino)fenil] sulfonil} - 3'-Demetilazitromicina	Impureza H	Processo	≤ 0,5%
Impureza L	N-óxido de azitromicina	Impureza L	Degradação	≤ 0,5%
Impureza M	3'-N-(N, N-Didemetil) -3'-N-formilazitromicina	Impureza M	Degradação	≤ 0,5%
Impureza N	3'-De(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina	Impureza N	Degradação	≤ 0,5%
Impureza O	2-Desetil-2-propilazitromicina	Impureza O	Processo	≤ 0,5%
Impureza P	Azitromicina impureza P	Impureza P	Origem desconhecida	≤ 0,2%
Impureza D (14-demetil-14-(hidroximetil)azitromicina)	-	Impureza D	Processo	≤ 0,2%
Impureza K (C ¹⁴ ,1''-epoxi-azitromicina)	-	Impureza K	Processo	≤ 0,2%
Impureza Q (3'-N-Demetil-3'-N-(fenilsulfonil)azitromicina)	-	-	Processo	≤ 0,2%
Eritromicina A oxima tiocianato (AZ01)	-	-	Intermediário	≤ 0,2%
Eritromicina A oxima (AZ02)	Eritromicina A oxima	-	Intermediário	≤ 0,5%
Eritromicina A iminoéter (AZ03)	Eritromicina A iminoéter	-	Intermediário	≤ 0,5%

Impureza S (Eritromicina A (H01-1))	-	-	Material de partida	≤ 0,2%
Azaeritromicina- 11,12- Hidrogenoborato (AZ04)	-	-	Intermediário	≤ 0,2%
Impureza R (Azitromicina- 11,12- hidrogenoborato)	-	-	Processo	≤ 0,2%
Qualquer outra impureza individual	Qualquer outra impureza individual	Qualquer outra impureza individual	-	≤ 0,2%
Total	Total	Total	-	≤ 3,0%

Fonte: DMF do Fabricante Alfa, 2022

2.1.2 Fabricante Beta

O processo de obtenção do IFA AZM, proveniente de um segundo fabricante, utiliza como material de partida a Eritromicina A (na forma de seu sal tiocianato de eritromicina A), o qual sofre reação de oximação com o cloridrato de hidroxilamina, para a formação da eritromicina A oxima. Através de um rearranjo de *Beckmann*, a eritromicina A oxima é convertida no seu derivado imino-éter, com a utilização de cloreto de tosila. O intermediário imino-éter obtido é reduzido à azaeritromicina via hidrogenação catalítica na presença de Pt/C. A azaeritromicina sofre reação de N-metilação com uma mistura ácido fórmico/formaldeído na presença de acetona para gerar a azitromicina. Sua metodologia analítica, também está baseada na monografia da USP. As impurezas estão descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Potenciais impurezas listadas pelo fabricante do IFA - Beta

Identificação adotada pelo fabricante	Identificação da impureza na Farmacopeia Americana	Identificação da impureza na Farmacopeia Europeia	Origem (com base no DMF)	Especificação Farmacopeia Americana
Azaeritromicina A	Azaeritromicina A	Impureza A	Intermediário	≤ 0,5%
3- Deoxiazitromicina (Azitromicina B)	3-Deoxiazitromicina (Azitromicina B)	Impureza B	Material de partida	≤ 1,0%
Azitromicina C (3''-O-Demetilazitromicina)	Azitromicina C (3''-O-demetilazitromicina)	Impureza C	Material de partida	≤ 0,5%
Desosaminilazitromicina	Desosaminilazitromicina	Impureza J	Degradação	≤ 0,3%
3'-N-{[4-(Acetilamino) fenil] sulfonil} -3', 3'-DidemetilAZM	3'-N-{[4-(Acetilamino) fenil] sulfonil} -3', 3'-Didemetilazitromicina	Impureza Q	Sub-produto e degradação	≤ 0,15%

3'- (N, N- Didemetil) azitro- micina (aminoazitromi- cina)	3'- (N, N-Didemetil) azitromicina (aminoazitromicina)	Impureza E	Degradação	≤ 0,5%
Composto relacionado F de Azitromicina	Composto relacionado F de Azitromicina	Impureza F	Degradação	≤ 0,5%
3'-N-Demetil-3'- N-[(4-metilfenil) sulfonil] azitromicina	3'-N-Demetil-3'-N- [(4-metilfenil) sulfonil] azitromicina	Impureza G	Sub-produto	≤ 0,5%
N- Demetilazitromi- cina	N- Demetilazitromicina	Impureza I	Material de partida e degradação	≤ 0,7%
3'-N-{[4- (Acetilamino) fenil] sulfonil} - 3'- Demetilazitromici- na	3'-N-{[4- (Acetilamino) fenil] sulfonil} - 3'- Demetilazitromicina	Impureza H	Sub-produto	≤ 0,5%
N-óxido de azitromicina	N-óxido de azitromicina	Impureza L	Degradação	≤ 0,5%
3'-(N, N- Didemetil) -3'-N- formilazitromicina	3'-(N, N-Didemetil) - 3'-N- formilazitromicina	Impureza M	Degradação	≤ 0,5%
3'- De(dimetilamino)- 3'-oxoazitromicina	3'-De(dimetilamino)- 3'-oxoazitromicina	Impureza N	Degradação	≤ 0,5%
2-Desetil-2- propilazitromici- na	2-Desetil-2- propilazitromicina	Impureza O	Material de partida	≤ 0,5%
Azitromicina impureza P	Azitromicina impureza P	Impureza P	Origem desconhecida	≤ 0,2%
Eritromicina A oxima	Eritromicina A oxima	-	Intermediário	≤ 0,5%
Iminoéter Eritromicina A	Iminoéter Eritromicina A	-	Intermediário	≤ 0,5%
Impureza D	-	Impureza D	Material de partida	≤ 0,2%
Impureza K	-	Impureza K	Material de partida	≤ 0,2%
Qualquer outra impureza individual	Qualquer outra impureza individual	Qualquer outra impureza individual	-	≤ 0,2%
Total	Total	Total	-	≤ 3,0%

Fonte: DMF do fabricante Beta, 2022

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a adequabilidade de um método analítico, por CLAE- UV-vis, para controle das impurezas orgânicas conhecidas e qualquer outra impureza individual (impureza desconhecida) acima do limite de especificação (LE), oriundas da degradação do IFA Azitromicina no medicamento (produto acabado), forma farmacêutica sólida, comprimido revestido de 500 mg.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar com auxílio da ferramenta de *DOE* (planejamento experimental), um método para determinação das impurezas orgânicas conhecidas e qualquer outra impureza individual (impureza desconhecida), oriundas da degradação do IFA no medicamento (produto acabado) ao longo de sua vida prateleira (*shelf life*).
- ✓ Validar o método analítico por CLAE- UV-vis, seguindo os parâmetros das legislações e guias vigentes.
- ✓ Utilizar a metodologia submetendo a análise seis amostras oriundas de cinco diferentes detentores de registro, com método validado, com ênfase na quantificação das impurezas orgânicas conhecidas e das impurezas desconhecidas, em comprimido revestido de 500 mg em comercialização no mercado brasileiro, confirmando sua adequabilidade.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1. SUBSTÂNCIA QUÍMICA REFERÊNCIA - (SQR/ SQC/ SQF)

Foram adquiridas as substâncias padrões, conforme **Tabela 9**.

Tabela 9 - Relação das SQFs e SQCs, Fornecedores, dados variáveis do lote e potência

Substância	Nº de Lote	Fornecedor	Potência	Data Validade
SQF - Padrão prim. de AZM	LRAC6480.1	Supelco	98,7%	31/12/2024
SQC - Padrão sec. de AZM	PS 003/22	Fabricante Alfa	102,7%	12/07/2022
SQF - Padrão de imp. identif. de picos <i>EPCRS</i> – <i>batch 5</i>	00M6FN	<i>European Pharmacopeia</i>	Não se aplica	–
	OLYAZ0010.0L,		87,7%	19/09/2024
	SAG-IS-1905,		83,5%	31/07/2023
	SAG-IS-1903,	<i>Olympus</i>	94,9%	31/07/2023
SQF - Padrão das impurezas	OLYAZ0010.0F,	<i>Chemicals & Fertilizers e</i>	96,1%	26/12/2023
L, M, E, F, J, I e N	OLYAZ0010.0J, OLYAZ0010.0I, SAG-IS-1904 e SAG-IS-1906	<i>SAG Chem.</i>	98,0% 94,8% 84,8% 90,2%, respectiv.	26/12/2023 26/12/2023 31/07/2023 31/07/2023, respectiv.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

4.2 LOTES DOS MEDICAMENTOS

Foram adquiridos comercialmente amostras da forma farmacêutica comprimido revestido, conforme **Tabela 10**.

Tabela 10 - Relação dos medicamentos e respectivos dados variáveis do lote

Medicamento	Número de Lote	Data Fabricação	Data Validade
Produto A	EP9533	03/21	02/24
Produto B ¹	O10494	02/21	02/23
Produto B ²	O21338	04/22	04/24
Produto C	838068	01/23	01/25
Produto D	LDPKP04183	02/23	02/25
Produto E	230090	01/23	01/25

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

4.3 FABRICANTES DOS IFAs.

Foram avaliados os fabricantes de IFA, conforme descrito na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Relação dos medicamentos e respectivos fabricantes do IFA

Medicamento	Fabricante do IFA	Medicamento	Fabricante do IFA
Produto A	Não informado	Produto C	Fabricante Zeta
Produto B ¹	Fabricante Alfa	Produto D	Fabricante Gama
Produto B ²	Fabricante Beta	Produto E	Fabricante Alfa

Fonte: Elaborado pelo autor, através de *benchmarking*, 2022

4.4 SOLVENTES E REAGENTES

Acetonitrila UV/CLAE - Merck, Ácido Fosfórico PA – Neon, Fosfato de amônio monobásico anidro PA - Neon, Fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado – Neon, Metanol UV/CLAE– Merck e água ultrapurificada.

4.5 EQUIPAMENTOS

Balança Analítica *Ohaus* – Modelo DU215CD – Classe I; peagâmetro *Methrom* - modelo 827 pH Lab.; Ultrassom – Unique – Modelo USC-5000; centrífuga microprocessadora – Quimis – Modelo G222TM208; CLAE *Agilent Technologies 1260 Infinity II* - Detector DAD - *Software Waters Empower 3*; CLAE *Shimadzu LC-20 30 C*- Detector DAD - *Software Lab Solutions*.

4.6. MÉTODO

4.6.1. Otimização e Adequação do Método Analítico

Durante os testes iniciais foi verificado que seguindo as condições cromatográficas exatas, conforme definição da *USP43*, não foi obtido uma boa resolução entre os picos da impureza J e do composto relacionado F de AZM. Com o objetivo de otimizar tal resolução ajustes de temperatura do forno da coluna cromatográfica foram propostos e avaliados.

Além disso, observou-se que os fatores respostas da impureza J, do composto relacionado F de AZM e da impureza I não corresponderam aqueles descritos na *USP*. Foram avaliadas essas três impurezas e a recuperação também não foi reprodutiva.

Na adequação do método analítico, foi proposto incorporar o método descrito na monografia da *BP* com alteração da concentração da solução amostras e de algumas soluções de *system*. Obteve-se êxito na identificação das impurezas com base no *EPCRS batch 5* – padrão referência de identificação de picos de Azitromicina (*Azithromycin for peak identification*), que possui condições cromatográficas semelhantes ao método em desenvolvimento. Visto que o método analítico é muito sensível, com intuito de eliminar equívocos ao se identificar cada uma das impurezas orgânicas, propôs-se incluir na análise cromatográfica uma injeção deste padrão e utilizá-lo como referência para integração das impurezas.

Através de análise instrumental, por CLAE UV-Vis, eluiu-se os compostos, usando uma transição progressiva denominada de gradiente. Na composição da fase móvel, partiu-se do aquoso (polar) para o orgânico (apolar). A ordem de eluição dos componentes da amostra é uma função das mudanças de solvente durante o gradiente. Os compostos eluem em ordem de polaridade, onde os compostos mais hidrofílicos ficam menos tempo retido na fase estacionária, sendo assim os primeiros a serem detectados. A premissa deste tipo de separação é de que os compostos orgânicos em uma fase móvel aquosa interagem através de diferentes mecanismos (adsorção, por exemplo), preferencialmente em um material orgânico estacionário, revestida num suporte sólido. Utilizou-se eluição do tipo gradiente, em fase reversa, com variação do tempo e concentração das fases móveis, conforme descrito na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Composição e proporção das fases móveis - eluição por gradiente

Tempo (minutos)	Fase móvel Tampão fosfato de sódio dibásico anidro (%)	Fase móvel Metanol: Acetonitrila – 1:3 (%) v/v	Tempo (minutos)	Fase móvel Tampão fosfato de sódio dibásico anidro (%)	Fase móvel Metanol: Acetonitrila – 1:3 (%) v/v
0	50	50	62	31	69
20	46	54	63	30	70
22	46	54	72	30	70
27	45	55	77	50	50
32	40	60	95	50	50

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Na **Tabela 13** foram elencadas as impurezas orgânicas conhecidas, oriundas de eventual degradação do fármaco durante o *shelf life* e os critérios de aceitação estabelecidos pelas monografias farmacopeicas *USP 43* e *BP 2022*.

Tabela 13 - Critérios de Aceitação – Impurezas de degradação na AZM

Impureza	Limite
N-óxido de Azitromicina – (Impureza L)	Máximo de 1,0%
3'-(N, N-Didemetil) -3'-N-formilazitromicina - (Impureza M)	Máximo de 1,0%
3'-(N, N-Didemetil) azitromicina aminoazitromicina – (Impureza E)	Máximo de 0,5%
3'-N-Demetil-3'N-formilazitromicina - (comp. relacionado F de AZM)	Máximo de 1,0%
Desosaminilazitromicina - (Impureza J)	Máximo de 0,5%
3'-N-Demetilazitromicina - (Impureza I)	Máximo de 0,7%
3'-De(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina – (Impureza N)	Máximo de 1,0%
Qualquer impureza não especificada	Máximo de 0,2%
Total de impurezas	Máximo de 5,0%

Fonte: *United States Pharmacopeia – USP 43* e *British Pharmacopeia, 2022*

As especificações são semelhantes para as duas monografias farmacopeicas pesquisadas. Para a impureza M e para o composto relacionado F de AZM, em virtude dos isomerismo conformacional (rotâmero) a quantificação deve contemplar seus respectivos rotâmeros.

4.6.2 Preparo das soluções cromatográficas

- ✓ Solução fase móvel A: Pesou-se, em balança analítica, cerca de 1,8 g de fosfato de sódio dibásico anidro e diluiu-se em 1.000 mL de água ultrapurificada. Ajustou-se o pH para 8,9 com ácido fosfórico diluído;

- ✓ Solução fase móvel B: Mediu-se 250 mL de metanol UV/CLAE e 750 mL de acetonitrila UV/CLAE;
- ✓ Solução B: Pesou-se, em balança analítica, cerca de 1,7 g de fosfato de amônio monobásico anidro PA e diluiu-se em 1.000 mL de água ultrapurificada. Ajustou-se o pH para 10,0 com hidróxido de amônio PA;
- ✓ Solução diluente A: Preparou-se uma mistura de metanol: acetonitrila: solução B (tampão de fosfato de amônio pH 10) (7:6:7) v/v.
- ✓ Solução diluente B: Preparou-se uma mistura de solução B (tampão de fosfato de amônio pH 10) e metanol (1:1) v/v.

Nota¹: Todas as soluções preparadas foram devidamente degaseificadas.

4.6.3 Preparo da solução *EPCRS batch 5* – padrão referência de identificação de picos de Azitromicina (*Azithromycin for peak identification*)

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 4,0 mg do padrão referência de identificação de picos de azitromicina *EP* diretamente em um frasco de vidro. Adicionou-se volumetricamente 1,0 mL de solução diluente A [MetOH: ACN: solução B (tampão de fosfato de amônio pH 10:MetOH – 1:1) - 7:6:7 v/v] e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, a temperatura ambiente. A solução foi filtrada com unidade filtrante de PVDF 0,22 µm e transferida para vial âmbar de 1,5 mL. Homogeneizou-se manualmente.

4.6.4 Placebos

Foram manipulados laboratorialmente com auxílio de gral com pistilo, quantidade suficiente de placebo semiquantitativo dos medicamentos A, B, C, D e E, respectivamente. A composição qualitativa e quantitativa de cada placebo está descrita nas **Tabelas 14 a 18**.

Tabela 14 - Composição do Placebo – Medicamento A

Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)	Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)
Amido pré-gelatinizado	19,5	Estearato de Magnésio	2,4
Fosfato de Cálcio dibásico anidro	0,7	Lauril Sulfato de Sódio	3,6
Croscarmelose Sódica	3,6	Opadry branco (polímero aquoso composto por: dióxido de titânio, hipromelose, macrogol e polissorbato 80	7,1

Fonte: bula do medicamento, 2022.

Tabela 15 - Composição do Placebo – Medicamento B¹ / B²

Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)	Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)
Celulose Microcristalina	63,9	Croscarmelose Sódica	7,1
Lauril Sulfato de Sódio	3,6	Opadry II White (polímero aquoso composto por: dióxido de titânio, hipromelose, macrogol e polissorbato 80	7,1
PVP K-30	10,9	Talco farmacêutico	5,0
Estearato de Magnésio	2,4		

Fonte: bula do medicamento, 2022.

Tabela 16 - Composição do Placebo – Medicamento C

Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)	Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)
Álcool etílico	0,0	Fosfato de Cálcio dibásico	2,4
Amido de milho	75,7	Hidroxipropilmetilcelulose	4,0
Croscarmelose Sódica	12,2	Polietilenoglicol	0,2
Dióxido de Titânio	0,5	Óleo Vegetal Hidrogenado	0,2
Estearato de Magnésio	4,9		

Fonte: bula do medicamento, 2022.

Tabela 17 - Composição do Placebo – Medicamento D

Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)	Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)
Álcool Polivinílico	7,9	Fosfato de cálcio dibásico	2,3
Amido	68,1	Lauril Sulfato de Sódio	1,1
Croscarmelose Sódica	10,4	Polietilenoglicol	0,8
Dióxido de Titânio	2,6	Talco Farmacêutico	4,5
Estearato de Magnésio	2,3		

Fonte: bula do medicamento, 2022.

Tabela 18 - Composição do Placebo – Medicamento E

Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)	Composição Qualitativa	Composição Quantitativa (%)
Amido de milho	12,2	Lauril Sulfato de Sódio	1,2
Celulose Microcristalina	65,0	Polietilenoglicol	0,4
Croscarmelose Sódica	7,3	Polissorbato 80	2,4
Estearato de Magnésio	2,4	Talco Farmacêutico	4,9
Hidroxipropilmetilcelulose	4,0		

Fonte: bula do medicamento, 2022.

4.6.5 Planejamento de Experimento

Adotou-se como metodologia a otimização para o método analítico descrito em *United States Pharmacopeia – USP 37, USP 43 e British Pharmacopeia, 2022*, respaldada por um planejamento de experimento, objetivando evidenciar a melhor condição de temperatura e fluxo de injeção uma vez que a adequabilidade do método analítico havia sido alcançada. Buscou-se o auxílio da Academia para o planejamento experimental e a otimização do método analítico.

A fim de respaldar a escolha dos parâmetros cromatográficos de temperatura do forno da coluna e fluxo de injeção, considerando como fator resposta a Resolução, um planejamento de experimento fatorial 3^2 , com triplicata no ponto central foi construído, conforme **Tabela 19**. Analisou-se a substância química farmacopeica (SQF): Padrão referência *EPCRS batch 5* – padrão referência de identificação de picos de Azitromicina, preparada conforme descrito em 4.6.3.

Tabela 19 - Planejamento de experimento usando modelo fatorial 3^2

x_1	Fluxo mL min ⁻¹	y	Resolução	
x_2	Temperatura °C			
Planejamento	x_1 (mL min. ⁻¹)	x_2 (°C)	Y	
(+)	0,7	50	CRS	
0	0,9	55	CRS	
(-)	1,1	60	CRS	
Ensaio	Fluxo mL min ⁻¹	Temperatura °C	x1	x2
1	0,7	50	-1	-1
2	0,9	50	0	-1
3	1,1	50	1	-1
4	0,7	55	-1	0
5	0,9	55	0	0
6	1,1	55	1	0
7	0,7	60	-1	1
8	0,9	60	0	1
9	1,1	60	1	1
10	0,9	55	0	0
11	0,9	55	0	0

Legenda: CRS (*Chromatographic Resolution Statistic*)

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Na **Tabela 20** foram descritas as condições cromatográficas empregadas no experimento, onde a temperatura do forno da coluna (parâmetro avaliado n° 1) e o fluxo de injeção (parâmetro avaliado n° 2) foram, então, estabelecidos.

Tabela 20 - Condições cromatográficas

- Pre coluna C18 (4 x 3,0mm);	- Fluxo: Parâmetro avaliado n° 2;
- Temp. do auto injetor: 15 °C;	- Detector: Arranjo de diodos (<i>DAD</i>) – 210 nm
- Coluna: C18 (250 mm x 4,6 mm – 5 µm);	Volume de injeção: 50 µL
- Temp. do forno da coluna: Parâm. avaliado n° 1;	- Sistema: CLAE <i>Agilent Tech. 1260 Infinity II</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A rotina computacional desenvolvida para a otimização de separações cromatográficas, conforme MC Guffin e Tavares, (1997) foi apresentada através da expressão matemática, a seguir.

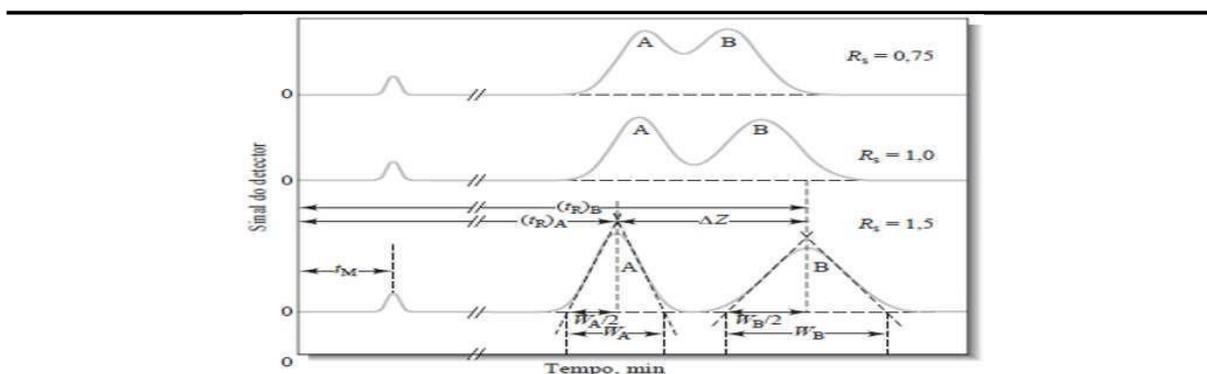
Os dados de resolução, área do pico, número de pratos teóricos, tempo de retenção relativo (*RTT*) obtidos através do *software Waters Empower* do CLAE *Agilent Technologies 1260 Infinity II* foram compilados em planilha *Excel* de forma a se obter o valor de *CRS*.

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(R_{i,i+1} - R_{opt})^2}{(R_{i,i+1} - R_{min})^2 R_{i,i+1}} \right] + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{R_{i,i+1}^2}{(n-1) R_{av}^2} \right\} \frac{t_n}{n}$$

Onde: **CRS**: *chromatographic resolution statistic*; **R_{i, i+1}** é a resolução entre pares de solutos adjacentes; **R_{av}** é a resolução média de todos os pares de solutos; **R_{opt}** é o ótimo ou resolução desejada (adotou-se o valor de 1,5); **R_{min}** é a resolução mínima aceitável (adotou-se o valor de 1,0); **t_n** é o tempo de migração do último soluto; **n** é o número de solutos na amostra.

Conforme, Skoog *et al.*, (2005) e demonstrado na **Figura10**, é evidente que uma resolução de 1,5 fornece uma separação essencialmente completa entre A e B, enquanto a resolução de 0,75 não o faz. A uma resolução de 1,0, a zona de A contém aproximadamente 4% de B e a zona B, aproximadamente 4% de A. Considerando uma resolução de 1,5, a sobreposição é aproximadamente de 0,3%. A resolução para uma dada fase estacionária pode ser melhorada aumentando-se o comprimento da coluna e, conseqüentemente o número de pratos teóricos e respectiva eficiência. No entanto, uma condição adversa a isso, seria o acréscimo do tempo requerido para a separação dos componentes.

Figura 10 - Separação a três valores de resolução $R_s = 2\Delta Z / (W_A + W_B)$



Fonte: Skoog *et al.*, 2005

A qualidade de toda a separação é avaliada por meio de uma função de resposta desenvolvida originalmente para separações cromatográficas. Designou-se o *chromatographic resolution statistic* - (CRS) que considera a resolução dos solutos na amostra, em vez de apenas o par menos resolvido, e incorpora três importantes aspectos da separação (MCGuffin e Tavares, 1997). O primeiro termo na equação, chamado de termo de resolução, avalia a resolução entre todos os adjacentes pares de solutos em comparação com os valores definidos para ótimo e resolução mínima. O termo de resolução diminui conforme $R_i, i+1$ se aproxima de R_{opt} e atinge o valor mínimo de zero quando $R_i, i+1$ é exatamente igual a R_{opt} . Qualquer aumento adicional na resolução não oferece nenhuma melhoria adicional na qualidade da separação, portanto, o termo de resolução é mantido em um valor constante próximo para zero. O termo de resolução aumenta rapidamente à medida que $R_i, i+1$ se aproxima R_{min} e torna-se indefinido quando $R_i, i+1$ é exatamente igual a R_{min} .

O segundo termo da equação, denominado termo de distribuição, considera o espaçamento relativo das zonas de soluto. O prazo de distribuição se aproxima de um valor mínimo de 1 quando a resolução de cada par de solutos é igual à resolução média, que é o caso quando todas as zonas estão uniformemente espaçadas. O terceiro termo ou termo multiplicador final na equação, leva em consideração o tempo de análise e a complexidade da amostra.

4.6.6 Validação do Método Analítico

Conduziu-se a validação deste método analítico, conforme RDC 166/2017, onde avaliou-se os parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade, robustez, LD e LQ, conforme ANVISA – RDC nº 166/2017, bem como o guia *ICH Q2(R2) – Validation of Analytical Procedures (European Medicine Agency, 2022)*.

4.6.6.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada através de comparação cromatográfica entre diluente/branco utilizado no preparo da amostra, placebo do medicamento, padrão de AZM, padrões de cada uma das impurezas individuais (L, M, E, F, I, J, N), IFA de AZM e amostra do medicamento (produto acabado) AZM 500mg.

Avaliou-se a pureza de pico no parâmetro seletividade através do *software Lab Solutions*, de acordo com o documento “*Data Acquisition & Processing Theory Guide*” item 4 “*Peak Purity Algorithms*”, disponibilizado pelo fabricante do software em questão. A presença de impurezas é avaliada considerando os resultados de *similarity (SI)*, *threshold (t)* e *purity index*, conforme **Figura 11**, a seguir:

Figura 11 - Cálculo da Pureza de Pico

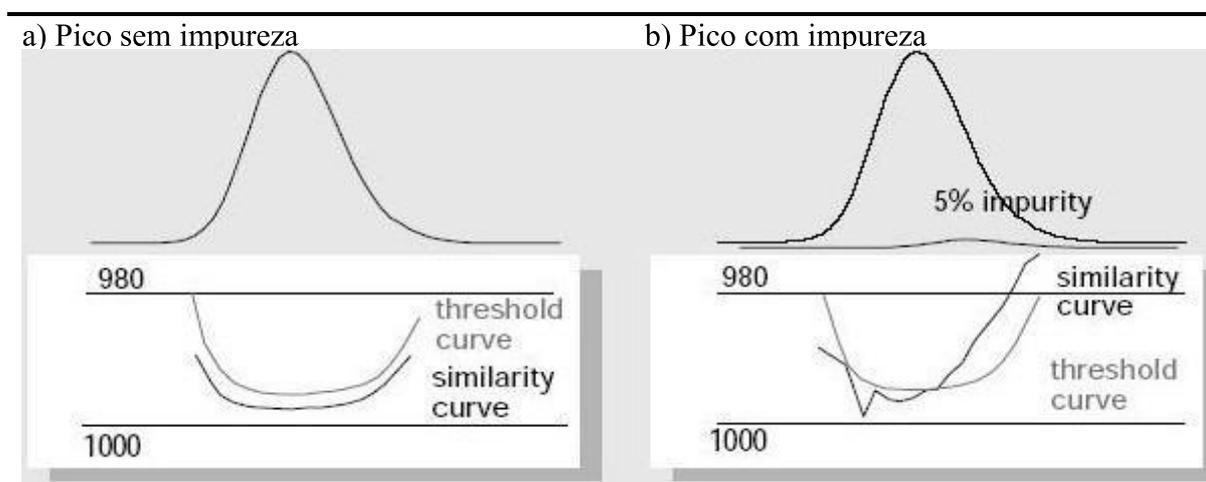
$SI \geq t$	$Purity\ index \geq 0$	No impurity is detected
$SI < t$	$Purity\ index < 0$	Impurity is detected

Legenda: *SI (similarity); t (threshold)*

Fonte: *software Lab Solutions*, 2023

Vale salientar que pureza de pico não é pureza química da substância e sim, pureza espectral. Avalia-se a coincidência do espectro presente em toda região do pico cromatográfico e se a coincidência existir, tem-se a pureza de pico. Neste caso, detector *PDA (photodiode Array)* pureza espectral da absorção na região do UV. A **Figura 12**, ilustra a ocorrência de pico cromatográficos puro e impuro.

Figura 12 - Figura ilustrativa de Pureza de Pico



Fonte: <https://malcolm4chemist.blogspot.com/2008/07/peak-purity-analysis-by-chemstation-1.html>

Para determinar a seletividade para o doseamento do IFA na amostra íntegra utilizou-se de uma concentração teórica de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para as impurezas orgânicas na concentração teórica adotada foi de $4.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Contemplou-se a avaliação das soluções de *system suitability*: solução de sensibilidade, solução de adequabilidade, solução padrão referência de identificação de picos de azitromicina EPe solução padrão de AZM P₁ e P₂.

Para as impurezas orgânicas contemplou-se a avaliação das seguintes soluções: amostra do IFA AZM diidratada, amostra do placebo, amostra do medicamento (produto acabado), amostra do placebo acrescido do IFA no LQ; amostra do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I e N no LQ, amostra do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I e N no limite de especificação (LE).

Nota²: Para evitar a ocorrência de *carry over* (efeito residual), que pudesse impactar no resultado da eluição do placebo, nova injeção do branco/ diluente foi adotada anteriormente a injeção do placebo.

Nas soluções preparadas para ensaio de degradação, houve exposição a condições drásticas de estresse compreendendo faixa de pH ácido, pH alcalino, oxidação, presença de íons metálicos, luz, temperatura elevada e alta umidade. As condições utilizadas no estudo são apresentadas na **Tabela 21**.

Tabela 21 – Condições de estresse e tempo de exposição utilizadas na amostra

Amostra	Condição de Estresse	Tempo de Exposição
Estresse Ácido	Ácido Clorídrico 0,2 M	1 hora e 15 min.
Estresse Alcalino	Hidróxido de Sódio 0,5 M	24 horas
Estresse Oxidativo	Peróxido de Hidrogênio 0,1% m/v	5 min.
Estresse Umidade	75 +/- 5% UR 30 +/- 2 °C	15 dias
Estresse Temperatura	80 °C	15 dias
Estresse Íon Metálico	Sulfato de Cobre II 0,05 M	24 horas
Estresse Foto exposição	2,4 milhões de lux-hora	120 horas

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Para impurezas orgânicas/ substâncias relacionadas em condições de estresse contemplou-se a avaliação das seguintes soluções: soluções do diluente, do branco sobre

estresse, do placebo sob estresse, do IFA AZM diidratada sob estresse, amostra íntegra do medicamento (produto acabado) sob estresse.

No estudo de seletividade foram avaliadas as possíveis interferências dos excipientes presentes na formulação do medicamento (produto acabado), onde placebo, amostras do medicamento e os padrões foram submetidos a condições de estresse relevantes, objetivando demonstrar que os excipientes da formulação, o branco, a fase móvel, as impurezas orgânicas e o diluente não interferem na quantificação da substância de interesse e na avaliação da pureza de pico de cada um dos compostos especificados.

Adotou-se os critérios de aceitação cromatográficos, conforme RDC 166/2017 e ICH Q2(R2) / 2022.

- ✓ Resolução: valor mínimo de 2,0 entre os picos de impureza J e composto relacionado F de AZM, na solução de adequabilidade do sistema;
- ✓ Relação sinal/ruído: mínimo de 10,0 para o pico de AZM na solução de sensibilidade;
- ✓ Recuperação de padrão: para a substância AZM, entre 95% e 105% na comparação entre as soluções padrão de AZM para cálculo de recuperação e a primeira injeção da solução padrão de AZM;
- ✓ Verificação do sistema: para a substância AZM, desvio padrão relativo máximo de 5,0 % entre as injeções da solução padrão de AZM e a injeção para verificação do sistema.

4.6.6.1.1 Preparo da solução (impurezas orgânicas) do IFA AZM diidratada:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 105,0 mg de AZM diidratada (equivalente a 100,0 mg de AZM) para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.1.2 Preparo da solução do placebo (impurezas orgânicas) do comprimido revestido:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 72,34 mg do placebo do comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg do IFA AZM) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou

e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: equivalente a 4.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.1.3 Preparo da solução (impurezas orgânicas) do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido:

Pesou-se 20 comprimidos e determinou o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg do IFA AZM para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.1.4 Preparo da solução do placebo do comprimido revestido acrescida do IFA AZM no LQ:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 72,34 mg do placebo do comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg de AZM) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Para o mesmo balão volumétrico, transferiu-se, volumetricamente, 0,1 mL da solução estoque de AZM. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.1.5 Preparo da solução de trabalho do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I e N no LQ - (0,1%):

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM para balão volumétrico de 25 mL. A esse mesmo balão volumétrico adicionou-se, volumetricamente, 0,1 mL da solução estoque da impureza J, da impureza L, do composto relacionado F de AZM, impureza I, da impureza M, da impureza N e 0,2 mL da solução estoque da impureza E. Adicionou-se cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Agitou-se a solução em agitador orbital, a 250 rpm, por 15 minutos. Completou-se o

volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza J; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto relacionado F de azitromicina; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza I; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza L; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza M; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza N e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza E.

4.6.6.1.6 Preparo da solução de trabalho do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I e N no LE:

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM para balão volumétrico de 25 mL. A esse mesmo balão volumétrico adicionou-se, volumetricamente, 0,5 mL da solução estoque da impureza J, 1 mL da solução estoque do composto relacionado F de AZM, da impureza L, da impureza M, da impureza N, da impureza E volume ricamente 0,7 mL da solução estoque da impureza I. Adicionou-se cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Agitou-se a solução em agitador orbital, a 250 rpm, por 15 minutos. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 4.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM; 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza J; 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto relacionado F de azitromicina; 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza I; 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza L; 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza M; 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza N e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza E.

4.6.6.1.7 Preparo das soluções padrão estoque das impurezas L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I e N:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 10,0 mg dos padrões de impureza L, impureza M, impureza N, composto relacionado F de AZM, impureza J, impureza I, 5,0 mg do padrão de impureza E volume ricamente transferiu-os para balões volumétricos de 10 mL distintos. Adicionou-se, cerca de 6 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final das soluções padrão estoque das Impurezas L, M, N, F, J e I de AZM: 1.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza. Concentração final da solução padrão estoque da Impureza E de azitromicina: 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza.

4.6.6.1.8 Preparo da solução (impurezas orgânicas) do placebo e do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido – ensaio de degradação:

Submeteu-se as amostras inicialmente a condição de estresse conforme o parâmetro (estresse por umidade, aquecimento e foto exposição).

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM e transferiu para um balão volumétrico de 25 mL. Transferiu-se, volumetricamente, cerca de 2 mL de acetonitrila para abertura da amostra e colocou no banho ultrassônico por 5 minutos, à temperatura ambiente. Transferiu, volumetricamente, cerca de 2 mL de acetonitrila UV/CLAE. Colocou em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Agitou-se a solução em agitador orbital, a 250 rpm, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Adicionou-se, cerca de 10 mL de solução diluente. Dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

Para os parâmetros (estresse ácido, alcalino, por oxidação e por íons metálicos), as amostras estressadas foram preparadas de forma semelhante, obtendo a mesma concentração final de 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM. Neste preparo, solubilizou-se as amostras em quantidade específica de solução diluente, acrescida do respectivo volume do agente para cada condição de estresse.

Vale salientar que para o caso do estresse ácido e do estresse alcalino antes de completar o volume as amostras foram neutralizadas com mesmo volume de solução de hidróxido de sódio para o estresse ácido e solução de ácido clorídrico para o estresse alcalino.

4.6.6.1.9 Preparo da solução branco para a condição de estresse:

Transferiu-se, volumetricamente, cerca de 2,0 mL de uma solução de acetonitrila UV/CLAE para um balão volumétrico de 25 mL e homogeneizou-se em banho ultrassônico por 5 minutos, à temperatura ambiente. Transferiu-se, volumetricamente, quantidade específica da solução diluente, acrescida do respectivo volume do agente para cada condição de estresse. Agitou-se em agitador orbital por 45 min, a 250 rpm, à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de estresse, adicionou-se cerca de 15,0 mL de solução diluente ajustada para estresse, diluiu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o

volume com solução diluente ajustada para estresse, homogeneizou e filtrou-se com unidade filtrante de PVDF 0,22 μm .

4.6.6.1.10 Preparo da solução amostra do IFA AZM diidratada para a condição de estresse:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 105,0 mg do IFA AZM diidratada (equivalente a 100,0 mg de azitromicina) AZM e transferiu para um balão volumétrico de 25 mL. Procedeu-se conforme descrito em 4.2.3.1.10. Concentração final: 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

As soluções de *system suitability* utilizadas na avaliação da seletividade das impurezas orgânicas/ subst. relacionadas foram preparadas conforme descrito a seguir.

4.6.6.1.11 Preparo da solução padrão de trabalho de AZM:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 8,0 mg de AZM diidratada (equivalente a 25,0 mg de AZM) para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se, cerca de 75 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final da solução padrão de trabalho: 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM, conforme **Figura 13**.

Figura 13 – Ilustração do preparo da solução padrão de trabalho da AZM



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

4.6.6.1.12 Preparo da solução padrão de sensibilidade:

Transferiu-se volumetricamente, 1,0 mL da solução padrão de análise de AZM para um balão volumétrico de 20 mL. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e

filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final da solução padrão de trabalho: 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.1.13 Preparo da solução de adequabilidade composta pelas impurezas I, J e Composto relacionado F de AZM:

Transferiu-se, volumetricamente, 40 μL da solução padrão estoque do Composto relacionado F; 120 μL das soluções padrão estoque das impurezas I e J para um balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final da solução de adequabilidade do sistema: 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza J, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto relacionado F de AZM e 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza I.

4.6.6.2 *Limite de Detecção (LD)*:

Demonstrou-se o limite de detecção através da obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pudesse ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD pode ser determinado com base nos parâmetros da curva de calibração, a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção ou a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

O limite de detecção foi obtido através da fórmula:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

Onde, IC é a inclinação da reta e σ é o desvio padrão obtido do intercepto com o eixo Y de três curvas analíticas construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de detecção.

Estimou-se o LD a partir das avaliações dos padrões de referência das substâncias de impurezas orgânicas L, M, E, F, J, I e N de AZM nas concentrações estabelecidas do limite de detecção do método, avaliando-se a razão sinal-ruído (S/N). Definiu-se considerando as concentrações capazes de produzir uma razão sinal-ruído maior ou igual a 3:1. Injetou-se soluções padrão das impurezas, no limite de detecção (LD) com concentração três vezes menor que a concentração definida para o limite de quantificação (LQ) utilizada no ensaio de

linearidade, bem como as soluções de cada impureza conhecida no LQ a fim de confirmar esta estimativa.

4.6.6.3 Limite de Quantificação (LQ):

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ deve ser coerente com o limite de especificação (LE) da impureza.

O limite de quantificação foi obtido através da fórmula:

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

Onde, IC é a inclinação da reta e σ é o desvio padrão obtido do intercepto com o eixo Y de três curvas analíticas construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de detecção.

Os limites de quantificação (LQ) para o método analítico foram estimados a partir das avaliações dos padrões de referência das substâncias de impurezas orgânicas L, M, E, J, I, N e composto F de AZM nas concentrações estabelecidas do limite de quantificação do método, avaliando-se a razão sinal-ruído (S/N). Os mesmos foram definidos como as concentrações capazes de produzir uma razão sinal-ruído maior ou igual a 10:1. Os limites de quantificação foram definidos como o limite de notificação do método, à saber: 0,10%. Experimentalmente e com base na RDC 53/2015, optou-se por adotar o limite de notificação (menor quantidade do analito a notificar).

4.6.6.4 Linearidade

A linearidade foi determinada através de seis níveis, em triplicata, de maneira independente partindo da mesma solução estoque. Preparou-se as curvas de calibração para todas as impurezas orgânicas L, M, E, composto relacionado F de AZM, J, I, N e para o IFA AZM, na faixa de trabalho de 80% -120%. Para cada replicata, foi gerada uma curva analítica relacionado área do pico versus concentração do analito por meio do método dos mínimos quadrados. Em seguida, foram calculados os parâmetros de regressão: coeficiente angular, intersecção com o eixo y e coeficiente de correlação. Por fim, foram realizados cálculos estatísticos de análise de variância para determinação da significância da regressão e verificar

se houve falta de ajuste. Além disso, foi utilizado o teste de *Cochran* para avaliação da homocedasticidade dos dados (BRASIL, 2017).

Os resultados foram tratados por métodos estatísticos apropriados e os fatores respostas para cada uma das impurezas foram obtidos através do seguinte cálculo:

$$\text{Fator resposta (Fr)} = \frac{\text{Coeficiente angular (impureza em avaliação)}}{\text{Coeficiente angular (AZM)}}$$

A avaliação da linearidade para o ensaio de impurezas orgânicas foi realizada com base na resposta analítica obtida para cada uma das sete impurezas orgânicas conhecidas oriundas da degradação do medicamento (produto acabado), sendo essas obtidas com as SQCs das respectivas substâncias. Como a AZM foi estabelecida como o padrão de análise para o método de impurezas orgânicas, a faixa coberta na linearidade teve por objetivo cobrir as especificações das impurezas orgânicas conhecidas, impurezas desconhecidas e da própria AZM. Dessa forma, a faixa linear avaliada cobriu toda a extensão de especificação do produto, partindo desde o limite de quantificação, até a faixa de especificação para todas as impurezas especificadas. A verificação das linearidades para as impurezas orgânicas conhecidas foi realizada conforme estabelecido e demonstrado na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Faixa de Linearidade avaliada

Analito	CONCENTRAÇÃO – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (µgmL ⁻¹)						
	0,10%	0,14%	0,20%	0,28%	0,30%	0,40%	0,50%
Impureza L	4,00	-	8,00	-	-	16,00	-
Impureza M	4,00	-	8,00	-	-	16,00	-
Impureza E	4,00	-	8,00	-	12,00	16,00	20,00
Impureza F	4,00	-	8,00	-	16,00	-	-
Impureza J	4,00	-	8,00	-	12,00	16,00	20,00
Impureza I	4,00	5,60	-	11,20	-	-	-
Impureza N	4,00	-	8,00	-	-	16,00	-
Impureza Desconhecida	-	-	8,00	-	-	-	-
Analito	CONCENTRAÇÃO – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (µgmL ⁻¹)						
	0,56%	0,60%	0,70%	0,80%	0,84%	1,00%	1,20%
Impureza L	-	-	-	32,00	-	40,00	48,00
Impureza M	-	-	-	32,00	-	40,00	48,00
Impureza E	-	24,00	-	-	-	-	-
Impureza F	-	-	-	32,00	-	40,00	48,00
Impureza J	-	24,00	-	-	-	-	-
Impureza I	22,40	-	28,00	-	33,60	-	-
Impureza N	-	-	-	32,00	-	40,00	48,00
Imp. Desconhecida	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.6.6.4.1 Preparo da solução para verificação da faixa linear para a impureza L:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20,0 mg da impureza L e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão estoque de impureza L: 1.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,8 mL da solução estoque de impureza L para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6.4.2 Preparo da solução para verificação da faixa linear da impureza M:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20,0 mg da impureza M de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão estoque de impureza M: 1.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,5 mL da solução estoque de impureza M para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6.4.3 Preparo da solução para verificação da faixa linear da impureza E:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 10,0 mg da impureza E de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão estoque de impureza E: 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,5 mL da solução estoque de impureza E para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6.4.4 Preparo da solução para verificação da faixa linear do composto relacionado F de AZM)

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20,0 mg da impureza composto relacionado F de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão estoque de composto relacionado F: $1.000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,5 mL da solução estoque de composto relacionado F para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de $0,22 \mu\text{m}$. Concentração final: $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6.4.5 Preparo da solução para verificação da faixa linear da impureza J:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20,0 mg da impureza J de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão estoque de impureza J: $1.000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,25 mL da solução estoque da impureza J para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de $0,22 \mu\text{m}$. Concentração final: $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6.4.6 Preparo da solução para verificação da faixa linear da impureza I:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20,0 mg da impureza I de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão estoque de impureza I: $1.000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,5 mL da solução estoque de impureza I para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de $0,22 \mu\text{m}$. Concentração final: $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.6.4.7 Preparo da solução para verificação da faixa linear da impureza N:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20,0 mg da impureza N de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final da solução padrão

estoque de impureza N: 1.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, transferiu-se volumetricamente, 0,5 mL da solução estoque de impureza N para balão volumétrico de 10 mL. Diluiu-se e completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante PVDF de 0,22 μm . Concentração final: 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nas **Tabelas 23** e **24** foram descritos para cada analito, o volume da solução para verificação da linearidade utilizada, o volume de solução diluente, a fração proporcional e a respectiva concentração teórica.

Tabela 23 - Preparo das soluções - verificação da faixa linear para as impurezas

Analito	Volume da solução para verificação da linearidade	Volume de solução diluente	Fração proporcional	Concentração
Impureza L	16,7 μL	983,3 μL	0,03%	C_{final} : 1,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Limite de detecção)
Impureza. M; I; N Composto F de AZM	26,7 μL	973,3 μL	0,03%	C_{final} : 1,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Limite de detecção)
Impureza. E; J	53,3 μL	946,7 μL	0,03%	C_{final} : 1,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Limite de detecção)
Impureza L	50,0 μL	950,0 μL	0,10%	C_{final} : 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Limite de quantificação)
Impureza M; I; N; Composto F de AZM	80,0 μL	920,0 μL	0,10%	C_{final} : 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Limite de quantificação)
Impureza. E; J	160,0 μL	840,0 μL	0,10%	C_{final} : 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Limite de quantificação)
Impureza. I	112,0 μL	888,0 μL	0,14%	C_{final} : 5,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (20% da especificação)
Impureza L	100,0 μL	900,0 μL	0,20%	C_{final} : 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (40% da especificação)
Impureza. M; N Composto F de AZM	160,0 μL	840,0 μL	0,20%	C_{final} : 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (40% da especificação)
Impureza. E; J	320,0 μL	680,0 μL	0,20%	C_{final} : 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (40% da especificação)
Impureza. I	224,0 μL	776,0 μL	0,28%	C_{final} : 11,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (40% da especificação)
Impureza. E; J	480,0 μL	520,0 μL	0,30%	C_{final} : 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (60% da especificação)
Impureza L	200,0 μL	800,0 μL	0,40%	C_{final} : 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (60% da especificação)
Impureza M; N; Composto F de AZM	320,0 μL	680,0 μL	0,40%	C_{final} : 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (60% da especificação)
Impureza E; J	640,0 μL	360,0 μL	0,40%	C_{final} : 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (80% da especificação)
Impureza E; J	800,0 μL	200,0 μL	0,50%	C_{final} : 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100% da especificação)

Impureza I	448,0 µL	552,0 µL	0,56%	C_{final} : 22,4 µgmL ⁻¹ (80% da especificação)
Impureza E; J	960,0 µL	40,0 µL	0,60%	C_{final} : 24,0 µgmL ⁻¹ (120% da especificação)
Impureza I	560,0 µL	440,0 µL	0,70%	C_{final} : 28,0 µgmL ⁻¹ (100% da especificação)
Impureza L	400,0 µL	600,0 µL	0,80%	C_{final} : 32,0 µgmL ⁻¹ (80% da especificação)
Impureza M; N; composto relacionado F de AZM	640,0 µL	360,0 µL	0,80%	C_{final} : 32,0 µgmL ⁻¹ (80% da especificação)
Impureza. I	672,0 µL	328,0 µL	0,84%	C_{final} : 33,6 µgmL ⁻¹ (120% da especificação)
Impureza L	500,0 µL	500,0 µL	1,00%	C_{final} : 40,0 µgmL ⁻¹ (100% da especificação)
Impureza M; N; composto relacionado F de AZM	800,0 µL	200,0 µL	1,00%	C_{final} : 40,0 µgmL ⁻¹ (100% da especificação)
Impureza L	600,0 µL	400,0 µL	1,20%	C_{final} : 48,0 µgmL ⁻¹ (120% da especificação)
Impureza M; N; composto relacionado F de AZM	960,0 µL	40,0 µL	1,20%	C_{final} : 48,0 µgmL ⁻¹ (120% da especificação)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.6.6.4.8 Preparo da solução para verificação da faixa linear da AZM

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 16,0 mg de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se, cerca de 75 mL de acetonitrila UV/CLAE e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com acetonitrila UV/CLAE e homogeneizou. Concentração final de AZM: 160,0 µg mL⁻¹.

Tabela 24 - Preparo das soluções para verificação da faixa linear para a AZM

Volume da solução para verificação da linearidade para a impureza AZM	Volume de solução diluente	Fração proporcional	Concentração
17,0 µL	1983,0 µL	0,03%	C_{final} : 1,33 µgmL ⁻¹ (Limite de detecção)
25,0 µL	975,0 µL	0,10%	C_{final} : 4,0 µgmL ⁻¹ (Limite de quantificação)
100,0 µL	900,0 µL	0,40%	C_{final} : 16,0 µgmL ⁻¹
200,0 µL	800,0 µL	0,80%	C_{final} : 32,0 µgmL ⁻¹
400,0 µL	600,0 µL	1,63%	C_{final} : 64,0 µgmL ⁻¹
500,0 µL	500,0 µL	2,00%	C_{final} : 80,0 µgmL ⁻¹

600,0 µL	400,0 µL	2,40%	C _{final} : 96,0 µgmL ⁻¹
----------	----------	-------	--

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.6.6.5 Precisão/ Exatidão

Para avaliação da precisão foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária. O tratamento estatístico aplicado aos resultados, considerou a média (x), o desvio padrão (S), a variância (S²) e o coeficiente de variação (CV) dos dados. A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, onde calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A avaliação dos ensaios de precisão para as impurezas orgânicas foi realizada em triplicata para cada concentração, em 3 níveis (baixo, médio e alto), preparadas de maneira independente, a partir de uma mesma solução estoque de cada impureza. Uma solução contendo a amostra íntegra do produto também foi avaliada visando desconsiderar os níveis de impurezas eventualmente já presentes na amostra. A precisão intermediária foi realizada em dias diferentes, com analistas diferentes, utilizando amostras nas concentrações descritas na **Tabela 22**. Para qualquer outra impureza individual (impureza desconhecida), a repetibilidade foi realizada com o padrão de referência do IFA de AZM em 4 níveis dentro de faixa de trabalho estabelecida a seguir: LQ (4,0 µg mL⁻¹ ou 0,1%); 100% da especificação de impurezas desconhecidas (8,0 µg mL⁻¹ ou 0,2%); 120% da especificação de impurezas desconhecidas (9,6 µg mL⁻¹ ou 0,24%) e 96,0 µg mL⁻¹ equivalente a 2,4%, englobando toda a faixa de trabalho do padrão de análise de AZM (LQ até 120% da concentração do padrão).

A repetibilidade para as impurezas especificadas foi avaliada para o medicamento AZM 500 mg comprimido revestido preparado na concentração de trabalho de 4.000,0 µg mL⁻¹ de AZM, contaminada com os padrões das impurezas orgânicas conhecidas.

A exatidão do método analítico foi obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. O resultado do teste de exatidão foi expresso em porcentagem de recuperação (Rec.) da substância de interesse com concentração conhecida adicionada à amostra.

$$\text{Recuperação} = \frac{CA (\text{amostra adicionada}) - CA (\text{amostra})}{CTA} \times 100$$

Na avaliação da exatidão foram comparados, através da ANOVA, os resultados obtidos com aqueles descritos nos compêndios oficiais, *USP 43* e *BP 2022*. Na avaliação para as impurezas orgânicas, o medicamento foi preparado na concentração de trabalho de 4.000,0 µg mL⁻¹ de AZM, contaminado com os padrões das impurezas orgânicas conhecidas conforme descrito na **Tabela 25**.

Tabela 25 – Parâmetros de Precisão (repetibilidade e intermediária) e Exatidão

Concentração nominal do Analito	Conc. em %	Precisão Repetibilid. CV máximo (%)	Precisão Intermed. CV máximo (%)	Exatidão Faixa de recuper. (%)
Impureza L				
C_{final} : 4,0 µg mL ⁻¹ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 40,0 µg mL ⁻¹ (especificação para impureza L)	1,00%	7,3	11,0	80-110
C_{final} : 48,0 µg mL ⁻¹ (120% da especificação para impureza L)	1,20%			
Impureza M				
C_{final} : 4,0 µg mL ⁻¹ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 40,0 µg mL ⁻¹ (especificação para impureza M)	1,00%	7,3	11,0	80-110
C_{final} : 48,0 µg mL ⁻¹ (120% da especificação para impureza M)	1,20%			
Impureza E				
C_{final} : 4,0 µg mL ⁻¹ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 20,0 µg mL ⁻¹ (especificação para impureza E)	0,50%	7,3	11,0	80-110
C_{final} : 24,0 µg mL ⁻¹ (120% da especificação para impureza E)	0,60%			
Composto relacionado F de AZM				
C_{final} : 4,0 µg mL ⁻¹ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 40,0 µg mL ⁻¹ (especificação para composto relacionado F de AZM)	1,00%	7,3	11,0	80-110
C_{final} : 48,0 µg mL ⁻¹ (120% da especificação para composto relacionado F de AZM)	1,20%			
Impureza J				
C_{final} : 4,0 µg mL ⁻¹ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 20,0 µg mL ⁻¹ (especificação para impureza J)	0,50%	7,3	11,0	80-110

C_{final} : 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (120% da especificação para impureza J)	0,60%			
Impureza I				
C_{final} : 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (especificação para impureza I)	0,70%	7,3	11,0	80-110
C_{final} : 33,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (120% da especificação para impureza I)	0,84%			
Impureza N				
C_{final} : 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (limite de quantificação do método)	0,10%			
C_{final} : 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (especificação para impureza N)	1,00%	7,3	11,0	80-110
C_{final} : 48,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (120% da especificação para impureza N)	1,20%			
Azitromicina (Impurezas não-especificadas)				
C_{final} : 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (limite de quantificação do método)	0,10%	5,3	8,0	90-107
C_{final} : 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100% da especificação para impurezas desconhecidas)	0,20%	3,7	6,0	95-105
C_{final} : 9,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (120% da especificação para impurezas desconhecidas)	0,24%	3,7	6,0	95-105
C_{final} : 96,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (120% da concentração de trabalho do padrão análise)	2,40%	2,7	4,0	97-103

Fonte: AOAC Peer- Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998), AOAC International, Gaithersburg, MD e AOC Official Methods of Analysis (2012) Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F.

4.6.6.5.1 Preparo da solução amostra para verificação da precisão do método de determinação de impurezas orgânicas – medicamento AZM 500 mg comprimido revestido:

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou com unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 4.000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.5.2 Preparo da solução amostra do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, J, I, N e composto relacionado F de AZM no LQ (0,1%) do método (nível baixo):

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM para balão volumétrico de 25 mL. A este balão volumétrico adicionou-se volumetricamente 0,10 mL da solução estoque da impureza L, da impureza M, do composto relacionado F de AZM, da impureza J, da impureza I, da impureza N e 0,20 mL da solução estoque de impureza E. Adicionou-se cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AZM, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza L, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza M, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza E, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto relacionado F de azitromicina, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza J, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza I e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza N.

4.6.6.5.3 Preparo da solução amostra do medicamento AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, J, I, N e composto relacionado F de AZM no LE do método, nas concentrações equivalentes a 1,0%; 1,0%; 0,5%, 1,0%, 1,0%, 0,5% e 0,7%, respectivamente (nível médio):

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM para balão volumétrico de 25 mL. A este balão volumétrico adicionou-se volumetricamente 1 mL da solução estoque de impureza L, da impureza M, da impureza E, do composto relacionado F de AZM, da impureza N, 0,5 mL da solução estoque de impureza J e 0,7 mL da solução estoque de impureza I. Adicionou-se cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AZM, 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza L, 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza M, 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza E, 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto relacionado F de azitromicina, 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza J, 28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza I e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza N.

4.6.6.5.4 Preparo da solução amostra do produto AZM 500 mg comprimido revestido acrescido das impurezas L, M, E, J, I, N e composto relacionado F de AZM no LE do método, nas concentrações equivalentes a 1,2%; 1,2%; 0,6%, 1,2%, 1,2%, 0,6% e 0,84%, respectivamente (nível alto):

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se, quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg de AZM para balão volumétrico de 25 mL. A este balão volumétrico adicionou-se volumetricamente 1,2 mL da solução estoque de impureza L, da impureza M, da impureza E, do composto relacionado F de AZM, da impureza N, 0,6 mL da solução estoque de impureza J e 840 μL da solução estoque de impureza I. Adicionou-se cerca de 15,0 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou manualmente e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de AZM, 48,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza L, 48,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza M, 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza E, 48,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto relacionado F de azitromicina, 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Impureza J, 33,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza I e 48,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de impureza N.

4.6.6.5.5 Preparo da solução padrão estoque de AZM para impurezas desconhecidas:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 16,0 mg do padrão referência de AZM e transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se, cerca de 12 mL de diluente e dissolveu-se em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 800,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.5.6 Preparo da solução de AZM no LQ do método (0,1% ou 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 72,34 mg do placebo do comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg de AZM) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Transferiu-se volumetricamente, 125 μL da solução padrão estoque de AZM para impurezas desconhecidas para esse mesmo balão volumétrico. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente, completou-se volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.5.7 Preparo da solução de AZM no LE do método (0,2% ou $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 72,34 mg do placebo do comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg de AZM) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Transferiu-se volumetricamente, 250 μL da solução padrão estoque de AZM para impurezas desconhecidas para esse mesmo balão volumétrico. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente, completou-se volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.5.8 Preparo da solução de AZM a 120% do LE das impurezas desconhecidas (0,24% ou $9,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 72,34 mg do placebo do comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg de AZM) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Transferiu-se volumetricamente, 300 μL da solução padrão estoque de AZM para impurezas desconhecidas para esse mesmo balão volumétrico. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente, completou-se volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: $9,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.5.9 Preparo da solução de AZM a 120% da concentração de trabalho do padrão análise de AZM (2,4% ou $96 \mu\text{g mL}^{-1}$) para impurezas desconhecidas:

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 72,34 mg do placebo do comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg de AZM) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Transferiu-se volumetricamente, 3 mL da solução padrão estoque de AZM para impurezas desconhecidas para esse mesmo balão volumétrico. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente, completou-se volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou em unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: $96,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.6.6 Robustez

A robustez do método foi contemplada no planejamento de experimento, conforme

descrito no item 4.2.5.

4.6.7 Monitoramento de seis lotes de medicamento oriundos de cinco detentores de registro disponíveis no mercado

O critério utilizado para escolha dos seis lotes de medicamento adquiridos de cinco detentores de registro de medicamento junto ao Ministério da Saúde distintos foi excetuando-se o medicamento referência (produto A), um *benchmarking* realizado com quatro detentores de registro do medicamento genérico objetivando elencar qual era o fabricante do IFA cada um destes detentores possuía homologado.

Para os medicamentos (produto acabado), comprimido revestido de 500mg, oriundos do detentor de registro do produto B, denominados B¹ e B², foram monitorados dois lotes distintos, processados com os IFAs oriundos dos fabricantes: Alfa e Beta. Para os demais, denominados produtos A, C, D e E foram monitorados um lote de cada um, processados com o IFA dos fabricantes “Não Informado”, Zeta, Gama e Alfa, respectivamente.

Para as análises cromatográficas foi utilizado o equipamento CLAE *Agilent Technologies 1260 Infinity II* - equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), *cooler* e software para aquisição e tratamento dos dados (*Waters Empower 3*).

O cálculo das concentrações foi realizado conforme equação descrita na **Figura 14**.

Figura 14 – Fórmula para cálculo das concentrações

AZM 500 mg comprimido revestido	
Peso dos 20 comprimidos (mg)	----- 500 mg x 20 de comprimidos
T.E.	----- X (100 mg) x Fr
$\% = \frac{AA \times CP (\mu\text{g mL}^{-1}) \times \text{Pot. pad.}}{AP \times CA (\mu\text{g mL}^{-1}) \times Fr}$	= % do Analito no medicamento (produto acabado).
$CP = \frac{PP (\text{mg})}{100,0} \times 1000$	= concentração de AZM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ na solução padrão de AZM, onde PP = Peso do padrão de AZM.
$CA = \frac{X (\text{mg})}{25,0} \times 1000$	= concentração de AZM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ na solução amostra, onde PA = Peso da amostra (AZM base)

Fonte: *USP-NF Azithromycin Tablets, 2022*

Onde: PP = peso do padrão de AZM (mg); TE = tomada de ensaio da amostra do produto AZM 500mg comprimido (mg); Pot. Pad. = potência do padrão da substância AZM na base tal qual (%); AA = área das impurezas detectadas na solução amostra; AP = área da substância AZM na solução padrão de AZM. Fr = Fator resposta relativo para cada impureza avaliada.

4.6.7.1 Preparo da solução amostra do produto AZM 500 mg comprimido revestido:

Pesou-se 20 comprimidos e determinou-se o peso médio. Em seguida, transferiu-os para um gral de porcelana e, com o auxílio de um pistilo, triturou-os até obter um pó fino. Transferiu-se quantitativamente, o equivalente a cerca de 100,0 mg do IFA AZM para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos. Completou o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou com unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: 4.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

4.6.7.2 Preparo da solução amostra do placebo do produto comprimido revestido:

Pesou-se, exatamente, cerca de 72,34 mg do placebo do produto Azitromicina 500mg comprimido revestido (equivalente a 100,0 mg do IFA azitromicina) e transferiu para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se, cerca de 15 mL de solução diluente e dissolveu em banho ultrassônico por 15 minutos, à temperatura ambiente. Completou-se o volume com solução diluente, homogeneizou e filtrou com unidade filtrante de PVDF 0,22 μm . Concentração final: equivalente a 4.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AZM.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que em virtude de variações ambientais, fase móvel, pH e fluxo de injeção o tempo de retenção do analito e conseqüentemente os picos cromatográficos podem sofrer alteração.

As imagens dos cromatogramas ilustradas neste trabalho foram obtidas dos relatórios emitidos do software *Empower 3* e *Lab Solutions*, licenciados, validados e respaldados pelas premissas de integridade de dados *ALCOA*. Assim, não foi possível exportar dados para obtenção dos cromatogramas em outro formato.

5.1 OTIMIZAÇÃO E ADEQUAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método otimizado apresentou melhor resolução entre os picos da impureza J, do composto relacionado F de AZM bem como reprodutibilidade dos fatores respostas das impurezas: J, composto relacionado F de AZM e impureza I, quando comparados aos valores especificados pela *USP*.

5.2 RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO - *DoE*

Pretendeu-se avaliar a resposta do método analítico descrito na monografia da *USP* aplicando padrão referência de identificação de picos de azitromicina *EP*, conforme proposto pela monografia da *BP*.

Em vista do não ajuste do modelo linear aos dados, foi verificado através do *software* estatístico qual seria o modelo mais adequado para a previsão dos resultados por meio do *Design of Experiment - (DoE)*. Dessa forma, foi verificado que o modelo mais condizente é uma regressão polinomial múltipla, na qual a equação que descreve a correlação entre as variáveis é:

$$\text{CRS} = 6,252 - 1,128 x_1 - 5,257 x_2 - 25,563 x_1x_2 + 5,816 x_2^2 + 33,600 x_1x_2^2 + 33,417 x_1^2x_2 - 14,381 x_2^2x_1$$

Onde: x_1 (variáveis de fluxo); x_2 (variáveis de temperatura); x_1x_2 (interação entre fluxo e temperatura).

Conforme **Figura 15**, procedeu-se com a análise de regressão polinomial múltipla aplicada aos dados do *DoE*, onde verificou-se que este modelo é capaz de prever com precisão

os possíveis resultados de *CRS*, uma vez que, R^2 ajustado foi igual a 0,9999. Ademais, o teste F confirmou o ajuste do modelo, visto que F foi igual a 10281,59 (p -valor > 0,05).

Figura 15 - Análise de regressão polinomial múltipla

Análise de Regressão: CRS versus x1; x2; x1x2						
Análise de Variância						
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P	
Regressão	7	10482,3	1497,47	10281,59	0,000	
x1	1	2,5	2,55	17,48	0,025	
x2	1	55,3	55,27	379,50	0,000	
x1x2	1	2613,9	2613,88	17946,86	0,000	
x2 ² x2	1	48,3	48,33	331,83	0,000	
x1x2 ² x1x2	1	1505,3	1505,25	10335,04	0,000	
x1 ² x1x2	1	1488,9	1488,89	10222,71	0,000	
x2 ² x1x2	1	275,8	275,75	1893,30	0,000	
Erro	3	0,4	0,15			
Falta de ajuste	1	0,1	0,08	0,44	0,575	
Erro puro	2	0,4	0,18	*	*	
Total	10	10482,7				

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	R2(pred)	
0,381635	100,00%	99,99%	*	

Coeficientes					
Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	6,252	0,171	36,63	0,000	
x1	-1,128	0,270	-4,18	0,025	3,00
x2	-5,257	0,270	-19,48	0,000	3,00
x1x2	-25,563	0,191	-133,97	0,000	1,00
x2 ² x2	5,816	0,319	18,22	0,000	1,91
x1x2 ² x1x2	33,600	0,331	101,66	0,000	1,91
x1 ² x1x2	33,417	0,331	101,11	0,000	3,00
x2 ² x1x2	-14,381	0,331	-43,51	0,000	3,00

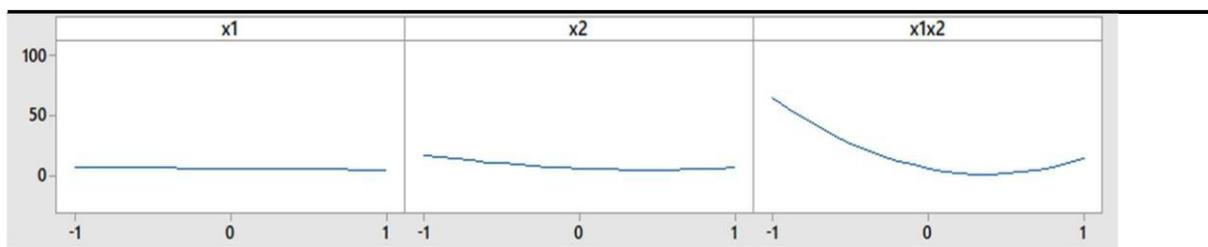
Equação de Regressão

$$CRS = 6,252 - 1,128 x1 - 5,257 x2 - 25,563 x1x2 + 5,816 x2^2x2 + 33,600 x1x2^2x1x2 + 33,417 x1^2x1x2 - 14,381 x2^2x1x2$$

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software MiniTab*, (2023)

A **Figura 16** descreveu os efeitos nos valores de *CRS* quando as variáveis cromatográficas do método são alteradas, sendo possível verificar, graficamente, o impacto da modificação do fluxo e temperatura na resolução das impurezas de *AZM*.

Figura 16 - Gráficos de Efeito para variáveis cromatográficas x *CRS*



Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software MiniTab*, (2023)

Portanto, aplicando a equação da reta obtida com a regressão adequada foi possível verificar qual o melhor valor para o parâmetro de resolução *CRS* a ser obtido considerando a interação entre as variáveis fluxo e temperatura, conforme **Tabela 26**.

Tabela 26 - Valores de CRS previstos pelo modelo de regressão polinomial múltipla

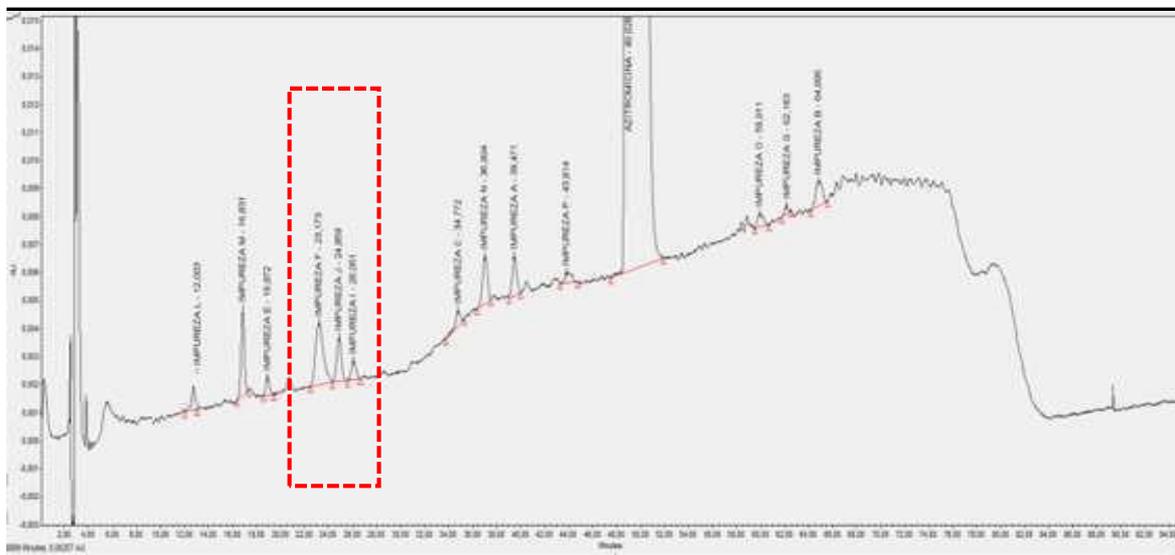
	{x1=-1;x2=-1}	{x1=-1;x2=0}	{x1=-1;x2=1}	{x1=0;x2=-1}	{x1=0;x2=0}	{x1=0;x2=1}	{x1=1;x2=-1}	{x1=1;x2=0}	{x1=1;x2=1}
CRS=	7,454	7,380	114,900	17,325	6,252	6,811	27,562	5,124	32,756
x1	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1
x2	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1
x1x2	1	0	-1	0	0	0	-1	0	1
(x2)^2	1	0	1	1	0	1	1	0	1
(x1x2)^2	1	0	1	0	0	0	1	0	1
x1*x1x2	-1	0	1	0	0	0	-1	0	1
x2*x1x2	-1	0	-1	0	0	0	1	0	1

↑
Menor valor de CRS

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Avaliando os valores de *CRS*, o melhor valor poderia ser obtido considerando fluxo de $1,1 \text{ mLmin}^{-1}$ e 55°C de temperatura do forno da coluna, com valor de *CRS* = 5,124. No entanto, o valor encontrado nos experimentos 5, 10 e 11 realizados em triplicata no ponto central considerando fluxo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ e 55°C de temperatura, segundo menor valor encontrado, *CRS*= 6,252 foi o escolhido, conforme **Figura 17**, onde evidenciou-se a resolução adequada dos pares críticos: Composto relacionado F de AZM, impurezas J e I.

Figura 17 - Eluição do padrão EPCRS de Azitromicina – $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ e 55°C



Legenda: Tempos de retenção (min.): Imp. F (22,750); Imp. J (24,408); Imp. I (25,506).

Resoluções: Imp. F (4,7); Imp. J (1,8) e Imp. I (1,6)

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2022

As razões para essa escolha foi o fato desta demandar um volume menor de fase móvel para performar as análises bem como foi a opção que apresentou maior resolução entre todos os picos. É recomendável que a resolução mínima entre os picos seja de 1,5 e esta condição foi

alcançada. Apesar do modelo de Regressão múltiplo ser capaz de prever os possíveis resultados de CRS, o posterior aprimoramento do estudo é necessário, com a execução do experimento com maior número de réplicas e interações, com o objetivo de obter um DoE ainda mais robusto.

5.3 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Conforme será apresentado a seguir, na validação do método analítico para determinação de impurezas orgânicas conhecidas bem como impurezas desconhecidas foram avaliados os parâmetros requeridos pela legislação vigente.

5.3.1 Seletividade

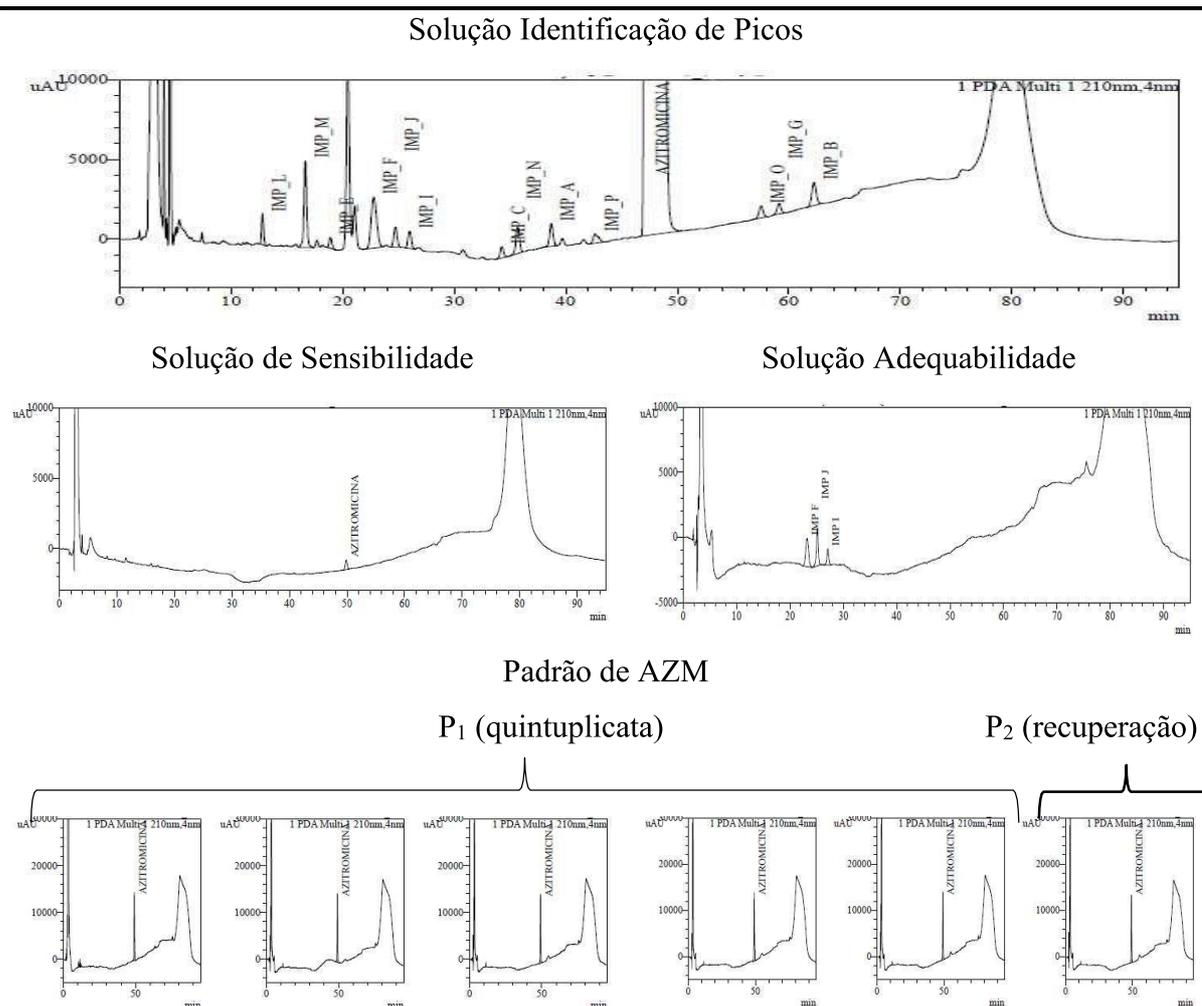
Demonstrou-se a seletividade do método uma vez que não houve interferência para integração dos picos nos tempos de retenção das soluções padrão e amostra de AZM, impurezas L, M, E, I, J, N e composto relacionado F de AZM, na avaliação da recuperação, os valores estipulados foram atingidos e para a pureza dos picos dos analitos, calculada através do software *Lab Solutions*, onde todos os valores de índice de impureza de pico (*peak impurity index*), que possível calcular, foram maiores ou iguais ao valores de limite de ponto único (*single point threshold*), confirmando existir pureza de pico. Ademais, demonstrou-se que no cromatograma da solução diluente não houve nenhum sinal analítico, ou seja, não houve interferência nos sinais dos padrões e da amostra.

Para a quantificação das impurezas orgânicas, adotou-se uma concentração teórica de $4.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tal estratégia se fez necessária pois na concentração mais baixa se quantificou adequadamente a AZM enquanto para as impurezas orgânicas, dado a baixa concentração presente, apenas em uma amostra mais concentrada foi possível quantificá-las.

5.3.1.1 Padrões/ Soluções de System

Através da **Figura 18** demonstrou-se os cromatogramas obtidos nas eluições de *system*: solução de sensibilidade, solução de adequabilidade, solução padrão de AZM P₁, solução padrão de AZM P₂ e solução padrão referência para identificação de picos de Azitromicina *European Pharmacopeia/EP*.

Figura 18 – Cromatogramas Soluções de System– Seletividade

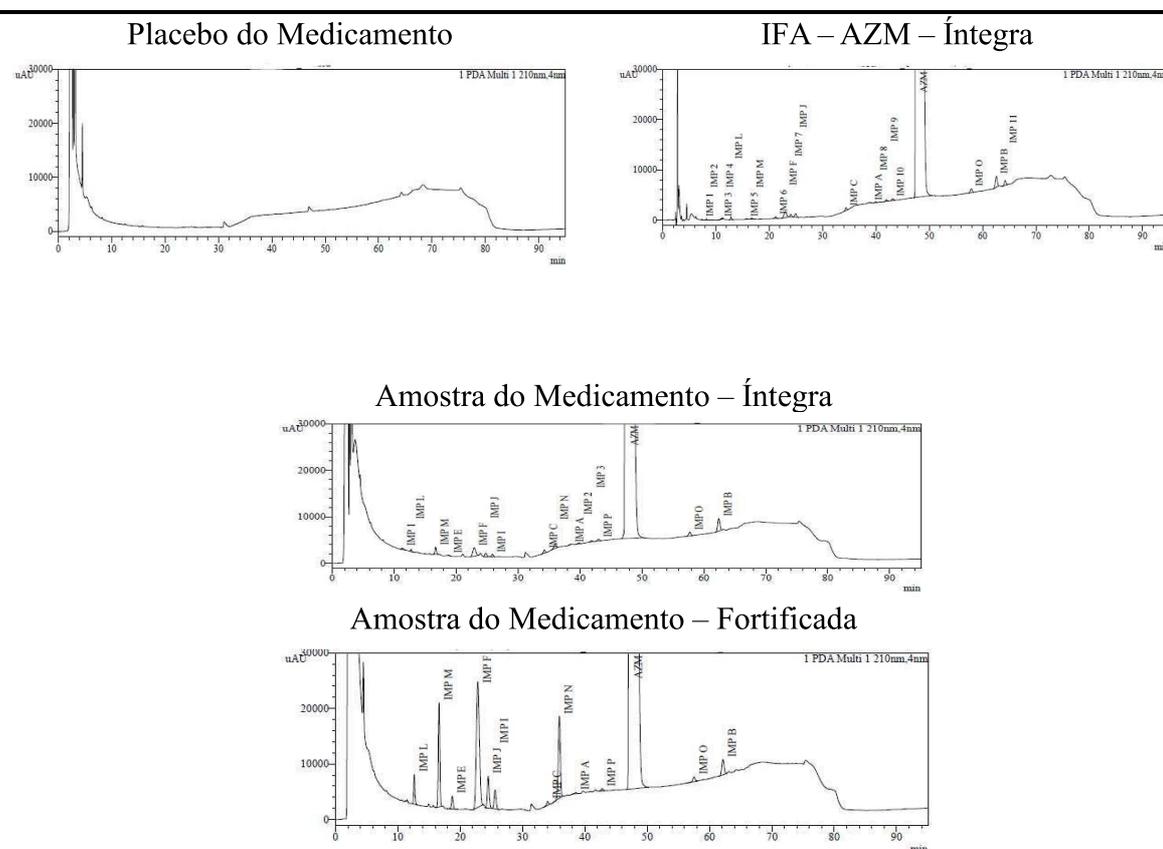


Fonte: Elaborado pelo autor, através do software *Waters Empower*, 2023

5.3.1.2 Amostra fortificada e amostra íntegra

Conforme **Figura 19** e **Tabela 27**, os picos dos analitos nos cromatogramas da amostra do medicamento (produto acabado) contaminada, amostras do medicamento e do IFA AZM íntegras apresentaram tempos de retenção semelhantes aos padrões. Assim sendo, confirmou-se que os mesmos analitos presentes na solução padrão também estavam presentes na amostra.

Figura 19 – Cromatograma Impureza Orgânica – Seletividade – Amostra Fortificada e Amostra Íntegra



Fonte: próprio autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Tabela 27 – Resultados das Amostras Fortificada e Íntegra

Analito	IFA Íntegro			Placebo tr (min.) / trr (min.) / Conc. exp. (%)	Medicamento Íntegro			Medicamento Contaminado - LE		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)		tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	12,81	0,27	0,09	—	12,72	0,27	0,08	12,63	0,27	1,00
Impureza M	16,73	0,35	0,01	—	16,69	0,35	0,07	16,61	0,35	0,87
Impureza E	—	—	—	—	18,84	0,40	0,02	18,72	0,40	0,41
Composto relacionado F de AZM	22,97	0,48	0,04	—	22,92	0,48	0,06	22,83	0,48	0,77
Impureza J	24,92	0,53	0,05	—	24,77	0,52	0,05	24,50	0,52	0,45
Impureza I	—	—	—	—	25,87	0,55	0,10	25,60	0,54	0,65
Impureza N	—	—	—	—	35,99	0,76	0,07	35,91	0,76	0,94
Imp. Desc. 1	7,34	0,16	0,01	—	11,29	0,24	0,03	—	—	—
Imp. Desc. 2	8,20	0,17	0,01	—	39,83	0,84	0,03	—	—	—
Imp. Desc. 3	10,83	0,23	0,00	—	41,87	0,88	0,03	—	—	—

Imp. Desc. 4	11,09	0,23	0,01	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 5	15,74	0,33	0,01	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 6	21,19	0,45	0,03	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 7	24,03	0,51	0,05	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 8	39,95	0,84	0,02	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 9	41,96	0,89	0,04	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 10	43,14	0,91	0,04	–	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 11	64,23	1,35	0,11	–	–	–	–	–	–	–
Total de Impurezas		0,52		–		0,54			5,09	
Doseamento de AZM		100,57		–		97,67			97,46	
Balanço de Massas		101,09		–		98,21			102,55	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.3 Condição de estresse

Conforme **Figuras 20 a 33** e **Tabelas 28 a 34**, os picos dos analitos no cromatograma da amostra apresentaram tempos de retenção semelhantes aos padrões. Assim sendo, confirmou-se que os mesmos analitos presentes na solução padrão também estavam presentes na amostra.

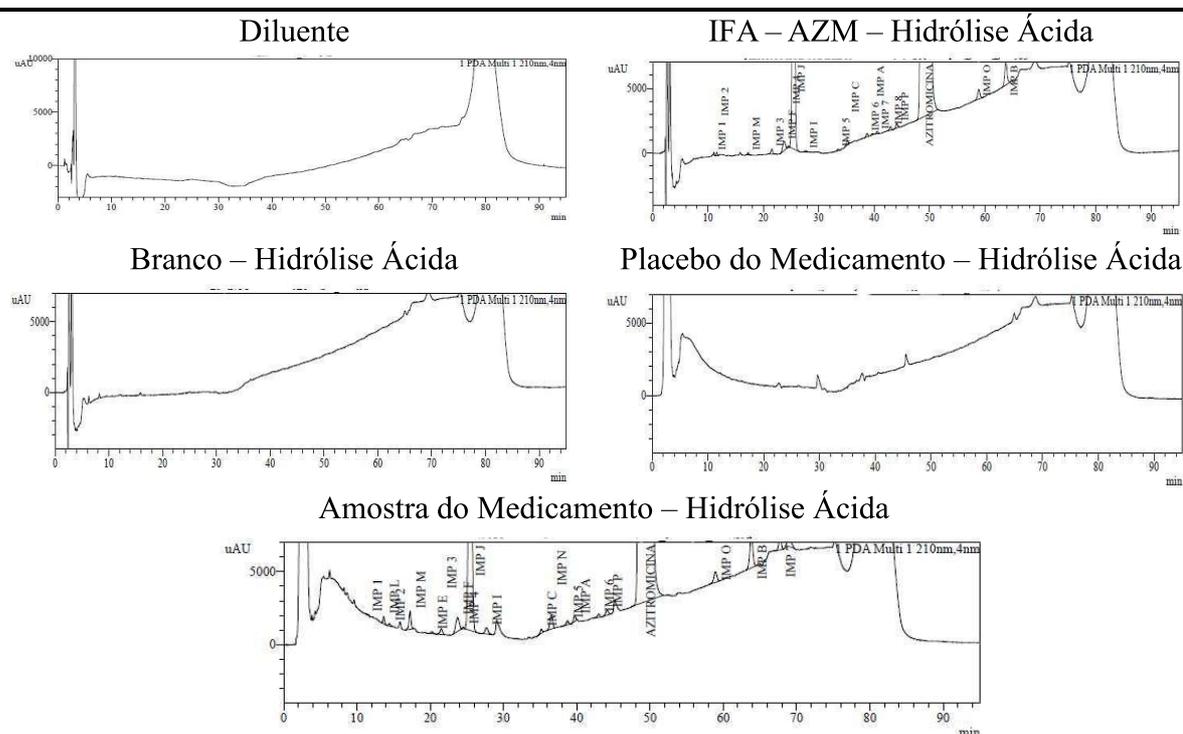
Impureza M e Composto relacionado F de AZM, as únicas que apresentam rotâmeros, dado a proximidade de seus tempos de retenção tiveram suas áreas somadas e foram expressos como única impureza. Para as sete impurezas orgânicas conhecidas, as purezas de picos foram avaliadas e todos os resultados encontrados cumpriram com o especificado em todas as condições de estresse monitoradas.

5.3.1.3.1 Hidrólise ácida

Na condição de estresse ácido o IFA apresentou degradação significativa, sendo observada formação majoritária da impureza J em todas as amostras avaliadas. A AZM possui um nitrogênio substituído com um grupo metila na posição 9a do anel aglicona, bloqueando a via de desidratação interna e conferindo um pouco mais de estabilidade quando comparada com outros antibióticos semelhantes. Nesse processo, ocorre a sua degradação, principalmente por hidrólise catalisada na presença de ácido, com a reação ocorrendo com o éter da molécula de açúcar cladinose. A partir da clivagem da ligação b-glicosídica, o átomo de oxigênio fica no anel da lactona formando uma hidroxila.

Através da **Figura 20** demonstrou-se os cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade na condição de estresse ácido.

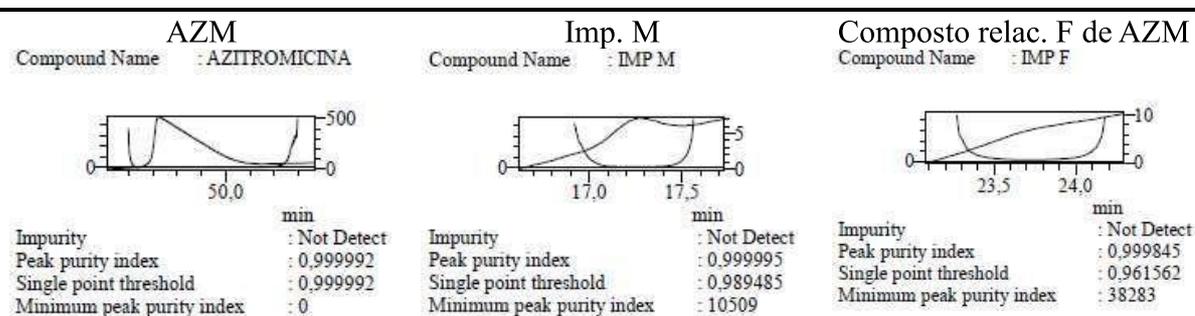
Figura 20 – Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Hidrólise Ácida



Fonte: Elaborado pelo autor, através do software *Waters Empower*, 2023

Através da **Figura 21**, pode-se observar a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição de estresse ácido. A condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada.

Figura 21 – Pureza de Pico – AZM, Imp. M e Comp. relac. F de AZM – Hidrólise Ácida



Fonte: Elaborado pelo autor, através do software *Waters Empower*, 2023

Para a condição de estresse ácido, através da **Tabela 28**, demonstrou-se os resultados encontrados para o IFA, o placebo e o medicamento (produto acabado).

Tabela 28 – Resultados Seletividade - Hidrólise Ácida

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	–	–	–	–	–	–	13,70	0,28	0,09
Impureza M	17,30	0,36	0,01	–	–	–	17,30	0,36	0,07
Impureza E	–	–	–	–	–	–	20,20	0,42	0,02
Composto relacionado F de AZM	23,80	0,49	0,02	–	–	–	23,80	0,49	0,03
Impureza J	25,40	0,52	4,85	–	–	–	25,40	0,52	3,92
Impureza I	27,60	0,57	0,03	–	–	–	27,70	0,57	0,11
Impureza C	35,20	0,72	0,04	–	–	–	35,20	0,72	0,03
Impureza N	–	–	–	–	–	–	36,50	0,75	0,07
Impureza P	44,10	0,91	0,04	–	–	–	44,10	0,91	0,05
Imp. Desc. 1	11,10	0,23	0,01	–	–	–	11,30	0,23	0,01
Imp. Desc. 2	11,60	0,25	0,02	–	–	–	14,50	0,30	0,01
Imp. Desc. 3	21,50	0,44	0,05	–	–	–	21,50	0,44	0,05
Imp. Desc. 4	24,50	0,51	0,01	–	–	–	24,50	0,51	0,01
Imp. Desc. 5	33,50	0,69	0,01	–	–	–	38,80	0,80	0,03
Imp. Desc. 6	38,70	0,80	0,03	–	–	–	43,00	0,89	0,03
Imp. Desc. 7	40,60	0,84	0,02	–	–	–	67,70	1,39	0,12
Imp. Desc. 8	42,90	0,89	0,03	–	–	–	–	–	–
Total de Impurezas		5,17		–	–	–		4,66	
Doseamento de AZM		93,15		–	–	–		89,75	
Balanço de Massas		98,32		–	–	–		94,41	
Amostra íntegra		101,15		–	–	–		98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

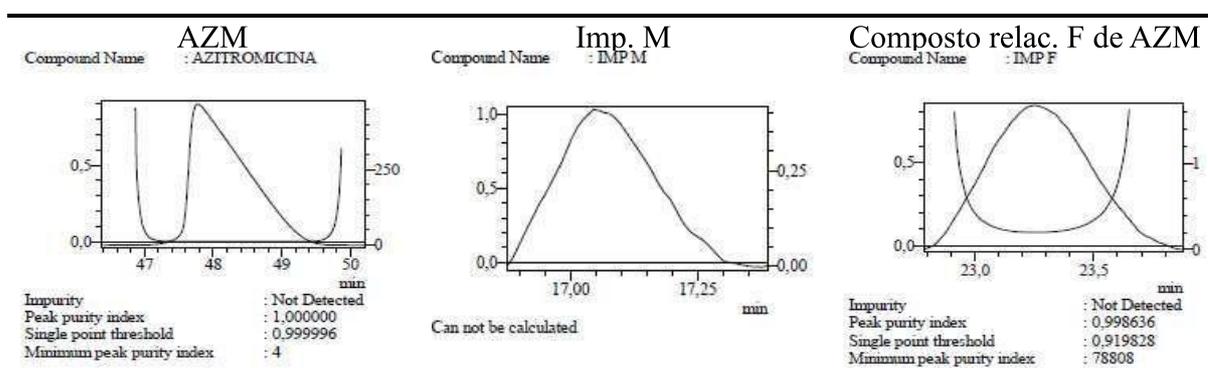
5.3.1.3.2 Hidrólise alcalina

Na condição de estresse alcalino o IFA apresentou degradação, sendo observada formação majoritária de uma impureza desconhecida 5 (TRR 0,65) e uma pequena formação de uma outra impureza desconhecida 2 (TRR 0,45), tanto no IFA isolado quanto na amostra do medicamento. Além disso, foi observado um aumento na impureza L apenas para o medicamento (produto acabado). Destacou-se que, ao contrário do observado para a hidrólise ácida, os níveis de impurezas M, F e J inicialmente detectados na amostra íntegra, foram

significativamente alterados após submissão das amostras à condição de estresse alcalino. Assim, é razoável afirmar que até as impurezas de degradação podem sofrer degradação secundária nessa condição. A AZM tem uma estabilidade maior em condições alcalinas em comparação às ácidas. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar uma ligeira susceptibilidade de degradação do IFA frente a condições de hidrólise alcalina, sendo a impureza desconhecida 5, o principal produto de degradação detectado nessa condição.

Através da **Figura 22**, pode-se observar a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição de estresse ácido. A condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada para a AZM e para o composto relacionado F de AZM. Para a impureza M, não pode ser calculado.

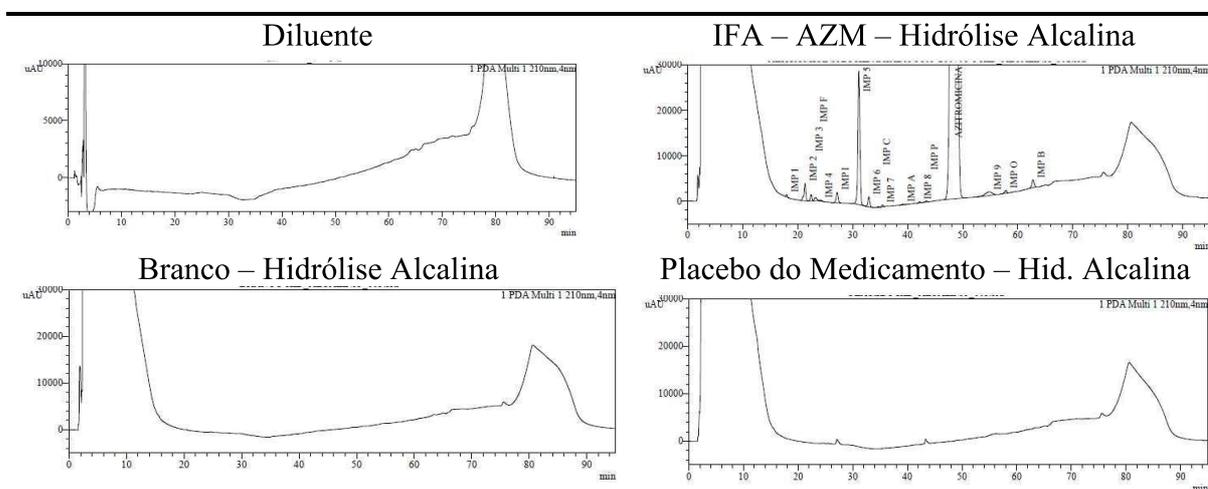
Figura 22 – Pureza de Pico – AZM, Imp. M e Comp. rela. F de AZM – Hid. Alcalina



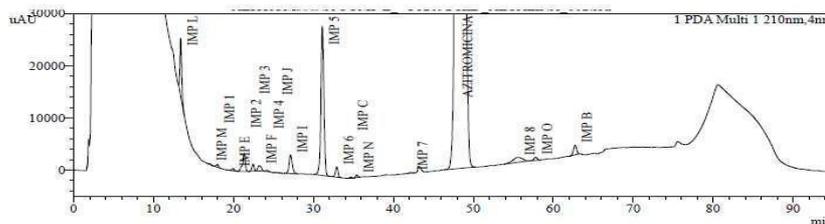
Fonte: Elaborado pelo autor, através do software Waters Empower, 2023

Através da **Figura 23** demonstrou-se os cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade na condição de estresse alcalino.

Figura 23 – Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade - Hidrólise Alcalina



Amostra do Medicamento – Hid. Alcalina



Fonte: Elaborado pelo autor, através do software *Waters Empower*, 2023

Através da **Tabela 29**, demonstrou-se os resultados encontrados para o IFA, o placebo e o medicamento (produto acabado) para a condição de estresse alcalino.

Tabela 29 – Resultados Seletividade - Hidrólise Alcalina

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	—	—	—	—	—	—	13,39	0,28	2,06
Impureza M	—	—	—	—	—	—	17,02	0,36	0,01
Impureza E	—	—	—	—	—	—	19,93	0,42	0,08
Composto relacionado F	23,27	0,49	0,02	—	—	—	23,25	0,49	0,03
Impureza J	—	—	—	—	—	—	25,25	0,53	0,01
Impureza I	27,18	0,57	0,5	—	—	—	27,13	0,57	0,86
Impureza C	34,66	0,73	0,02	—	—	—	34,66	0,73	0,02
Impureza N	—	—	—	—	—	—	35,42	0,74	0,02
Impureza P	43,39	0,91	0,04	—	—	—	—	—	—
Imp. Desc. 1	18,01	0,38	0,04	—	—	—	18	0,38	0,05
Imp. Desc. 2	21,34	0,45	0,44	—	—	—	21,33	0,45	0,41
Imp. Desc. 3	22,44	0,47	0,15	—	—	—	22,44	0,47	0,13
Imp. Desc. 4	24,18	0,51	0,03	—	—	—	24,18	0,51	0,02
Imp. Desc. 5	31,12	0,65	3,73	—	—	—	31,11	0,65	3,58
Imp. Desc. 6	32,94	0,69	0,25	—	—	—	32,93	0,69	0,21
Imp. Desc. 7	35,42	0,74	0,04	—	—	—	42,18	0,88	0,02
Imp. Desc. 8	42,19	0,88	0,25	—	—	—	55,62	1,16	0,39
Imp. Desc. 9	54,85	1,15	0,36	—	—	—	—	—	—
Total de Impurezas		5,65						7,91	
Doseamento de AZM		93,86						90,13	
Balanco de Massas		99,51						98,04	
Amostra íntegra		101,15						98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

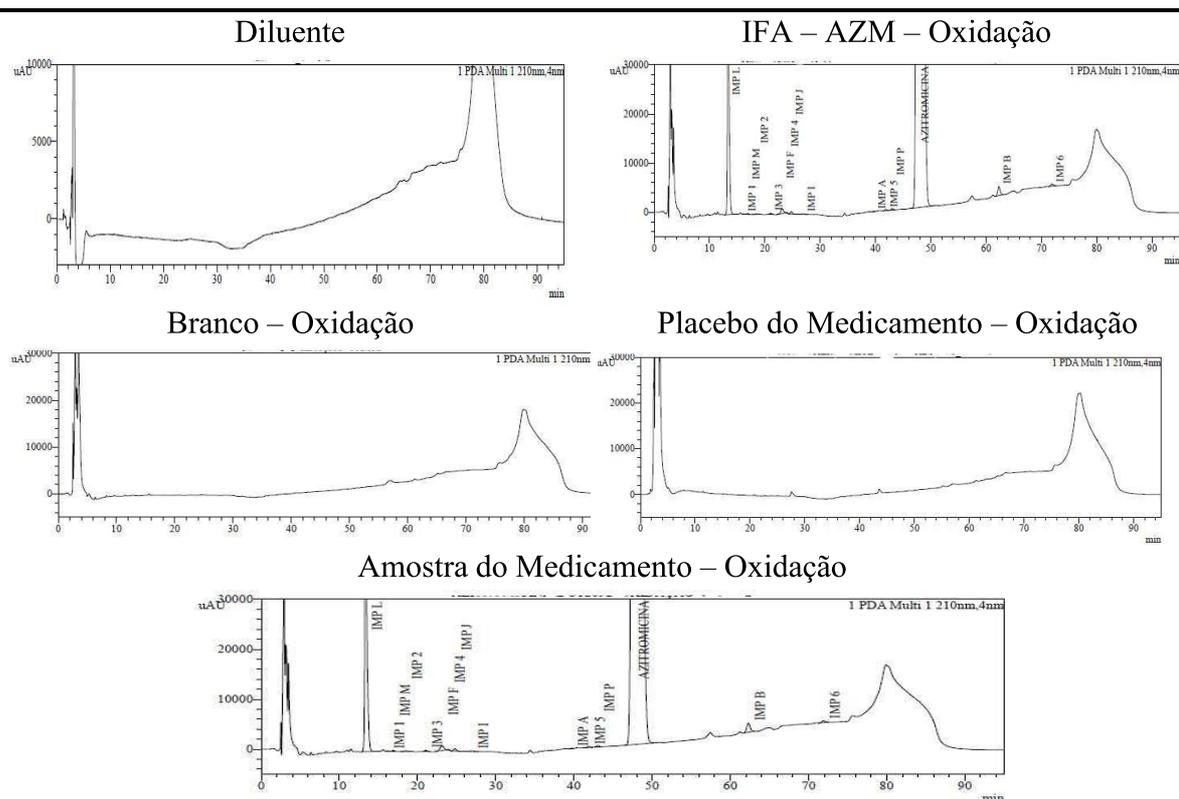
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.3.3 Oxidação

Na condição de estresse oxidativo o IFA apresentou extensa degradação, sendo observada a formação majoritária da impureza L:13,09%. Dessa forma, é razoável afirmar que a AZM pode apresentar a formação da impureza L e há a possibilidade de formação de degradação secundários oriundo desta impureza. Esse processo possivelmente ocorre de forma paralela ao de hidrólise. A patente EP 1606299 A1, citada anteriormente, descreveu os principais produtos de oxidação, sendo todos decorrentes de processos no grupamento amina terciária axial da desosamina (posição C-5 do radical). Partem desse grupamento a formação do óxido nitroso, a formação de um radical formila com conseqüente desmetilação, além da completa eliminação do radical nitrogenado com obtenção de uma carbonila na posição originária (C-5).

Através da **Figura 24** demonstrou-se os cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade na condição de estresse oxidativo.

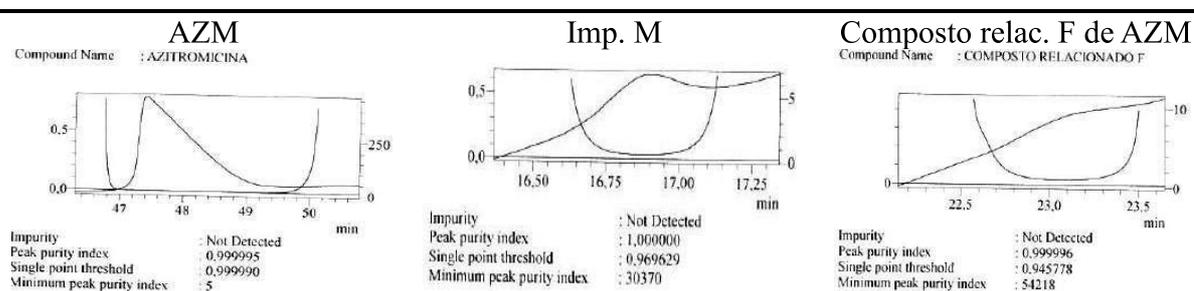
Figura 24 – Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade – Oxidação



Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Conforme demonstrado através da **Figura 25**, a condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada confirmando assim a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição de estresse oxidativo.

Figura 25 – Pureza de Pico – AZM, Imp. M e Comp. rela. F de AZM – Oxidação



Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Através da **Tabela 30** demonstrou-se os resultados encontrados para o IFA, o placebo e o medicamento (produto acabado) para a condição de estresse oxidativo.

Tabela 30 - Resultados Seletividade – Oxidação

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	13,34	0,28	12,43	–	–	–	13,29	0,28	13,09
Impureza M	16,90	0,36	0,01	–	–	–	16,88	0,36	0,07
Impureza E	–	–	–	–	–	–	19,52	0,41	0,02
Composto relacionado F	23,13	0,49	0,03	–	–	–	23,06	0,49	0,05
Impureza J	24,78	0,52	0,04	–	–	–	24,72	0,52	0,04
Impureza I	26,95	0,57	0,05	–	–	–	26,88	0,57	0,06
Impureza C	–	–	–	–	–	–	34,32	0,72	0,07
Impureza N	–	–	–	–	–	–	35,68	0,75	0,05
Impureza P	43,04	0,91	0,04	–	–	–	–	–	–
Imp. Desc. 1	9,91	1,82	0,01	–	–	–	16,15	0,34	0,01
Imp. Desc. 2	18,48	0,39	0,03	–	–	–	23,88	0,5	0,02
Imp. Desc. 3	21,06	0,44	0,03	–	–	–	41,82	0,88	0,02
Imp. Desc. 4	23,93	0,50	0,02	–	–	–	43,00	0,91	0,01
Imp. Desc. 5	41,89	0,88	0,03	–	–	–	60,02	1,27	0,01
Imp. Desc. 6	71,92	1,52	0,06	–	–	–	–	–	–
Total de Impurezas		12,77						13,52	
Doseamento de AZM		88,39						89,25	
Balanço de Massas		101,16						102,77	
Amostra íntegra		101,15						98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

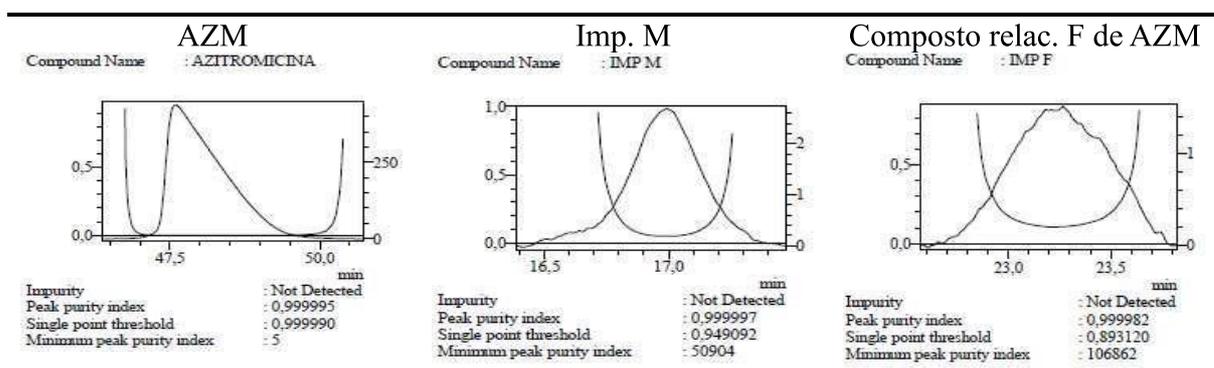
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.3.4 Íons metálicos

Não houve degradação considerável nessa condição estressante. Obteve-se um balanço de massas levemente positivo com formação de poucas impurezas relevantes. É importante mencionar que, apesar das reações envolvendo íons metálicos tem por objetivo avaliar o efeito catalítico destes nas reações de oxidação com possíveis radicais presentes na formulação do medicamento, o íon Cu (II) apresenta caráter oxidante ($E^\circ = +0,337$ V, para a reação de redução), podendo levar a oxidação de compostos por si só.

Através da **Figura 26**, pode-se observar a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição por íons metálicos. A condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada.

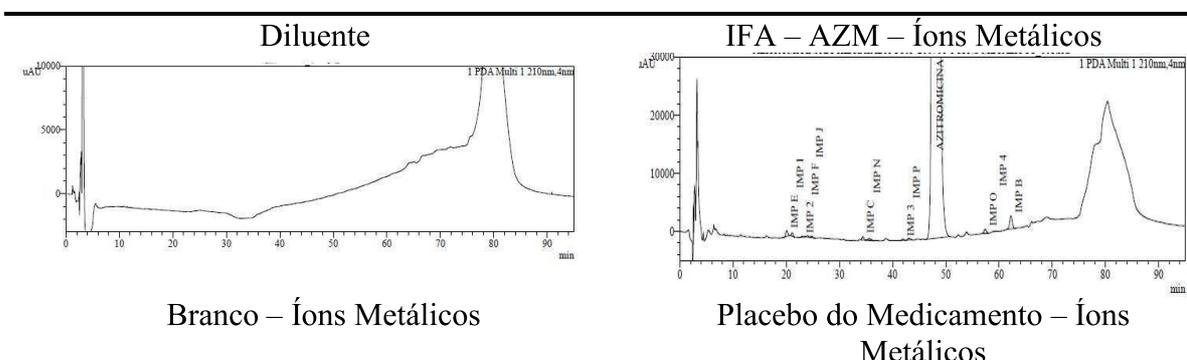
Figura 26 - Pureza de Pico – AZM, Imp. M e Comp. rela. F de AZM – Íons Metálicos

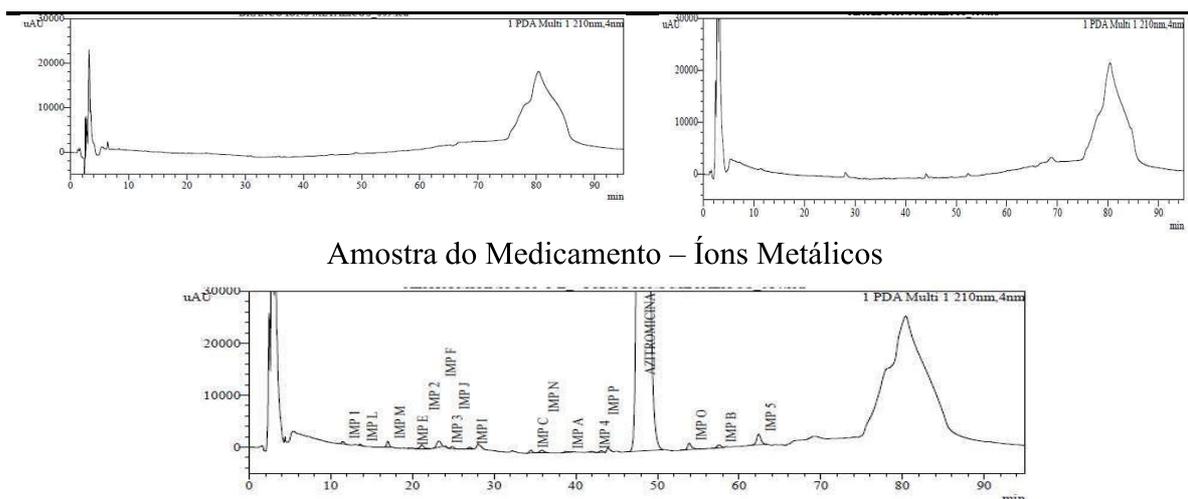


Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Através da **Figura 27** demonstrou-se os cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade na condição de estresse com íons metálicos.

Figura 27 – Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade – Íons Metálicos





Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Para a condição de estresse por íons metálicos, através da **Tabela 31**, demonstrou-se os resultados encontrados para o IFA, o placebo e o medicamento (produto acabado).

Tabela 31 - Resultados Seletividade - Íons Metálicos

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	—	—	—	—	—	—	13,59	0,29	0,04
Impureza M	—	—	—	—	—	—	16,99	0,36	0,07
Impureza E	20,07	0,42	0,25	—	—	—	19,80	0,42	0,03
Composto relacionado F de AZM	23,95	0,51	0,01	—	—	—	23,24	0,49	0,04
Impureza J	24,79	0,52	0,02	—	—	—	24,88	0,52	0,04
Impureza I	—	—	—	—	—	—	27,04	0,57	0,09
Impureza C	34,38	0,73	0,07	—	—	—	34,49	0,73	0,06
Impureza N	35,60	0,75	0,04	—	—	—	35,82	0,75	0,05
Impureza P	43,01	0,91	0,05	—	—	—	43,12	0,91	0,04
Imp. Desc. 1	21,09	0,45	0,07	—	—	—	11,44	0,24	0,06
Imp. Desc. 2	22,98	0,48	0,02	—	—	—	21,17	0,45	0,12
Imp. Desc. 3	41,91	0,88	0,03	—	—	—	24,01	0,50	0,02
Imp. Desc. 4	59,29	1,25	0,01	—	—	—	42,05	0,88	0,02
Imp. Desc. 5	—	—	—	—	—	—	62,39	1,31	0,40
Total de Impurezas		0,56						1,09	
Doseamento de AZM		101,72						97,60	
Balanço de Massas		102,28						98,68	
Amostra íntegra		101,15						98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

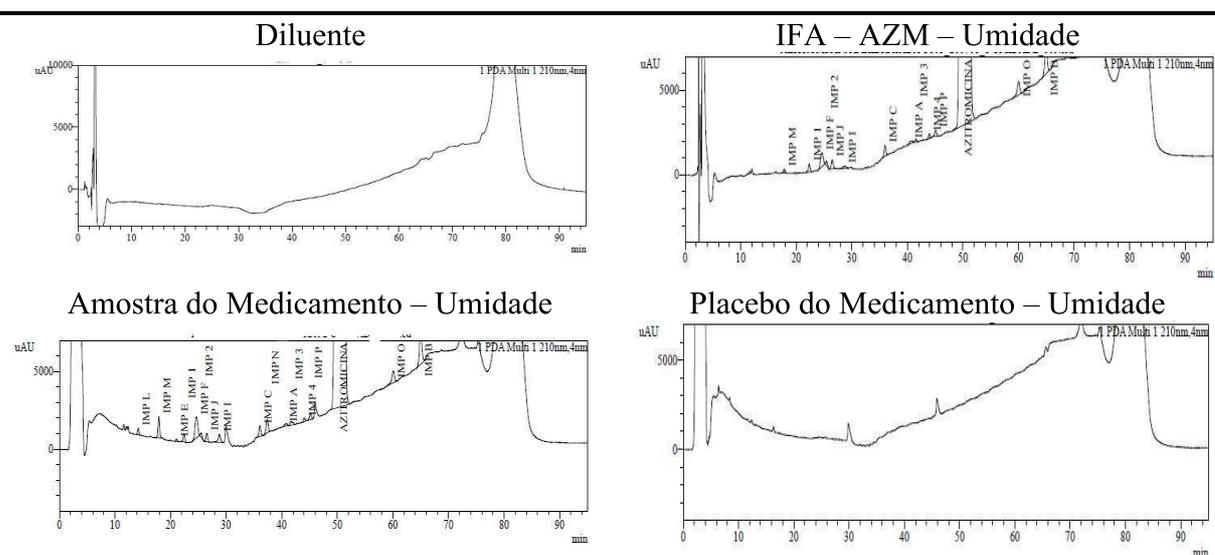
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.3.5 Umidade

Para este estudo, o IFA mostrou-se consideravelmente estável, seja isolado ou na formulação, não apresentando nenhum produto de degradação em níveis diferentes dos obtidos para a amostra íntegra.

Através da **Figura 28** demonstrou-se os cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade na condição de estresse por umidade.

Figura 28 - Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade – Umidade



Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Conforme demonstrado através da **Figura 29**, a condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada confirmando assim a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição de estresse por umidade.

Figura 29 - Pureza de Pico – AZM, Imp. M e Comp. rela. F de AZM – Umidade

AZM		Imp. M		Composto rela. F de AZM	
Compound Name	: AZITROMICINA	Compound Name	: IMP M	Compound Name	: IMP F
Impurity	: Not Detect	Impurity	: Not Detect	Impurity	: Not Detect
Peak purity index	: 0.999999	Peak purity index	: 0.999995	Peak purity index	: 0.999952
Single point threshold	: 0.999961	Single point threshold	: 0.909852	Single point threshold	: 0.814311
Minimum peak purity index	: 38	Minimum peak purity index	: 90143	Minimum peak purity index	: 185640

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Através da **Tabela 32**, demonstrou-se os resultados encontrados para o IFA, o placebo e o medicamento (produto acabado) para a condição de estresse por umidade.

Tabela 32 - Resultados Seletividade - Umidade

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L				–	–	–	14,20	0,29	0,09
Impureza M	17,90	0,36	0,01	–	–	–	17,90	0,36	0,08
Impureza E				–	–	–	21,10	0,42	0,03
Composto relacionado F de AZM	24,60	0,50	0,03	–	–	–	24,70	0,50	0,05
Impureza J	26,50	0,54	0,05	–	–	–	26,50	0,53	0,05
Impureza I	28,70	0,58	0,05	–	–	–	28,80	0,58	0,13
Impureza C	36,00	0,73	0,07	–	–	–	36,10	0,73	0,08
Impureza N				–	–	–	37,40	0,75	0,06
Impureza P	45,10	0,91	0,04	–	–	–	45,20	0,91	0,05
Imp. Desc. 1	22,40	0,45	0,06	–	–	–	22,40	0,45	0,05
Imp. Desc. 2	25,40	0,51	0,03	–	–	–	25,50	0,51	0,03
Imp. Desc. 3	41,50	0,84	0,02	–	–	–	41,70	0,84	0,05
Imp. Desc. 4	43,90	0,89	0,03	–	–	–	44,10	0,89	0,03
Total de Impurezas		0,39		–	–	–		0,77	
Doseamento de AZM		100,13		–	–	–		97,95	
Balanço de Massas		100,52		–	–	–		98,72	
Amostra íntegra		101,15		–	–	–		98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.3.6 Aquecimento

Para este estudo, o IFA mostrou-se consideravelmente estável, seja isolado ou na formulação, não apresentando nenhum produto de degradação em níveis diferentes dos obtidos para a amostra íntegra.

Conforme demonstrado através da **Figura 30**, a condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada confirmando assim a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição de estresse por aquecimento.

Tabela 33 - Resultados Seletividade Aquecimento

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	13,80	0,28	0,03	–	–	–	14,10	0,29	0,73
Impureza M	18,00	0,36	0,13	–	–	–	17,90	0,36	0,46
Impureza E	21,20	0,43	0,07	–	–	–	20,00	0,40	0,04
Composto relacionado F de AZM	24,70	0,50	0,24	–	–	–	24,60	0,50	0,24
Impureza J	26,50	0,54	0,06	–	–	–	26,40	0,53	0,11
Impureza I	28,90	0,58	0,23	–	–	–	28,70	0,58	0,62
Impureza C	36,20	0,73	0,07	–	–	–	36,00	0,73	0,08
Impureza N	37,50	0,76	0,04	–	–	–	37,30	0,75	0,28
Impureza P	45,20	0,91	0,04	–	–	–	45,00	0,91	0,04
Imp. Desc. 1	14,30	0,29	0,02	–	–	–	21,00	0,43	0,08
Imp. Desc. 2	16,90	0,34	0,02	–	–	–	22,40	0,45	0,07
Imp. Desc. 3	22,50	0,45	0,05	–	–	–	25,30	0,51	0,01
Imp. Desc. 4	34,60	0,70	0,03	–	–	–	39,40	0,80	0,09
Imp. Desc. 5	38,60	0,78	0,02	–	–	–	41,50	0,84	0,01
Imp. Desc. 6	41,70	0,84	0,03	–	–	–	42,00	0,85	0,03
Imp. Desc. 7	44,10	0,89	0,04	–	–	–	43,80	0,89	0,02
Total de Impurezas		1,11		–	–	–		2,89	
Doseamento de AZM		100,70		–	–	–		97,05	
Balanço de Massas		101,81		–	–	–		99,94	
Amostra íntegra		101,15		–	–	–		98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

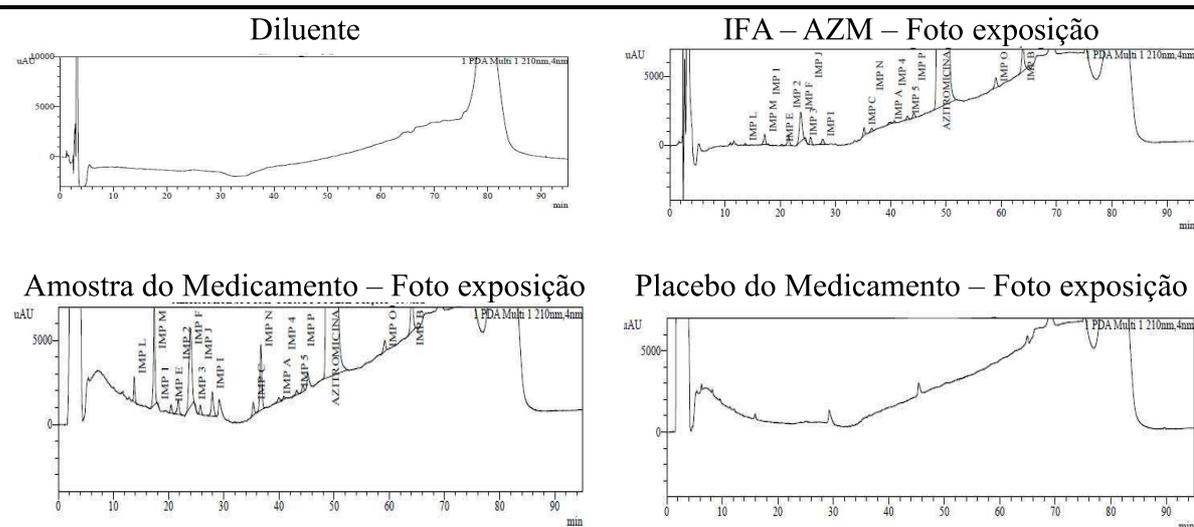
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.3.7 Fotoexposição

O IFA AZM se mostrou estável após exposição à condição de fotoexposição, com formação de produtos de degradação de baixa intensidade, com destaque para o composto relacionado F de AZM e a impureza I para o IFA isolado. Em relação a amostra do medicamento, destacaram-se as impurezas L, M, I, N e o composto relacionado F com valores encontrados maior que 0,10%.

Através da **Figura 32** demonstrou-se os cromatogramas obtidos para o parâmetro seletividade na condição de fotoexposição.

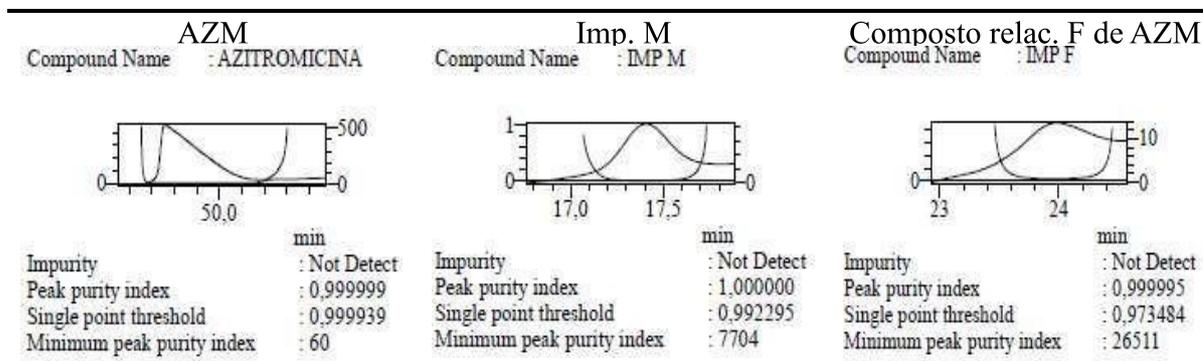
Figura 32 – Cromatogramas Impurezas Orgânicas – Seletividade – Fotoexposição



Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Através da **Figura 33**, pode-se observar a pureza de pico da AZM, Impureza M e Composto relacionado F de AZM para o parâmetro seletividade na condição por fotoexposição. A condição de *purity index* igual ou maior que zero, foi alcançada.

Figura 33 – Pureza de Pico – AZM, Imp. M e C. relac. F de AZM – Fotoexposição



Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower*, 2023

Para a condição de estresse por fotoexposição, através da **Tabela 34**, demonstrou-se os resultados encontrados para o IFA, o placebo e o medicamento (produto acabado).

Tabela 34 - Resultados Seletividade - Fotoexposição

Analito	IFA			Placebo			Medicamento		
	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)	tr (min.)	trr (min.)	Conc. exp. (%)
Impureza L	13,60	0,28	0,03	–	–	–	13,80	0,28	0,31
Impureza M	17,20	0,35	0,05	–	–	–	17,40	0,36	0,34
Impureza E	20,30	0,42	0,02	–	–	–	20,40	0,42	0,10
Composto relacionado F de AZM	23,70	0,49	0,08	–	–	–	24,00	0,49	0,17
Impureza J	25,50	0,53	0,05	–	–	–	25,80	0,53	0,05
Impureza I	27,70	0,57	0,10	–	–	–	27,90	0,57	0,36
Impureza C	35,20	0,72	0,06	–	–	–	35,40	0,73	0,09
Impureza N	36,60	0,75	0,02	–	–	–	36,70	0,75	0,26
Impureza P	44,10	0,91	0,05	–	–	–	44,30	0,91	0,04
Imp. Desc. 1	17,80	0,37	0,01	–	–	–	17,90	0,37	0,01
Imp. Desc. 2	21,50	0,44	0,10	–	–	–	21,80	0,45	0,11
Imp. Desc. 3	24,50	0,50	0,02	–	–	–	24,60	0,51	0,01
Imp. Desc. 4	40,60	0,84	0,02	–	–	–	40,90	0,84	0,02
Imp. Desc. 5	43,00	0,89	0,03	–	–	–	43,20	0,89	0,04
Total de Impurezas		0,61		–	–	–		1,91	
Doseamento de AZM		99,02		–	–	–		96,76	
Balanço de Massas		99,63		–	–	–		98,67	
Amostra íntegra		101,15		–	–	–		98,32	

Legenda: tr (tempo de retenção); trr (tempo de retenção relativo)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.1.4 Impurezas Individuais

Os cromatogramas e gráficos de pureza de pico obtidos para as injeções das impurezas isoladas, demonstram que o método apresentou seletividade para todas as impurezas avaliadas. Adicionalmente, para a amostra fortificada com as respectivas impurezas orgânicas conhecidas, os resultados de recuperação obtidos indicaram recuperações satisfatórias, conforme demonstrado na **Tabela 35**. O método se mostrou seletivo para a avaliação das impurezas orgânicas conhecidas e desconhecidas do medicamento (produto acabado).

Tabela 35 – Resultados da Recuperação

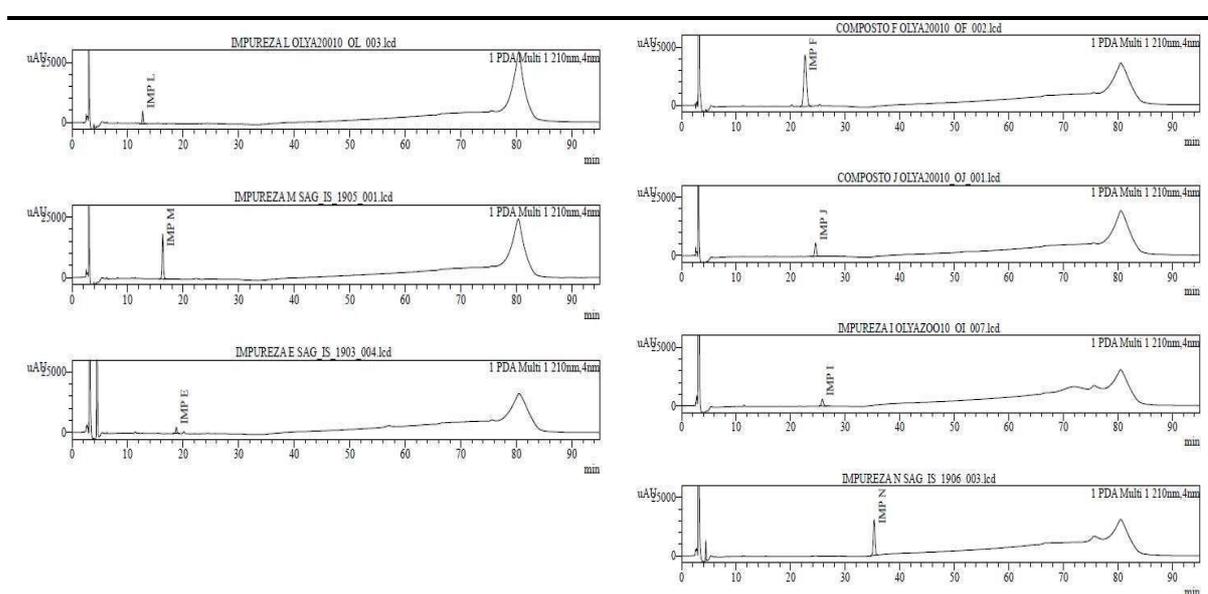
Analito	Conc. exp. (%)	Recuperação (%)
Impureza L	1,0	101,30
Impureza M	1,0	95,67
Impureza E	0,5	82,93
Composto relacionado F de AZM	1,0	84,88

Impureza J	0,5	81,01
Impureza I	0,7	90,66
Impureza N	1,0	91,43

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Demonstrou-se, através da **Figura 34**, os cromatogramas de injeção dos padrões das impurezas L, M, E, composto relacionado F de AZM, I, J e N.

Figura 34 – Cromatogramas dos Padrões de Impurezas Orgânicas Conhecidas Individuais



Legenda: Padrões de impurezas orgânicas conhecidas individuais. Tempos de retenção (min.): Imp. L (12,730); Imp. M (16,320); Imp. E (18,769); Imp. F (22,636); Imp. J (24,560); Imp. I (25,793) e Imp. N (35,309).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

5.3.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Avaliou-se os parâmetros cromatográficos referente a determinação do LD e do LQ, em 3 níveis, para a AZM e as impurezas orgânicas conhecidas, conforme **Tabela 36**.

Tabela 36 – Resultado dos parâmetros cromatográficos de LD e LQ

Analito	Limite/ Amostra	tr (min.)	Área	Fator Caudal	Nº Pratos Teóricos	S/N
Azitromicina	LD A1	48,061	6340	1,0	85964	14,6
	LQ A1	48,020	18367	1,1	78376	48,4
	LQ A2	47,956	18134	1,1	81771	59,8
	LQ A3	47,949	17041	1,1	78429	38,8
	LD A1	13,008	2958	1,1	17848	15,3

Impureza L	LQ A1	12,627	7861	1,1	16917	22,3
	LQ A2	12,625	8185	1,2	16363	43,4
	LQ A3	12,630	8011	1,1	16711	32,1
Impureza M	LD A1	17,009	9519	1,0	17215	31,0
	LQ A1	16,944	32581	1,3	15124	88,5
	LQ A2	16,933	31791	1,6	17872	112,1
	LQ A3	16,929	29177	1,5	16431	96,3
Impureza E	LD A1	18,766	3308	1,2	26851	22,9
	LQ A1	18,691	10612	1,1	23312	31,9
	LQ A2	18,687	11489	1,1	22508	49,5
	LQ A3	18,695	10719	1,1	23028	52,3
Composto relacionado F de AZM	LD A1	22,945	22052	1,1	9790	55,9
	LQ A1	22,845	77648	1,1	9112	198,0
	LQ A2	22,643	81561	1,1	9115	244,2
	LQ A3	22,957	75850	1,1	9272	234,5
Impureza J	LD A1	24,373	7886	1,0	30494	19,5
	LQ A1	24,494	27186	1,0	24532	89,4
	LQ A2	24,441	26731	1,1	25313	70,2
	LQ A3	26,684	27621	1,1	26163	98,8
Impureza I	LD A1	25,404	4993	1,4	26393	20,2
	LQ A1	25,298	11062	1,2	20704	13,5
	LQ A2	25,263	10231	1,3	21301	18,7
	LQ A3	25,305	10087	1,2	22920	30,7
Impureza N	LD A1	35,767	14144	1,0	52746	11,7
	LQ A1	35,542	64178	1,0	54849	111,7
	LQ A2	35,571	67456	1,0	54582	103,3
	LQ A3	35,958	69214	0,9	51423	69,0

Legenda: tr (tempo de retenção)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.3 Linearidade

A distribuição normal dos resíduos, a independência destes, além da homocedasticidade dos dados foram avaliadas para escolha do modelo matemático adequado. O método dos mínimos quadrados ordinários só pôde ser utilizado após comprovação desses parâmetros. A estimativa das curvas de regressão linear foi realizada mediante emprego do método dos mínimos quadrados, através de planilha Excel, sendo os parâmetros da regressão avaliados através de Análise de Variância (ANOVA). Todas as curvas obtidas apresentaram coeficiente angular significativo, coeficiente de correlação (r) acima de 0,990 e coeficiente linear estatisticamente igual a zero. Além disso, a distribuição dos resíduos também foi atendida para todas as curvas avaliadas, apresentando-se uma distribuição independente e normal, conforme testes estatísticos de *Durbin-Watson* e *Shapiro-Wilk* (95% de confiança).

A substância AZM foi estabelecida como o padrão de análise para o método de impurezas orgânicas, dessa forma, foi realizada uma avaliação visando garantir a relação linear das impurezas quantificadas frente a ela na mesma faixa da linearidade. Tendo em vista que

todos os modelos matemáticos se mostraram ajustados à faixa avaliada, a definição dos fatores resposta se tornou fundamental para a obtenção de resultados assertivos.

A faixa de trabalho adotada foi de LQ até 120% do limite de especificação para as impurezas em avaliação. Para a AZM, foi do LQ até 120% da concentração de trabalho do padrão análise, ou seja, até 96,0 µg/mL equivalente a 2,4%. Sendo assim, foi atingido a faixa especificada para todas as impurezas orgânicas especificadas, consideradas, além de contemplar a faixa das impurezas desconhecidas e a faixa de trabalho do padrão análise. Os resultados dos cálculos estatísticos para linearidade foram demonstrados na **Tabela 37**.

Tabela 37 – Resultados obtidos para a Linearidade

Analito	Significância/ Linearidade – F_{tab.}: 4,4940	Equação da Reta	R²	Falta de Ajuste - F_{tab.}: 3,259
Azitromicina	29.079,341	$y = 4952,6x + 360,22$	0,9995	3,241
Impureza L	29.503,835	$y = 1990,9x + 655,05$	0,9995	0,314
Impureza M	11.963,034	$y = 9114,1x + 1436,70$	0,9987	0,839
Impureza E	17.142,204	$y = 2828x - 100,89$	0,9991	1,824
Composto relacionado F de AZM	8.939,240	$y = 25210x - 13663$	0,9982	1,907
Impureza J	14.390,752	$y = 6880,9x - 643,67$	0,9989	1,029
Impureza I	5.670,717	$y = 2782,3x - 74,68$	0,9972	3,066
Impureza N	18.100,111	$y = 9438x + 2467,70$	0,9991	1,314

Analito	Coef. Angular	Fator resposta	Espec. para impurezas
Azitromicina	5010,50	–	–
Impureza L	1990,86	0,40	1,0%
Impureza M	9114,14	1,82	1,0%
Impureza E	2818,02	0,56	0,5%
Composto relacionado F de AZM	25209,98	5,03	1,0%
Impureza J	6880,90	1,37	0,5%
Impureza I	2872,30	0,57	0,7%
Impureza N	9438,04	1,88	1,0%

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

De posse dos resultados obtidos na validação método analítico, parâmetro linearidade, os valores de tempos de retenção relativo e do fator resposta para cada um dos analitos foram ajustados, contemplando a variabilidade inerente ao processo de validação do método analítico. Valores diferentes são esperados quando se revalida um método analítico.

Obviamente se espera valores próximos aos valores descritos na monografia farmacopeica. Os valores ajustados foram demonstrados na **Tabela 38**.

Tabela 38 - Valores ajustados de Tempo de Retenção Relativo e Fator Reosta para Impurezas Orgânicas conhecidas de AZM

Descrição/ Analito		trr	Fator resposta	Descrição/ Analito		trr	Fator resposta
N-óxido de Azitromicina	L	0.28	0.4	3'-De (dimetila amino) -3'-oxoazi-tromicina	N	0.75	1.88
3'-(N, N-Didemetil) -3'-N-formilazitromicina	M	0.36	1.82	Azaeritromicina	A	0.82	-
3'-(N, N-Didemetil) azitromicina (amino-azitromicina)	E	0.42	0.56	Impureza P de azitromicina	P	0.91	
3'-(N-Demetil) -3'-N-formilazitromicina	F	0.49	5.03	Azitromicina		1.0	
14-Demetil-14(hidroximetilazitromicina)	D	-	-	2-Desetil-2-propil-AZM	O	1.21	-
Desosaminilazitromicina	J	0.53	1.37	3'-N-De-metil3'-N-[(4-metil-fenil) sulfonil] AZM	G	1.25	-
N-Demetilazitromicina	I	0.57	0.57	3-Deoxiazitromicina	B	1.31	-
3'' -O-demetilazitromicina	C	0.72	1.0	Qualquer outra impureza não especificada		-	1.0
3'-N-[(4-(Acetil-amino) fenil) sul-fonil]3'-N-demetilazitromicina	H	-	-				

Legenda: trr (tempo de retenção relativo)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.3.4 Precisão e Exatidão

Os resultados encontrados para o ensaio de precisão (repetibilidade) e precisão intermediária demonstraram que o método é preciso e exato, uma vez que os valores obtidos para a recuperação individual (%), recuperação média (%) para ambos analistas e coeficiente de variação (CV%) encontraram-se dentro dos limites estipulados tanto para as impurezas orgânicas conhecidas quanto para as impurezas desconhecidas/ não especificadas. Os CV% máximos aceitáveis para a repetibilidade e precisão intermediária foram definidos baseados na concentração da amostra, adotando-se o valor máximo permitido de até 7,3% para cada uma

das impurezas, conforme Miguel e Barbas (2003). A especificação para precisão intermediária adotada, foi baseada na concentração proporcional do IFA na amostra, sendo o valor máximo permitido de 11,0%. Para as impurezas desconhecidas, os valores máximos aceitáveis para o CV% e recuperação foram calculados levando em consideração a concentração proporcional do IFA na amostra do medicamento sendo o peso médio teórico de 885,8 mg e o quantitativo de AZM de 500 mg.

Conforme David Bliesner (2006), as faixas de recuperação aceitáveis para a determinação de impurezas orgânicas são de 75% a 125% para recuperação individual, conforme classificação dos testes segundo a sua finalidade, enquadrados na categoria II, ou seja, aplicável aos testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Por outro lado, o trabalho realizado por Miguel e Barbas (2003), propõe critérios de 80% a 110% para recuperação de cada uma das impurezas, sendo encontrado valores de CV% entre 4,1% e 16,8% para precisão (repetibilidade). Vale ressaltar que a proposta de CV% e de recuperação para as impurezas de AZM estão relacionadas ao fato desta ser suscetível a reações, principalmente em meio ácido e oxidativo, conforme relatos de Zhang *et al.*, (2009) e pode ser favorecido pelo uso de um solvente prótico, neste caso o metanol, como um dos componentes da solução diluente do método analítico.

Nas **Tabelas 39 a 54** foram demonstrados os resultados encontrados para repetibilidade (analista 1) e precisão intermediária (analistas 1 e 2) para as sete impurezas orgânicas conhecidas e qualquer outra impureza individual (impureza desconhecida).

Tabela 39 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza L – (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,089	0,094	105,27			
2	0,10	0,089	0,094	105,38	105,76	0,75	0,71
3		0,089	0,095	106,63			
1		0,896	0,827	92,32			
2	1,00	0,890	0,842	94,65	94,13	1,61	1,72
3		0,894	0,853	95,42			
1		1,089	0,979	89,85			
2	1,20	1,109	1,019	91,91	90,62	1,12	1,24
3		1,089	0,981	90,10			
Amostra íntegra	-	-	0,094		Fator resposta:	0,40	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 40 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza L

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		1,00		1,20	
105,271	104,263	92,320	99,415	89,851	100,950
105,384	99,644	94,645	100,069	91,906	102,782
106,629	94,138	95,423	99,696	90,105	99,956
Média (%)	102,55	Média (%)	96,93	Média (%)	95,92
Desvio Padrão	4,78	Desvio Padrão	3,24	Desvio Padrão	5,92
CV (%)	4,66	CV (%)	3,34	CV (%)	6,18

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 41 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza M – (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,082	0,090	109,61			
2	0,10	0,082	0,090	108,99	109,35	0,33	0,30
3		0,082	0,090	109,46			
1		0,828	0,840	101,45			
2	1,00	0,823	0,813	98,86	100,33	1,33	1,32
3		0,827	0,832	100,68			
1		1,007	0,983	97,62			
2	1,20	1,025	0,988	96,38	97,39	0,92	0,94
3		1,007	0,988	98,17			
Amostra íntegra	-	-	0,056	Fator resposta:		1,82	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 42 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza M

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		1,00		1,20	
109,610	92,850	101,452	80,671	97,622	84,477
108,985	91,367	98,865	85,783	96,381	85,498
109,457	94,136	100,682	86,389	98,169	84,225
Média (%)	101,07	Média (%)	92,31	Média (%)	91,06
Desvio Padrão	9,12	Desvio Padrão	9,05	Desvio Padrão	6,97
CV (%)	9,02	CV (%)	9,81	CV (%)	7,65

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 43 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza E – (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,097	0,100	103,72			
2	0,10	0,096	0,095	98,63	102,11	3,01	2,95
3		0,096	0,100	103,96			
1		0,485	0,497	102,34			
2	0,50	0,482	0,494	102,53	104,65	3,83	3,66
3		0,485	0,529	109,07			
1		0,590	0,591	100,08			
2	0,60	0,601	0,562	93,64	95,04	4,50	4,74
3		0,590	0,539	91,40			
Amostra íntegra	-	-	0,036	Fator resposta:		0,56	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 44 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza E

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		0,50		0,60	
103,732	89,219	102,342	90,646	100,076	91,649
98,633	91,915	102,532	91,345	93,640	91,644
103,963	84,813	109,068	90,918	91,397	90,479
Média (%)	95,38	Média (%)	97,81	Média (%)	93,15
Desvio Padrão	7,94	Desvio Padrão	7,86	Desvio Padrão	3,55
CV (%)	8,33	CV (%)	8,05	CV (%)	3,81

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 45 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) – Comp. relacionado F (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,082	0,071	86,71			
2	0,10	0,082	0,071	86,59	86,65	0,06	0,07
3		0,082	0,071	86,65			
1		0,829	0,707	85,27			
2	1,00	0,823	0,703	85,36	85,64	0,56	0,65
3		0,827	0,714	86,28			
1		1,008	0,887	88,08			
2	1,20	1,025	0,883	86,10	87,30	1,06	1,21
3		1,007	0,884	87,73			

Amostra íntegra	-	-	0,057	Fator resposta:	5,03
------------------------	---	---	-------	------------------------	------

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 46 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) – Comp. relacionado F de AZM

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		1,00		1,20	
86,714	86,463	85,273	89,741	88,076	90,245
86,594	85,541	85,362	89,757	86,099	89,959
86,650	83,941	86,282	89,402	87,730	90,111
Média (%)	85,98	Média (%)	87,64	Média (%)	88,70
Desvio Padrão	1,09	Desvio Padrão	2,22	Desvio Padrão	1,68
CV (%)	1,27	CV (%)	2,53	CV (%)	1,89

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 47 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza J – (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,097	0,092	95,13			
2	0,10	0,096	0,090	93,73	96,30	3,32	3,45
3		0,096	0,097	100,05			
1		0,486	0,431	88,77			
2	0,50	0,482	0,418	86,72	86,17	2,92	3,38
3		0,485	0,403	83,02			
1		0,591	0,479	81,02			
2	0,60	0,601	0,487	80,96	81,05	0,10	0,13
3		0,590	0,479	81,16			
Amostra íntegra	-	-	0,038	Fator resposta:	1,37		

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 48 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza J

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		0,50		0,60	
95,134	85,549	88,772	83,486	81,024	82,482
93,729	84,775	86,176	84,002	80,960	83,642
100,050	81,494	83,017	84,450	81,163	81,877
Média (%)	90,12	Média (%)	85,07	Média (%)	81,86

Desvio Padrão	7,22	Desvio Padrão	2,22	Desvio Padrão	1,05
CV (%)	8,01	CV (%)	2,61	CV (%)	1,29

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 49– Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza I – (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,099	0,107	107,76			
2	0,10	0,099	0,107	108,61	106,95	2,19	2,05
3		0,099	0,103	104,47			
1		0,697	0,766	109,89			
2	0,70	0,692	0,756	109,11	109,57	0,41	0,38
3		0,696	0,764	109,72			
1		0,848	0,917	108,13			
2	0,84	0,863	0,936	108,46	108,21	0,22	0,21
3		0,847	0,916	108,05			
Amostra íntegra	-	-	0,093	Fator resposta:		0,57	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 50 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza I

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		0,70		0,84	
107,760	92,982	109,893	92,984	108,127	90,869
108,612	92,138	109,109	89,915	108,464	89,718
104,469	86,558	109,721	91,386	108,046	90,122
Média (%)	98,75	Média (%)	100,50	Média (%)	99,22
Desvio Padrão	9,35	Desvio Padrão	9,99	Desvio Padrão	9,85
CV (%)	9,46	CV (%)	9,94	CV (%)	9,93

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 51 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) - Impureza N - (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,093	0,095	101,79			
2	0,10	0,093	0,095	101,37	102,01	0,77	0,76

3		0,093	0,096	102,87			
1		0,940	0,896	95,31			
2	1,00	0,934	0,895	95,89	95,18	0,78	0,82
3		0,938	0,885	94,35			
1		1,143	1,089	95,26			
2	1,20	1,163	1,114	95,77	94,95	1,02	1,07
3		1,143	1,072	93,81			
Amostra íntegra	-	-	0,069		Fator resposta:	1,88	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 52 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impureza N

Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)	Analista 1 Resultado (%)	Analista 2 Resultado (%)
0,10		1,00		1,20	
101,794	96,447	95,312	97,121	95,258	96,919
101,369	97,359	95,889	97,711	95,773	97,591
102,869	95,003	94,347	96,469	93,808	96,720
Média (%)	99,14	Média (%)	96,14	Média (%)	96,01
Desvio Padrão	3,27	Desvio Padrão	1,23	Desvio Padrão	1,36
CV (%)	3,30	CV (%)	1,27	CV (%)	1,42

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 53 – Precisão/ Exatidão (Repetibilidade) – Impurezas desconhecidas (Analista 1)

Réplicas	Conc. Teórica (%)	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1		0,096	0,089	92,11			
2	0,10	0,100	0,097	96,55	96,43	4,27	4,43
3		0,089	0,090	100,65			
1		0,197	0,193	97,90			
2	0,20	0,191	0,199	104,56	101,05	3,34	3,31
3		0,180	0,181	100,69			
1		0,234	0,246	104,94			
2	0,24	0,222	0,232	104,45	102,61	3,63	3,53
3		0,218	0,214	98,43			
1		2,310	2,378	102,95			
2	2,40	2,226	2,227	100,01	101,10	1,61	1,59
3		2,160	2,168	100,35			
Fator resposta:						1,00	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 54 – Precisão/ Exatidão (Intermediária) - Impurezas desconhecidas

Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Resultado (%)	Resultado (%)	Resultado (%)	Resultado (%)
0,10		0,20	
92,110	97,920	97,900	100,090
96,550	103,890	104,560	99,620
100,650	101,270	100,690	102,640
Média (%)	98,73	Média (%)	100,92
Desvio Padrão	4,15	Desvio Padrão	2,36
CV (%)	4,20	CV (%)	2,33
Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Resultado (%)	Resultado (%)	Resultado (%)	Resultado (%)
0,24		2,40	
104,340	97,890	102,950	100,620
104,450	101,340	100,010	100,540
98,430	100,100	100,350	101,200
Média (%)	101,29	Média (%)	100,35
Desvio Padrão	3,00	Desvio Padrão	1,06
CV (%)	2,96	CV (%)	1,05

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Após a avaliação dos dados, pode-se concluir que o método é preciso e exato, uma vez que os valores obtidos para a recuperação individual (%), recuperação média (%) para cada um dos analistas e CV% encontraram-se dentro dos limites estabelecidos. Os resultados foram aprovados tanto para o ensaio de precisão (repetibilidade) considerando os analistas 1 e 2, quanto à análise de precisão intermediária (entre analistas e dias de análise) de acordo com os critérios estabelecidos, contemplando tanto para as impurezas orgânicas conhecidas quanto a as impurezas desconhecidas ou não especificadas.

A validação do método analítico foi conduzida e contemplou os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira vigente, ANVISA – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, bem como o guia *ICH Q2(R2) – Validation of Analytical Procedures (European Medicine Agency, 2022)*. O método analítico proposto atendeu, de forma satisfatória, aos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade, robustez, LD e LQ para o monitoramento das impurezas orgânicas, oriundas de degradação do medicamento AZM. Respalidou-se com este trabalho, que a solução de adequabilidade, composta pelas impurezas I, J e Composto relacionado F de AZM deixou de ser critério de avaliação do *system suitability* e foi substituída pela utilização da solução *EPCRS* – padrão referência de identificação de picos de Azitromicina. Além disso, verificou-se que a resolução entre impureza J e Impureza I é um

atributo crítico de resolução e do sistema. Assim optou-se pela recomendação de inclusão da avaliação da resolução entre essas duas impurezas na solução de identificação. O valor sugerido como critério de aceitação foi o de maior ou igual a 1,4. É importante destacar ainda, que a legislação brasileira aprimorada nas últimas duas décadas, através de sucessivas atualizações das resoluções da diretoria colegiada (RDC) da ANVISA, estabelece que um método analítico deva necessariamente ser indicativo de estabilidade, ou seja, capaz de identificar e quantificar o fármaco na presença de seus produtos de degradação na forma farmacêutica submetida a análise, o que foi comprovado neste trabalho.

5.3.5 Robustez

Em relação a robustez para as impurezas orgânicas foi possível que o método se mostrou robusto para a condição de temperatura do forno da coluna avaliada bem como a condição de fluxo adotada, exceto o parâmetro de fluxo de $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, onde foi observado resultados baixos para a recuperação das impurezas I e J. Posteriormente ao planejamento de experimento, outros parâmetros foram avaliados:

- ✓ Variação do pH da solução A (fase móvel): Satisfatório para pH: 8,8; 8,9 e 9,0;
- ✓ Teste de elemento filtrante: Satisfatório para *PVDF* $0,22 \mu\text{m}$ e *PTFE* $0,22 \mu\text{m}$;
- ✓ Extração da amostra em banho ultrassônico: Satisfatório para 5, 15 e 20 minutos.

5.4 RESULTADOS DOS MEDICAMENTOS (PRODUTO ACABADO) MONITORADOS DO MERCADO

Um total de seis lotes de medicamentos foram avaliados.

Para cada amostra do medicamento AZM foi realizada uma única injeção, uma injeção de diluente/ branco e uma injeção para cada um dos Placebos. Para o solução de identificação de picos (Padrão de identificação Farmacopeia Europeia) foi realizada uma única injeção. Para os padrões do IFA AZM foram realizadas injeções de P_1 em quintuplicata e do P_2 (recuperação) uma única injeção.

Verificou-se todos os parâmetros de adequabilidade do sistema tais como: fator caudal (entre 0,8 e 2,0), número de pratos teóricos (superior a 1.000) e sinal ruído (S/N) (acima de 10) cumpriram com as especificações descritas no capítulo geral <621> *Chromatography* da USP.

Na **Tabela 55**, foram compilados os valores do tempo de retenção (min.) e teor (%) calculado para as impurezas dos seis lotes de medicamento (produto acabado) avaliados.

Tabela 55 – Resultados encontrados – seis lotes avaliados

Analito/ Produto	Resultado (%)						Especificação
	A	B ¹	B ²	C	D	E	
Impureza L	0,03	0,17	0,14	0,02	0,08	0,07	< 1%
Impureza M	0,07	0,17	0,12	0,02	0,01	0,08	< 1%
Impureza E	0,04	0,05	0,05	0,07	0,03	0,04	< 0,5%
Impureza F	0,06	0,13	0,06	0,04	0,01	0,08	< 1%
Impureza J	0,02	0,05	0,01	0,04	0,04	0,04	< 0,5%
Impureza I	0,10	0,16	0,17	0,05	0,03	0,12	< 0,7%
Impureza N	0,06	0,11	0,09	0,01	0,03	0,06	< 1%
Impurezas desconhecidas	0,17	0,18	0,18	0,21	0,20	0,20	Máx. 0,2%
Total de impurezas	0,55	1,02	0,82	0,46	0,43	0,69	Máx. 5,0%

Analito/ Produto	Tempo de retenção (min.)					
	A	B ¹	B ²	C	D	E
Azitromicina	48,041	47,883	47,925	48,018	48,197	48,051
Impureza L	12,850	12,739	12,780	12,692	13,394	12,823
Impureza M	16,878	16,716	16,747	16,953	16,920	16,862
Impureza E	18,861	18,773	18,713	19,418	18,763	18,796
Impureza F	23,035	22,920	22,929	23,069	23,058	23,093
Impureza J	24,609	24,502	24,577	24,673	24,793	24,697
Impureza I	25,667	25,550	25,561	25,797	25,551	25,698
Impureza N	36,611	36,441	36,481	36,066	37,408	36,577
Impurezas desconhecidas	20,592	20,461	20,483	20,565	20,699	20,574

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

No **apêndice A – Figura 35** demonstrou-se o espectro da AZM, varredura em DAD no intervalo de 190 nm a 400 nm e no **apêndice B – Figura 36**, o comprimento de onda onde houve maior absorção foi o de 210 nm, da eluição da solução padrão de AZM 80,0 µg mL⁻¹, onde evidenciou-se a formação de um pico cromatográfico referente ao espectro da AZM no tempo de retenção de cerca de 48 minutos.

No **apêndice C - Figuras 37 a 45** demonstrou-se os cromatogramas obtidos, nas eluições cromatográficas para o padrão referência de identificação de picos de AZM EP versus diluente/ branco; dos padrões P₁, P₂ (recuperação) da AZM versus diluente/ branco; do padrão de sensibilidade versus diluente/ branco e dos placebos versus medicamento versus diluente/ branco; respectivamente, dos seis lotes avaliados.

Observou-se que todas as amostras dos lotes avaliados apresentaram picos referentes as impurezas orgânicas conhecidas: L, M, E, composto relacionado de AZM F, I, J e N. Todos os resultados encontrados estavam em conformidade com os limites farmacopeicos especificados. Para todas as eluições observou-se também formação de pico para o diluente nos tempos de retenção de aproximadamente 4 e 11 minutos. Por fim, observou-se a formação de picos para impurezas desconhecidas os quais foram numerados em ordem cronológica. Para os lotes avaliados dos produtos A e B foram identificadas 7 impurezas desconhecidas em tempos de retenção aproximados em ambos os produtos. Para os demais produtos, identificou-se 6 impurezas desconhecidas sendo que a última impureza eluída no tempo de retenção de aproximadamente 28 minutos ocorreu apenas nos produtos C e D e a impureza desconhecida eluída no tempo de retenção de aproximadamente 13 minutos não ocorreu no produto D.

Para os seis lotes de medicamentos monitorados neste estudo: A, B¹, B², C, D e eluída, oriundos de cinco detentores de registro e quatro fabricantes farmoquímicos distintos, os resultados encontrados para o monitoramento das impurezas, em todos eles, foram satisfatórios, ou seja, cumpriram com a especificação vigente. A adequabilidade proposta para o método analítico atendeu à proposta e assim, foi possível, com base nesta amostragem, inferir que os medicamentos Azitromicina comprimido revestido 500 mg disponíveis no mercado brasileiro são seguros, eficazes e possuem sua qualidade assegurada.

6. CONCLUSÃO

Conseguiu-se, de forma assertiva através deste trabalho, uma aproximação entre Academia e Mercado com a proposição da otimização do método analítico através de análise instrumental, por CLAE UV-vis para determinação de impurezas de degradação da AZM na forma farmacêutica sólida – comprimido revestido, durante seu *shelf life*, método este desafiador, que agora tem sua aplicabilidade à indústria farmacêutica.

A estratégia adotada, fundamentou-se na sistemática de otimização para pesquisar e identificar as condições favoráveis para uma separação adequada. Além disso, pode ser usada vantajosamente como uma ferramenta pedagógica para examinar o efeito de uma variedade de parâmetros na separação. Outra vantagem de se adotar o planejamento de experimento objetivando eleger os parâmetros para sermos assertivos na condução e conclusão, com êxito, da validação do método analítico é a possibilidade de se otimizar tempo, reduzir gastos com reagentes, consumíveis e padrões primários (SQR/ SQF) ou secundários (SQC – Substância Química de Referência Caracterizada) no processo de internalização de métodos analíticos.

REFERÊNCIAS

AOAC Official Methods of Analysis (2012) Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F, p. 9.

BARTRA, María S. *et al.* Interacciones farmacocinéticas de la azitromicina y implicación clínica, **JRevista Cubana de Medicina Militar**, v. 50, n.3 (2021)

BERGER, E. *et al.* **Degradation products of azithromycin, and methods for their identification.** Teva Pharmaceutical Industries, cessionário. EP1606299 A1. 2005. Dez 2021.

BLIESNER, D. M. *Validation Chromatographic Methods.* [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.

BRASIL. Resolução nº 58, de 20 de dezembro de 2013. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares e dá outras providências.**

BRASIL. Guia nº 10, de 12 de setembro de 2017. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica.**

BRASIL. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.**

BRASIL. Resolução nº 658, de 30 de março de 2022. **Dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos e dá outras providências.**

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 53, de 04 de dezembro de 2015. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas.**

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 171, de 22 de agosto de 2017. **Revisa a aplicabilidade da RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015, para alterações pós-registro e os prazos desta resolução para produtos já registrados.**

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira.** 6ª. ed. Brasília: ANVISA, 2019.

BRITISH Pharmacopeia. **Azithromycin tablets**, vol. III, p.193-195, 2022.

CARVALHO, R.D.S; CARVALHO, W.A; SILVA, P. **Farmacologia**, 5, ed. Rio de Janeiro – Editora Guanabara Koogan, 1998. 1314 p.

COSTA, Sabryna Isabelly Giordani da. Degradação da azitromicina através de processos oxidativos avançados. 2015. **Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Químicos)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2015.

DEBREMAEKER, D.*et al.* Analysis of unknown compounds in azithromycin bulk samples with liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 4, p. 342–350, 6 jan. 2003.

FERREIRA, J. R. N. **Azitromicina: desenvolvimento e validação de métodos de análise em formas farmacêuticas.** 2007. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FERRE, A. C. **Identificación y síntesis de las sustancias relacionadas de la azitromicina**. Tese de mestrado, Universitat Ramon Llull, Espanha, 2006.

GÖRÖG, S. Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 101, p. 2–16, abr. 2018.

GUIDANCE for Industry- Andas: Impurites in Drug Products. Food and Drugs Administration, novembro de 2010.

GUIDANCE on setting specifications for related impurities in antibiotics. European Medicines Agency, 30 de julho de 2012.

GIGUÈRE, S. Macrolides, Azalides, and Ketolides. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5th. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2013. p. 211-231.

GUO, N. *et al.* Separation and characterization of impurity P in azithromycin product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, p. 113853, 20 fev. 2021.

HAO, G. *et al.* Azithromycin “ghost peak”: A solution degradation product of azithromycin via leaching from borosilicate glass volumetric flasks and vials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, p. 114-248, set. 2021.

ICH Q2(R2) – Validation of Analytical Procedures (European Medicine Agency, 2022).

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Impurites in New Drug Products - Q3B (R2)**, 02 de junho de 2006.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). – **Harmonization for better health**. 2021. Disponível em: <<https://www.ich.org/home.html>>. Acesso em 22/10/2021.

JIN, Y. *et al.* Characterization of four unknown impurities in azithromycin and erythromycin imino ether using two-dimensional liquid chromatography coupled to high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. 11, 20 abr. 2020

KONG, F. Y. S. *et al.* Pharmacokinetics of a single 1g dose of azithromycin in rectal tissue in men. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0174372, 28 mar. 2017.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**, 1ed, Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988.

KWIECIEŃ, A.; KRZEK, J.; WALCZAK, M. Stress Degradation Studies on Azithromycin and Development of a Validated Stability-Indicating TLC-Densitometric Method with HPLC/Electrospray Ionization-MS Analysis of Degradation Products. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 5, p. 1418–1424, 1 set. 2012.

Laboratórios Pfizer Ltda. 2021 Disponível em:

<<https://consultaremedios.com.br/zitromax/bula#composicao>> Acesso em 24 de out. de 2021.

LEITE, F. Impurezas de degradação. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 63-72, jul. – ago.2009.

LODE, H. *et al.* Azithromycin-review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, n. suppl C, p. 1–8, 1 jun. 1996.

MCGUFFIN, V. L.; FRANCO, M. Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 152–164, 1 jan. 1997.

MIGUEL, L.; BARBAS, C. L. C. Determination of impurities in azithromycin tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 2, p. 211–217, set. 2003.

MANOJ, K.*et al.* LC-MS/MS profile of an active pharmaceutical ingredient and its impurities in commercial preparation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 43, n. 3-4, p. 131–137, 25 out. 2019.

Medquimica Industria Farmacêutica Ltda. 2021 Disponível em:

<<https://consultaremedios.com.br/azitromed/bula#composicao>>. Acesso em 24 de out. de 2021.

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

PALANISAMY, P. *et al.* Formulation and Evaluation of Film Coated Tablets of Azithromycin Usp. **International Journal of Medicine and Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 59-71, dez. 2013

PHARMAFFILIATES Analytics and Synthetics P. Ltd. Azithromycin and its impurities Disponível em:

<https://www.pharmaffiliates.com/en/products/impurities/azithromycin-impurities>. Acesso em 15. de mar. de 2022.

SAITA, M. G. *et al.* Estabilidade dependente do pH da azitromicina em solução aquosa e identificação da estrutura de dois novos produtos de degradação. **Revista de Análise Farmacêutica e Biomédica**, v. 158, p. 47-53, 05 de setembro de 2018.

SATYAJIT D. Sarker, Lutfun Nahar. Natural Products Isolation. **eBook ISBN978-1-61779-624-1**. Published: 25 February 2012 Humana Totowa, NJ 3rd edition

SKOOG, Douglas A; West; Holler; Crouch. **Fundamentos de Química Analítica**, tradução da 8ª edição norte-americana, editora Cengage Learning, 2011

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2, 9 ed. LTC, 2009.

TONG, L. *et al.* Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. **Chemosphere**, v. 83, n. 3, p. 340–348, abr. 2011.

UNITED States Pharmacopeia. **Azithromycin tablets**. USP 37-NF 32, volume 2, p. 1895, 2014.

UNITED States Pharmacopeia. **Azithromycin tablets**, USP 43-NF 38 – 457

UNITED States Pharmacopeia. **Chromatography/ System Suitability**. USP 43, General Chapters <621> Chromatography.

CHANG, Y. *et al.* Factors Influencing the HPLC Determination for Related Substances of Azithromycin, **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 2, p. 187-194, 30 ago. 2015.

WAGHULE, S. *et al.* Method Development and Validation of HPLC Method for Determination of Azithromycin. **Der Pharma Chemica**, v. 5, n. 4, p. 166-172, jul. – ago. 2013.

WORLD Health Organization. Technical Report Series 929. **Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations- Thirty-Ninth Repor**. Genebra. 2005. p. 139.

WORLD Health Organization. **Guidelines on Validation – Appendix 4: ANALYTICAL METHOD VALIDATION 4 (June 2016)**. Disponível em:

<http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/GuidelineValidation_AnalyticalMethodValidationQAS16-671.pdf>. Acesso em: 20 de out. 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Aspects of Degradation Kinetics of Azithromycin in Aqueous Solution. **Chromatographia**, v. 70, n. 1-2, p. 67–73, 28 abr. 2009.

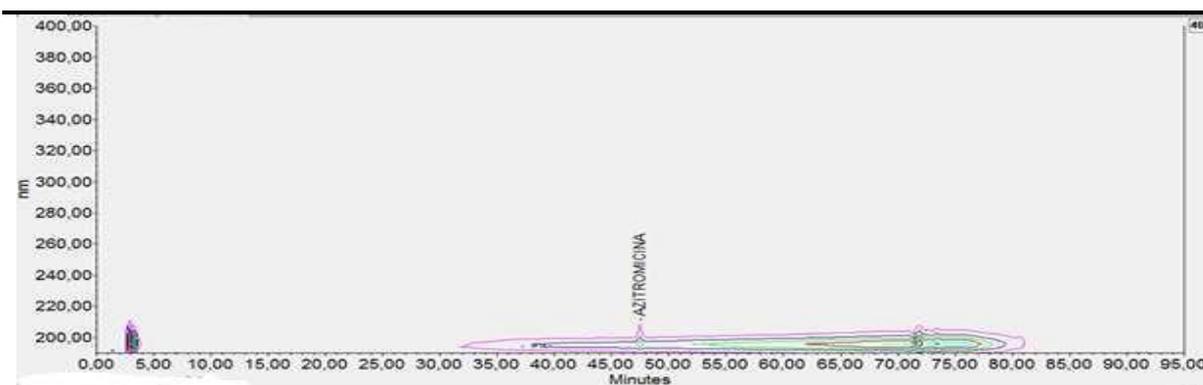
YANG, Z. Y.; WANG, L.; TANG, X. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 811–815, abr. 2009.

ZENG, A. *et al.* Determination of azithromycin in raw materials and pharmaceutical formulations by HPLC coupled with an evaporative light scattering detector. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 107–116, 1 abr. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Varredura espectral da AZM

Figura 35 – Varredura espectral da AZM em DAD – intervalo 190 nm – 400 nm

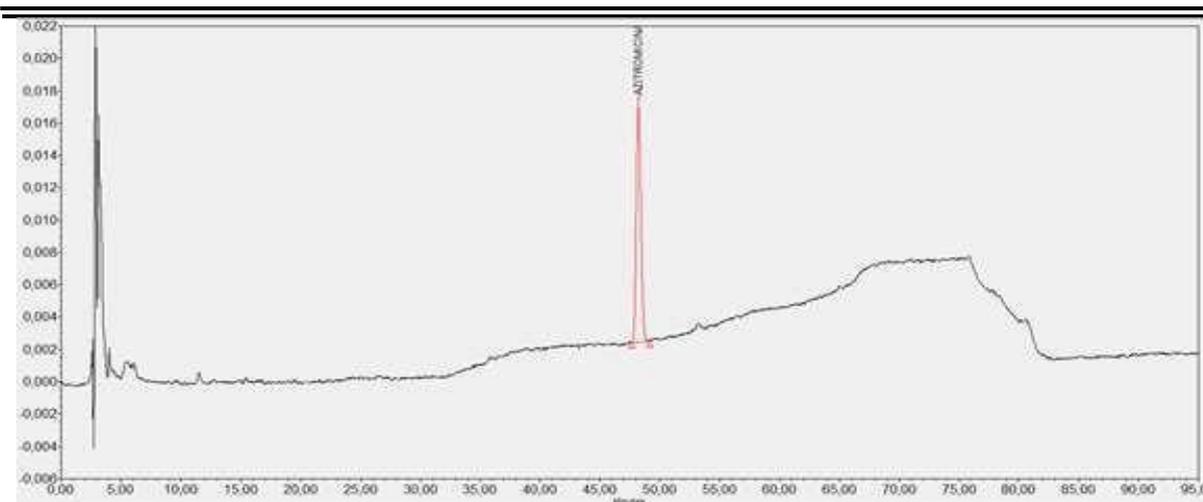


Legenda: Padrão AZM. Tempo de retenção (min.): AZM (48,206)

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

APÊNDICE B – Comprimento de onda com maior absorção

Figura 36 – Cromatograma da AZM em 210 nm

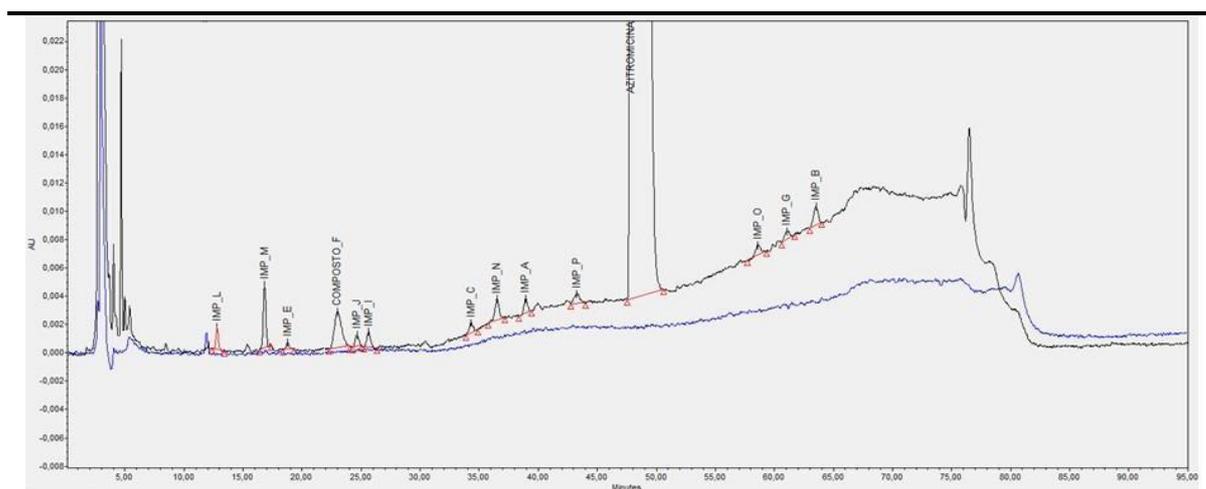


Legenda: Padrão AZM. Tempo de retenção (min.): AZM (48,206)

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

**APÊNDICE C – Cromatogramas das análises dos medicamentos (Produto Acabado)
monitorados do mercado**

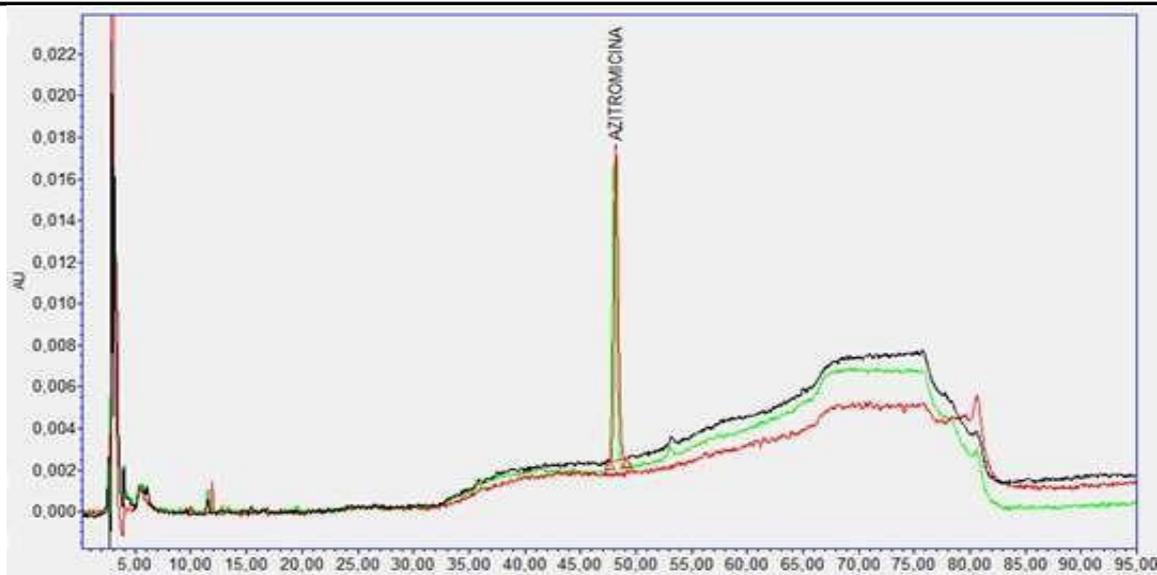
Figura 37 – Cromatograma *EPCRS batch 5* – padrão referência de identificação de picos de Azitromicina (*Azithromycin for peak identification*) e Diluente/branco



Legenda: Padrão Ref. Ident. Picos AZM – EP (preto); Diluente/ branco (azul). Tempos de retenção (min.): Imp. L (12,801); Imp. M (16,819); Imp. E (18,764); Imp. F (22,993); Imp. J (24,662); Imp. I (25,646); Imp. N (36,496) e AZM (47,879)

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

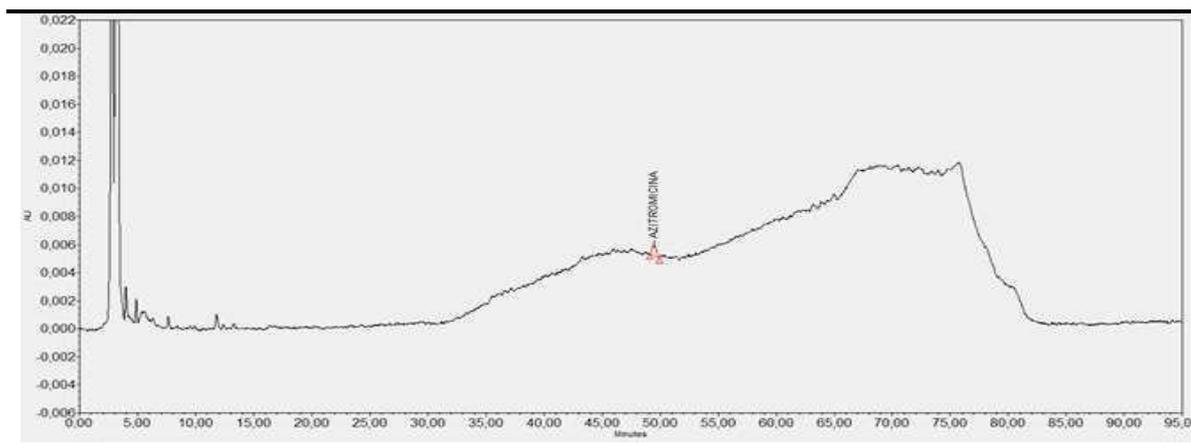
Obteve-se resolução de 1.7 entre os picos de impureza I e impureza J, para um valor mínimo especificado de 1.4, conforme cálculo realizado pelo *software Waters Empower 3*.

Figura 38 – Cromatograma padrões P₁, P₂ (recuperação) da AZM e Diluente/branco

Legenda: Padrão Análise/ P₁ (vermelho); Padrão de Recuperação/ P₂ (verde); Diluente/ branco (preto). Tempos de retenção (min.): P₁ (48,206) e P₂ rec. (48,763)

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

Conforme capítulo geral <621> *Chromatography da USP*, o *RSD* entre as injeções da solução padrão de AZM e a injeção para verificação do sistema deve ser de no máximo 5,0%. Evidenciou-se, conforme cálculo realizado pelo *software Waters Empower 3*, o valor de *RSD* igual a 1,3% em conformidade com o especificado.

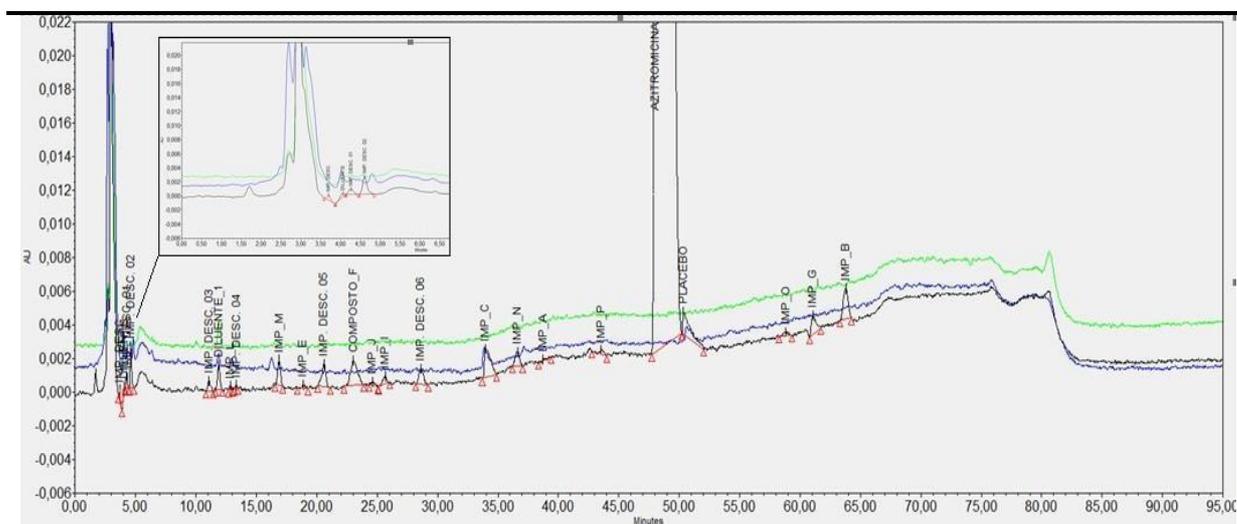
Figura 39 – Cromatograma da Solução de Sensibilidade

Legenda: AZM. Tempos de retenção: (48,477)

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

Conforme capítulo geral <621> *Chromatography da USP*, a relação S/N para a solução de sensibilidade deve ser de no mínimo 10. Obteve-se o valor de sinal ruído de 17, conforme cálculo realizado pelo *software Waters Empower 3*.

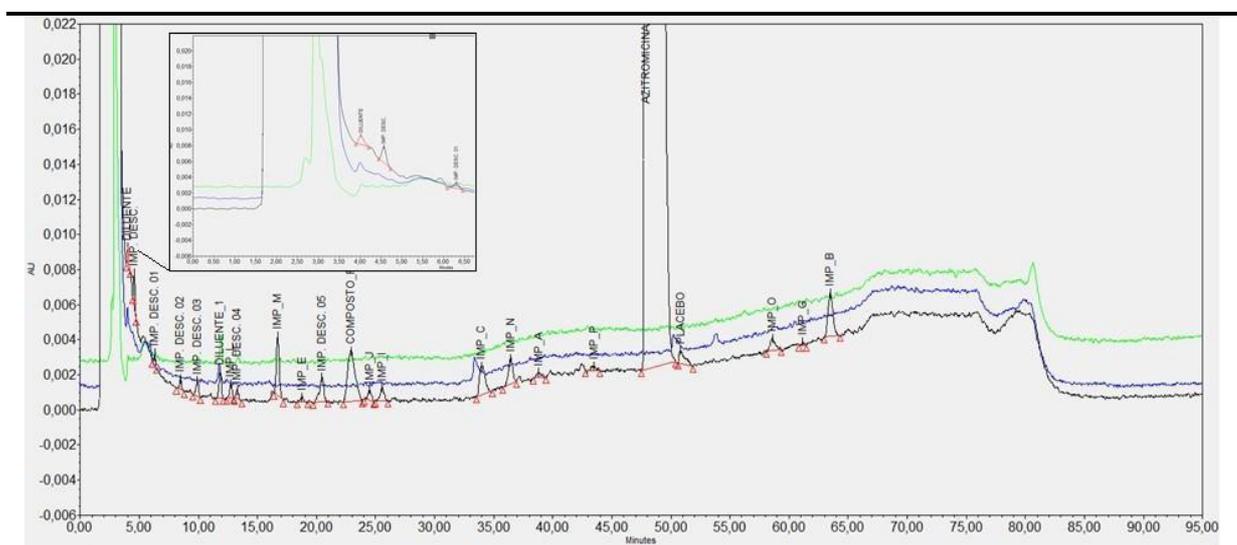
Figura 40 – Cromatograma do Placebo A, Produto A e Diluente/branco



Legenda: Amostra (preto); Placebo (azul); Diluente/ branco (verde). Tempos de retenção (min.): Imp. Desc. (3,696); Diluente (4,058); Imp. Desc. 01 (4,262); Imp. Desc. 02 (4,607); diluente 1 (11,891); Imp. Desc. 03 (11,074); Imp. L (12,850); Imp. Desc. 04 (13,338); Imp. M (16,878); Imp. E (18,861); Imp. Desc. 05 (20,592); Imp. F (23,035); Imp. J (24,609); Imp. I (25,667); Imp. Desc. 06 (28,613); Imp. N (36,611); AZM (48,041) e Placebo (50,352).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do software *Waters Empower 3*, 2023

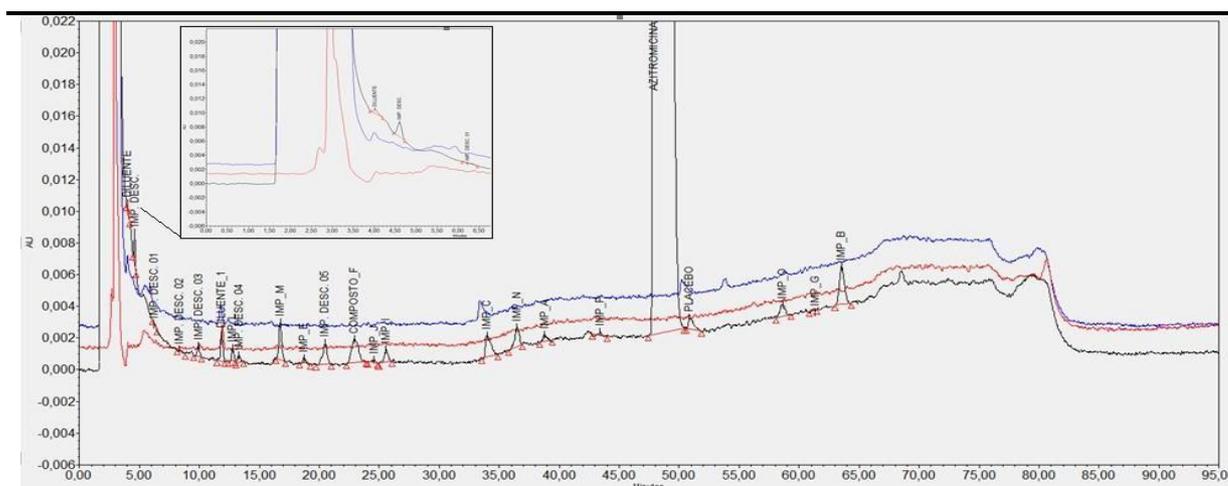
Figura 41 – Cromatograma do Placebo B, Produto B¹ e Diluente/branco



Legenda: Amostra (preto); Placebo (azul); Diluente/ branco (verde). Tempos de retenção (min.): Diluente (4,021); Imp. Desc. (4,569); Imp. Desc. 01 (6,307); Imp. Desc. 02 (8,469); Imp. Desc. 03 (9,914); diluente 1 (11,840); Imp. L (12,739); Imp. Desc. 04 (13,277); Imp. M (16,716); Imp. E (18,773); Imp. Desc. 05 (20,461); Imp. F (22,920); Imp. J (24,502); Imp. I (25,550); Imp. N (36,441); AZM (47,883) e Placebo (50,799).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do software *Waters Empower 3*, 2023

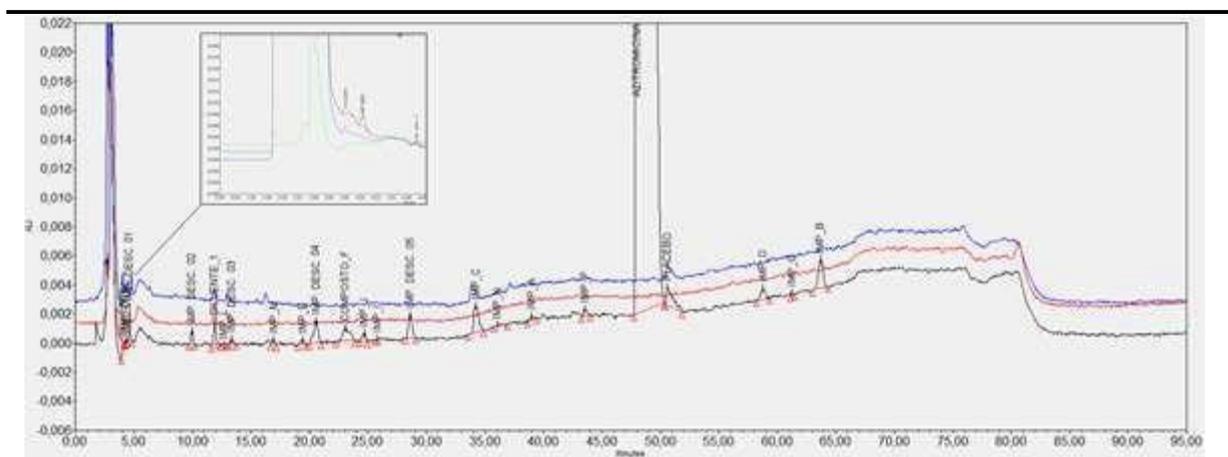
Figura 42 – Cromatograma do Placebo B, Produto B² e Diluente/branco



Legenda: Amostra (preto); Placebo (azul); Diluente/ branco (vermelho). Tempos de retenção (min.): Diluente (4,015); Imp. Desc. (4,599); Imp. Desc. 01 (6,221); Imp. Desc. 02 (8,334); Imp. Desc. 03 (9,921); diluente 1 (11,861); Imp. L (12,780); Imp. Desc. 04 (13,229); Imp. M (16,747); Imp. E (18,713); Imp. Desc. 05 (20,483); Imp. F (22,929); Imp. J (24,577); Imp. I (25,561); Imp. N (36,481); AZM (47,925) e Placebo (50,832).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

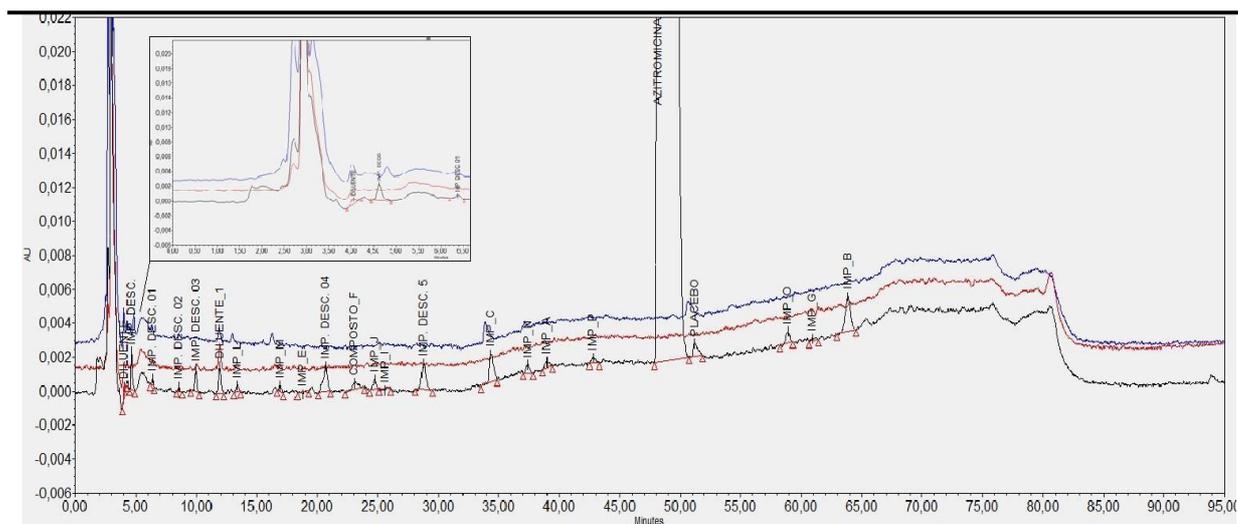
Figura 43 – Cromatograma do Placebo C, Produto C e Diluente/branco



Legenda: Amostra (preto); Placebo (azul); Diluente/ branco (vermelho). Tempos de retenção (min.): Diluente (4,021); Imp. Desc. (4,320); Imp. Desc. 01 (4,599); Imp. Desc. 02 (9,961); diluente 1 (11,897); Imp. L (12,692); Imp. Desc. 03 (13,339); Imp. M (16,953); Imp. E (19,418); Imp. Desc. 04 (20,565); Imp. F (23,069); Imp. J (24,673); Imp. I (25,797); Imp. Desc. 05 (28,613); Imp. N (36,066); AZM (48,018) e Placebo (50,595).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

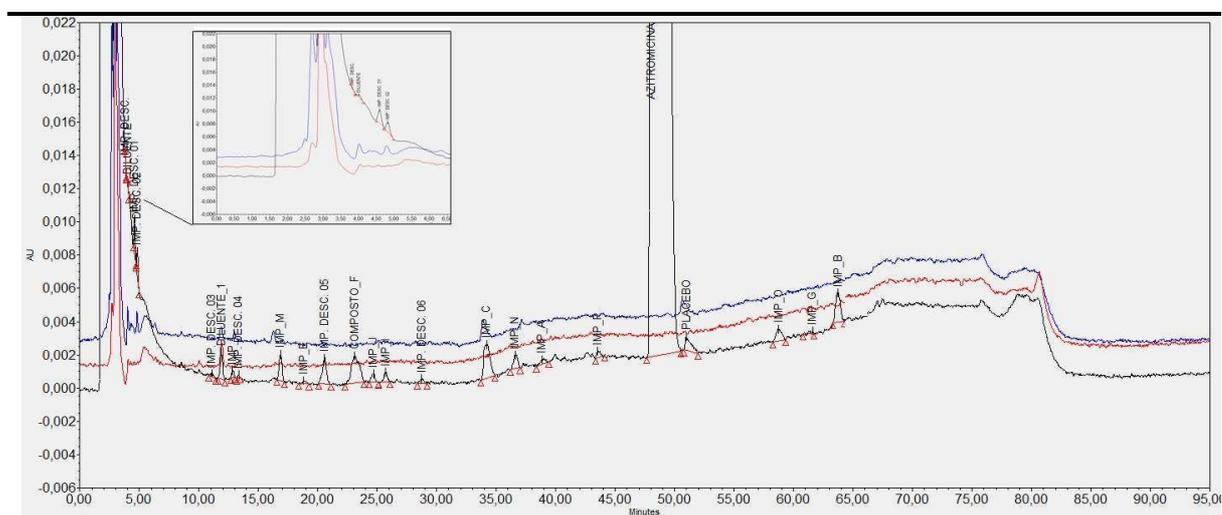
Figura 44– Cromatograma do Placebo D, Produto D e Diluente/branco



Legenda: Amostra (preto); Placebo (azul); Diluente/ branco (vermelho). Tempos de retenção (min.): Diluente (4,051); Imp. Desc. (4,620); Imp. Desc. 01 (6,383); Imp. Desc. 02 (8,539); Imp. Desc. 03 (9,964); diluente 1 (11,898); Imp. L (13,394); Imp. M (16,920); Imp. E (19,548); Imp. Desc. 04 (20,669); Imp. F (23,058); Imp. J (24,793); Imp. I (25,551); Imp. Desc. 05 (28,783); Imp. N (37,408); AZM (48,197) e Placebo (51,182).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023

Figura 45 – Cromatograma do Placebo E, Produto E Dent Diluente/branco



Legenda: Amostra (preto); Placebo (azul); Diluente/ branco (vermelho). Tempos de retenção (min.): Imp. Desc. (3,818); Diluente (4,007); Imp. Desc. 01 (4,593); Imp. Desc. 02 (4,823); Imp. Desc. 03 (11,095); diluente 1 (11,893); Imp. L (12,823); Imp. Desc. 04 (13,340); Imp. M (16,862); Imp. E (18,796); Imp. Desc. 05 (20,574); Imp. F (23,093); Imp. J (24,697); Imp. I (25,698); Imp. Desc. 06 (28,716); Imp. N (36,577); AZM (48,051) e Placebo (50,975).

Fonte: Elaborado pelo autor, através do *software Waters Empower 3*, 2023