

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AZITROMICINA: DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM
FORMAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

João Ronaldo Notargiacomo Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AZITROMICINA: DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM
FORMAS FARMACÊUTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

João Ronaldo Notargiacomo Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

AZITROMICINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM FORMAS FARMACÊUTICAS

por

João Ronaldo N. Ferreira

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, com Área de Concentração em Controle de Qualidade e Avaliação de Insumos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^ª. Dr. Simone Gonçalves Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AZITROMICINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS DE ANÁLISE EM FORMAS FARMACÊUTICAS**

elaborada por
João Ronaldo N. Ferreira

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Simone Gonçalves Cardoso, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marcos Antônio Segatto Silva, Dr. (UFSC)

Elisabete de Ávila da Silva, Dr. (UNICRUZ)

Santa Maria, 04 de maio de 2007.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela presença sempre constante em minha vida, proporcionando à minha existência, a saúde, a felicidade, a família, o trabalho, os professores, os colegas e os amigos.

Aos meus pais, e familiares, pelo esforço, pela educação, carinho e amizade, que sempre dedicaram a mim, em todos os momentos.

À minha Professora e Orientadora Dr Simone Gonçalves Cardoso, pelo empenho sempre presente, pelo incentivo e confiança, pelo ensino e amizade, os quais foram ingredientes fundamentais para o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, desta universidade, pelo ensino, incentivo e apoio, a mim dedicados.

Às bolsistas de iniciação científica Karin Goebel e Emanuelle Raquel Dorigoni, e ao amigo e colega Gustavo Paraginski, pelo auxílio e esforço dedicado, para que este trabalho pudesse ser realizado.

À todos os funcionários e professores do departamento de Farmácia Industrial, e em especial à Prof^a. Clarice, Prof^a. Margareth, Rosecler, Marinês, Carminha, Renato e Elaide, pelo trabalho incansável que estes dedicam ao departamento e aos alunos.

Aos profissionais Dr. Marcos Antônio Segatto Silva e Dr. Antonio Luiz Braga, pela colaboração na nas etapas iniciais deste trabalho, na realização dos testes de espectrometria.

À Francine Marchiori pelo apoio, incentivo, pela presença, carinho e compreensão, em todos os momentos que percorremos juntos, esta caminhada. E aos seus pais e familiares, pela confiança e amizade, a mim dedicados, para que eu pudesse motivar-me cada vez mais, em busca de meus sonhos.

A todos os amigos, e em especial ao Rodrigo Feldmann, pela verdadeira amizade que tem dedicado a mim e a minha família, o que nos dá forças e faz acreditar que sempre seremos capazes de grandes conquistas, quando contamos com o companheirismo e o apoio, de grandes amigos.

EPÍGRAFE

S. H.

É vivendo a inocência das horas
que desvendo a malícia dos dias,
e conquisto a experiência dos anos
com a perseverança da vida ;

pequenas coisas da vida que fazem ver
que a verdadeira inteligência
não está em tudo que sei,
mas na minha capacidade de aprender ;
que o maior patrimônio da vida
não está no ter, e sim no ser

caso contrário eu seria,
um mero erro do engano:
um equivocado “ter humano”.

João Ronaldo N. Ferreira

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AZITROMICINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM FORMAS FARMACÊUTICAS

AUTOR: JOÃO RONALDO N. FERREIRA
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SIMONE GONÇALVES CARDOSO
DATA E LOCAL DE DEFESA: SANTA MARIA, 04 DE MAIO DE 2007.

Azitromicina (AZ) é um antibiótico macrolídeo derivado da eritromicina. AZ apresenta um grande espectro de atividade contra patógenos Gram negativos comuns e tem sido utilizada para o tratamento de infecções do trato respiratório, infecções da pele e doenças sexualmente transmissíveis. No mercado brasileiro a AZ está disponível na forma de comprimidos, cápsulas manipuladas e pó para suspensão oral. Os métodos oficiais para o doseamento de AZ como matéria-prima; cápsulas e pó para a suspensão oral são a cromatografia líquida de alta eficiência ou o método microbiológico de difusão em ágar. Não existem monografias em farmacopéias para avaliação de AZ em comprimidos. Neste trabalho dois métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos e validados para a análise de AZ em comprimidos e em pó para suspensão oral. O primeiro método foi baseado na reação de AZ com ácido sulfúrico concentrado (98%, p/v), com detecção em 226 nm. O outro método foi baseado na reação de complexo de transferência de carga do fármaco com o σ -acceptor iodo, com detecção em 363 nm. Ambos os métodos mostraram linearidade ($r > 0,99$), precisão ($CV < 5\%$) e exatidão ($> 99\%$). Os resultados obtidos com os métodos propostos estavam de acordo com aqueles obtidos com o método microbiológico de difusão em ágar. A otimização das condições do teste de dissolução para o controle de qualidade *in vitro* de AZ em comprimidos foi também estudado. O uso de 900 mL de HCl 0,1N, a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, aparato pá, a um a velocidade de 50 rpm, demonstrou resultados satisfatórios para produtos testados. A percentagem de dissolução de AZ na condição estabelecida foi superior a 90% em 45 minutos. O método espectrofotométrico validado para avaliar a dissolução mostrou-se específico, sem interferência do placebo dos comprimidos, na quantificação de AZ, linear ($r > 0,99$), preciso ($CV < 5\%$) e exato ($> 97\%$). O fármaco mostrou estabilidade satisfatória no meio de dissolução selecionado.

Palavras-chaves: azitromicina, espectrofotometria, validação, dissolução.

ABSTRACT

Dissertation for obtaining the degree of Master
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AZITHROMYCIN: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYSIS METHODS IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

AUTHOR: JOÃO RONALDO N. FERREIRA
ADVISER: PROF^a. DR^a. SIMONE GONÇALVES CARDOSO
DATE AND LOCAL OF THE DEFENSE: SANTA MARIA, 04 DE MAIO DE 2007.

Azithromycin (AZ) is a macrolide antibiotic derivate from erythromycin. AZ has a broad spectrum of activity against common gram-negative pathogens and has been used for the treatment of respiratory tract infection, skin infections and sexually transmitted diseases. In the Brazilian market AZ is available as tablets, compounded capsules and powder for oral suspension. The official methods for the assay of AZ in bulk form; capsules and powder for oral suspension are high performance liquid chromatography or microbiological diffusion assay. No monographs are reported in the pharmacopoeias for AZ evaluation in tablets. In this work two spectrophotometric methods were developed and validated for AZ analysis in tablets and powder for oral suspension. The first method was based on the reaction of AZ with concentrated sulfuric acid (98 % w/v), with detection at 226 nm. The other method was based in the charge-transfer reaction of the drug with σ -acceptor iodine, with detection at 363 nm. Both methods showed good linearity ($r > 0.99$), precision ($CV < 5\%$) and accuracy ($> 99\%$). The results obtained with the proposed methods were in good agreement with those obtained by microbiological diffusion agar method. The optimization of dissolution test conditions for in vitro quality control of AZ in tablets was also studied. The use of 900 mL of 0.1N HCl at 37.0 ± 0.5 °C, paddle as apparatus, at a stirring rate of 50 rpm, provided satisfactory results for tested products. The percent dissolution of AZ in the established condition was more than 90% in 45 minutes. The validated spectrophotometric method used to evaluate the dissolution testing showed to be specific (with no interference of the placebo or tablets in the quantification of AZ), linear ($r > 0.99$), precise ($RSD < 5\%$) and accurate ($> 97\%$). The drug showed satisfactory stability in the selected dissolution medium.

Key-words: azithromycin, spectrophotometry, validation, dissolution.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fórmula estrutural da azitromicina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003)..25
- Figura 2 – Espectro na região do IV da AZ.33
- Figura 3 – Avaliação da velocidade de reação através da variação do volume de ácido sulfúrico.....48
- Figura 4 – Avaliação das absorbâncias em função do tempo, em diferentes temperaturas, após a reação com ácido sulfúrico.....48
- Figura 5 – Representação gráfica da sobreposição dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria no UV, da solução de SQR (P), de amostra (A) e de solução simulada de excipientes dos Produtos A (a), B (b) e C (c), após reação com ácido sulfúrico.....49
- Figura 6 – Representação gráfica da curva de calibração da AZ, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.50
- Figura 7 – Avaliação da velocidade de reação através da variação do volume e da concentração, da solução de iodo.61
- Figura 8 – Avaliação das absorbâncias nas diferentes temperaturas, após a reação por complexo de transferência de carga com iodo 0,005 M.61
- Figura 9 – Representação gráfica da sobreposição dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria no UV, da solução de SQR (P), de amostra (A), do branco (B) e das amostras simuladas de excipientes, dos Produtos A (a), B (b) e C (c), após reação por complexo de transferência de carga com iodo.....62

- Figura 10 – Representação gráfica da curva de calibração da AZ por espectrometria no UV, após reação por complexo de transferência de carga com iodo.....64
- Figura 11 – Avaliação das absorbâncias em função do tempo de intervalo entre o preparo e a reação com a solução de iodo 0,005 M.69
- Figura 12 – Avaliação da velocidade de reação através da variação do volume ácido sulfúrico.79
- Figura 13 – Avaliação das absorbâncias através e reação com ácido sulfúrico, em função do tempo, frente a variações de temperatura79
- Figura 14 – Representação gráfica da sobreposição dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria no visível, da solução de SQR (P), de amostra (A) e das amostras simuladas de excipientes, dos Produtos A (a), B (b) e cápsula vazia (c), após reação com ácido sulfúrico concentrado.....80
- Figura 15 – Representação gráfica da curva de calibração da AZ por espectrometria na região do visível, após reação com ácido sulfúrico.....81
- Figura 16 – Perfis de dissolução dos comprimidos contendo AZ (Produto A), em diferentes meios (900 ml), à temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e velocidade de 100 rpm.....86
- Figura 17 – Perfis de dissolução dos comprimidos contendo AZ (Produto A), em diferentes meios (900 ml), à temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e velocidade de 75 rpm.....87
- Figura 18 – Perfis de dissolução dos comprimidos contendo AZ (Produto A), em diferentes meios (900 ml), à temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e velocidade de 50 rpm.....87
- Figura 19 – Sobreposição dos perfis de dissolução, dos Produtos A e B (comprimidos), em 900 ml de HCl 0,1 N, à temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e velocidade de 50 rpm.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores obtidos no ensaio de pureza da AZ (pH, umidade e faixa de fusão).	34
Tabela 2 – Valores obtidos na determinação de peso dos comprimidos (Produtos A e B).....	34
Tabela 3 – Valores obtidos nos testes de dureza, friabilidade e desintegração dos comprimidos (Produtos A e B).....	35
Tabela 4 – Valores obtidos nas determinações de pH da suspensão reconstituída, do volume do diluente e do peso pó para suspensão.....	35
Tabela 5 – Condições experimentais desenvolvidas para análise da AZ através da espectrofotometria no UV, utilizando reação com ácido sulfúrico.....	43
Tabela 6 – Condições experimentais utilizadas na análise de AZ pelo método microbiológico de difusão em ágar.....	46
Tabela 7 – Valores de absorbâncias obtidos na determinação da curva de calibração da AZ por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	50
Tabela 8 – Tratamento estatístico dos resultados obtidos na curva de calibração, pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA, para o método espectrofotométrico no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	51
Tabela 9 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto A), por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.	52

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto A, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	52
Tabela 11 - Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto B), por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	53
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto B, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	53
Tabela 13 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em pó para suspensão (Produto C), por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	54
Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto C, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.....	54
Tabela 15 – Comparação estatística (ANOVA) entre o método espectrofotométrico na região do UV, após reação com ácido sulfúrico, e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003).....	55
Tabela 16 – Condições experimentais desenvolvidas para análise da AZ através da espectrofotometria no UV, utilizando reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	57
Tabela 17 – Valores de absorbâncias obtidos na determinação da curva de calibração da AZ por espectrofotometria no UV, através da reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	63
Tabela 18 – Tratamento estatístico dos resultados obtidos na reta de calibração, pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA, para o método espectrofotométrico no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	64
Tabela 19 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto A), por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	65

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto A, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.	65
Tabela 21 - Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto B), por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	66
Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto B, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	66
Tabela 23 - Valores experimentais referentes à determinação de AZ do pó para suspensão (Produto C), por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	67
Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto C, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.....	67
Tabela 25 – Comparação estatística (ANOVA) entre o método espectrofotométrico no UV após reação por complexo de transferência de carga com iodo e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003).....	68
Tabela 26 – Comparação estatística (ANOVA) entre os métodos espectrofotométricos no UV, após reação com ácido sulfúrico e reação por complexo de transferência de carga com iodo, e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003).....	69
Tabela 27 – Condições experimentais desenvolvidas para determinação da percentagem dissolvida de AZ, através da espectrofotometria no visível, utilizando reação com ácido sulfúrico.....	74
Tabela 28 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos contendo AZ (Produto A), utilizando o aparato pá.....	77

- Tabela 29 - Valores de absorvâncias obtidos na determinação da curva de calibração da AZ por espectrofotometria no visível, após reação com ácido sulfúrico.....82
- Tabela 30 - Tratamento estatístico dos resultados obtidos na reta de calibração, pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico no visível, através de reação com ácido sulfúrico.....82
- Tabela 31 – Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de AZ (45 min), em comprimidos (Produto A), em 900 ml de HCl 0,1 N, aparato pá, por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico.....83
- Tabela 32 - Análise de variância (ANOVA) dos valores de percentagem dissolvida de AZ em comprimidos (Produto A), para análise da precisão intrermediária, por espectrofotometria no visível através de reação com ácido sulfúrico.....83
- Tabela 33 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes dos Produtos A e B, por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico.....84
- Tabela 34 – Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de AZ, através do perfil de dissolução, com 12 comprimidos (Produto A), em 900 ml de HCl 0,1 N, aparato pá, por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico.....88
- Tabela 35 - Percentagem média de AZ dissolvida em função do tempo, eficiência de dissolução ED (%) e análise estatística entre as ED (%) dos produtos A e B.....89
- Tabela 36 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de AZ nos comprimidos dos Produtos A e B, em 900 ml de HCl ,01 N, aparato pá, no tempo de 30 min, utilizando espectrofotometria no visível, após reação com ácido sulfúrico.....90

LISTA DE ABREVIATURAS

A _A	Absorbância absoluta da amostra
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
A _{SQR}	Absorbância da SQR
ATCC	American Type Culture Collection
AZ	Azitromicina
C _A	Concentração de AZ na amostra
C _A %	Concentração da amostra em percentagem
CCD	Cromatografia em camada delgada
CL	Ácido cloranílico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C _{SQR}	Concentração da SQR
C _T	Concentração de AZ teórica na amostra
CV	Coefficiente de variação
CV %	Coefficiente de variação percentual
DDQ	2,3 – dicloro – 5,6 – diciano – p – benzoquinona
DP	Desvio Padrão
Gl	Graus de liberdade
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	Infravermelho
LSS	Lauril sulfato de sódio
M	Molar
mg	miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro

mm	Milímetro
N	Normal
pH	Potencial hidrogeniônico
Q	% de fármaco dissolvido relativo ao teor declarado no rótulo
r	Coefficiente de correlação de Pearson
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundos
SQR	Substância química de referência
TCNQ	7,7,8,8 – tetracianoquinodimetano
TPA	Tampão fosfato de sódio dibásico
TPF	Tampão acetato de sódio triidratado
µg	Micrograma
µl	Microlitro
USP	The United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta e visível
V/V	Volume/volume
V/V/V	Volume/volume/volume
Vis	Visível

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) da AZ SQR....98

ANEXO B - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) da AZ SQR..99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Considerações Gerais.....	24
3.2 Descrição	26
4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E DAS AMOSTRAS.....	27
4.1 Introdução.....	27
4.2 Substância Química de Referência (SQR)	27
4.3 Produtos Farmacêuticos.....	28
4.4 Solventes e Reagentes	28
4.5 Equipamentos e acessórios	29
4.6 Análise Qualitativa da SQR	29
4.6.1 Identificação	29
4.6.2 Descrição (descrição física e solubilidade)	29
4.6.3 Ensaio de pureza (determinação do pH, da umidade e da faixa de fusão).....	30
4.7 Análise dos comprimidos.....	30
4.7.1 Determinação do peso.....	30
4.7.2 Determinação da dureza.....	31
4.7.3 Determinação da friabilidade.....	31
4.7.4 Determinação do tempo de desintegração.....	31
4.8 Análise do pó para suspensão.....	31

4.8.1 Determinação do peso médio.....	31
4.8.2 Determinação do pH.....	32
4.8.3 Determinação do volume.....	32
4.9 Resultados e discussão.....	32
4.10 Conclusão.....	36

5 CAPITULO I – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA.....37

5.1 Introdução	37
5.2 Métodos de determinação.....	37
5.3 Substância química de referência.....	41
5.4 Amostras	41
5.5 Solventes e Reagentes.....	42
5.6 Equipamentos e acessórios.....	42
5.7 Método espectrofotométrico através da reação com ácido sulfúrico.....	42
5.7.1 Desenvolvimento do método	43
5.7.2 Validação do método	43
5.7.2.1 Especificidade	44
5.7.2.2 Linearidade	44
5.7.2.3 Precisão.....	45
5.7.2.4 Exatidão.....	46
5.7.2.5 Robustez.....	47
5.7.3 Resultados e discussão	47
5.8 Método espectrofotométrico através da reação por complexação com iodo.....	56
5.8.1 Desenvolvimento do método.....	56
5.8.2 Validação do método.....	57
5.8.2.1 Especificidade.....	57
5.8.2.2 Linearidade.....	58
5.8.2.3 Precisão.....	58
5.8.2.4 Exatidão.....	59
5.8.2.5 Robustez.....	59
5.8.3 Resultados e discussão.....	59
5.9 Comparação entre os métodos propostos e o método oficial.....	69

6 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS.....	71
6.1 Introdução.....	71
6.2 Substância química de referência (SQR).....	72
6.3 Solventes e Reagentes.....	72
6.4 Equipamentos e acessórios.....	72
6.5 Desenvolvimento e validação de método para determinação de AZ por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico concentrado (98 %)......	73
6.5.1 Avaliação da especificidade.....	74
6.5.2 Linearidade	75
6.5.3 Precisão	75
6.5.4 Exatidão.....	75
6.5.5 Robustez	76
6.6 Avaliação da estabilidade da SQR e das amostras no meio de dissolução.....	76
6.7 Escolha dos parâmetros de dissolução	76
6.8 Resultados e discussão	78
7 CONCLUSÕES	91
8 REFERÊNCIAS	92
ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

Durante décadas pesquisadores moveram-se em busca de descobertas que fossem importantes para o desenvolvimento de fármacos com atividade antimicrobiana, resultando atualmente em um número bastante expressivo destes agentes, já isolados, por outras vezes modificados sinteticamente e elaborados para fins terapêuticos. Dentre os antibióticos desenvolvidos e amplamente utilizados, destacam-se os macrolídeos, por apresentarem melhor perfil farmacocinético e maior espectro de ação no tratamento das infecções causadas por germes sensíveis. Deste grupo tem-se como principal representante a eritromicina, pela eficácia terapêutica nas infecções causadas por patógenos tais como *Legionella*, *Campylobacter* e *Chlamydia*. Dado a sua relativa segurança e eficácia, vários estudos foram realizados e levaram a modificações na sua estrutura, buscando melhorias no espectro de ação e diminuição nos efeitos colaterais (CARVALHO; CARVALHO, 1998).

Destes estudos surgiu a azitromicina (AZ), a qual passou a destacar-se pela redução dos efeitos adversos, com sensível melhoria no espectro de ação, quando comparada à eritromicina. A AZ difere-se da eritromicina por apresentar um anel lactônico composto de 15 membros, ou seja, um a mais do que a eritromicina. Desta modificação, por inclusão de um grupo metila ligado ao nitrogênio no anel macrocíclico, resultou melhorias na estabilidade em meio ácido e conseqüentemente, alterações farmacocinéticas, melhor espectro de ação e redução dos efeitos colaterais gastrintestinais (JAIN; DANZIGER, 2004).

A AZ é comercializada no mercado nacional nas formas de comprimidos simples ou revestidos de 500 mg e suspensão oral de 600 mg/15 ml e 900 mg/15 ml, podendo também ser encontrada na forma de cápsulas, manipuladas em farmácias magistrais.

Encontram-se na literatura vários estudos para a determinação de AZ em matérias-primas e formas farmacêuticas utilizando métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), microbiológico, espectrofotométricos, entre outros. Entretanto, muitos dos métodos já propostos apresentam desvantagens como necessidade de reações intermediárias, equipamentos ou reagentes específicos, nem sempre disponíveis em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, ou o tempo de análise é muito elevado, desencorajando sua aplicação em controle de qualidade.

Neste sentido, o presente trabalho contempla o desenvolvimento de métodos rápidos, simples e de custo inferior aos já propostos, para a determinação de AZ em formas farmacêuticas e matérias-primas e para estudos de dissolução de comprimidos, utilizando

equipamentos de fácil operação e encontrados normalmente em laboratórios de controle de qualidade, sendo também exequíveis em farmácias de manipulação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos para análise de azitromicina em formas farmacêuticas e avaliar o perfil de dissolução do fármaco em comprimidos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a matéria-prima a ser utilizada como substância química de referência através de espectroscopia na região do infravermelho e determinação de faixa de fusão, da umidade, do pH e da solubilidade;
- Avaliar as características físicas e físico-químicas dos comprimidos e do pó para suspensão.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do UV, através de reação de cor com ácido sulfúrico, para a quantificação de azitromicina em formas farmacêuticas;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo, para a quantificação de azitromicina em formas farmacêuticas;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do visível para a quantificação de AZ e avaliação do perfil de dissolução de comprimidos;
- Desenvolver e validar método de dissolução de comprimidos contendo azitromicina;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações Gerais

A partir da picromicina, primeiro antibiótico macrolídeo isolado em 1950, vários estudos, através de modificações moleculares, resultaram em importantes contribuições na descoberta de novos compostos macrolídeos. Dentre estes, destacaram-se a eritromicina e, posteriormente, os seus derivados, como a roxitromicina, eritromicilamina, diritromicina, azitromicina e fluritromicina, os quais passaram a representar os novos macrolídeos (OLIVEIRA, 1995).

Os antibióticos macrolídeos são produzidos por microrganismos da espécie *Streptomyces* e possuem características estruturais comuns, como a presença de uma lactona macrocíclica contendo entre 12 e 17 átomos, um grupo cetônico, um ou dois aminoaçúcares unidos ao núcleo por ligações glicosídicas, um açúcar neutro ligado ao núcleo ou ao aminoaçúcar e a presença de um grupo dietilamínico no resíduo de açúcar, o qual explica a sua basicidade e torna possível a preparação de seus sais (LODE et al., 1996).

A AZ (Figura 1) foi o primeiro antibiótico azalídeo introduzido no mercado, no final de 1991. A mesma é obtida de forma semi-sintética e pertence à subclasse dos macrolídeos. Derivada da eritromicina diferencia-se desta por apresentar um anel macrocíclico de 15 membros, ou seja, um membro a mais se comparado com a eritromicina (CARVALHO; CARVALHO, 1998).

A expansão do anel lactônico com a inserção de um nitrogênio metil-substituído, partindo da eritromicina, confere à AZ uma melhor estabilidade ácida e, conseqüentemente, maior resistência ao meio gástrico. Com isto evita-se a formação de derivados anidro-hemicetais os quais podem estar associados aos efeitos tóxicos gastrintestinais, através da indução da motilidade gástrica, observados no tratamento com a eritromicina (ITOH et al., 1984). Destas modificações resultaram também melhorias significativas nas propriedades microbiológicas e farmacocinéticas da AZ, como maior espectro de ação e aumento na meia vida de eliminação (JAIN; DANZIGER, 2004).

A AZ é um antibiótico de amplo espectro de ação, utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, doenças sexualmente transmissíveis e infecções da pele e de tecidos moles. O tratamento de três a cinco dias, em dose oral diária de 500 mg, tem

demonstrado efetividade nos casos de bronquite aguda, pneumonia, sinusites, faringites, tonsilites e otites médias (GHANDI, 2004).

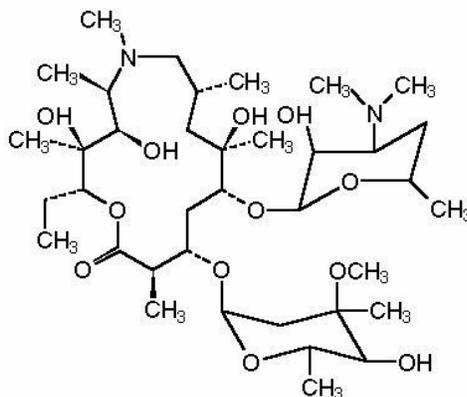


Figura 1 – Fórmula estrutural da azitromicina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003).

Após administração oral de AZ, a mesma é rapidamente absorvida e amplamente distribuída nos tecidos, seguindo modelo de dois-compartimentos. A rapidez e a extensão de sua distribuição resultam em uma maior concentração de AZ nos tecidos, comparadas às concentrações plasmáticas, demonstrando sua forte ligação com os tecidos. O tempo necessário para atingir os picos de concentração plasmática é de 2 a 3 horas. Sua biodisponibilidade é de 37 %, podendo a mesma ser reduzida em até 43 % quando a administração de AZ for concomitante com alimentos. Por isso recomenda-se a administração de AZ 1 hora antes ou 2 horas depois das refeições. A administração oral de AZ concomitante com antiácidos reduz as concentrações plasmáticas máximas, mas não afeta a absorção global. A AZ possui meia vida tecidual de 2 a 4 dias, volume de distribuição de 31 l/Kg, *clearance* de 9 ml/min./Kg e 12 % de excreção urinária. Possui também meia-vida de eliminação longa, de aproximadamente 40 horas. A AZ interage de forma importante com a terfenadina e com aztemizol (Hismanal) e não parece interagir com a teofilina e a varfarina, como acontece com a eritromicina (CARVALHO; CARVALHO, 1998).

Os efeitos colaterais mais comuns com o uso de AZ ocorrem ao nível de trato gastrointestinal e incluem principalmente diarreia (3,6 %), náuseas (2,6 %), vômitos (1 %), dor ou desconforto abdominal (2,5 %), cefaléia branda e tontura (1,3 %). Também podem ocorrer reações alérgicas, mas estas são de pouca frequência, geralmente com manifestações de erupções cutâneas tipo exantema. Os testes de função hepática podem apresentar

ocasionalmente discretas elevações, e o uso de doses elevadas de AZ pode provocar perda auditiva reversível. O uso de AZ em crianças menores de 16 anos não deve ser recomendado até que sejam estabelecidas a segurança e eficácia da droga neste grupo de paciente. Do mesmo modo, a utilização de AZ durante a gravidez e em mulheres lactantes ainda não foi suficientemente investigada (CARVALHO; CARVALHO, 1998).

O mecanismo de ação da AZ ocorre por inibição da síntese protéica nos microorganismos sensíveis, ligando-se a subunidade ribossomal 50 S, impedindo a fixação do RNAt ao ribossomo, bloqueando o aporte dos aminoácidos, componentes das proteínas (GAYNOR; MANKIN, 2005).

3.2 Descrição (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003; BUDAVARIS, 1996).

- Forma diidratada: pó branco cristalino.
- Nome químico: (2 R, 3 S, 4 R, 5 R, 8 R, 10 R, 12 S, 13S, 14 R)-13-[2,6-Didesoxi-3-C-metil- α -L-ribohexapiranosil]oxi]-2-etil-3,4,10-triidroxi-3, 5, 6, 8, 10, 12, 14 heptametil-11-[[3,4,6-tridesoxi-3-(dimetilamino)- β -D-xilohexapiranosil]oxi]-1-oxa-6-azaciclopentadecan-15-ona.
- Registro no Chemical Abstracts Service (CAS):
 Forma diidratada: 117772-70-0
 Base anidra: 83905-01-5
- Código da Denominação Comum Brasileira (DCB):
 Forma diidratada: 00752.02-9
 Base anidra: 2037.01-7
- Fórmula molecular da azitromicina base: $C_{38}H_{72}H_2O_{12}$
- Peso molecular da base: 749,0
- Fórmula molecular da azitromicina diidratada: $C_{38}H_{72}H_2O_{12} \cdot 2H_2O$
- Peso molecular da forma diidratada: 785,0
- Temperatura de fusão: 113 – 114 °C
- Solubilidade: muito pouco solúvel em água, solúvel em clorofórmio, facilmente solúvel em etanol e metanol. Muito pouco solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos. Ligeiramente solúvel em soluções ácidas.

4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E DAS AMOSTRAS

4.1 Introdução

No desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e preparações farmacêuticas, torna-se indispensável a utilização de substâncias químicas de referência (SQR) adequadamente caracterizadas, assim como preparações farmacêuticas de qualidade definida. Entre as substâncias utilizadas como padrão de referência, algumas delas podem ser classificadas como compendiais, as quais são obtidas de farmacopéias (Americana, Européia, Brasileira), e não necessitam de caracterização antes de serem utilizadas. Porém, podem também ser utilizadas as substâncias de fontes não oficiais, também chamadas de não compendiais, as quais devem ser cuidadosamente caracterizadas antes do uso para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ; KRULL, 1998).

Em virtude da SQR do fármaco em estudo ser classificada como não compendial, foram realizados testes de identificação, descrição e ensaios de pureza, conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira IV (2003), para caracterizar a matéria-prima adquirida.

Para as amostras de comprimidos foram realizados os testes de determinação de peso, de resistência mecânica e desintegração e, para o pó para suspensão, foram realizados os testes de determinação de peso do pó, volume do diluente e pH da suspensão reconstituída, ambos utilizando metodologias descritas na Farmacopéia Brasileira IV (1988).

4.2 Substância Química de Referência (SQR)

A substância utilizada como referência foi AZ matéria-prima adquirida comercialmente da DEG Importadora de Produtos Farmacêuticos LTDA, com teor declarado de 98,6 %, na forma diidratada, e pertencente ao lote 031204.

4.3 Produtos Farmacêuticos

Foram adquiridos, comercialmente, comprimidos e suspensão de azitromicina, conforme as descrições a seguir:

a) Comprimidos revestidos contendo 524 mg de azitromicina diidratada (equivalente a 500 mg de azitromicina base). Excipientes: amido pré-gelatinizado, fosfato de cálcio dibásico anidro, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio e revestimento com hidroxipropilmetilcelulose, triacetina e dióxido de titânio (Produto A - Genérico).

b) Comprimidos revestidos contendo 524 mg de azitromicina diidratada (equivalente a 500 mg de azitromicina base). Excipientes: celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, amido glicolato de sódio, lauril sulfato de sódio, estearato de magnésio, talco, dióxido de silício coloidal e policoat clear (Produto B - Similar).

c) Pó para suspensão contendo 209,6 mg de azitromicina diidratada para cada 5 ml da suspensão reconstituída (equivalente a 200 mg de azitromicina base). Excipientes: açúcar, goma xantana, fosfato tribásico de sódio e aromatizante (Produto C - Similar).

4.4 Solventes e Reagentes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Água destilada
- Ácido clorídrico, Merck[®]
- Etanol, Tedia[®]
- Clorofórmio, Tedia[®]
- Hidróxido de sódio, Merck[®]
- Metanol, Tedia[®]
- Pastilhas de Brometo de Potássio

4.5 Equipamentos e acessórios

- Aparelho de desintegração, Nova Ética[®]
- Aparelho de Karl Fisher, Titroline Alpha[®]
- Aparelho de Ponto de Fusão, Gehaka[®]
- Balança analítica Sartorius[®]
- Banho ultra-sônico, Thornton[®]
- Destilador, Biomatic[®]
- Durômetro, Pharma Test[®]
- Espectrofotômetro Infra-vermelho (IR), Shimadzu Prestige-21[®]
- Filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell[®]
- Friabilômetro, Fieldlab Schott[®]
- Micropipetador Transferpette Brand[®]
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]
- Pipetador Transferpette, Brand[®]
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]

4.6 Análise Qualitativa da SQR

4.6.1 Identificação

O teste de identificação preconizado na Farmacopéia Brasileira IV (2003) para AZ é a espectrofotometria de absorção no infravermelho.

O espectro de absorção no IV da AZ, realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, foi obtido em espectrofotômetro IR, marca Shimadzu modelo IR Prestige-21. Para as análises foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo 20 mg do fármaco.

4.6.2 Descrição (descrição física e solubilidade)

A descrição da AZ, de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (2003), deve ser realizada através da avaliação dos caracteres físicos e solubilidade. A descrição física da SQR,

quanto à cor e aspecto cristalino foi realizada através da observação visual. A solubilidade foi determinada através da solubilização da SQR nos seguintes solventes: água, clorofórmio, etanol, metanol, solução de hidróxidos alcalinos e soluções ácidas, ambos a 25 °C.

4.6.3 Ensaio de pureza (determinação do pH, da umidade e da temperatura de fusão)

Segundo a Farmacopéia Brasileira IV (2003), os ensaios de pureza que devem ser realizados para AZ são a determinação do pH e da água.

A determinação potenciométrica do pH refere-se à medida da diferença de potencial entre dois eletrodos adequados, imersos na solução em análise. A determinação do pH foi realizada em solução a 0,2 % (p/V) de AZ, em mistura de água e metanol (1:1).

A determinação da água presente na matéria-prima foi realizada através do método volumétrico de Karl Fischer, em aparelho titulométrico, seguindo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Outro teste realizado foi a determinação da temperatura de fusão, em que se avalia a temperatura em que determinada substância funde-se completamente. Também pode ser determinada a faixa de fusão, onde se observam a temperatura inicial de fusão, correspondente ao aparecimento das primeiras gotículas na parede do tubo capilar, e a temperatura correspondente a total fluidificação da amostra. A temperatura de fusão da SQR foi determinada utilizando aparelho de fusão Gehaka modelo PF 100. Uma pequena quantidade da SQR foi dessecada previamente durante 24 horas em estufa à vácuo sobre sílica-gel. Foram introduzidas em capilares, quantidades suficientes para preencher aproximadamente 4 mm de altura, fechando-se uma de suas extremidades e inseridos na célula de aquecimento. Durante o aquecimento foi observada a temperatura de fusão, onde a substância tornou-se totalmente líquida.

4.7 Análise dos comprimidos

4.7.1 Determinação do peso

A determinação de peso dos comprimidos foi realizada conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988). Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos de cada produto, calculando-se a média e os limites de variação.

4.7.2 Determinação da dureza

A determinação da dureza dos comprimidos foi realizada conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988), utilizando equipamento de dureza, onde foi determinada a força, em Newtons, necessária para romper 10 comprimidos de cada produto, calculando-se as médias.

4.7.3 Determinação da friabilidade

A determinação da friabilidade dos comprimidos foi realizada conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988), utilizando equipamento específico para o teste. Foram pesados 20 comprimidos de cada produto, os quais foram introduzidos no aparelho e submetidos à ação do mesmo a 20 rotações por minuto. Após 5 minutos os 20 comprimidos foram novamente pesados, calculando-se a perda de pó, por diferença entre as pesagens.

4.7.4 Determinação do tempo de desintegração

A determinação do tempo de desintegração dos comprimidos foi realizada conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988), utilizando equipamento específico de desintegração, e água como líquido de imersão, mantida a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o teste foram utilizados seis comprimidos de cada produto.

4.8 Análise do pó para suspensão

4.8.1 Determinação do peso médio

A determinação do peso dos frascos contendo o pó para suspensão foi realizada conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988). Foram pesados, individualmente, 10 frascos. O conteúdo de cada frasco foi removido e os frascos foram lavados e secos em estufa. Após a secagem, os 10 frascos foram pesados, individualmente, e a diferença entre as duas pesagens representou o peso do conteúdo de cada unidade, calculando-se a média e os limites de variação.

4.8.2 Determinação do pH

Para a determinação do pH as suspensões foram reconstituídas, conforme indicado no rótulo do produto, e posteriormente foram verificados os valores correspondentes de pH, em triplicata, utilizando equipamento potenciométrico.

4.8.3 Determinação do volume

A determinação do volume foi realizada conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988). Foram pesadas, individualmente, 3 unidades das soluções diluentes. O conteúdo de cada frasco foi removido e os frascos foram lavados e secos em estufa. Após a secagem, os 10 frascos foram pesados, individualmente, e a diferença entre as duas pesagens representou o peso do conteúdo de cada unidade. Determinou-se, igualmente, a densidade do diluente, através do método do picnômetro. Através dos pesos individuais e da densidade, calculou-se os volumes médios correspondentes.

4.9 Resultados e discussão

O espectro de absorção no IV da AZ encontra-se na Figura 2. As atribuições das bandas foram descritas com base na literatura pertinente (SILVERSTEIN, 2000).

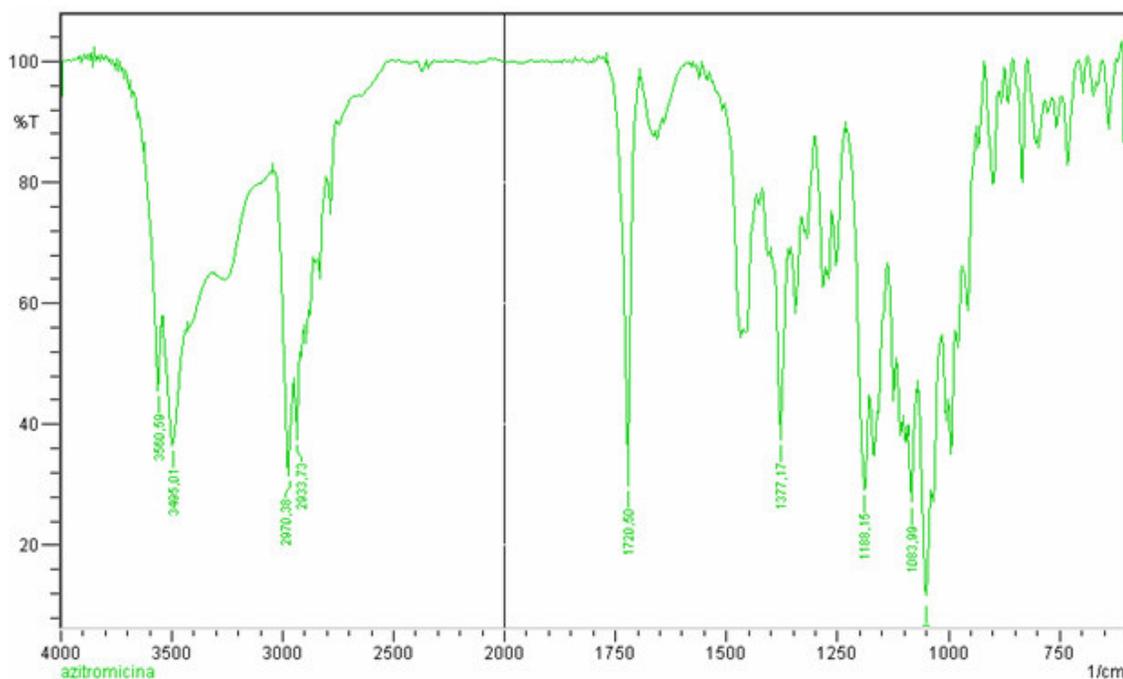


Figura 2 – Espectro na região do IV da AZ.

As bandas obtidas na região de 3560,59 e 3495,01 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de deformação axial dos grupos OH livre e com ligações intermoleculares. As bandas observadas na região de 2970,38 a 2933,73 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de deformação axial de C-H, de grupamentos metila. Ambas as estruturas encontram-se, tanto no anel macrocíclico, quanto nas duas porções açúcares (Figura 1). A banda na região de 1720,50 cm^{-1} pode estar relacionada às vibrações de deformação axial de C=O, que faz parte da estrutura macrocíclica da AZ. A banda encontrada na região de 1377,17 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação angular de C-H, de grupamentos dimetila geminados, encontrados nas porções açúcares da AZ. As bandas encontradas na região de 1188,15 e 1083,99 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de deformação axial de C-C-O e C-O, ambos presentes na estrutura macrocíclica e nas porções açúcares, da AZ (SILVERSTEIN, 2000).

Para identificação da AZ foram realizados, adicionalmente, espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) e de ^{13}C (RMN ^{13}C), os quais estão apresentados nos Anexos A e B, respectivamente.

Nos aspectos descritivos, como forma e cor, foram obtidos resultados satisfatórios, de acordo com a monografia da AZ (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1988).

A Farmacopéia Brasileira IV (1988) preconiza como teste de solubilidade a dissolução de uma parte de fármaco (1 g se for sólido ou 1 ml se for líquido) em partes pré-definidas de

solvente, conforme tabela de solubilidade incluída nesta literatura. Os testes de solubilidade foram realizados com quantidades reduzidas de fármaco, proporcionalmente a quantidade de solvente. Os resultados obtidos no teste de solubilidade foram satisfatórios, cumprindo com as especificações farmacopéicas.

Os valores obtidos nos ensaios de pureza encontram-se descritos na Tabela 1. Os valores de pH e água estão em acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira IV (2003). Os valores da temperatura de fusão encontram-se, igualmente, dentro dos limites especificados na literatura (BUDAVARIS, 1996).

Tabela 1 – Valores obtidos no ensaio de pureza da azitromicina.

Amostra	pH	Umidade (%)	Temperatura de fusão (°C)
1	10,05	4,65	115
2	10,15	4,65	114
3	9,93	4,64	114
Média	10,04	4,64	114
Especificações	9,0 a 11,0 *	Máximo 5 % *	113 a 115 °C **

* Os valores das especificações correspondem aos limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira IV (2003)

** Valores especificados no The Merck Index (BUDAVARIS, 1996).

Os resultados obtidos na determinação de peso dos comprimidos (produtos A e B) e do estão indicados na Tabela 2, onde se verifica que ambos os produtos cumpriram com as especificações da Farmacopéia Brasileira IV (1988). Para comprimidos podem-se tolerar no máximo duas unidades fora do limite especificado, em relação ao peso médio, e nenhuma unidade pode ter valores acima ou abaixo da porcentagem indicada.

Tabela 2 – Valores obtidos na determinação de peso dos comprimidos (Produtos A e B)

Produtos	Peso Médio (g) ± DP	Limites de variação^a	Nº de unidades fora dos limites especificados^b
Produto A	0,9357 ± 0,005	± 5 %	-
Produto B	0,6909 ± 0,019	± 5 %	2

^a Limites especificados pela Farmacopéia Brasileira IV (2003), para variação de pesos.

^b Número de unidades fora dos limites especificados, porém abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Os valores encontrados para a dureza, friabilidade e desintegração dos comprimidos, estão apresentados na Tabela 3, onde se verifica que os produtos A e B cumpriram com as especificações farmacopéicas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Tabela 3 – Valores obtidos nos testes de dureza, friabilidade e desintegração dos comprimidos (Produtos A e B).

Produtos	Dureza (Média = 10 un)	Friabilidade (%)	Tempo de desintegração
Produto A	151,7	0,043	1 min, 19 seg
Produto B	332,62	0,029	15 min, 28 seg
Especificações*	Mínimo aceitável: 30 N	Inferior a 1,5 %	Máximo: 30 min.

* Especificações preconizadas pela Farmacopéia Brasileira IV (2003).

Os resultados obtidos nas análises de pH da amostra reconstituída, na determinação do volume do diluente e do peso do pó a reconstituir, do produto C, estão descritos na Tabela 4. Os resultados encontram-se dentro dos limites especificados na Farmacopéia Brasileira IV (1988, 2003). Para pós, o peso médio do conteúdo não pode ser inferior ao valor nominal declarado.

Tabela 4 – Valores obtidos nas determinações de pH da suspensão reconstituída, do volume do diluente e do peso pó para suspensão.

Amostra	pH	Determinação do volume	Determinação do peso ^c
1	10,56	14,03	
2	10,40	14,10	
3	10,58	14,05	
Média	10,51	14,06	8,925 ± 0,341
Especificações	8,5 a 11,0 ^a	Máximo 2,5 % ^b	± 10 %

^a Limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira IV (2003).

^b Limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira IV, para variação de volume (1988).

^c Peso médio, do conteúdo em pó, de 10 unidades (valor declarado: 200 mg/ 5 ml de suspensão reconstituída)

4.10 Conclusão

Os resultados obtidos nas análises da matéria-prima indicaram a sua identidade e pureza, permitindo, com isto, sua utilização como substância química de referência. Da mesma forma, os resultados nas análises das características físicas-químicas das amostras demonstraram que as mesmas encontram-se dentro das especificações farmacopéicas, podendo estas serem utilizadas no desenvolvimento e validação de métodos de análise destas preparações farmacêuticas.

5 CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA

5.1 Introdução

No decorrer do desenvolvimento, fabricação e controle de qualidade de medicamentos, é imprescindível que se tenham controles, tanto de qualidade de produtos acabados como de processos, que possibilitem obter dados precisos da condição de uma preparação farmacêutica ou de um processo. Estes dados somente serão obtidos de forma confiável se for através de métodos analíticos validados, garantindo assim que tal método é adequado para uma análise pretendida.

Para validação de métodos analíticos de controle de qualidade, podem ser utilizados guias que indicam os parâmetros a serem seguidos, tais como especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005; USP 29, 2006).

5.2 Métodos de determinação

Conforme será apresentado a seguir, vários métodos, como o microbiológico de difusão em agar, CLAE, espectrofotometria, CCD, entre outros, têm sido descritos para a determinação de AZ em matérias-primas e formulações farmacêuticas.

A Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) disponibiliza monografias para AZ como matéria-prima, na forma de cápsulas e suspensão oral. O método descrito nesta farmacopéia, para quantificação e estudos de dissolução de cápsulas, é a CLAE, que indica a utilização de fase móvel com pH elevado (pH = 11), coluna cromatográfica específica (gama-alumina) e detector eletroquímico. O teste de dissolução preconizado indica: a) meio de dissolução: solução tampão de fosfato de sódio pH 6,0, contendo 0,1 % de tripsina (900 ml); b) aparato: pá, 100 rpm; c) tempo de coleta: 45 minutos, d) liberação mínima de 75 % e e) temperatura: 37 °C ± 0,5 °C.

Na Farmacopéia Brasileira IV (2003) encontram-se disponíveis monografias para matéria-prima e cápsulas. O método de determinação da potência de AZ é o microbiológico de difusão em ágar, utilizando *Micrococcus luteus* ATCC 9341 como microrganismo teste. O

teste de dissolução não se encontra descrito nessa farmacopéia. Para comprimidos não foram encontradas monografias oficiais.

A avaliação da potência de AZ em formas farmacêuticas pelo método de difusão em ágar tem sido proposta por alguns autores. Turcinov e Pepeljnjak (1998) determinaram a potência de AZ através do método microbiológico utilizando o modelo quadrado latino 8 x 8, com duas concentrações da solução padrão e duas da amostra, e testando a sensibilidade de AZ frente a vários microrganismos. O método apresentado por Breier et al. (2002) utilizou *Micrococcus luteus* ATCC 9341 como microrganismo teste para avaliar a potência de AZ em cápsulas e suspensão oral, demonstrando linearidade, exatidão e precisão. Salgado e Roncari (2005) desenvolveram método microbiológico por difusão em ágar para a determinação de AZ em soluções oftálmicas. A concentração de trabalho foi de 1,66 mg/ml de AZ e o microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis* ATCC 9372. O método demonstrou linearidade, precisão e exatidão.

Gandhi et al. (2000) desenvolveram e validaram método por CLAE para quantificação e estudo de dissolução de comprimidos e cápsulas contendo AZ. Os autores utilizaram coluna C₁₈, fase móvel constituída de acetato de amônia, acetonitrila: metanol e tetraidrofurano (60:27:25:2,5, V/V), com vazão de 1 ml/min e detector eletroquímico. Os estudos de dissolução de três produtos comerciais foram realizados, conforme monografia para AZ cápsulas da USP 23, utilizando tampão fosfato de sódio pH 6,0 como meio de dissolução, sistema de pá e rotação de 100 rpm. Amostras (n=3) de cada produto foram coletadas em 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e avaliadas. O método demonstrou ser simples, exato e preciso para o objetivo proposto.

Zubata et al. (2002) desenvolveram método por CLAE mais simples e com equipamentos mais acessíveis, utilizando coluna C₁₈ e fase móvel constituída de tampão fosfato de amônio: acetonitrila e metanol (60:20:20, V/V/V), com pH ajustado para 8,0 com ácido fosfórico e detecção no ultravioleta, em 215 nm. Segundo os autores, o método pode ser aplicado para análise de teor e testes de dissolução. Os dados referentes à dissolução não foram, no entanto, apresentados no referido trabalho.

A CLAE com detecção no ultravioleta a 210 nm foi aplicada por Miguel e Barbas (2003) para determinação de impurezas em AZ comprimidos. O método desenvolvido utilizou duas fases móveis. A fase A era constituída de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, e a fase B era constituída de uma mistura de acetonitrila: metanol (1:1, V/V). A eluição por gradiente foi realizada a uma vazão de 1 ml/min. Foi utilizada coluna C₄, mantida a 50 °C. O método proposto permitiu a separação de seis impurezas relacionadas à AZ.

Debremaeker et al. (2003) desenvolveram método por CLAE acoplado à espectrometria de massa. O método foi aplicado para avaliação da pureza de matéria-prima de AZ, e apresentou algumas vantagens quando comparado aos métodos já descritos por CLAE com detecção no UV, como a possibilidade de detecção de novas substâncias, com ganho de tempo por não necessitar de isolamento e purificação das substâncias analisadas.

Li (2006) desenvolveu método por CLAE para a determinação de AZ cloridrato e substâncias relacionadas, em matérias-primas, utilizando coluna C₁₈, mantida à temperatura de 40 °C e fase móvel contendo tampão fosfato de amônio (pH ajustado para 6,5 com trietilamina) e acetonitrila (70:30, V/V). A vazão foi de 1 ml/min. e detecção no UV à 215 nm. O método demonstrou ser rápido, simples e sensível.

Um método espectrofluorimétrico foi desenvolvido por Khashaba (2002) para análise de antibióticos macrolídeos, como a AZ, em formas farmacêuticas. O método demonstrou linearidade, exatidão, precisão, robustez e aplicabilidade em formulações farmacêuticas. Também não foram detectadas interferências de excipientes, além de ser mais simples e econômico do que os métodos descritos anteriormente.

A determinação de AZ em formas farmacêuticas foi realizada por Nigovic e Simunic (2003) através da voltametria em sistema cíclico, linear e pulso diferencial, utilizando eletrodo de carbono. O método apresentou resultados comparáveis aos obtidos pelo método oficial. Farghaly e Mohamed (2004) também desenvolveram método por voltametria em onda quadrada equipado com eletrodo de carbono. O método demonstrou ser comparável aos já descritos por CLAE, podendo ser utilizado para análise de AZ em matérias-prima, em preparações farmacêuticas e em fluídos biológicos.

Foi desenvolvido, por Komorsky-Lovric e Nogovic (2004), método para identificação de AZ, ciprofloxacino e ácido 5-aminosalicílico através da voltametria equipada com eletrodo de grafite, na forma cíclica e onda quadrada. Os autores propuseram o método para determinação qualitativa, destes fármacos, em preparações farmacêuticas.

Song e Wang (2003) desenvolveram método baseado na reação de quimioluminescência usando luminol e peróxido de hidrogênio. Este método demonstrou ser econômico, eficiente, sensível e seletivo para AZ em preparações farmacêuticas e em fluidos biológicos.

Khedr e Sheha (2003) propuseram método por cromatografia em camada delgada para a análise de AZ em cápsulas e matéria-prima. Nesta metodologia foram utilizadas placas de sílica-gel e fase móvel constituída de hexano-acetato de etila-dietilamina (75:25:10, V/V/V). O referido método mostrou seletividade, sensibilidade, exatidão, precisão, linearidade e

robustez satisfatórias. Os autores sugeriram que o mesmo pode ser utilizado para a determinação de impurezas de cápsulas e matéria-prima, uniformidade de conteúdo, teste de dissolução e estabilidade de cápsulas.

Danielson et al. (1993) apresentaram método simples de identificação qualitativa e quantitativa de antibióticos macrolídeos por espectrofotometria no visível, em 420 nm, através da reação com ácido sulfúrico concentrado. O método foi desenvolvido para análise de eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, espiramicina e tilosina, e o mesmo demonstrou ser aplicável para formulações e matérias-primas.

Gallagher e Danielson (1995) desenvolveram método espectrofotométrico para a determinação de eritromicina, oleandomicina, espiromicina e tilosina em formulações farmacêuticas, através de reações com íon férrico (Fe^{3+}) na presença de mistura de ácido acético e ácido sulfúrico. A reação produziu coloração a qual pode ser detectada a 592 nm.

Um sistema rápido de identificação de antibióticos macrolídeos, incluindo a AZ, foi desenvolvido por Hu et al. (2006), como ferramenta de investigação de produtos falsificados. O método foi baseado na reação entre ácidos concentrados e as substâncias em análise, produzindo colorações que permitem a detecção e diferenciação dos antibióticos macrolídeos presentes nas matérias primas e preparações farmacêuticas.

A determinação espectrofotométrica de seis fármacos contendo grupos doadores de elétrons foi apresentada por Kelani et al. (1997). Foram testados azitromicina, cetoconazol, clotrimazol, clozapina, oxamniquine e pimozida. O método foi baseado na formação de produto da reação entre 2,3 – dicloro – 5,6 – diciano – p – benzoquinona (DDQ) e os fármacos contendo os grupos doadores de elétrons, possibilitando leituras em 588 nm. O método demonstrou ser aplicável para a determinação destas substâncias em matérias-primas e formas farmacêuticas.

Li et al. (2004) realizaram a determinação de AZ por espectrofotometria baseados na reação de transferência de carga entre o fármaco, como doador, e vermelho de alizarina, como receptor, em solução etanólica. A absorbância do complexo formado foi mensurada em 546 nm. O método demonstrou ser aplicável para a determinação de AZ em formas farmacêuticas.

Tian et al. (2005) validaram método espectrofotométrico para a determinação de azitromicina no teste de dissolução de comprimidos, também baseado na formação de complexo entre a AZ e o vermelho de alizarina, com leitura em 538 nm. As condições do teste de dissolução foram 900 ml meio tampão fosfato de sódio (pH 6,0), a 100 rpm, tempo de coleta de 45 minutos, com tolerância de liberação mínima de 75 % da quantidade declarada de

AZ. O método demonstrou linearidade e aplicabilidade no teste de dissolução de comprimidos.

Huang et al. (2006) desenvolveram método espectrofotométrico através da interação de azitromicina com 7,7,8,8 – tetracianoquinodimetano (TCNQ) e com ácido cloranílico (CL). As absorvâncias foram determinadas em 743 nm para o complexo com TCNQ e em 842 nm para o complexo com CL. Ambos os métodos demonstraram aplicabilidade para a determinação de azitromicina em comprimidos.

Rachidi et al. (2006) realizaram a determinação de azitromicina por espectrofotometria através da formação de pares iônicos entre o fármaco e o complexo inorgânico de tiocianato seguido da extração com dicloroetano. O complexo formado apresentou coloração alaranjada com máximo de absorvância em 469 nm. As condições da reação foram estudadas e otimizadas e o método demonstrou ser simples e aplicável para a determinação de azitromicina em formulações farmacêuticas e para o teste de dissolução de comprimidos.

Entre os métodos para avaliar AZ em fluídos biológicos encontram-se CLAE com detecção amperométrica (SHEPARD et al., 1990; TANINAKA et al., 1999; MANDIC et al., 2003), CLAE com detecção por fluorescência (TORANO e GUCHELAAR, 1998; WILMS et al., 2004; BAHRAMI et al., 2005), CLAE acoplado à espectrometria de massa (NIROGI et al., 2005) e voltametria (KIM et al., 2005). A comparação entre métodos por CLAE e microbiológico para a determinação de azitromicina foram apresentados em estudos clínicos por Riedel et al. (1992). Estudos para a determinação de AZ em águas da rede pública de alguns municípios norte americanos foram realizados através da CLAE acoplada à espectrometria de massas (KOCH et al., 2005).

5.3 Substância química de referência

Como substância química de referência foi utilizada a matéria-prima de AZ, caracterizada conforme descrito anteriormente no item 4.

5.4 Amostras

As amostras utilizadas para a validação dos métodos análise quantitativa de AZ em preparações farmacêuticas, encontram-se descritas no item 4.3.

5.5 Solventes e Reagentes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido sulfúrico concentrado (98%), Merck[®]
- Água destilada
- Iodo ressublimado, Merck[®]
- Meio de cultura nº 11, Difco[®]
- Metanol, Tedia[®]
- Tampão Fosfato de Potássio, Tedia[®]

5.6 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Sartorius[®]
- Banho ultra-sônico, Thornton[®]
- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Cilindros de aço inoxidável (8 mm de diâmetro interno x 10 mm de comprimento)
- Destilador, Biomatic[®]
- Espectrofotômetros UV/VIS, Spectronic Genesys 2 e Shimadzu[®] UV PC 1601
- Membrana filtrante de celulose, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Sartorius[®]
- Micropipetador Transferpette Brand[®]
- Placas de petri (20 mm x 100 mm)
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]

5.7 Método espectrofotométrico através da reação com ácido sulfúrico

Métodos espectrofotométricos na região do UV são amplamente utilizados em laboratórios de controle de qualidade devido, principalmente, a sua facilidade de execução e ao seu baixo custo operacional. Para que determinado fármaco possa ser analisado por essa técnica, o mesmo deve possuir grupamentos cromóforos e ter absorvidade adequada em dado solvente. Os métodos espectrofotométricos para fins quantitativos devem ser livres de interferência do solvente, de impurezas ou de excipientes (WATSON, 1999).

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método analítico para a determinação de AZ em matérias-primas e formas farmacêuticas por espectrofotometria na região do UV, através de reação com ácido sulfúrico concentrado.

5.7.1 Desenvolvimento do método

O método de análise foi desenvolvido através da reação de ácido sulfúrico concentrado com AZ, em acetonitrila. As condições da reação foram estudadas quanto ao volume do ácido (20 – 400 µl), tempo (10 – 15 min.) e temperatura (15 – 25 °C). As condições experimentais desenvolvidas para a análise de AZ pelo método espectrofotométrico no UV, após reação com ácido sulfúrico, encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Condições experimentais desenvolvidas para análise da AZ através da espectrofotometria no UV, utilizando reação com ácido sulfúrico.

Característica	Descrição
Diluyente	Acetonitrila
Reagente	400 µl de Ácido Sulfúrico Concentrado (98 %)
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	226 nm
Solução Branco	400 µl de ácido sulfúrico em 25 ml de Acetonitrila

As leituras de absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro, em 226 nm entre 10 e 15 minutos, à temperatura ambiente (25 °C), comparadas com um branco preparado nas mesmas condições.

5.7.2 Validação do método

A validação de um método proposto visa demonstrar a sua adequabilidade para a análise pretendida, garantindo que as condições estabelecidas e a certificação de que suas

características satisfaçam as exigências de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (USP 29, 2006; ICH, 2005).

5.7.2.1 Especificidade

No estudo da especificidade do método foram avaliadas as possíveis interferências dos excipientes presentes nas formulações comerciais de AZ. Amostras simuladas contendo os excipientes presentes nos produtos farmacêuticos foram preparadas em conformidade com o peso médio de cada produto farmacêutico. Estas amostras foram diluídas em acetonitrila, em diluições equivalentes à SQR. Posteriormente as soluções foram filtradas e a reação foi conduzida nas mesmas condições descritas anteriormente, na Tabela 5.

5.7.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através de três curvas de calibração, preparadas em dias diferentes, com 6 níveis de concentração baseados na concentração de trabalho (70 µg/ml), a qual possibilitou a obtenção de valores de absorbâncias adequados à análise.

Para a obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 25 mg de AZ SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml com o auxílio de 50 ml de acetonitrila. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som durante 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Desta solução foram retiradas, com o auxílio de uma bureta, alíquotas de 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5 ml, que foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, aos quais se adicionaram quantidades de acetonitrila suficiente para volume de 20 ml. Em seguida, as reações foram conduzidas com a adição de 400 µl de ácido sulfúrico em cada balão, com posterior agitação de 1 minuto. Após a agitação, os volumes foram completados com acetonitrila e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 226 nm, em comparação com branco preparado nas mesmas condições (400 µl de ácido sulfúrico sobre 20 ml de acetonitrila, em balão de 25 ml, com 1 minuto de agitação e posterior ajuste de volume final, com o mesmo solvente).

5.7.2.3 Precisão

Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos dos Produtos A e B, que posteriormente triturados até formação de um pó finamente dividido. Também foram pesadas 10 unidades do Produto C e seus conteúdos foram misturados. Destas amostras foram pesadas, analiticamente, quantidades equivalentes a 87,5 mg de AZ dihidratada, e transferidas para balão de 50 ml, com o auxílio de 40 ml de acetonitrila. As mesmas foram colocadas em ultra-som, durante 10 minutos e após completou-se o volume com mesmo solvente. As soluções foram homogeneizadas e filtradas através de filtros quantitativos (Schleicher & Schuell). Do filtrado diluíram-se alíquotas até concentração de 350 µg/ml. Destas soluções, retiraram-se alíquotas de 5 ml, que foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml. As reações foram conduzidas conforme descrito anteriormente no item 5.7.2.2.

As determinações de AZ foram realizadas no mesmo dia (n=6), em dias diferentes (n=3), com operadores e equipamentos diferentes. Os resultados foram avaliados estatisticamente quanto ao desvio padrão, coeficiente de variação e análise de variância (ANOVA).

A concentração de AZ nas amostras foi calculada através da seguinte equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

C_A = Concentração de AZ na amostra

A_A = Absorbância absoluta da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Absorbância da SQR

O valor percentual de AZ nas amostras foi calculado através da seguinte equação:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

$C_A\%$ = Concentração da amostra em percentagem

C_A = Concentração de AZ encontrada na amostra

C_T = Concentração de AZ teórica na amostra

5.7.2.4 Exatidão

Na avaliação da exatidão foram comparados, através da ANOVA, os resultados obtidos na precisão do método proposto com aqueles obtidos através do método oficial descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003).

O método oficial para a determinação da potência de AZ é o microbiológico de difusão em ágar utilizando cilindros. Para a execução deste método as amostras foram preparadas pesando-se, individualmente, 20 comprimidos contendo AZ, das marcas A e B, e 10 unidades de pó para suspensão. Estas amostras foram trituradas e homogeneizadas, e destas, pesadas alíquotas equivalentes a 25 mg de AZ. As mesmas foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml e completados os volumes com metanol. Logo após foram agitadas, filtradas e diluídas em solução estéril de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 8,0), para obter soluções com concentrações de 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml e 0,4 µg/ml. A solução da SQR foi preparada pesando-se o equivalente a 25mg de AZ, e seguindo-se o mesmo procedimento definido anteriormente para as amostras. As condições do método estão descritas a seguir:

Tabela 6 – Condições experimentais utilizadas na análise de AZ pelo método microbiológico de difusão em ágar.

Condições	Descrição
Concentrações de Trabalho	0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml
Microrganismo	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
Camada base	Meio 11 (20 ml)
Camada semeada (1 %)	Meio 11 (5 ml)
Diluyente 1°	Metanol
Diluyente 2°	Tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 8,0)
Volume de amostra	20 µl
Especificações da Potência	90 % - 110 %

5.7.2.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade das soluções de AZ SQR e amostras, ambas na concentração de 350 µg/ml, diluídas em acetonitrila, as quais foram mantidas a 4 °C e à temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), por 48 horas. As amostras foram analisadas após os tempos de 0 e 48 horas, empregando procedimento descrito anteriormente.

5.7.3 Resultados e discussão

Devido à baixa absorvidade da AZ na região do ultravioleta (KANFER, 1998; HUEBRA, 2005), os métodos espectrofotométricos encontrados na literatura para esta fármaco envolvem reações para a detecção na região do visível, através de reações por complexação (KELANI et al., 1997; LI et al., 2004; TIAN et al., 2005; HUANG et al., 2006; RACHIDI, et al., 2006).

Em 1993, Denielsen et al. apresentaram método espectrofotométrico na região do visível, através de reação com ácido sulfúrico, para a determinação de alguns macrolídeos, como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, espiramicina e tilosina. Os autores sugeriram que esta reação foi devido à presença de moléculas de açúcares na estrutura química destes antibióticos. Hu et al. (2005) também aplicaram esta reação com ácido para identificação de macrolídeos, dentre os quais se encontrava a AZ. No entanto a reação não foi aplicada para fins de quantificação de fármacos.

Diversos estudos foram realizados para o estabelecimento das condições do método, como: variação do volume de ácido adicionado, determinação do tempo para a ocorrência completa da reação e para a leitura, e temperatura.

Os volumes de ácido testados variaram de 20 a 400 µl, e foram avaliados em período de tempo de 0 a 160 minutos. De acordo com os resultados obtidos (Figura 3), o volume escolhido para a reação foi de 400 µl, a fim de se garantir a totalidade da reação, com menores riscos de interferência das possíveis variações de temperatura. Conforme pode ser observado, o tempo entre 10 e 15 minutos para a leitura, após a adição de 400 µl de ácido, foi suficiente para completar a reação.

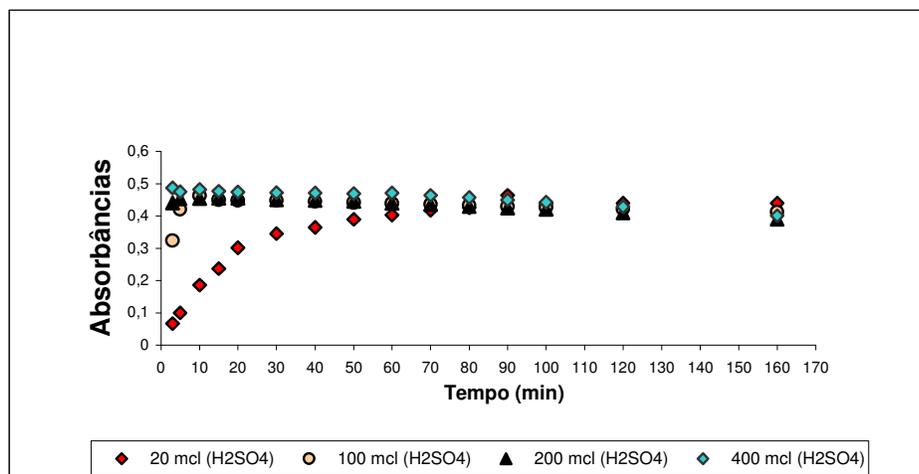


Figura 3 – Avaliação da velocidade de reação através da variação do volume de ácido sulfúrico.

A influência da temperatura na reação foi igualmente avaliada. As temperaturas estudadas foram: 15 °C, 20 °C e 25 °C. Conforme os resultados obtidos (Figura 4), os valores das leituras, nas diferentes temperaturas, foram similares no intervalo de 10 a 20 minutos, após a adição do ácido. Com isto, as leituras foram realizadas nos tempos entre 10 e 15 minutos após a adição do ácido, com uma pequena redução do intervalo, para fins de agilização do método.

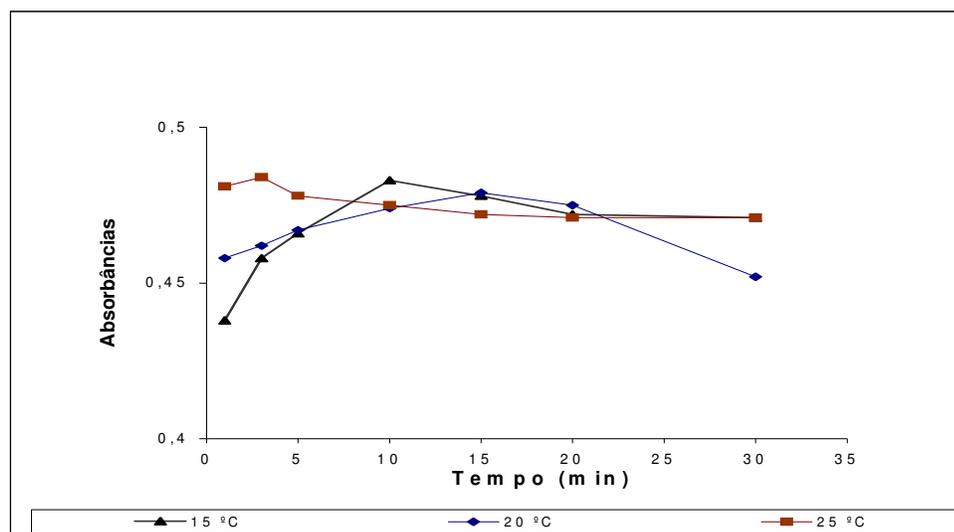


Figura 4 – Avaliação das absorvâncias em função do tempo, em diferentes temperaturas, após a reação com ácido sulfúrico.

Após o desenvolvimento, o método foi validado quanto aos parâmetros de especificidade (avaliada através da influência dos excipientes), linearidade (avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson e de ANOVA), precisão (avaliada através do CV %),

exatidão (avaliada através de análise comparativa com um método caracterizado e validado) e robustez (através da avaliação da estabilidade das soluções). Segundo a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003a), os limites de quantificação e de detecção não necessitam ser determinados quando o método tiver por objetivo a quantificação de princípios ativos em preparações farmacêuticas e matérias-primas, motivo pelo qual estes parâmetros não foram avaliados para o presente método.

Para avaliação da especificidade do método foram realizadas análises com amostras simuladas de excipientes dos produtos A, B e C. Conforme resultados apresentados na Figura 5, não houve interferência significativa dos excipientes, para ambas as amostras de comprimidos, no comprimento de onda de 226 nm. Para a amostra simulada de pó para suspensão verificou-se uma pequena interferência em 226 nm. Ressalta-se que a amostra simulada foi preparada com os mesmos excipientes presentes na formulação do pó, sem representar, no entanto, a fórmula exata. Além disso, estudos comparativos entre os resultados obtidos através do método espectrofotométrico, com aqueles obtidos com o método microbiológico, demonstraram que não houve diferença entre os teores obtidos por ambos os métodos, indicando que esta interferência não foi reproduzida na análise das amostras, sugerindo a especificidade do método.

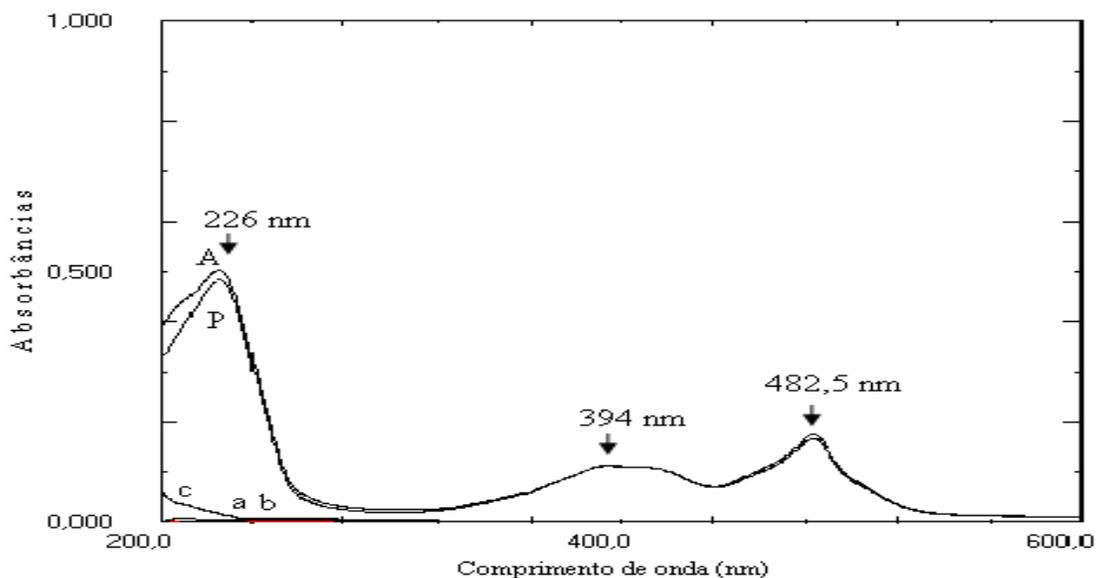


Figura 5 – Representação gráfica da sobreposição dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria no UV, da solução de SQR (P), de amostra (A) e de solução simulada de excipientes dos Produtos A (a), B (b) e C (c), após reação com ácido sulfúrico.

Os valores definidos para os 6 níveis de concentração da curva de calibração foram baseados numa faixa de 65 a 135 % da concentração de trabalho de 70 µg de AZ. As

absorbâncias obtidas nas três curvas de calibração encontram-se na Tabela 7, onde se observa que os valores de coeficiente de variação das leituras de absorbâncias foram $\leq 2\%$, com valor médio de coeficiente de variação entre as curvas de $0,73\%$.

A curva de calibração obtida para avaliação da linearidade (Figura 6), apresentou valor de coeficiente de correlação de Pearson superior a $0,99$. Os resultados obtidos estatisticamente, através do método dos mínimos quadrados e da análise de variância (ANOVA) encontram-se na Tabela 8. A avaliação estatística demonstrou que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio da linearidade. Os resultados obtidos confirmam, assim, a linearidade do método proposto.

Tabela 7 – Valores de absorbâncias obtidos na determinação da curva de calibração da AZ por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbâncias			Média	CV %
	1º dia	2º dia	3º dia		
45	0,320	0,316	0,314	0,317	0,96
55	0,389	0,387	0,386	0,387	0,39
65	0,460	0,470	0,468	0,466	1,14
75	0,543	0,541	0,544	0,543	0,28
85	0,626	0,625	0,618	0,623	0,70
95	0,685	0,697	0,688	0,690	0,91
CV % = coeficiente de variação percentual				Média CV %	0,73

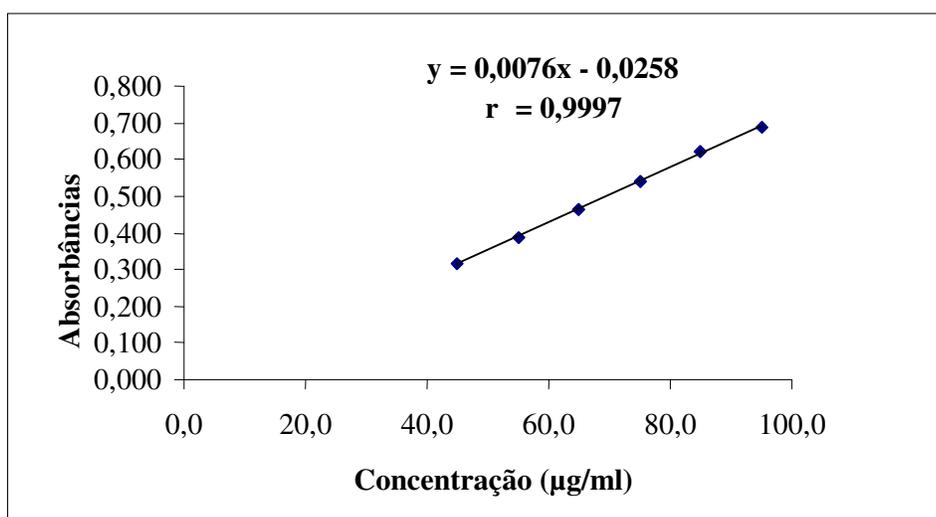


Figura 6 – Representação gráfica da curva de calibração da AZ, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Tabela 8 – Tratamento estatístico dos resultados obtidos na curva de calibração, pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA, para o método espectrofotométrico no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	45-95 µg/ml
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,0076x - 0,0258$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0076x \pm 0,0001$
Intercepto (b) ± desvio padrão	$-0,0258 \pm 0,0060$
Coefficiente de correlação (r)	0,9997
Análise de Variância	Resultados *
Regressão linear	18065,09 (4,75)
Desvio da linearidade	1,75 (3,26)

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), com operadores e equipamentos diferentes, e os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 9, 11 e 13. Os valores de CV obtidos para comprimidos foram inferiores a 2 %, tanto para as análises intra-dias quanto para as análises entre-dias. Os valores de CV obtidos para o pó para suspensão oral foram inferiores a 3 %. De acordo com a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003a), os valores de CV obtidos devem ser inferiores a 5 % para indicar a precisão do método. A comparação dos resultados obtidos entre-dias, foi realizada através da ANOVA (Tabelas 10, 12 e 14), que demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos, para $p = 0,01$, para todos os produtos avaliados. Os resultados obtidos confirmam a precisão do método.

Tabela 9 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto A), por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Amostras	Teor de AZ nos comprimidos					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)
1	508,90	101,78	508,10	101,62	511,60	102,32
2	493,50	98,7	505,15	101,03	511,60	102,32
3	497,60	99,52	506,15	101,23	510,60	102,12
4	503,75	100,75				
5	500,68	100,136				
6	496,60	99,32				
Média	500,17	100,03	506,47	101,29	511,27	102,25
CV%	1,11		0,30		0,11	

* Diferente analista e equipamento.

Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto A, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	10,45	5,23	7,43 (8,02)
Resíduo	9	6,33	0,70	
Total	11	16,78		

*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,01$.

Tabela 11 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto B), por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Amostras	Teor de AZ nos comprimidos					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)
1	518,95	103,79	505,50	101,10	530,60	106,12
2	534,60	106,92	512,00	102,40	515,20	103,04
3	527,75	105,55	520,00	104,00	528,55	105,71
4	527,75	105,55				
5	528,70	105,74				
6	546,30	109,26				
Média	530,68	106,14	512,50	102,50	524,78	104,96
CV%	1,72		1,42		1,59	

* Diferente analista e equipamento.

Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto B, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	26,43	13,21	4,48 (8,02)
Resíduo	9	26,53	2,95	
Total	11	52,96		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,01$.

Tabela 13 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em pó para suspensão (Produto C), por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Amostras	Teor de AZ nos pós para suspensão					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(mg/5ml)	(%)	(mg/5ml)	(%)	(mg/5ml)	(%)
1	203,80	101,9	195,60	97,80	193,40	96,7
2	191,80	95,9	186,80	93,40	189,80	94,9
3	205,40	102,7	188,40	94,20	192,60	96,3
4	199,40	99,7				
5	196,60	98,3				
6	203,80	101,9				
Média	200,13	100,07	190,27	95,13	191,13	95,97
CV%	2,62		2,46		0,98	

* Diferente analista e equipamento.

Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto C, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, após reação com ácido sulfúrico.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	62,24	31,12	5,95 (8,02)
Resíduo	9	47,04	5,23	
Total	11	109,29		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,01$.

A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são baseados no uso de materiais de referência certificados; na comparação do método proposto com o método de referência; no uso de ensaios de adição de padrão (recuperação) e em estudos colaborativos (ICH, 2005).

No presente estudo, a avaliação da exatidão foi realizada através da comparação dos resultados obtidos entre o método proposto e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira (2003). A comparação dos resultados obtidos por ambos os métodos foi realizada através de ANOVA, que demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos (Tabela 15), indicando exatidão equivalente ($p < 0,05$).

Tabela 15 – Comparação estatística (ANOVA) entre o método espectrofotométrico na região do UV, após reação com ácido sulfúrico, e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003).

Produtos	Método Espectrofotométrico		Método Oficial		F ^b
	% ± DP ^a	CV%	% ± DP ^a	CV%	Entre Métodos
Protudo A	102,25 ± 0,11	0,11	102,85 ± 1,06	1,03	1,17 (6,61)
Produto B	102,50 ± 1,45	1,41	103,33 ± 1,14	1,10	0,76 (6,61)
Produto C	95,13 ± 2,34	2,46	97,16 ± 0,90	0,93	2,44 (6,61)

^a DP = desvio padrão

^b Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

A robustez de um método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, provendo indicação da sua dependência durante o uso normal. Deve ser considerada durante o processo de desenvolvimento do método, pois se for constatado que o método é susceptível a variações nas condições analíticas, e estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003a). A estabilidade das soluções analíticas, a variação do pH das soluções, a temperatura e o uso de solventes de diferentes fabricantes são alguns dos fatores que podem ser considerados na avaliação da robustez.

A estabilidade das soluções analíticas foi avaliada para demonstrar a robustez do método, através do estudo da estabilidade do fármaco por até 48 horas, à temperatura ambiente (25 °C). Neste estudo foram mantidas as mesmas condições descritas na Tabela 5, para a reação, e os resultados de absorvância obtidos foram similares aos resultados do dia

anterior, demonstrando com isto a robustez do método frente a variações de tempo, com o fármaco em solução.

Entretanto, durante o processo de otimização do presente método também foi possível verificar que pequenas variações no volume de ácido e na temperatura não provocaram alterações significativas nos resultados, num intervalo entre 10 e 20 minutos após a adição do ácido sulfúrico (Figuras 3 e 4).

O método espectrofotométrico, através da reação do fármaco com ácido sulfúrico, utilizando as condições descritas na Tabela 5, mostrou-se adequado para quantificação de AZ em comprimidos e pó para suspensão, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

5.8 Método espectrofotométrico através da reação por complexo de transferência de carga com iodo

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método analítico para a determinação de AZ em matérias-primas e formas farmacêuticas por espectrofotometria na região do UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

5.8.1 Desenvolvimento do método

As condições da reação que foram estudadas no desenvolvimento deste método foram: volume (3 ml a 5 ml) e concentração (0,005 M a 0,01 M) da solução de iodo; tempo de leitura através do perfil da reação e temperatura (15 °C, 20 °C e 25 °C). As condições experimentais desenvolvidas para a análise da AZ pelo método espectrofotométrico no UV, após reação por complexo de transferência de carga com iodo, encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Condições experimentais desenvolvidas para análise da AZ através da espectrofotometria no UV, utilizando reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Característica	Descrição
Diluyente	Acetonitrila
Reagente	3 ml de solução de iodo 0,005 M, em acetonitrila
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	363 nm
Solução Branco	3 ml de solução de iodo 0,005 M em 25 ml de Acetonitrila

As leituras de absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro, em 363 nm entre 10 e 15 minutos, à temperatura ambiente (25 °C), comparadas com um branco preparado nas mesmas condições.

5.8.2 Validação do método

Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (USP 29, 2006; ICH, 2005).

5.8.2.1 Especificidade

No estudo da especificidade do método foram avaliadas as possíveis interferências dos excipientes presentes nas formulações comerciais de AZ. Foram pesadas quantidades de amostra simulada de excipientes, equivalentes ao peso médio dos comprimidos e do pó para suspensão, as quais foram diluídas em acetonitrila. Posteriormente as soluções foram filtradas e a reação foi conduzida nas mesmas condições descritas anteriormente, na Tabela 16.

5.8.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através de três curvas de calibração, preparadas em dias diferentes, com 5 níveis de concentração baseados na concentração de trabalho (8 µg/ml), a qual possibilitou a obtenção de valores de absorvâncias adequados à análise.

Para a obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 10 mg de AZ SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml com o auxílio de 50 ml de acetonitrila. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som durante 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Desta solução foram retiradas, com o auxílio de uma bureta, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml, que foram adicionadas em balões volumétricos de 25 ml. Em seguida, as reações foram conduzidas com a adição de 3 ml de solução de iodo 0,005 M em cada balão, com posterior agitação de 1 minuto. Após a agitação, os volumes foram completados com acetonitrila e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 363 nm, em comparação com branco preparado nas mesmas condições (3 ml de solução de iodo 0,005 M, em balão de 25 ml, com 1 minuto de agitação e posterior ajuste de volume final, com o mesmo solvente).

5.8.2.3 Precisão

Foram pesados individualmente, 20 comprimidos dos Produtos A e B, que posteriormente triturados até formação de um pó finamente dividido. Também foram pesadas 10 unidades do Produto C e misturados. Destas amostras foram pesadas analiticamente, quantidades equivalentes a 50 mg de AZ dihidratada, e transferidas para balão de 50 ml, com o auxílio de 40 ml de acetonitrila. As mesmas foram colocadas em ultra-som, durante 10 minutos, e após completou-se o volume com mesmo solvente. As soluções foram homogeneizadas e filtradas através de filtros quantitativos (Schleicher & Schuell). Do filtrado diluíram-se alíquotas até concentração de 100 µg/ml. Destas soluções, retiraram-se alíquotas de 2 ml, que foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml. As reações foram conduzidas conforme descrito anteriormente no item 5.8.2.2.

As determinações de AZ foram realizadas no mesmo dia (n=6), em dias diferentes (n=3), com operadores e equipamentos diferentes. Os resultados foram avaliados estatisticamente quanto ao desvio padrão, coeficiente de variação e análise de variância (ANOVA).

A concentração de AZ nas amostras analisadas foi calculada conforme descrito no item 5.7.2.3.

5.8.2.4 Exatidão

Assim como no método anterior, a exatidão do presente método foi avaliada através da comparação por ANOVA, dos resultados obtidos na precisão do método proposto, com aqueles obtidos no método oficial descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003), utilizando as condições descritas no item 5.7.2.4.

5.8.2.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade das soluções de AZ SQR e amostras, ambas na concentração de 100 µg/ml, diluídas em acetonitrila, as quais foram mantidas a 4 °C e à temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), por 48 horas. As amostras foram analisadas após os tempos de 0 e 48 horas, empregando procedimento descrito anteriormente.

5.8.3 Resultados e discussão

Reações de complexo de transferência de cargas têm sido utilizadas para a determinação de fármacos contendo grupos nitrogenados, doadores de elétrons. O iodo tem sido utilizado como acceptor σ na análise de fármacos como fluoxetina e sertralina (BEBAWY et al., 1999), lanzoprazol e pantoprazol (MOUSTAFA, 2000), loperamida (SHERIF et al., 2000), cefalosporina (SALEH et al., 2001), clobetazol (MOSTAFA et al., 2002), carvedilol (CARDOSO et al, 2007), entre outros. A AZ contém grupo nitrogenado, o que motivou a aplicação desta reação ao fármaco.

A solução de iodo 0,005 M em acetonitrila apresenta três máximos de absorção; em 211 nm, 290 nm e 461 nm, o que corrobora com dados da literatura para os íons I^- e I_2 (KEBEDE, 1998). Esta mesma solução apresenta cor marrom, característica da solução de iodo em solventes orgânicos, a qual muda para amarelo-limão na presença de AZ, sugerindo que a

formação do complexo entre AZ e o iodo seja responsável pela mudança de coloração. Este complexo formado apresenta três máximos de absorção, em 220 nm, 292 nm e 363 nm, de acordo com as bandas características de íon triiodeto (I_3^-), em processos de complexação (KEBEDE, 1998; SHARGHI et al., 1999). Com isto, o comprimento de onda escolhido para as leituras do complexo formado foi de 363 nm, pois o mesmo não coincide com os outros máximos obtidos pelos íons I^- e I_2 , os quais não fazem parte do complexo.

Vários estudos foram realizados para o estabelecimento das condições do método, como: variação do volume e concentração da solução de iodo, determinação do tempo para a ocorrência completa da reação e para a leitura, e temperatura.

Os volumes das soluções de iodo testados foram de 3 a 5 ml, nas concentrações de 0,005 M e 0,01 M, e foram avaliados em período de tempo de 0 a 40 minutos. Em testes preliminares, foi observado que é necessário pelo menos 1,5 ml de solução de iodo 0,005 M para que haja um excesso de iodo, permitindo a formação do complexo com a AZ, com valores de absorbância proporcionais à concentração de AZ na solução analisada. No entanto, conforme vai-se aumentando o volume da solução de iodo, o grau de interferência do branco também aumenta, no comprimento de onda de formação do complexo (363 nm). Com isto, foi utilizado o menor volume da solução de iodo, cuja interferência do branco fosse a menor possível, mantendo-se o excesso de iodo para a garantia da proporcionalidade entre as absorbâncias e as concentrações de AZ.

Também, no estudo do tempo de reação, foi verificado que os picos formados em 363 nm, relacionados ao complexo por transferência de carga com iodo, apresentam uma pequena instabilidade, com tendência a um discreto aumento nos valores de absorbância, no decorrer do tempo. Com isto, observou-se a necessidade de se igualar o intervalo de tempo entre a adição da solução de iodo e as leituras, para as amostras e a SQR. O tempo escolhido para a leitura foi de 15 minutos, pois em tempos inferiores a este, foram observados maiores variações nos valores das absorbâncias, entre os intervalos de leitura. Isto pode ser visto na Figura 7, onde a reação de formação do complexo tende a atingir seu máximo de absorbância a partir dos 15 minutos, após a adição da solução de iodo.

Os resultados das absorbâncias em diferentes volumes e concentrações encontram-se na Figura 7, e a interferência do branco no comprimento de onda de 363 nm pode ser observado na Figura 9.

Com base no que foi descrito anteriormente, o volume mais adequado para a reação foi de 3 ml, com um tempo de 15 minutos para a leitura, após a adição da solução de iodo.

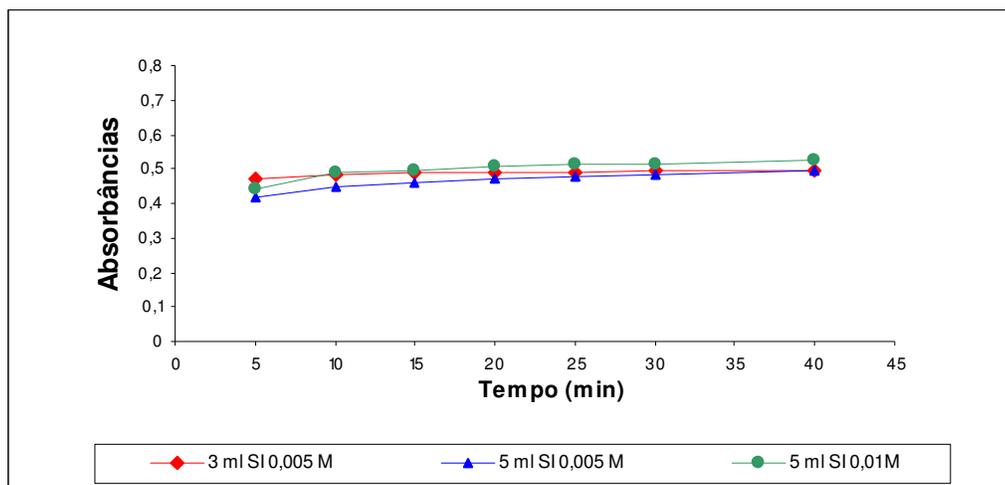


Figura 7 – Avaliação da velocidade de reação através da variação do volume e da concentração, da solução de iodo.

A influência da temperatura na reação foi avaliada, nas temperaturas de: 15 °C, 20 °C e 25 °C. Conforme os resultados obtidos (Figura 8), observa-se que as leituras obtidas, em 15 minutos após a adição da solução de iodo, nas diferentes temperaturas utilizadas, foram muito próximas, indicando que a influência da temperatura, na faixa estudada, não foi representativa.

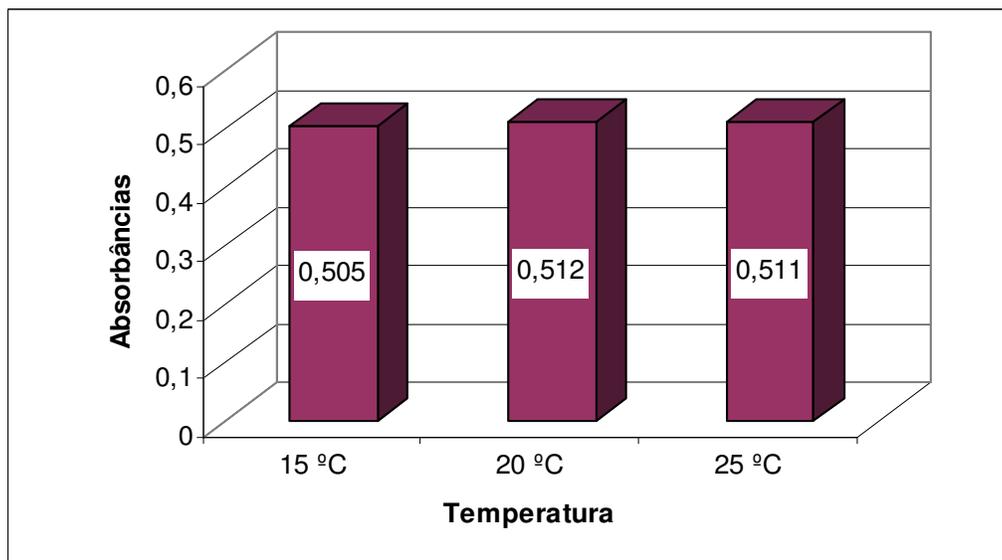


Figura 8 – Avaliação das absorbâncias nas diferentes temperaturas, após a reação por complexo de transferência de carga com iodo 0,005 M.

Após o desenvolvimento, o método foi validado quanto aos parâmetros de especificidade (avaliada através da influência dos excipientes), linearidade (avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson e de ANOVA), precisão (avaliada através do CV %), exatidão (avaliada através de análise comparativa com um método caracterizado e validado) e robustez (através da avaliação da estabilidade das soluções).

Para avaliação da especificidade do método foram realizadas análises com amostras simuladas de excipientes dos produtos A, B e C. Conforme os resultados apresentados na Figura 9, não houve interferência significativa dos excipientes, para ambas as amostras de comprimidos, no comprimento de 363 nm. Porém na amostra simulada de excipiente do pó para suspensão, verificou-se uma pequena interferência em 363 nm. Acredita-se que, pelo fato da amostra simulada de excipiente não representar a fórmula exata dos produtos analisados, esta interferência pode não estar sendo reproduzida nos resultados obtidos no teste de precisão do método, com as amostras. Isto corrobora com a análise estatística comparativa entre o método proposto e o método oficial, a qual não apresentou diferença significativa entre ambos. Deste modo, sugere-se que a especificidade do presente método esteja garantida, para a determinação de AZ nas preparações farmacêuticas analisadas.

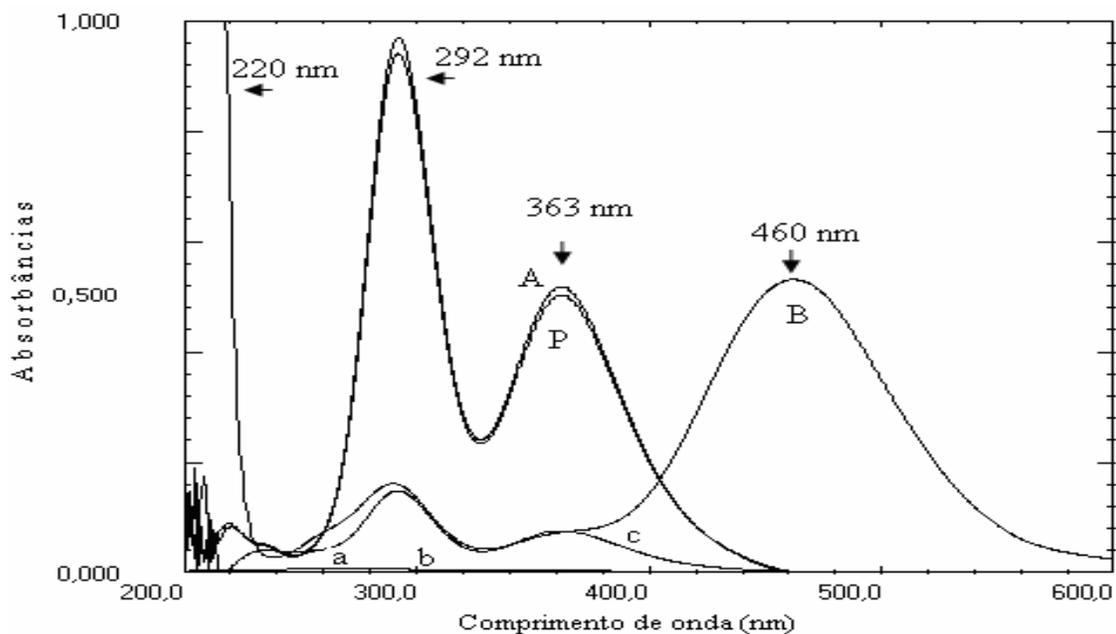


Figura 9 – Representação gráfica da sobreposição dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria no UV, da solução de SQR (P), de amostra (A), do branco (B) e das amostras simuladas de excipientes, dos Produtos A (a), B (b) e C (c), após reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Os valores definidos para os 5 níveis de concentração da curva de calibração foram baseados numa faixa de 50 a 150 % da concentração de trabalho de 8 µg de AZ. As absorvâncias obtidas nas três curvas de calibração encontram-se na Tabela 17, onde se observa que os valores de coeficiente de variação foram ≤ 2 %, com valor médio de coeficiente de variação entre as curvas de 1,72 %.

Tabela 17 – Valores de absorvâncias obtidos na determinação da curva de calibração da AZ por espectrofotometria no UV, através da reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Concentração (µg/ml)	Absorbâncias			Média	CV %
	1º dia	2º dia	3º dia		
4	0,222	0,224	0,230	0,225	1,85
6	0,355	0,342	0,345	0,347	1,96
8	0,462	0,457	0,466	0,461	0,98
10	0,565	0,577	0,586	0,576	1,83
12	0,675	0,691	0,702	0,689	1,97
				Média CV %	1,72

CV % = coeficiente de variação percentual

A curva de calibração obtida para avaliação da linearidade, apresentou valor de coeficiente de correlação de Pearson superior a 0,99 (Figura 10). Os resultados obtidos estatisticamente, através do método dos mínimos quadrados e da análise de variância (ANOVA) encontram-se na Tabela 18. A avaliação estatística demonstrou que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio da linearidade. Os resultados obtidos confirmam, assim, a linearidade do método proposto.

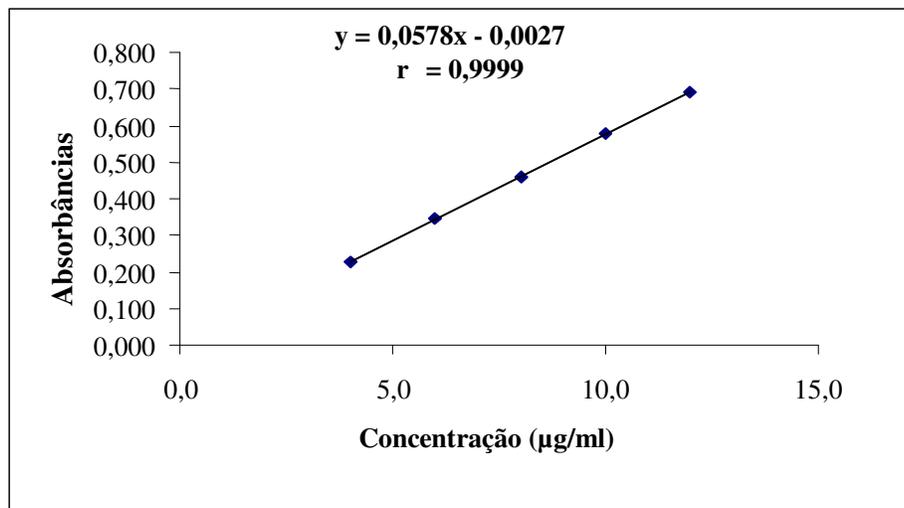


Figura 10 – Representação gráfica da curva de calibração da AZ por espectrometria no UV, após reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Tabela 18 – Tratamento estatístico dos resultados obtidos na reta de calibração, pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA, para o método espectrofotométrico no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	8-12 µg/ml
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,0076x - 0,0258$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0578x \pm 0,002$
Intercepto (b) ± desvio padrão	$-0,0027 \pm 0,001$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999
Análise de Variância	Resultados *
Regressão linear	5290,36 (4,96)
Desvio da linearidade	0,36 (3,71)

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), com operadores e equipamentos diferentes, e os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 19, 21 e 23. Os valores de CV obtidos para comprimidos e pó para suspensão, foram inferiores a 2 %, tanto para as análises intra-dias quanto para as análises

entre-dias. De acordo com a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003a), os valores de CV obtidos devem ser inferiores a 5 % para indicar a precisão do método. A comparação dos resultados obtidos entre-dias foi realizada através da ANOVA (Tabelas 20, 22 e 24), que demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos, para $p = 0,05$, para todos os produtos avaliados. Os resultados obtidos confirmam a precisão do método.

Tabela 19 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto A), por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Amostras	Teor de AZ nos comprimidos					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)
1	534,45	106,89	516,30	103,26	506,00	101,2
2	522,35	104,47	528,65	105,73	511,00	102,2
3	513,95	102,79	519,00	103,80	520,50	104,1
4	530,75	106,15				
5	526,10	105,22				
6	529,80	105,96				
Média	526,23	105,25	521,32	104,26	512,50	102,50
CV%	1,39		1,25		1,44	

* Diferente analista e equipamento.

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto A, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	15,09	7,55	3,69 (4,26)
Resíduo	9	18,37	2,04	
Total	11	33,47		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Tabela 21 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ em comprimidos (Produto B), por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Amostras	Teor de AZ nos comprimidos					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)	(mg/comp)	(%)
1	521,05	104,21	511,50	102,30	523,50	104,7
2	517,35	103,47	516,30	103,26	520,50	104,1
3	515,55	103,11	521,00	104,20	515,50	103,1
4	521,95	104,39				
5	517,35	103,47				
6	527,90	105,58				
Média	520,19	104,26	516,27	103,25	519,83	103,97
CV %	0,86		0,92		0,78	

* Diferente analista e equipamento.

Tabela 22 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto B, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	1,31	0,66	0,83 (4,26)
Resíduo	9	7,14	0,79	
Total	11	8,46		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Tabela 23 – Valores experimentais referentes à determinação de AZ do pó para suspensão (Produto C), por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Amostras	Teor de AZ em pó para suspensão					
	1º dia		2º dia		3º dia*	
	(mg/5ml)	(%)	(mg/5ml)	(%)	(mg/5ml)	(%)
1	197,78	98,89	203,94	101,97	200,44	100,22
2	193,10	96,55	200,86	100,43	201,18	100,59
3	197,00	98,5	202,40	101,20	201,94	100,97
4	198,56	99,28				
5	203,26	101,63				
6	201,30	100,65				
Média	198,50	99,25	202,40	101,20	201,19	100,59
CV%	1,78		0,76		0,37	

* Diferente analista e equipamento.

Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na avaliação do Produto C, em diferentes dias, por espectrofotometria no UV, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	2	8,68	4,34	2,29 (4,26)
Resíduo	9	17,07	1,90	
Total	11	25,76		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,01$.

Da mesma forma que o método anterior, a avaliação da exatidão foi realizada através da comparação dos resultados obtidos entre o método proposto e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003). A comparação, dos resultados obtidos nos dois métodos, foi realizada através de ANOVA, que demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos (Tabela 25), indicando exatidão equivalente ($p < 0,05$).

Tabela 25 – Comparação estatística (ANOVA) entre o método espectrofotométrico no UV após reação por complexo de transferência de carga com iodo e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003)

Produtos	Método Espectrofotométrico		Método Oficial		F ^b
	% ± DP ^a	CV%	% ± DP ^a	CV%	Entre Métodos
Protudo A	102,50 ± 1,47	1,44	102,85 ± 1,06	1,03	0,13 (6,61)
Produto B	103,25 ± 0,95	0,92	103,33 ± 1,14	1,10	0,11 (6,61)
Produto C	97,98 ± 1,25	1,28	97,16 ± 0,90	0,93	1,05 (6,61)

^a DP = desvio padrão

^b Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,05.

Assim como estudado anteriormente, a estabilidade das soluções analíticas foi avaliada para demonstrar a robustez. Verificou-se que as soluções foram estáveis por até 48 horas em temperatura ambiente. Neste estudo foram mantidas as mesmas condições descritas na Tabela 16, para a reação, e os resultados de absorvância obtidos foram similares aos resultados do dia anterior, demonstrando com isto a robustez do método frente a variações de tempo, com o fármaco em solução.

Também foi possível verificar, durante a otimização do método, que pequenas variações no volume da solução de iodo e na temperatura, não provocam grandes alterações nos resultados, num intervalo de 15 minutos, após a adição da solução de iodo (Figuras 7 e 8).

Na avaliação do tempo de durabilidade da solução de iodo 0,005 M, observou-se através dos resultados (Figura 11), que a solução deve ser preparada e utilizada em seguida, pois, para um intervalo de 2 horas, a mesma perde 4,15 % de seu poder de formação do complexo com AZ. Após 24 horas a perda aumenta para 34,25 %.

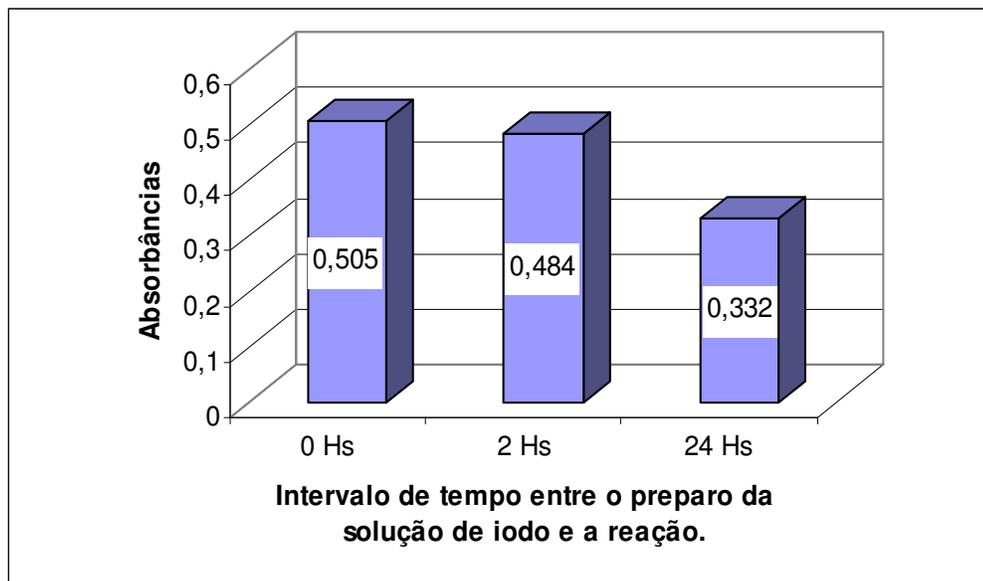


Figura 11 – Avaliação das absorvâncias em função do tempo de intervalo entre o preparo e a reação com a solução de iodo 0,005 M.

O método espectrofotométrico, através da reação por complexo de transferência de carga com iodo, utilizando as condições descritas na Tabela 16, mostrou-se adequado para quantificação de AZ em comprimidos e pó para suspensão, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

5.9 Comparação entre os métodos propostos e o método oficial

Na análise estatística comparativa (Tabela 26) entre os dois métodos espectrofotométricos propostos no UV (reação com ácido sulfúrico e reação por complexo de transferência de carga com iodo), e o método oficial, observou-se que não há diferença significativa entre os três métodos, para $p < 0,05$. Portanto, os métodos espectrofotométricos, devido a sua simplicidade e tempo reduzido para a obtenção dos resultados, quando comparados ao método oficial, tornam-se alternativas interessantes para laboratórios de controle de qualidade. Os métodos propostos, além de não necessitar de reações intermediárias, como em outros métodos por espectrofotometria, apresentam um tempo operacional reduzido, numa faixa de 20 a 30 minutos, cujo intervalo é suficiente para a realização das reações e suas respectivas leituras.

Tabela 26 – Comparação estatística (ANOVA) entre os métodos espectrofotométricos no UV, após reação com ácido sulfúrico e reação por complexo de transferência de carga com iodo, e o método microbiológico descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2003).

Produtos	Método Espectrofotométrico (reação com H ₂ SO ₄)		Método Espectrofotométrico (reação com iodo)		Método Oficial (microbiológico)		F ^b
	% ± DP ^a	CV %	% ± DP ^a	CV %	% ± DP ^a	CV %	Entre Métodos
A	102,25 ± 0,11	0,11	102,50 ± 1,47	1,44	102,85 ± 1,06	1,03	0,24 (5,14)
B	102,50 ± 1,45	1,41	103,25 ± 0,95	0,92	103,33 ± 1,14	1,10	0,44 (5,14)
C	95,13 ± 2,34	2,46	97,98 ± 1,25	1,28	97,16 ± 0,90	0,93	2,45 (5,14)

^aDP = desvio padrão

^bValores entre parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,05.

6 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS

6.1 Introdução

As preparações farmacêuticas sólidas de uso oral são amplamente utilizadas na terapêutica, com grande aceitação pelos profissionais da área da saúde e pacientes, pois dentre as várias vantagens na sua utilização, citam-se a praticidade, economia, segurança e uma melhor estabilidade, quando comparadas às formas farmacêuticas líquidas. Com isto tem-se uma boa adesão do paciente ao tratamento, contribuindo para a eficácia da terapêutica prescrita (STORPIRTIS et al., 1999).

Entretanto, para que formulações sólidas de uso oral possam exercer o seu efeito terapêutico, é imprescindível que a substância ativa seja efetivamente absorvida no trato gastrointestinal. Neste sentido, diversos são os fatores que influenciam esta absorção, como aspectos relacionados ao fármaco, à formulação e aos processos de fabricação, entre outros, os quais podem afetar a desagregação ou a dissolução de uma formulação sólida de uso oral, e com isto, alterar a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS et al., 1999; MANADAS, 2002).

A dissolução de uma preparação farmacêutica sólida representa o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (MARCOLONGO, 2003). Neste sentido, o teste de dissolução torna-se ferramenta indispensável para se avaliar o comportamento de uma formulação farmacêutica nos líquidos biológicos, sendo largamente utilizado nos estudos de desenvolvimento de formulações, no controle de qualidade lote a lote, nos estudos de estabilidade, nos encaminhamentos de registros de medicamentos genéricos, entre outros (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2003b).

No teste de dissolução são avaliadas as quantidades de fármaco dissolvidas, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, em um tempo pré-determinado, o qual pode ser em um ou dois tempos, assim como em vários intervalos de tempos, em testes de perfis de dissolução. Para isto utilizam-se aparelhos específicos chamados de dissolutores ou aparelhos de dissolução (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003; USP 29, 2006).

Na literatura consultada foram encontrados alguns métodos aplicados para quantificação de AZ em estudos de dissolução do fármaco em comprimidos, porém, não foram encontrados trabalhos de desenvolvimento e validação de métodos para dissolução de comprimidos. Os métodos de dissolução utilizados nestes estudos foram os mesmos preconizados na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) para cápsulas, utilizando como meio 900 ml de tampão fosfato de sódio pH 6, contendo 0,1 % de tripsina, aparato pá, com rotação de 100 rpm, tempo de coleta de 45 minutos e liberação mínima de 75 %. Sendo assim, o presente trabalho teve como um de seus objetivos, desenvolver e validar método de dissolução de comprimidos contendo AZ, sem a utilização de tripsina, enzima cujo custo é bastante elevado.

6.2 Substância química de referência (SQR)

A substância química utilizada como referência esta descrita no item 4.2, a qual foi devidamente caracterizada, para as análises pretendidas.

6.3 Solventes e reagentes

- Acetato de sódio trihidratado, Tedia[®]
- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido Clorídrico fumegante, Tedia[®]
- Ácido sulfúrico concentrado (98%), Merck[®]
- Água destilada
- Fosfato de sódio dibásico, Tedia[®]
- Lauril sulfato de sódio, Tedia[®]

6.4 Equipamentos e acessórios

- Aparelho para teste de dissolução, Pharma Test[®]
- Balança analítica Sartorius[®]
- Banho de ultra-som, Thornton[®]

- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Destilador, Biomatic[®]
- Espectrofotômetros UV/VIS, Spectronic Genesys 2 e Shimadzu[®] UV PC 1601
- Filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell[®]
- Micropipetador Transferpette Brand[®]
- Pipetador Transferpette, Brand[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]

6.5 Desenvolvimento e validação de método para determinação de AZ por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico concentrado (98 %)

O método de análise foi desenvolvido através da reação de ácido sulfúrico concentrado com AZ, em acetonitrila. As condições da reação foram estudadas quanto ao volume do ácido (550– 650 µl), tempo de leitura (10 – 15 min.) e à temperatura (15 °C, 20 °C e 25 °C).

Após definidas as condições da reação, foram conduzidos os ensaios de dissolução e nos tempos pré-determinados foram transferidas, manualmente, alíquotas de 5 ml de cada cuba, para tubos de ensaio. Em seguida estas alíquotas foram filtradas com filtros quantitativos faixa preta, Schleicher & Schuell[®], onde foi transferido 1 ml para balão volumétrico de 10 ml e completado o volume com acetonitrila. Destas soluções, foram transferidas alíquotas de 2 ml, para balões volumétricos de 10 ml, e sobre as mesmas foram adicionados 600 µl de ácido sulfúrico concentrado (98 %), agitados durante 1 minuto, e em seguida foram completados os volumes, com o mesmo solvente. As leituras foram feitas por espectrofotometria na região do visível, à 482 nm, após 10 minutos de reação.

Tabela 27 – Condições experimentais desenvolvidas para determinação da percentagem dissolvida de AZ, através da espectrofotometria no visível, utilizando reação com ácido sulfúrico.

Característica	Descrição
Diluyente	Acetonitrila
Reagente	600 µl de Ácido Sulfúrico Concentrado (98 %)
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	482 nm
Solução Branco	600 µl de ácido sulfúrico em 10 ml de Acetonitrila

As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro, em 482 nm, com 10 minutos de intervalo após a adição do ácido sulfúrico, à temperatura ambiente (25 °C), comparadas com um branco preparado nas mesmas condições.

O método por espectrofotometria no visível foi validado quanto à especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005; USP 29, 2006).

6.5.1 Avaliação da especificidade

Foram preparadas amostras simuladas de excipientes de comprimidos contendo AZ, que foram avaliadas nas seguintes condições: 900 ml de HCl 0,1 N, como meio, mantidos a 37 °C \pm 0,5 °C, utilizando aparato pá e rotação de 50 rpm. Após 45 minutos alíquotas de 5 ml foram retiradas, filtradas, e os passos seguintes foram descritos no item 6.5, para as diluições, condições das reações e das leituras. Apesar do método proposto ter sido desenvolvido para a dissolução de comprimidos contendo AZ, também foi avaliada a interferência de cápsulas coloridas nos resultados do método proposto, para um estudo da viabilidade de se utilizar o presente método para a dissolução de cápsulas. Foram adicionadas duas cápsulas coloridas e vazias, uma em cada cuba, contendo 900 de HCl 0,1 N, e após, seguiram as mesmas condições descritas no item 6.5.

6.5.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através de três curvas de calibração, preparadas em dias diferentes, com 5 níveis de concentração baseados na concentração de trabalho (11 µg/ml, de AZ), a qual possibilitou a obtenção de valores de absorvâncias adequados à análise.

Pesou-se 75 mg da SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml, com o auxílio de 30 ml de HCl 0,1 N. Desta solução, transferiram-se alíquotas de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10 ml, para balões volumétricos de 20 ml, completando-se o volume com HCl 0,1 N. Foram transferidas, destas soluções, alíquotas de 1 ml, para balões volumétricos de 10 ml, completando-se o volume com acetonitrila. Destas soluções foram retiradas as alíquotas de 2 ml e colocadas em balões volumétricos de 10 ml. As reações foram conduzidas conforme item 6.5.

6.5.3 Precisão

Foram avaliados seis comprimidos no mesmo dia e em dias diferentes, empregando-se as seguintes condições: 900 ml de HCl 0,1 N, como meio, mantidos à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando aparato pá e rotação de 50 rpm. Após 45 minutos alíquotas de 5 ml foram retiradas, filtradas, e os passos seguintes foram conduzidos conforme descrito no item 6.5, para as diluições, condições da reação e das leituras.

6.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida de SQR adicionada às amostras simuladas de excipientes. Foram preparadas três amostras simuladas de excipientes de cada produto (A e B), nas quais foram adicionadas 30 %, 100 % e 120 % de SQR, em relação à quantidade declarada de AZ nos rótulos dos produtos. A partir da adição da SQR e amostra simulada de excipientes, o ensaio de dissolução foi conduzido em 900 ml de HCl 0,1 N, a 50 rpm, utilizando aparato pá e mantido a temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. As reações para a leitura espectrofotométrica estão descritas no item 6.5.

6.5.5 Robustez

Assim como nos métodos anteriores, a robustez do presente método foi avaliada através da análise da estabilidade das soluções de AZ SQR e amostras, ambas na concentração de 100 µg/mL, diluídas em acetonitrila, as quais foram mantidas a 4 °C e à temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), por 48 horas. As amostras foram analisadas após os tempos de 0 e 48 horas, empregando procedimento descrito no item 6.5.

6.6 Avaliação da estabilidade da SQR e das amostras no meio de dissolução

Foram preparadas soluções da SQR e da amostra de comprimidos, e as mesmas mantidas à temperatura ambiente (25 °C) e à temperatura de 37 °C ± 0,5 °C, durante duas horas, ambas em HCl 0,1 N, tampão fosfato de sódio dibásico (pH 6 ± 0,05) e tampão acetato de sódio triidratado (pH 4,5 ± 0,05).

6.7 Escolha dos parâmetros de dissolução

Para a escolha dos parâmetros, do teste de dissolução, foram testadas diversas condições conforme metodologia geral da USP 29 (2006), utilizando equipamento Pharma Test[®], equipado com seis cubas. Foi utilizado o aparato pá, com velocidades de rotação de 50 rpm, 75 rpm e 100 rpm, e 900 ml de meio, na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), conforme recomendações para desenvolvimento de métodos de dissolução (MARQUES; BROWN, 2002; BRASIL, 2004; FORTUNATO, 2005).

Os meios selecionados para teste preliminar, com três comprimidos cada (n=3), foram:

- Ácido clorídrico 0,1 N
- Tampão fosfato de sódio dibásico (pH 6 ± 0,05)
- Tampão fosfato de sódio dibásico (pH 6 ± 0,05) + 0,1 % de lauril sulfato de sódio (LSS)
- Tampão fosfato de sódio dibásico (pH 6 ± 0,05) + 0,2 % de LSS
- Tampão acetato de sódio triidratado (pH 4,5 ± 0,05)

Os meios de dissolução, após preparo, foram aquecidos a 41 °C, filtrados e desgaseificados em ultra-som, durante 10 minutos. Em seguida foram reaquecidos até 38 °C antes de serem colocados nas cubas, onde foram mantidos a 37 °C \pm 0,5 °C.

As condições testadas estão descritas na Tabela 28. Foram coletadas, manualmente, com pipetadores automáticos, alíquotas de 5 ml, nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, com reposição do mesmo volume de meio, a 37 °C \pm 0,5 °C. As alíquotas foram filtradas e avaliadas por espectrofotometria no UV, nas condições descritas no item 6.5.

Tabela 28 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos contendo AZ (Produto A), utilizando o aparato pá.

Condição*	Meio (900 ml)	Velocidade (rpm)
I	HCl 0,1 N	100
II	TP pH 6	100
III	TPF pH 6 + 0,1% LSS	100
IV	TPA pH 4,5	100
V	HCl 0,1 N	75
VI	TP pH 6	75
VII	TPF pH 6 + 0,1% LSS	75
VIII	TPA pH 4,5	75
XIX	HCl 0,1 N	50
XX	TPF pH 6 + 0,1% LSS	50
XI	TPF pH 6 + 0,2% LSS	50
XII	TPA pH 4,5	50
XIII	TPA pH 4,5 + 0,05% LSS	50
XIV	TPA pH 4,5 + 0,1% LSS	50

* Nas diferentes condições testadas foram utilizados 3 comprimidos.

TPF: tampão fosfato de sódio dibásico

TPA: tampão acetato de sódio triidratado

6.8 Resultados e discussão

A avaliação da % dissolvida de fármaco requer a utilização de método adequado de análise. Inicialmente planejou-se utilizar os métodos descritos no Capítulo I para a quantificação da percentagem de AZ dissolvida no teste *in vitro*. Porém, foram observadas interferências dos meios de dissolução contendo tampão, nas absorvâncias da SQR e das amostras testadas, em 226 nm, quando se utilizou o método que empregou reação com ácido sulfúrico. Da mesma forma, interferências originadas pela presença do tampão, no meio de dissolução, foram igualmente observadas no método utilizando reação por transferência de carga com iodo, em 363 nm. Entretanto, verificou-se que, no método utilizando reação com ácido sulfúrico, formava-se um pico em 482 nm, no qual não se observava interferência do tampão.

Com isto, foi necessária uma nova validação do método, em razão das novas condições propostas, para se obter melhores resultados na determinação do fármaco, no teste de dissolução. Sendo assim, conforme os resultados obtidos na região do visível em 482 nm, através da reação com ácido sulfúrico, readequaram-se as concentrações de trabalho (11 µg/ml), para que a quantidade de AZ fosse compatível com o volume de ácido utilizado (600 µl). Nestas condições, a reação ocorreu na sua totalidade, em poucos minutos, proporcionando picos estáveis em 482 nm.

Verificou-se, também, que o volume das alíquotas de solução amostra e padrão não devem ser inferiores a 2 ml, visto que, conforme ensaios preliminares, volumes pequenos proporcionam uma reação muito forte com 600 µl de ácido sulfúrico concentrado (98%), aumentando o calor liberado da reação, com possibilidade de extravasamento da solução pela formação de bolhas.

Foram observados, no estudo dos diferentes volumes de ácido em função do tempo de reação (Figura 12), que os resultados das absorvâncias obtidas foram bastante próximos, proporcionando reação completa a partir de cinco minutos, com 600 µl de ácido.

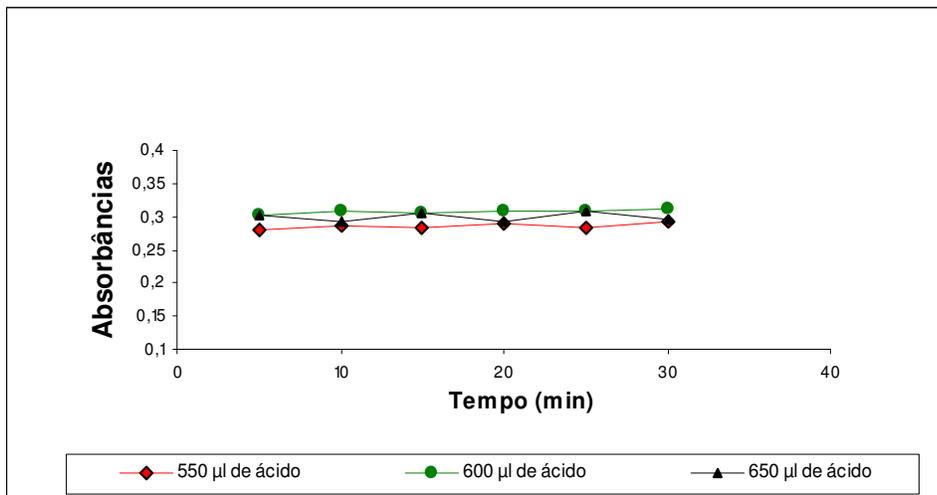


Figura 12 – Avaliação da velocidade de reação através da variação do volume ácido sulfúrico.

No estudo da interferência das variações de temperatura, na velocidade reação e nos resultados de absorvância (Figura 13), observou-se que houve uma pequena diferença entre os valores, com uma tendência ao aumento, conforme se aumentou também, a temperatura. No entanto, consideraram-se os valores bastante próximos, sugerindo que a influência das temperaturas avaliadas não representa grandes alterações no resultado final, quando comparadas com um padrão, nas mesmas condições de reação.

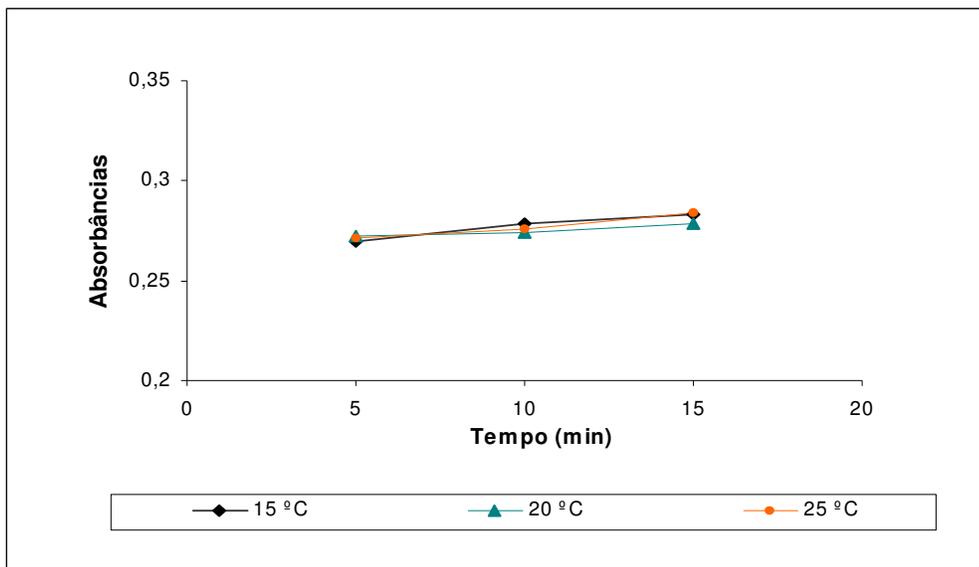


Figura 13 – Avaliação das absorvâncias através e reação com ácido sulfúrico, em função do tempo, frente a variações de temperatura.

Com base no exposto, a condição experimental ficou definida conforme Tabela 27, demonstrada no item 6.5, compreendendo na adição de 600 μ l de ácido sulfúrico concentrado (98 %) sobre alíquota de 2 ml de SQR e amostra, em acetonitrila, com tempo de leitura entre 10 e 15 minutos.

O estudo da especificidade do método para a quantificação da percentagem dissolvida de AZ, no teste de dissolução, pode ser observado na Figura 14, onde não foram observadas interferências da amostra simulada de excipientes, para comprimidos contendo AZ.

Com o objetivo de verificar a aplicabilidade do presente método para a quantificação de AZ na forma de cápsulas, foi avaliada a possível interferência das cápsulas coloridas no comprimento de onda de 482 nm. O teste foi realizado através da dissolução de cápsulas vazias, em 900 ml de HCl 0,1 N, e conforme pode ser observado na Figura 14, a cápsula colorida apresenta interferência no visível, a 482 nm, demonstrando que o método não possui especificidade para cápsulas contendo AZ. Como descrito anteriormente, a AZ pode ser encontrada na forma de comprimidos, suspensão e cápsulas manipuladas. Neste caso, para as preparações testadas, o método proposto apresentou especificidade para comprimidos contendo AZ.

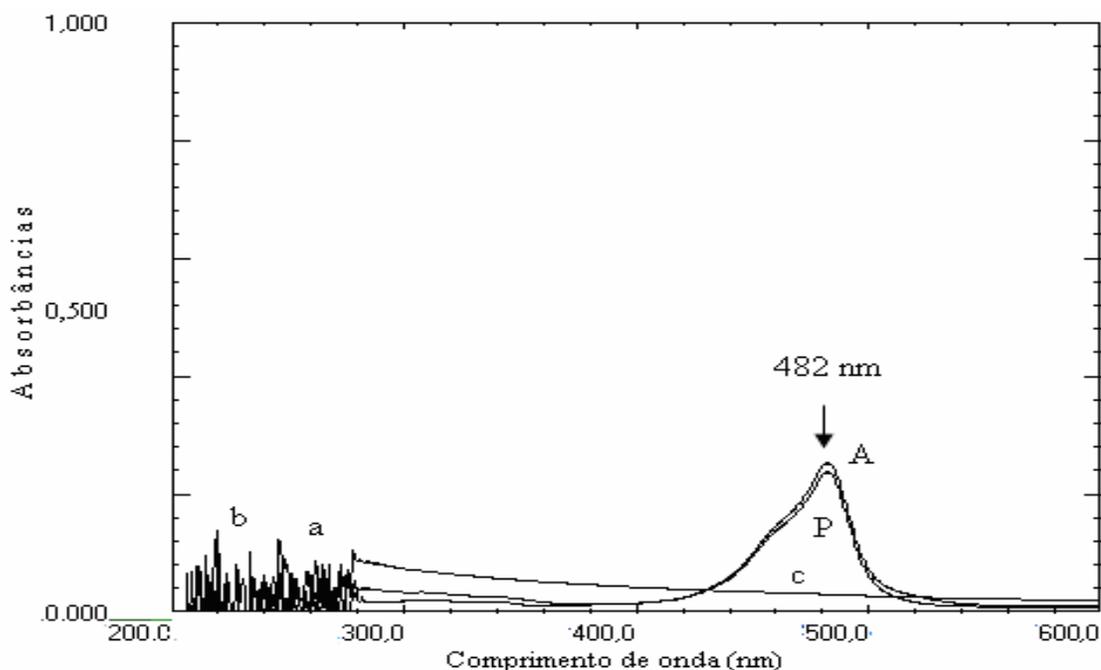


Figura 14 – Representação gráfica da sobreposição dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria no visível, da solução de SQR (P), de amostra (A) e das amostras simuladas de excipientes, dos Produtos A (a), B (b) e cápsula vazia (c), após reação com ácido sulfúrico concentrado.

A curva de calibração obtida na avaliação da linearidade está apresentada na Figura 15, e os resultados obtidos nas três curvas de calibração encontram-se na Tabela 29, onde se observa que os valores de coeficiente de variação das leituras de absorbâncias foram $\leq 2\%$, com valor médio de coeficiente de variação entre as curvas de 1,01%. Os resultados também foram comparados estatisticamente, através do método dos mínimos quadrados, e estão descritos na Tabela 30. A avaliação estatística demonstrou que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio da linearidade. Desta forma, resultados obtidos confirmaram a linearidade do método proposto. Estudos no desenvolvimento do método demonstraram que a linearidade do mesmo é mantida até concentrações próximas de 18 $\mu\text{g/ml}$, de AZ, nas condições de reação descritas na Tabela 27. Já para concentrações maiores de AZ, seriam necessárias modificações nas condições da reação, como aumento do volume de ácido utilizado.

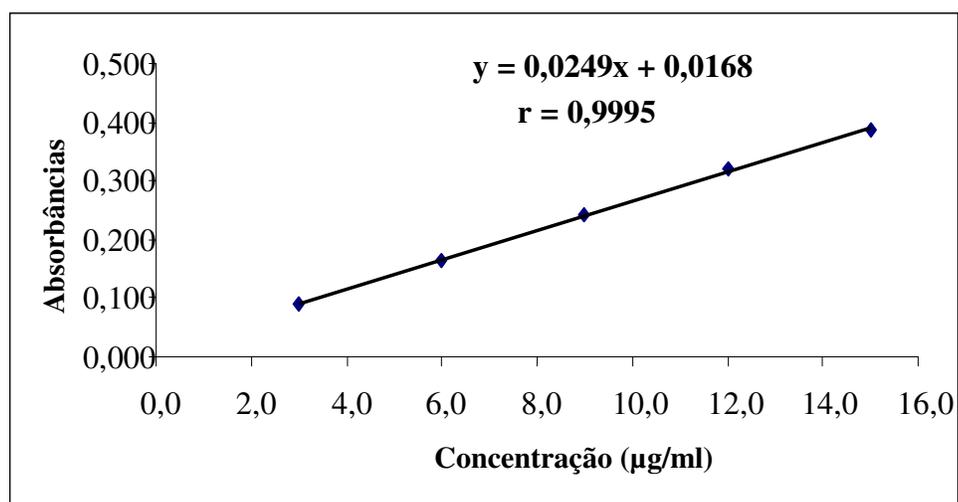


Figura 15 – Representação gráfica da curva de calibração da AZ por espectrofotometria na região do visível, após reação com ácido sulfúrico.

Tabela 29 – Valores de absorvâncias obtidos na determinação da curva de calibração da AZ por espectrofotometria no visível, após reação com ácido sulfúrico.

Concentração (µg/ml)	Absorbâncias			Média	CV %
	1º dia	2º dia	3º dia		
3	0,09	0,089	0,088	0,089	1,12
6	0,166	0,169	0,163	0,166	1,81
9	0,241	0,245	0,244	0,243	0,86
12	0,317	0,320	0,321	0,319	0,65
15	0,384	0,384	0,388	0,385	0,60
				Média CV %	1,01

CV% = coeficiente de variação percentual

Tabela 30 – Tratamento estatístico dos resultados obtidos na reta de calibração, pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico no visível, através de reação com ácido sulfúrico.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	3-15 µg/ml
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,0249x + 0,0168$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0249x \pm 0,0004$
Intercepto (b) ± desvio padrão	$+0,00168 \pm 0,003$
Coeficiente de correlação (r)	0,9995

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), onde foram analisados seis comprimidos, em dois dias diferentes, obtendo-se valores de CV inferiores a 2 %, para os resultados da percentagem de fármaco dissolvido, em 45 minutos (Tabela 31). Os resultados também foram avaliados através da ANOVA, para precisão intermediária, onde foi demonstrado que não houve diferença significativa entre os dias, para $p = 0,01$ (Tabela 32).

Tabela 31 – Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de AZ (45 min), em comprimidos (Produto A), em 900 ml de HCl 0,1 N, aparato pá, por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico.

Amostras	% dissolvida de AZ	
	Dia 1	Dia 2
1	103,32	104,23
2	101,80	103,93
3	103,32	102,41
4	104,53	104,84
5	105,75	104,84
6	102,41	104,23
Média	104	104
CV %	1,38	0,86

Tabela 32 – Análise de variância (ANOVA) dos valores de percentagem dissolvida de AZ em comprimidos (Produto A), para análise da precisão intermediária, por espectrofotometria no visível através de reação com ácido sulfúrico.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	1	0,935	0,93	0,72 (4,84)
Resíduo	11	14,27	1,28	
Total	12	15,21		

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$.

Outro parâmetro importante na validação é a exatidão do método, a qual foi avaliada através da recuperação, e os resultados da média das amostras simuladas de excipientes foram de 98,36 % para o Produto A, e de 98,6 % para o Produto B, conforme pode ser observado na Tabela 33. Com isto, a exatidão ficou demonstrada, com os resultados dentro dos limites especificados de 95 % a 105 % (MARQUES; BROWN 2002).

Tabela 33 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes dos Produtos A e B, por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico.

Amostras	Quantidade de SQR (mg)		% de Recuperação	% média de Recuperação
	Adicionada	Recuperada		
Produto A (ASE)*	150	147,66	98,44	98,74
	500	498,50	99,70	
	600	588,60	98,10	
Produto B (ASE)*	150	146,05	97,37	98,36
	500	502,05	100,41	
	600	583,80	97,30	

* ASE: amostra simulada de excipiente.

Assim como nos métodos anteriores, a estabilidade das soluções analíticas foi avaliada para demonstrar a robustez, e verificou-se que as soluções foram estáveis por até 48 horas em temperatura ambiente. Neste estudo foram mantidas as mesmas condições descritas na Tabela 24, para a reação, e os resultados de absorvância obtidos foram similares aos resultados do dia anterior, demonstrando com isto a robustez do método frente a variações de tempo, com o fármaco em solução.

Para o desenvolvimento de um método de dissolução devem-se escolher os equipamentos adequados, o meio de dissolução, seu volume e a velocidade de agitação, e os fatores relacionados ao fármaco e à forma farmacêutica devem ser levados em consideração. (MARQUES; BROWN, 2002).

Características como a permeabilidade e a solubilidade de um fármaco representam requisitos prévios para a obtenção da resposta clínica, e determinam as condições para teste de dissolução. Para que ensaios de dissolução possam prever o comportamento *in vivo* de determinado fármaco em uma preparação farmacêutica, os meios utilizados devem se assemelhar aos líquidos fisiológicos, e fatores como a condição *sink*, presença de tensoativos e estabilidade do fármaco no meio de dissolução devem também ser considerados.

No desenvolvimento do método de dissolução, a seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser no sentido de se obter o máximo de poder discriminativo, detectando eventuais desvios dos padrões de qualidade das preparações testadas (MANADAS, 2002). O volume do meio de dissolução pode variar de 500 ml a 1000 ml, sendo 900 ml o volume mais

utilizado. Os meios também podem variar com relação ao pH, numa faixa entre 1,2 a 6,8. As velocidades de dissolução variam, de 50 rpm a 100 rpm, sendo que para comprimido, as velocidades mais utilizadas são de 50 rpm ou 75 rpm. Os aparatos cestas e pás, são rotineiramente utilizados para cápsulas e comprimidos, respectivamente (MARQUES; BROWN, 2002).

Conforme citado nos capítulos anteriores foram encontrados trabalhos de aplicação de métodos para testes de dissolução para cápsulas contendo AZ. Alguns dos estudos de desenvolvimento de metodologia para a determinação de AZ e aplicação destes nos testes de dissolução utilizaram as condições de dissolução preconizadas pela Farmacopéia Americana (USP 29, 2006), o qual define como meio 900 ml de tampão fosfato de sódio pH 6 contendo 0,1 % de tripsina; aparato pá, com rotação de 100 rpm e tempo de coleta de 45 minutos. Com isto, no presente trabalho, procurou-se desenvolver um método de dissolução para comprimidos contendo 500 mg de AZ, visando a possibilidade de eliminar o uso da tripsina, já que esta possui custo bastante elevado.

Com o objetivo de definir uma condição com poder discriminativo na liberação de AZ, a partir de preparações farmacêuticas em comprimidos, foram avaliadas diferentes condições (Tabela 28) para a escolha dos parâmetros de dissolução.

Avaliou-se, inicialmente, a estabilidade da SQR e das amostras nos meios que seriam testados (HCl 0,1N, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,0). Verificou-se que o fármaco foi estável por até 2 horas, tanto à temperatura ambiente quanto a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, em todos os meios descritos, com variação entre 98 % a 102 % (FORTUNATO, 2005; MARQUES; BROWN, 2002).

Os resultados obtidos nos perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições testadas, conforme descritos na Tabela 28, podem ser vistos nas Figuras 16, 17 e 18. Nos perfis onde as amostras foram submetidas a uma velocidade de rotação de 100 rpm e 75 rpm, observou-se uma liberação muito rápida do princípio ativo já nos primeiros 10 minutos, o que poderia dificultar uma discriminação entre lotes de um mesmo produto, ou entre produtos de diferentes fabricantes. Porém, nos testes com velocidade de rotação de 50 rpm, observou-se uma velocidade mais lenta e gradual do princípio ativo, para todos os meios testados. No entanto, dentre os meios avaliados em 50 rpm, apenas o meio constituído de HCl 0,1 N proporcionou ao fármaco uma liberação de 100 % a partir dos 30 minutos de ensaio. Com isto, os demais meios foram descartados, sendo selecionado o HCl 0,1 N que permitiu a dissolução total do fármaco, sem a necessidade de adição da tripsina ou LSS, reduzindo de forma significativa o custo para a realização do teste de dissolução.

O fato de se obter uma dissolução de 100 % do fármaco em HCL 0,1N também sugere que o mesmo não esteja sendo limitado pela saturação da solubilidade (condição *sink*) no meio avaliado. A condição *sink*, segundo Abdou (1989, apud MARCOLONGO, 2003), representa de 5 a 10 vezes o volume de saturação do fármaco em determinado meio, e esta condição deve ser mantida para que a velocidade de dissolução não seja afetada artificialmente pela saturação do meio. A AZ, conforme solubilidade descrita em monografia, é ligeiramente solúvel em soluções ácidas (HCl 0,1 N), o que de acordo com esta faixa de solubilidade, é necessário entre 30 a 100 partes deste solvente para dissolver 1g de soluto. Baseado nesta especificação de solubilidade, a qual foi confirmada através de testes preliminares, sugere-se que a condição *sink* esteja mantida em 900 ml de HCl 0,1 N de meio, tendo em vista que, se 1 g de fármaco dissolve em até 100 partes de solvente, teríamos uma condição bem mais favorável na solubilização de 1 comprimido de 500 mg de AZ em 900 ml de meio, ou seja, 18 vezes superior ao volume presumido de saturação, desconsiderando a possibilidade de interferência dos excipientes.

Com base no exposto, a condição mais adequada para a dissolução dos comprimidos contendo AZ foi a condição correspondente a 900 ml de HCl 0,1N como meio, aparato pá e velocidade de rotação de 50 rpm, mantida a temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

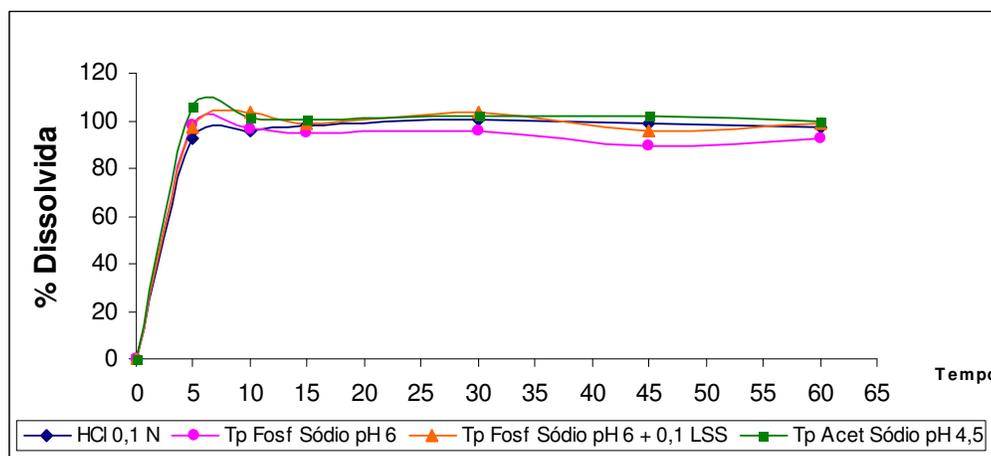


Figura 16 – Perfis de dissolução dos comprimidos contendo AZ (Produto A), em diferentes meios (900 ml), à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, com aparato pá e velocidade de 100 rpm.

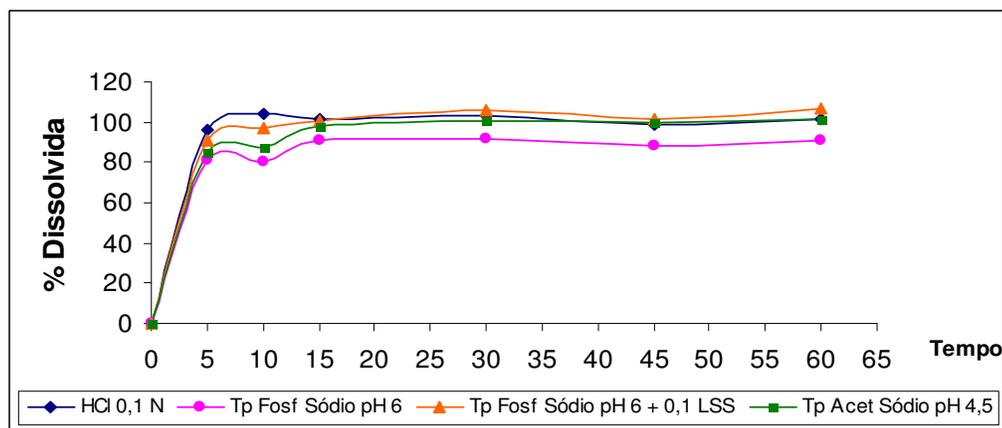


Figura 17 – Perfis de dissolução dos comprimidos contendo AZ (Produto A), em diferentes meios (900 ml), à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, com aparato pá e velocidade de 75 rpm.

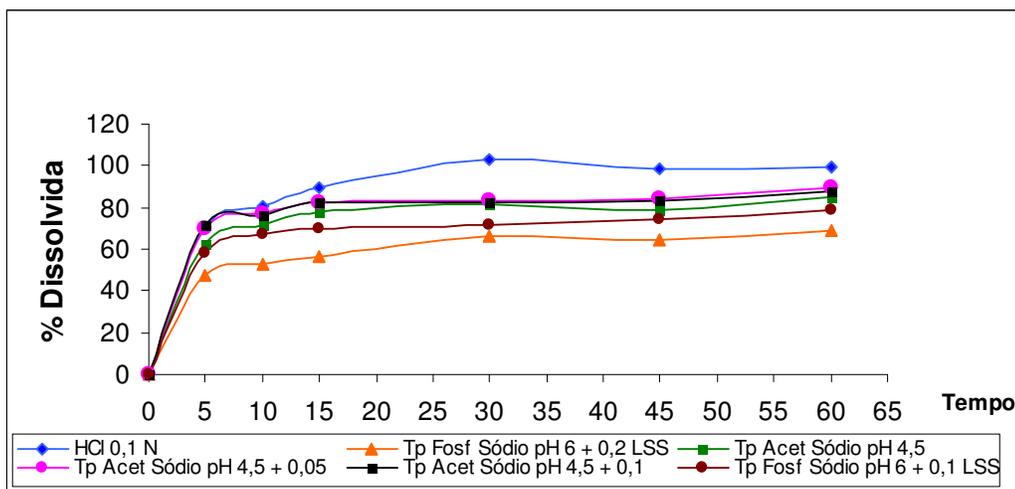


Figura 18 – Perfis de dissolução dos comprimidos contendo AZ (Produto A), em diferentes meios (900 ml), à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, com aparato pá e velocidade de 50 rpm.

Foi realizado, também, um perfil de dissolução com 12 comprimidos do Produto A, cujos valores da % de fármaco dissolvido encontram-se na Tabela 34. Foram obtidos resultados satisfatórios entre as cubas, com valores de CV % inferiores a 10 % para todos os tempos de coleta. Com isto verificou-se que o meio selecionado proporciona uma menor variação entre cubas, o que é extremamente necessário para que o teste de dissolução tenha precisão nos resultados (ANSARI et al., 2004).

Tabela 34 – Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de AZ, através do perfil de dissolução, com 12 comprimidos (Produto A), em 900 ml de HCl 0,1 N, aparato pá, por espectrofotometria no visível, através de reação com ácido sulfúrico.

Tempos de coleta	Média da %		
	dissolvida de AZ	DP	CV %
5	82,73	5,776	6,98
10	90,99	6,951	7,64
15	95,47	4,208	4,41
30	100,46	3,825	3,81
45	103,80	1,177	1,13
60	101,70	1,272	1,25

Um perfil de dissolução de comprimidos ($n = 3$) do Produto B, nas condições definidas anteriormente, foi também realizado, para avaliar o método de dissolução proposto frente a outros produtos ou lotes. Os perfis dos Produtos A e B foram então sobrepostos (Figura 19), e avaliados através da eficiência de dissolução (MARCOLONGO, 2003). Os valores de ED obtidos foram comparados estatisticamente através do teste t , que demonstrou diferença significativa entre os produtos ($p < 0,05$), com 95 % de limite de confiança (Tabela 35).

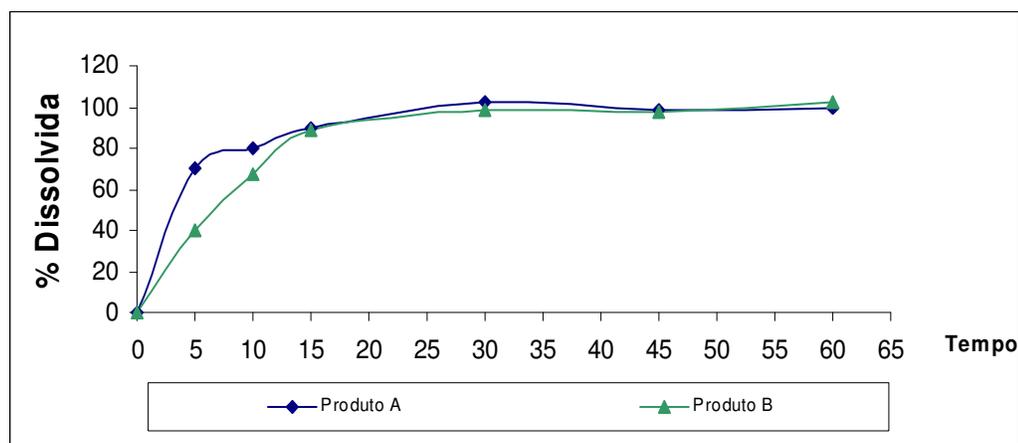


Figura 19 – Sobreposição dos perfis de dissolução, dos Produtos A e B (comprimidos), em 900 ml de HCl 0,1 N, à temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e velocidade de 50 rpm.

Tabela 35 – Percentagem média de AZ dissolvida em função do tempo, eficiência de dissolução ED (%) e análise estatística entre as ED (%) dos produtos A e B.

Tempo (min)	% dissolvida (n = 12)	% dissolvida (n = 3)
	Produto A	Produto B
5	70,57	40,29
10	80,16	67,74
15	89,91	88,48
30	102,60	98,92
45	98,86	97,66
60	99,67	102,15
ED (%)	87,72	81,65
Teste – t (P)	P = 0,0228*	

* Valor significativo para $p < 0,05$. Limite de confiança = 95 %.

As especificações para a determinação da % de fármaco dissolvido estão diretamente relacionadas com a quantidade mínima dissolvida em um intervalo de tempo. As monografias de preparações farmacêuticas sólidas de uso oral, geralmente estabelecem que as mesmas não devem apresentar menos do que 75 % de fármaco dissolvido, em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003). Para fármacos de dissolução rápida, ou seja, 85 % em 15 minutos, as possíveis variações na taxa de absorção serão devido ao trânsito intestinal, ao conteúdo luminal e à permeabilidade da membrana, e não a fatores relacionados à formulação. De acordo com monografia para AZ na farmacopéia americana, a % mínima de fármaco que deve ser dissolvida após 45 minutos de teste é 75%. Nas condições definidas no presente trabalho, verificou-se que a liberação foi superior a 95 % já em 30 minutos (Tabela 34).

Observando-se os perfis de dissolução demonstrados anteriormente, verifica-se que a liberação do fármaco é superior a 85% partir 15 minuto minutos. Conforme pode ser observado na Tabela 36, os produtos A e B apresentaram % de liberação superior a 90% em 30 minutos. Sugere-se, assim, que a especificação de um único ponto, com no mínimo 85 % de dissolução em 30 minutos seja suficiente para comprovar a qualidade do produto lote a lote.

Tabela 36 – Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de AZ nos comprimidos dos Produtos A e B, em 900 ml de HCl ,01 N, aparato pá, no tempo de 30 min, utilizando espectrofotometria no visível, após reação com ácido sulfúrico.

Amostras	% dissolvida de AZ	
	Produto A	Produto B
1	96,63	98,92
2	93,90	97,5
3	96,94	99,62
4	98,76	
5	99,06	
6	96,94	
Média	97	98,68
DP	1,85	1,08
CV %	1,91	1,09

DP: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação.

7 CONCLUSÕES

- A identidade e a pureza da matéria-prima utilizada como SQR foram atestadas através de análises do ponto de fusão, umidade, solubilidade, pH e infravermelho.
- As amostras de comprimidos e pó para suspensão oral cumpriram com as especificações farmacopéicas quanto às características físico-químicas.
- O método por espectrofotometria na região do ultravioleta, em 226 nm, através de reação com ácido sulfúrico concentrado (98 %), utilizando acetonitrila como diluente, mostrou-se específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto, para a análise quantitativa de AZ, em comprimidos e pó para suspensão.
- O método por espectrofotometria na região do ultravioleta, em 363 nm, através de reação por complexo de transferência de carga com iodo, utilizando acetonitrila como diluente, mostrou-se específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto, para a análise quantitativa de AZ, em comprimidos e suspensão.
- A análise comparativa entre os métodos de quantificação de AZ propostos e o método oficial demonstrou não haver diferença significativa na análise de variância (ANOVA).
- O método por espectrofotometria na região do visível, em 482 nm, através de reação com ácido sulfúrico concentrado (98 %), utilizando acetonitrila como diluente, mostrou-se específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto, para a análise quantitativa de AZ em comprimidos, podendo ser utilizado para a determinação da percentagem de AZ dissolvida nos testes de dissolução.
- A utilização de 900 ml de HCl 0,1 N como meio de dissolução, mantida à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, aparato pá, com velocidade de 50 rpm, demonstrou resultados satisfatórios para analisar a dissolução de comprimidos contendo AZ.
- Sugere-se que a especificação de 85 % de dissolução em 30 minutos seja o suficiente para comprovar a qualidade de comprimidos contendo AZ, nas condições estabelecidas no presente trabalho.

8 REFERÊNCIAS

- ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; TALEBNIA, J. The Development and Validation of a Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, v. 11, p. 16-24, 2004.
- BAHRAMI, G.; MIRZAEI, S.; KIANI, A. High performance liquid chromatographic determination of azithromycin in serum using fluorescent detection and its application in human pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 820, p. 277-281, 2005.
- BEBAWY, L. I.; KOUSY, N.; SUDDIK, J. K.; MOHAMED, S. Spectrophotometric determination of fluoxetine and sertraline using chloranil, 2, 3 dichloro-5,6 dicyano benzoquinone and iodine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p.133 -142, 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para a realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 set. 2004.
- BREIER, AR.; GARCIA, C.V.; OPPE, T.; STEPPE, M.; SHCAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p.957 - 961, 2002.
- BUDAVARIS. The Merck Index. 12. ed. London: Merck, 1996.
- CARDOSO, S. G.; IEGGLI, C. V. S.; POMBLUM, S. C. G. Spectrophotometric determination of carvedilol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. **Pharmazie**, v.62, p.1, 2007.
- CARVALHO, R.D.S.; CARVALHO, W.A. In: SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. 1314 p.
- DANIELSON, N.D.; HOLEMAN, J. A.; BRISTOL, D.C.; KIRZNER, H. Simple methods for the qualitative and quantitative determination of macrolide antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.11, p. 121-130, 1993.
- DEBREMAEKER, D.; VISKY, D.; CHEPKWONY, H.K.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of unknown compounds in azithromycin bulk samples with liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 342-350, 2003.
- FARGHALY, O.A.E.; MOHAMED, N.A.L. Voltammetric determination of azithromycin at the carbon paste electrode. **Talanta**, v. 62, p. 531-538, 2004.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed., São Paulo, Atheneu, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed., São Paulo, Atheneu, 1988.

FORTUNATO, D. Dissolution method development for immediate release solid oral dosage forms. **Dissolution technologies**, p. 12 – 14, 2005.

GALLAGHER, P.A.; DANIELSON, N.D. Colorimetric determination of macrolide antibiotics using ferric ion. **Talanta**, v.42, p. 1425-1432, 1995.

GANDHI, R.; KAUL, C.L.; PANCHAGNULA, R. Validated LC method for in vitro analysis of azithromycin using electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, p.1073 - 1079, 2000.

GANDHI, R.; KAUL, C.L.; PANCHAGNULA, R. Pharmacokinetic evaluation of an azithromycin controlled release dosage form in healthy human volunteers: a single dose study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.270, p.1-8, 2004.

GAYNOR, M.; MANKIN, A.S. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. **Frontiers in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 21 – 35, 2005.

HU, C.; ZOU, W.; HU, W.; MA, X.; YANG, M.; ZHOU, S.; SHENG, J.; LI, Y.; CHENG, S.; XUE, J. Establishment of a fast chemical identification system for screening of counterfeit drugs of macrolide antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p. 68-74, 2006.

HUANG, W.; LIU, X.-J.; ZHAO, F.-L. Spectrophotometric determination of azithromycin base by charge transfer reaction. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi / Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 26, p. 913-916, 2006.

HUEBRA, M.J.Gonzalez de la; VINCENT, U. Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 376-398, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 2005.

ITOH, Z.; SUZUKI, T ; NAKAYA, M.; INOUE, M. MITSUHASHI, S. Gastrointestinal motor stimulating activity of macrolides antibiotics and analysis of their side effects on the canine gut. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 26, p.863-869, 1984.

JAIN, R. DANZIGER, L.H. The Macrolide Antibiotics: A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 3045 – 3053, 2004.

KANFER, I.; SKINNER, M.F.; WALKER, R.B. Analysis of macrolide antibiotics. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 255-286, 1998.

KEBEDE, Z.; LINDQUIST, S.E. Donor-acceptor interaction between non-aqueous solvents and I₂ to general I₃, and its implication in dye sensitized solar cells. **Solar energy Materials & Solar Cells**. V. 57, p. 259-275, 1998.

KELANI, K.; BEBAWY, L.I.; ABDEL-FATTAH, L. AHMAD, A.-K. S. Spectrophotometric of some n-donating drugs using DDQ. **Analytical Letters**, v. 30, p. 1843-1860, 1997.

KHASHABA, P. Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, p.923 - 932, 2002.

KHEDR, A.; SHEHA, M. Quantitative Thin-Layer Chromatographic Method of Analysis of Azithromycin in Pure and Capsule Forms. **Journal of Chromatographic Science**, v.41, n° 1, p.10-16, 2003.

KIM, Y.-K.; POTHULURI, J.V.; CERNIGLIA, C.E. **Voltametric investigation of macrolides by an HPLC-columetric assay**, v. 38, p. 390-396, 2005.

KOCH, D.E.; BHANDARI, A.; CLOSE, L.; HUNTER, R.P. Azithromycin extraction from municipal wastewater and quantitation using liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 17-22, 2005.

KOMORSKY-LOVRIC, S.; NIGOVIC, B. Identification of 5-aminosalicylic acid, ciprofloxacin and azithromycin by abrasive stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 81-89, 2004.

LI, H.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; KANG, J. Spectrophotometric determination of azithromycin based on the charge transfer reaction between azithromycin and alizarin. **Fenxi Huaxue**, v. 32, p. 598-600, 2004.

LI, Z. Determination of azithromycin hydrochloride and its related substances by HPLC. **Journal of China Pharmaceutical University**, v. 37, p. 91-92, 2006.

LODE, H.; BORNER, K.; KOEPPE, P.; SCHABERG, T. Azithromycin: review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. **Antimicrobials Chemotherapy**, v. 37, p. 1 – 8, 1996.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375 – 399, 2002.

MANDIC, Z.; WEITNER, Z.; ILIJAS, M. Electrochemical oxidation of azithromycin and its derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 647-654, 2003.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES M.R.C.; BROWN, E. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analítica**, v. 1, p. 48-51, 2002.

MIGUEL, L.; BARBAS, C. LC determination of impurities in azithromycin tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, p.211 - 217, 2003.

MOUSTAFA, A. A. M. Spectrophotometric methods for the determination of lansoprazole and pantoprazole sodium sesquihydrate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, p.45-58, 2000.

MOSTAFA, A. A.; BEBAWY, L. I.; REFFAT, H.H. Spectrophotometric determination of clobetasol propionate, halobetasol propionate, quinagolide hydrochloride, through charge transfer complexation. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27,p.889-899, 2002.

NIGOVIC, B.; SIMUNIC, B. Voltammetric assay of azithromycin in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, p.197 - 202, 2003.

NIROGI, R.V.S.; KANDIKERE, V.N.; SHUKLA, M.; MUDIGONDA, K.; MAURYA, S.; BOOSI, R.; YERRAMILI, A. Sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for de quantification os azithromycin in human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 553, p. 1-8, 2005.

OLIVEIRA, V. Desenvolvimento de métodos para análise da roxitromicina em comprimidos. 1995. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

RACHIDI, M.; ELHARTI, J. DIGUA, K.; CHERRAH, Y.; BOUKLOUZE, A. New spectrophotometric method for azithromycin determination. **Analytical Letters**, v. 39, p. 1917-1926, 2006.

RIEDEL, K.-D.; WILDFEUER, A.; LAUFEN, H.; ZIMMERMANN, T. Equivalence of a high-performance liquid chromatographic assay and a bioassay of azithromycin in human serum samples. **Journal of Chromatography: Biomedical Applications**, v. 576, p. 358-362, 1992.

SALEH, G.A.; ASKAL, H.F.; RADWAN,M.F.; OMAR, M.A. Use of charge-transfer complexation in the spectrphotometric análisis of certain cephalosporins. **Talanta**, v.54 p. 1205-1215, 2001.

SALGADO, H.R.N., RONCARI, A.F.F. Microbiological assay for determination of azithromycin in ophthalmic solutions. **Yaouxue Xuebao**, v. 40, p. 544-549, 2005.

SHARGHI, H.; MASSAH, A.R.; ABEDI, M. Spectrophotometric study of the reaction of iodine and bromine with new macrocycle diamides and di-ortho methoxybenzoyl thiourea in chloroform solution. **Talanta**, v. 49, p. 531 – 538, 1999.

SHEPARD, R.M.; DUTHU, G.S., FERRAINA, R.A.; MULLINS, M.A. High-performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection for azithromycin in serum end tissues. **Journal of Chromatography: Biomedical Applications**, v. 565, p. 321-337, 1991.

SHERIF, Z. A.; MOHAMED, A. O.; WALASH, M. I.; TARRAS, F. M. Spectrophotometric determination of loperimide hydrochloride by acid-dye and charge-transfer complexation

methods in the presence of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, p.13-23, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds, 4. ed., 2000.

SONG, Z.; WANG, C. Ultrasensitive assay of azithromycin in medicine and bio-fluids based on its enhanced luminol-H₂O₂ chemiluminescence reaction using flow injection technique. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 5375-5380, 2003.

STORPIRTIS, S; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, n. 1, p. 1 – 11, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TANINAKA, C.; OHTANI, H.; HANADA, E.; KOTAKI, H.; SATO, H.; IGA, T. Determination of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin, and azithromycin in plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 738, p. 405-411, 2000.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 28^a ed. Rockville, United States Convention, 2005.

TIAN, S.-X.; JIANG, Y.; XIE, Z.; CAI, T.-M.; ZHAO, X.-R. Spectrophotometric determination of azithromycin tablets dissolution by charge-transfer complex with alizarin red. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 30, p. 533-534 + 567, 2005.

TORANO, J.S.; GUCHELAAR, H.-J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethylloxycarbonyl chloride and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 720, p. 89-97, 1998.

TURCINOV, T.; PEPELJNANK, S. Azithromycin potency determination: optimal conditions for microbiological diffusion method assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.17, p.903 - 910, 1998.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 29. ed. Rockville, United States Convention, 2006.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis** – A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists, Ed. Churchill Livingstone, Glasgow, UK, 1999.

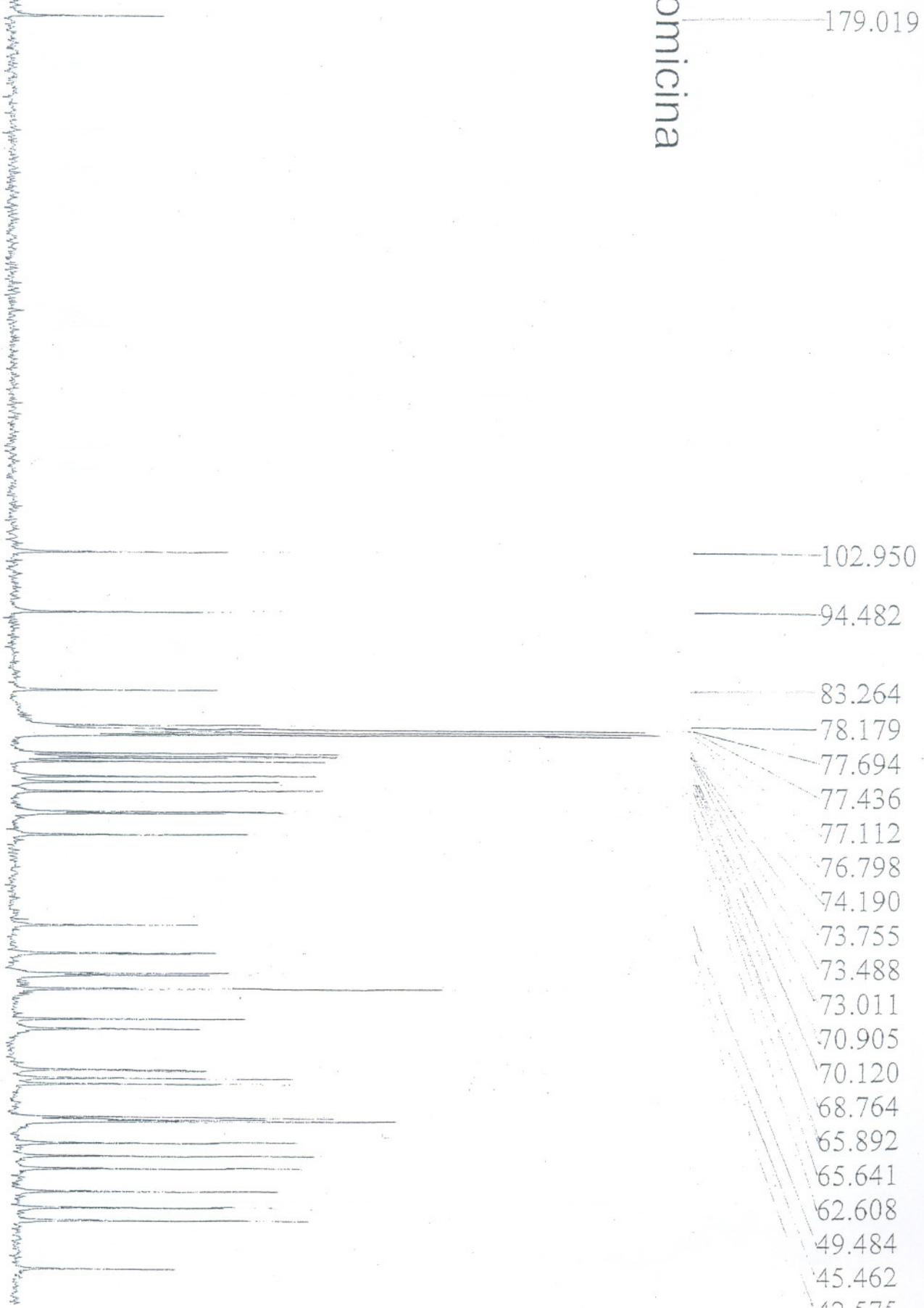
WILMS, E.; TRUMPIE, H.; VEENENDAAL, W.; TOUW, D. Quantitative determination of azithromycin in plasma, blood and isolated neutrophils by liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethylloxycarbonyl chloride and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 37-42, 2005.

ZUBATA, P.; CERESOLE, R.; ROSASCO, A.; PIZZORNO, M.T. A new HPLC method for azithromycin quantitation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, p.833 - 836, 2002.

Anexo A

Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) da AZ SQR

Azitromicina



Anexo B

Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) da AZ SQR

Azitromicina

