

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS DE
ESTABILIDADE E DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE
ORBIFLOXACINO**

EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY

ARARAQUARA – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS DE
ESTABILIDADE E DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE
ORBIFLOXACINO**

EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA – SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G386a Cazedey, Edith Cristina Laignier
Análise químico-farmacêutica e estudos de estabilidade e de dissolução
de comprimidos de orbifloxacino / Edith Cristina Laignier Cazedey. –
Araraquara, 2012
282 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Orbifloxacino. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência.
3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.
4. Espectrofotometria. 5. Doseamento microbiológico. 6. Dissolução.
7. Estabilidade. 8. Produtos de degradação. I. Salgado, Hérica Regina Nunes,
orient. II. Título.

CAPES: 40300005

EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS DE
ESTABILIDADE E DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE
ORBIFLOXACINO**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Araraquara, 16 de agosto de 2012.

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Presidente/orientadora

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Universidade de São Paulo (USP-IQSC)

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara (UNESP)

A Ti Senhor, seja toda Honra e toda Glória, pois sei que é
Cristo Jesus quem trabalha a meu favor. Este trabalho é
entregue e dedicado a Ti.

*“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem
com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu
Deus além de Ti, que trabalha para aquele que
nele espera” (Is. 64:4).*

Fato ocorrido em 1892, verdadeiro e parte integrante da biografia do protagonista.

Um senhor de 70 anos viajava de trem, tendo ao seu lado um jovem universitário, que lia o livro de ciências de autoria daquele senhor.

O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta. Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia e estava aberta no livro de Marcos. Sem muita cerimônia, o jovem interrompeu a leitura do velho senhor e perguntou:

- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?

- Sim, mas não é um livro de crendices. É a Palavra de Deus. Estou errado?

- Mas é claro que está! –retrucou o jovem. -Creio que o senhor deveria estudar a História Universal. Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda crêem que Deus tenha criado o mundo em seis dias. O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.

- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia? –perguntou o velho demonstrando o interesse de quem quer aprender um pouco.

- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência.

O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário.

Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba.

No cartão estava escrito:

*Professor Doutor Louis Pasteur
Diretor-Geral do Instituto de Pesquisas
Científicas da Universidade Nacional da França.*

Louis Pasteur - ilustre pesquisador francês que descobriu a vacina anti-rábica e impulsionou a criação do Instituto Pasteur de Paris e de várias outras instituições, que receberam o mesmo nome, no mundo todo.

O Instituto Pasteur da França foi fundado em 1888 pelo próprio Louis Pasteur. Este instituto é um dos mais famosos centros de pesquisa da atualidade.

Após este fato ocorrido no trem com o jovem, o próprio Dr. Pasteur deixou como legado à humanidade a seguinte frase:

"Un peu de science éloigne de Dieu, beaucoup de science y ramène."

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

- citado em "L'Age nouveau", Edições 99-104 - Página 66, 1957

AGRADECIMENTOS

A Deus que me sustenta, capacita e realiza Seu querer. Estar em Suas mãos é o motivo da minha alegria. *(Porque Deus é o que opera em vós tanto o querer como o realizar, segundo a sua boa vontade. Filipenses 2:13)*

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, meus sinceros agradecimentos pela orientação e amizade, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela dedicação, disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À minha família, meus avós José Maria e Nelzira, minha mãe Clarice, meus tios Clerismar, Miriam e Cleunice, minha irmã Thamara e meu cunhado Bruno, meus primos Dâmaris, Sophia, Lara, Fillipe e Miguel, que apesar da distância, sempre me apóiam nos caminhos da vida.

Ao Juninho pelo incentivo, amor, carinho e compreensão.

Aos meu amigos, Ana Carolina Kogawa, Andressa Figueiredo, Aylime Castanho, Carolina Peres, Caroline Trevelin, Mariana Siqueira, Thaís Diniz, Juliana Felix, Daniela Vieira, Débora Perez, Eliane Tótolí, Emiliane Araújo, Fernanda Kolenyak, Flávia Fiorentino, Flávia Ribeiro, Guilherme Emerick, Gustavo Rossanezi, Hilris Rocha, Iane Murta, Edu e Mateus, Jan Frommelt, Jaqueline Perez, Jemima Moraes, Jéssica, Rita e Joyce Bernegossi, Rafael Salmazi, Josilene Corrêa, Letícia Caramari, Lucas Chierentin, Lucélia Magalhães, Marcelo Gonzaga, Marcelo Hiene, Mariana Santoro, Michel Campos, Patrícia Alessio, Paula Lacerda Oliveira, Rudy Bonfilio, Sabrina e Valentina Mesquita, Tahisa Pedroso, Vanessa Fernandes dos Santos, Vânia Ortega, obrigada pela alegre convivência e amizade, pelos conselhos e pelas boas lembranças.

À Maria de Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico e amizade.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, muito obrigada pela ajuda, por estarem sempre solícitos a esclarecer dúvidas e dar contribuições.

À Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, da USP – Ribeirão Preto e à Profa. Dra. Marcela Raquel Longhi, da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, pelas enriquecedoras discussões no exame geral de qualificação.

Ao Laboratório de Análise Térmica Ivo Giolito, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ/UNESP), Araraquara-SP, com a colaboração do Prof. Dr. Massao Ionashiro.

À Profa. Dra. Chung Man Chin por ceder as dependências do laboratório de Química Farmacêutica para realização das análises por espectrofotometria no infravermelho e fusão. Ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos e aos técnicos Osmar e Mateus, pelas discussões e ajuda com os equipamentos.

Ao Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira e ao Dr. Guilherme Luz Emerick pela disponibilização do aparelho de espectrofotometria para o desenvolvimento do visível junto ao laboratório de toxicologia.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto, da USP-IQSC, pela disponibilização de seu tempo para a discussão do capítulo de massas.

Ao Prof. Dr. Sanjay Garg, da *The University of Auckland*, na Nova Zelândia, por permitir a realização do doutorado sanduíche, pela presteza, apoio e amizade. *This research would not have been possible without the help of Dr. Garg. He provided me with all assistance I needed.*

A todos os meus amigos da AnQual Labs, em Auckland, Nova Zelândia, Sanjay Garg, Mandy Collocott (*Mandy is one of the best people I know, and I will always be in her debt for all of her support and love*), Asma Othman (*Thanks for all lunch, tea and coffee times*), Sairam Behera, Manisha Sharma, Wei Hu, Neera Naidoo e Manju Kanamala. *Thank you all for help me with my studies, my emotional issues, my homesick, as well as for being wonderful persons and friends during the good and bad times.*

Aos amigos que fiz em Auckland (NZ), especialmente à Vanessa Dutra, foi Deus que te colocou no meu caminho. À minha *host-family*, Leighton, Deborah e Kaitlyn Gosnell.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Cláudia, Sônia, Laura e Joyce, pela atenção e boa vontade.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre solícitos e dispostos a ajudar.

À FAPESP (Processo nº 2008/58526-0) pelo apoio financeiro concedido para a realização do doutorado.

Ao CNPq (Processo nº 200280/2010-4) pela bolsa concedida para a realização do doutorado sanduíche no exterior (SWE).

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	xiv
	LISTA DE TABELAS.....	xx
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvi
	RESUMO.....	xxix
	ABSTRACT.....	xxx
1	INTRODUÇÃO	
1.1	Introdução geral e justificativa.....	1
1.2	Desenvolvimento dos métodos.....	4
1.3	Validação dos métodos.....	4
1.4	Estudos de dissolução.....	5
1.5	Estudos de estabilidade.....	5
1.5.1	Requerimentos para os testes de estresse.....	6
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo geral.....	8
2.2	Objetivos específicos.....	8
3	REVISÃO DA LITERATURA	
3.1	Introdução.....	9
3.2	Aplicações clínicas.....	14
3.3	Farmacodinâmica do orbifloxacino.....	16
3.4	Farmacocinética do orbifloxacino.....	27
3.5	Métodos analíticos.....	36
4	DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS	
4.1	Descrição geral de orbifloxacino.....	51
4.2	Substância química de referência (SQR).....	52
4.3	Amostra da forma farmacêutica comprimido.....	52
4.4	Equipamentos.....	53
4.5	Solventes e reagentes.....	54
4.6	Micro-organismos.....	55
5	ANÁLISE QUALITATIVA	
5.1	Introdução.....	56
5.2	Características organolépticas de orbifloxacino SQR e comprimidos.....	56
5.2.1	Método.....	56
5.2.2	Resultados e discussão.....	56

5.3	Determinação do peso médio dos comprimidos de orbifloxacino.....	57
5.3.1	Método.....	58
5.3.2	Resultados e discussão.....	58
5.4	Desintegração.....	59
5.4.1	Método.....	59
5.4.2	Resultados e discussão.....	60
5.5	Determinação da resistência mecânica dos comprimidos de orbifloxacino	60
5.5.1	Dureza.....	60
5.5.1.1	Método.....	60
5.5.2	Friabilidade.....	60
5.5.2.1	Método.....	61
5.5.3	Resultados e discussão.....	61
5.6	Determinação do intervalo de fusão.....	62
5.6.1	Método.....	62
5.6.2	Resultados e discussão.....	62
5.7	Análise térmica de orbifloxacino.....	63
5.7.1	Método.....	63
5.7.2	Resultados e discussão.....	63
5.8	Determinação da umidade – método gravimétrico.....	65
5.8.1	Método.....	65
5.8.2	Resultados e discussão.....	65
5.9	Cromatografia em camada delgada (CCD)	65
5.9.1	Método.....	66
5.9.2	Resultados e discussão.....	68
5.10	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV).....	71
5.10.1	Método.....	71
5.10.2	Resultados e discussão.....	71
5.11	Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	74
5.11.1	Método.....	74
5.11.2	Resultados e discussão.....	75
5.12	Espectrofotometria de absorção na região do visível (VIS).....	78
5.12.1	Reação com vermelho congo.....	78
5.12.1.1	Método.....	78
5.12.1.2	Resultados e discussão.....	79
5.12.2	Reação com cloreto férrico.....	79
5.12.2.1	Método.....	80

5.12.2.2	Resultados e discussão.....	80
5.13	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	80
5.13.1	Método.....	80
5.13.2	Resultados e discussão.....	81
6	ANÁLISE QUANTITATIVA	
6.1	Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	82
6.1.1	Método.....	82
6.1.2	Resultados e discussão.....	85
6.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	92
6.2.1	Método.....	92
6.2.2	Resultados e discussão.....	95
6.3	Métodos microbiológicos.....	104
6.3.1	Ensaio de difusão em ágar.....	107
6.3.1.1	Método.....	107
6.3.1.2	Resultados e discussão.....	109
6.3.2	Ensaio turbidimétrico.....	113
6.3.2.1	Método.....	113
6.3.2.2	Resultados e discussão.....	114
6.4	Análise comparativa dos métodos desenvolvidos.....	120
7	ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO	
7.1	Introdução.....	123
7.1.1	Conceitos de dissolução.....	124
7.1.2	Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução.....	125
7.1.2.1	Meio de dissolução.....	125
7.1.2.2	Aparatos de dissolução.....	126
7.1.2.3	Protocolo de estudo de dissolução.....	127
7.1.2.4	Análise dos resultados.....	128
7.2	Método.....	130
7.2.1	Determinação das condições <i>sink</i>	130
7.2.2	Determinação do perfil de dissolução.....	130
7.2.3	Avaliação da influência do filtro.....	131
7.2.4	Avaliação da estabilidade de orbifloxacino comprimidos no meio de dissolução.....	132
7.2.5	Validação do ensaio de dissolução.....	133
7.2.5.1	Seletividade.....	133
7.2.5.2	Linearidade.....	133

7.2.5.3	Precisão.....	133
7.2.5.4	Exatidão.....	133
7.2.6	Avaliação da cinética de liberação.....	134
7.2.7	Poder discriminatório do ensaio de dissolução.....	136
7.3	Resultados e discussão.....	136
7.3.1	Validação do ensaio de dissolução.....	139
7.3.1.1	Seletividade.....	139
7.3.1.2	Linearidade.....	140
7.3.1.3	Precisão.....	140
7.3.1.4	Exatidão.....	140
7.3.2	Avaliação da cinética de liberação.....	141
7.3.3	Poder discriminatório do método.....	144
8	ESTUDOS DE ESTABILIDADE	
8.1	Introdução.....	149
8.1.1	Proposta do estudo de estabilidade.....	149
8.1.2	Testes de estresse.....	150
8.1.3	Testes acelerados de estabilidade.....	150
8.1.4	Testes de longa duração de estabilidade.....	150
8.1.5	Cinética química.....	151
8.1.5.1	Reação de ordem zero.....	151
8.1.5.2	Reação de primeira ordem.....	151
8.1.5.3	Reação de segunda ordem.....	152
8.1.5.4	Determinação da ordem das reações.....	152
8.2	Métodos.....	152
8.3	Resultados e discussão.....	153
8.3.1	Avaliação das características organolépticas dos comprimidos de orbifloxacino.....	153
8.3.2	Estudos acelerados de estabilidade.....	154
8.3.2.1	Comprimidos triturados de orbifloxacino.....	154
8.3.2.2	Comprimidos íntegros de orbifloxacino.....	156
8.3.3	Estudos de longa duração de estabilidade.....	159
8.3.3.1	Comprimidos triturados de orbifloxacino.....	159
8.3.3.2	Comprimidos íntegros de orbifloxacino.....	160
9	IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE ORBIFLOXACINO	
9.1	Introdução.....	163
9.2	Métodos.....	170

9.2.1	Estudos de degradação forçada de orbifloxacino.....	170
9.2.2	Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida compatível com espectrometria de massas (LC-MS) para identificação dos produtos de degradação de orbifloxacino.....	171
9.3	Resultados e discussão.....	174
9.3.1	Validação do método por LC-MS.....	174
9.3.2	Taxa de degradação de orbifloxacino.....	179
9.3.3	Identificação dos produtos de degradação gerados pela degradação de orbifloxacino.....	181
9.3.3.1	Identificação dos produtos de degradação gerados pela hidrólise ácida....	182
9.3.3.2	Identificação dos produtos de degradação gerados pela hidrólise básica..	185
9.3.3.3	Identificação dos produtos de degradação gerados pela hidrólise neutra..	189
9.3.3.4	Identificação dos produtos de degradação gerados pela reação de oxidação.....	192
9.3.3.5	Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise neutra....	194
9.3.3.6	Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise ácida.....	199
9.3.3.7	Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise básica....	201
9.3.3.8	Identificação dos produtos de degradação gerados no estudo acelerado de estabilidade.....	202
9.3.3.9	Identificação dos produtos de degradação gerados no estudo de longa duração de estabilidade.....	203
9.3.3.10	Identificação dos produtos de degradação gerados pela degradação térmica.....	204
9.3.3.11	Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise da SQR na forma sólida.....	206
10	DISCUSSÃO GERAL.....	210
11	CONCLUSÕES.....	214
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	216

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura química de orbifloxacino.....	13
Figura 4.1	Estrutura química numerada de orbifloxacino.....	52
Figura 5.1	Pó da substância química de referência de orbifloxacino.....	56
Figura 5.2	Comprimido íntegro de orbifloxacino (Orbax®).....	57
Figura 5.3	Variações de peso de vinte comprimidos de orbifloxacino.....	59
Figura 5.4	Curvas TG/DTA de orbifloxacino SQR.....	64
Figura 5.5	Curvas TG/DTA de orbifloxacino amostra.....	64
Figura 5.6	Cromatografias em camada delgada dos sistemas de fases móveis testados descritos na seção 5.9.1.....	70
Figura 5.7	Espectro de orbifloxacino SQR na região do infravermelho.....	71
Figura 5.8	Espectro de orbifloxacino amostra na região do infravermelho.....	72
Figura 5.9	Sobreposição dos espectros de orbifloxacino SQR e amostra na região do infravermelho.....	72
Figura 5.10	Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.....	76
Figura 5.11	Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente.....	76
Figura 5.12	Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.....	76
Figura 5.13	Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando ácido acético 5% como solvente.....	77
Figura 5.14	Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente.....	77
Figura 5.15	Espectro de absorção do produto gerado pela reação de orbifloxacino SQR (50,0 µg/mL) com o reagente vermelho congo na região do visível.....	79
Figura 5.16	Reação do ferro (III) com orbifloxacino.....	79

Figura 5.17	Espectro de absorção do produto gerado pela reação de orbifloxacino SQR (40,0 µg/mL) com o reagente cloreto férrico $1 \times 10^{-3} M$ na região do visível.....	80
Figura 5.18	Sobreposição de cromatogramas de orbifloxacino SQR e amostra, nas mesmas concentrações (3,5 µg/mL), para identificação pelo método por CLAE, no comprimento de onda de 290 nm, utilizando coluna SymmetryShield RP18 Waters®, (250 x 4,6 mm, 5 µm) e ácido acético 5%: metanol (80:20, v/v) como fase móvel na vazão de 0,7 mL/min.....	81
Figura 6.1	Curva de Ringbom utilizada na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para orbifloxacino, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente no comprimento de onda de 290 nm.....	86
Figura 6.2	Curva analítica de orbifloxacino SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente a 290 nm.....	88
Figura 6.3	Comparação das curvas analíticas padrão e amostra para determinação da seletividade do método por espectrofotometria na região do UV.....	90
Figura 6.4	Cromatograma da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 3,5 µg/mL, utilizando como fase móvel ácido acético 5%: metanol (80:20, v/v).....	96
Figura 6.5	Curva analítica de orbifloxacino SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando como fase móvel ácido acético 5% e metanol (80:20, v/v).....	98
Figura 6.6	Cromatogramas típicos de: (a) hidrólise ácida; (b) hidrólise básica; (c) hidrólise neutra; (d) degradação oxidativa; (e) fotodegradação ácida; (f) fotodegradação básica; (g) fotodegradação neutra; (h) degradação térmica (pó) e (i) degradação fotolítica (pó).....	100
Figura 6.7	Delineamento 3 x 3 demonstrando a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri.....	107
Figura 6.8	Curvas analíticas de soluções de orbifloxacino SQR e amostra, nas concentrações de 16,0; 32,0 e 64,0 µg/mL, obtidas pelo ensaio de difusão em ágar.....	110
Figura 6.9	Curvas analíticas de soluções de orbifloxacino SQR e amostra, em concentrações de 8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.....	113

Figura 6.10	Curvas analíticas de soluções de orbifloxacino SQR e amostra, em concentrações de 8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.....	115
Figura 7.1	Perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos empregando aparato 2, 900 mL de meio HCl 0,01 M e velocidade de 50 rpm.....	137
Figura 7.2	Perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos empregando aparato 2, 900 mL de meio tampão acetato pH 4,5 e velocidade de 50 rpm.....	137
Figura 7.3	Perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos empregando aparato 2, 900 mL de meio tampão fosfato pH 6,8 e velocidade de 50 rpm.....	137
Figura 7.4	Perfis de dissolução de comprimidos de orbifloxacino, obtidos pelos métodos por CLAE e UV, dia 1, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.....	141
Figura 7.5	Perfis de dissolução de comprimidos de orbifloxacino, obtidos pelos métodos por CLAE e UV, dia 2, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.....	142
Figura 7.6	Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes acelerados de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por espectrofotometria na região do UV, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.....	145
Figura 7.7	Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes acelerados de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por CLAE, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.....	145
Figura 7.8	Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes de longa duração de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por espectrofotometria na região do UV, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.....	146

Figura 7.9	Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes de longa duração de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por CLAE, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.....	146
Figura 8.1	Avaliação das características organolépticas dos comprimidos triturados de orbifloxacino, submetidos às condições de estudo acelerado de estabilidade (40 °C/75% UR).....	153
Figura 8.2	Avaliação das características organolépticas dos comprimidos íntegros de orbifloxacino, submetidos às condições de estudo acelerado de estabilidade (40 °C/75% UR).....	153
Figura 8.3	Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos triturados de orbifloxacino, expostos às condições de estudo acelerado de estabilidade, analisados por CLAE, por espectrofotometria no UV e por doseamento microbiológico - difusão em ágar e turbidimétrico.....	156
Figura 8.4	Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos íntegros de orbifloxacino, expostos às condições de estudo acelerado de estabilidade, analisados por CLAE, por espectrofotometria no UV e por doseamento microbiológico - difusão em ágar e turbidimétrico.....	158
Figura 8.5	Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos triturados de orbifloxacino, expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade, analisados por CLAE e por espectrofotometria no UV.....	160
Figura 8.6	Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos íntegros de orbifloxacino, expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade, analisados por CLAE e por espectrofotometria no UV.....	161
Figura 9.1	Curva analítica de orbifloxacino SQR obtida pelo método por LC-MS.....	177
Figura 9.2	Taxa de fotodegradação de orbifloxacino em diferentes pHs.....	180
Figura 9.3	Produtos de degradação gerados na hidrólise ácida de orbifloxacino.....	183
Figura 9.4	Cromatogramas de massas de PD ₁ (modo SIM) gerados pela hidrólise ácida de orbifloxacino.....	183
Figura 9.5	Espectro de massas de PD ₁ isolado de orbifloxacino.....	184
Figura 9.6	Estrutura química sugerida para o PD ₁ de orbifloxacino.....	184
Figura 9.7	Produtos de degradação gerados na hidrólise básica de orbifloxacino.....	185

Figura 9.8	Cromatogramas de massas de PD ₂ , PD ₃ , PD ₄ e PD ₅ (modo SIM) gerados pela hidrólise básica de orbifloxacino.....	186
Figura 9.9	Espectro de massas de PD ₂ isolado de orbifloxacino.....	186
Figura 9.10	Estrutura química sugerida para o PD ₂ de orbifloxacino.....	186
Figura 9.11	Espectro de massas de PD ₃ isolado de orbifloxacino.....	187
Figura 9.12	Estrutura química sugerida para o PD ₃ de orbifloxacino.....	187
Figura 9.13	Espectro de massas de PD ₄ isolado de orbifloxacino.....	188
Figura 9.14	Estrutura química sugerida para o PD ₄ de orbifloxacino.....	188
Figura 9.15	Espectro de massas de PD ₅ isolado de orbifloxacino.....	188
Figura 9.16	Estrutura química sugerida do PD ₅ de orbifloxacino.....	189
Figura 9.17	Produtos de degradação gerados na hidrólise neutra de orbifloxacino.....	190
Figura 9.18	Cromatogramas de massas de PD ₆ (modo SIM) gerados pela hidrólise neutra de orbifloxacino.....	190
Figura 9.19	Espectro de massas de PD ₆ isolado de orbifloxacino.....	191
Figura 9.20	Estruturas químicas sugeridas para o PD ₆ de orbifloxacino.....	191
Figura 9.21	Produtos de degradação gerados pela oxidação de orbifloxacino utilizando peróxido de hidrogênio 3%.....	192
Figura 9.22	Cromatogramas de massas de PD ₂ e PD ₇ (modo SIM) gerados pela oxidação de orbifloxacino utilizando H ₂ O ₂ 3%.....	193
Figura 9.23	Espectro de massas de PD ₇ isolado de orbifloxacino.....	193
Figura 9.24	Estrutura química sugerida para o PD ₇ de orbifloxacino.....	193
Figura 9.25	Cromatograma dos produtos de degradação gerados na fotólise neutra de orbifloxacino.....	194
Figura 9.26	Cromatogramas de massas de PD ₈ , PD ₉ , PD ₁₀ e PD ₁₁ (modo SIM) gerados pela fotólise neutra de orbifloxacino.....	194
Figura 9.27	Espectro de massas de PD ₈ isolado de orbifloxacino.....	195
Figura 9.28	Estruturas químicas sugeridas para o PD ₈ de orbifloxacino.....	195
Figura 9.29	Espectro de massas de PD ₉ isolado de orbifloxacino.....	196
Figura 9.30	Estrutura química sugerida para o PD ₉ de orbifloxacino.....	197
Figura 9.31	Espectro de massas de PD ₁₀ isolado de orbifloxacino.....	197
Figura 9.32	Estrutura química sugerida para o PD ₁₀ de orbifloxacino.....	198
Figura 9.33	Espectro de massas de PD ₁₁ isolado de orbifloxacino.....	198
Figura 9.34	Estrutura química sugerida para o PD ₁₁ de orbifloxacino.....	199
Figura 9.35	Cromatograma dos produtos de degradação gerados na fotólise ácida de orbifloxacino.....	200

Figura 9.36	Cromatogramas de massas de PD ₁₀ (modo SIM) gerados pela fotólise ácida de orbifloxacino.....	200
Figura 9.37	Espectro de massas de PD ₁₀ isolado de orbifloxacino.....	200
Figura 9.38	Produtos de degradação gerados na fotólise básica de orbifloxacino.....	201
Figura 9.39	Cromatogramas de massas de PD ₈ (modo SIM) gerados pela fotólise básica de orbifloxacino.....	201
Figura 9.40	Espectro de massas de PD ₈ isolado de orbifloxacino.....	202
Figura 9.41	Produtos de degradação gerados durante estudo acelerado de estabilidade.....	203
Figura 9.42	Cromatogramas de massas de PD ₆ (modo SIM) gerados durante o estudo acelerado de estabilidade de orbifloxacino.....	203
Figura 9.43	Produtos de degradação gerados durante estudo de longa duração de estabilidade.....	204
Figura 9.44	Cromatogramas de massas de PD ₆ (modo SIM) gerados durante o estudo de longa duração de estabilidade de orbifloxacino.....	204
Figura 9.45	Produtos de degradação gerados durante estudo de degradação térmica de orbifloxacino na forma sólida.....	205
Figura 9.46	Cromatogramas de massas de PD ₆ (modo SIM) gerados pelo estudo de degradação térmica de orbifloxacino SQR na forma sólida.....	205
Figura 9.47	Cromatograma típico para orbifloxacino SQR na forma sólida irradiado por luz UV/VIS.....	206
Figura 9.48	Cromatograma de massas típico (modo SIM) para orbifloxacino SQR na forma sólida irradiado por luz UV/VIS.....	206
Figura 9.49	Rotas de fragmentação sugeridas para a molécula de orbifloxacino.....	207

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Concentrações inibitórias mínimas de orbifloxacino em isolados bacterianos e cepas-controle descritos na literatura.....	22
Tabela 3.2	Parâmetros farmacocinéticos de orbifloxacino, em diferentes espécies, encontrados na literatura.....	31
Tabela 3.3	Metabólitos encontrados em amostras de urina, em estudos farmacocinéticos de orbifloxacino, em felinos, caninos, suínos e bovinos..	34
Tabela 3.4	Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino.....	42
Tabela 5.1	Variação de peso de comprimidos segundo a FB 5 (2010).....	57
Tabela 5.2	Relação do peso individual dos comprimidos de orbifloxacino.....	58
Tabela 5.3	Dureza dos comprimidos de orbifloxacino.....	61
Tabela 5.4	Valores obtidos no teste de friabilidade.....	61
Tabela 5.5	Faixas de fusão do orbifloxacino.....	62
Tabela 5.6	Fases móveis utilizadas na CCD para caracterização de orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada em luz UVC.....	67
Tabela 5.7	Valores de R _f obtidos com os sistemas de fases móveis testados para orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada.....	69
Tabela 5.8	Bandas do espectro de orbifloxacino na região de infravermelho com as respectivas deformações.....	73
Tabela 5.9	Taxa de extração de orbifloxacino da forma farmacêutica comprimido.....	75
Tabela 5.10	Comprimento de onda e absorção de orbifloxacino em diferentes solventes.....	75
Tabela 6.1	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	84
Tabela 6.2	Valores obtidos na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para orbifloxacino SQR, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente no comprimento de onda de 290 nm.....	85
Tabela 6.3	Valores de absorvância determinados para a curva analítica de orbifloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente a 290 nm.....	87
Tabela 6.4	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de orbifloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	88

Tabela 6.5	Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV para quantificação de orbifloxacino em comprimidos.....	89
Tabela 6.6	Valores determinados pelo doseamento de orbifloxacino em comprimidos, pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	89
Tabela 6.7	Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	89
Tabela 6.8	Valores de absorvância obtidos para a determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV.....	91
Tabela 6.9	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico indicativo de estabilidade.....	94
Tabela 6.10	Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino em comprimidos pelo método cromatográfico indicativo de estabilidade.....	96
Tabela 6.11	Valores das áreas referentes ao pico de orbifloxacino SQR para construção da curva analítica, utilizando como fase móvel ácido acético 5% e metanol (80:20, v/v) a 290 nm.....	97
Tabela 6.12	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de orbifloxacino SQR, utilizando o método cromatográfico indicativo de estabilidade.....	98
Tabela 6.13	Valores determinados para o doseamento de orbifloxacino em comprimidos, pelo método cromatográfico indicativo de estabilidade.....	99
Tabela 6.14	Valores do teste de recuperação do método cromatográfico indicativo de estabilidade.....	99
Tabela 6.15	Dados do pico principal de orbifloxacino, em relação aos picos vizinhos, em diferentes estudos de degradação.....	101
Tabela 6.16	Valores de área obtidos para a determinação da robustez do método cromatográfico indicativo de estabilidade.....	102
Tabela 6.17	Parâmetros testados durante o desenvolvimento dos ensaios microbiológicos – difusão em ágar e turbidimétrico para determinação de orbifloxacino em comprimidos.....	105
Tabela 6.18	Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino em comprimidos pelo ensaio de difusão em ágar.....	106
Tabela 6.19	Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino em comprimidos pelo método turbidimétrico.....	106
Tabela 6.20	Preparo das soluções para o teste de recuperação do ensaio de difusão em ágar.....	108

Tabela 6.21	Valores dos diâmetros dos halos de inibição determinados para a construção da curva analítica de orbifloxacino, pelo ensaio de difusão em ágar.....	109
Tabela 6.22	Análise de variância dos valores de diâmetro dos halos determinados na obtenção das curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra, utilizando o ensaio de difusão em ágar.....	110
Tabela 6.23	Potências de orbifloxacino em comprimidos, obtidas pela equação de Hewitt, para o ensaio por difusão em ágar.....	111
Tabela 6.24	Valores do teste de recuperação do ensaio de difusão em ágar.....	111
Tabela 6.25	Valores de diâmetro dos halos obtidos para a determinação da robustez do ensaio de difusão em ágar.....	112
Tabela 6.26	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico.....	114
Tabela 6.27	Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de orbifloxacino, pelo método turbidimétrico.....	115
Tabela 6.28	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra, utilizando o método turbidimétrico.....	116
Tabela 6.29	Potências de orbifloxacino em comprimidos, obtidas pela equação de Hewitt, para o método turbidimétrico.....	117
Tabela 6.30	Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico.....	117
Tabela 6.31	Valores de absorvância obtidos para a determinação da robustez do método turbidimétrico.....	118
Tabela 6.32	Aplicabilidade, exatidão, precisão e seletividade dos métodos propostos..	120
Tabela 6.33	Valores obtidos na determinação do teor de orbifloxacino comprimidos utilizando os métodos propostos.....	121
Tabela 6.34	Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de orbifloxacino comprimidos pelos métodos desenvolvidos.....	121
Tabela 7.1	Condições testadas para o desenvolvimento do ensaio de dissolução de comprimidos contendo orbifloxacino.....	131
Tabela 7.2	Modelos matemáticos usados para determinar a cinética de dissolução de comprimidos contendo orbifloxacino.....	135
Tabela 7.3	Condições utilizadas para o desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução de orbifloxacino comprimidos.....	138
Tabela 7.4	Interferência dos filtros na filtração das amostras do ensaio de dissolução.....	139

Tabela 7.5	Estabilidade de orbifloxacino no meio de dissolução.....	139
Tabela 7.6	Valores obtidos no teste de precisão do ensaio de dissolução de orbifloxacino comprimidos.....	140
Tabela 7.7	Quantidade de orbifloxacino dissolvido no ensaio de dissolução (n=6), dia 1, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, pás e velocidade de rotação de 50 rpm.....	141
Tabela 7.8	Quantidade de orbifloxacino dissolvido no ensaio de dissolução (n=6), dia 2, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, pás e velocidade de rotação de 50 rpm.....	142
Tabela 7.9	Coeficientes de correlação das equações matemáticas dos modelos de cinética de dissolução.....	143
Tabela 7.10	Parâmetros calculados pelo estudo da cinética de dissolução de orbifloxacino comprimidos por espectrofotometria no UV e CLAE.....	144
Tabela 7.11	Eficiência de dissolução percentual de comprimidos de orbifloxacino nos tempos zero, três e seis meses de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade.....	147
Tabela 7.12	Análise de variância da eficiência de dissolução de comprimidos de orbifloxacino nos tempos zero, três e seis meses de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade.....	147
Tabela 8.1	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE.....	154
Tabela 8.2	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV.....	154
Tabela 8.3	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – difusão em ágar.....	155

Tabela 8.4	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – método turbidimétrico.....	155
Tabela 8.5	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE.....	157
Tabela 8.6	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV.....	157
Tabela 8.7	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – difusão em ágar.....	157
Tabela 8.8	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – método turbidimétrico.....	158
Tabela 8.9	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE.....	159
Tabela 8.10	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV.....	159

Tabela 8.11	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE.....	160
Tabela 8.12	Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV.....	161
Tabela 9.1	Condições testadas para o desenvolvimento do método por LC-MS.....	172
Tabela 9.2	Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino e seus produtos de degradação pelo método por LC-MS.....	175
Tabela 9.3	Valores das áreas referentes ao pico de orbifloxacino SQR para construção da curva analítica do método por LC-MS.....	176
Tabela 9.4	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de orbifloxacino SQR, utilizando o método por LC-MS.....	177
Tabela 9.5	Valores do teste de recuperação de orbifloxacino pelo método por LC-MS.....	178
Tabela 9.6	Percentuais obtidos nos estudos de degradação de orbifloxacino.....	179
Tabela 9.7	Dados do estudo de fotodegradação de orbifloxacino em condições ácida, básica e neutra.....	180
Tabela 9.8	Produtos de degradação de orbifloxacino isolados por LC-MS.....	182

LISTA DE ABREVIações

ε	absortividade molar
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda máximo
A	Absorvância
A	Amostra
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO/RPs	Processos de oxidação/redução avançadas (<i>advanced oxidation/reduction processes</i>)
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (<i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i>)
API	Ingrediente farmacêutico ativo (<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
API	Ionização à pressão atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>b</i>	Caminho óptico da cubeta (cm)
BCS	<i>Biopharmaceutical Classification System</i>
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BV	Balão volumétrico
<i>c</i>	Concentração molar (mol/L)
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CIPRO	Ciprofloxacino
CIPRO desetileno	Desetileno ciprofloxacino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DANO	Danofloxacino
DCI	Denominação comum internacional
DI	Difloxacino
DMF	Dimetilformamida
DPR%	Desvio padrão relativo percentual
DTA	Análise térmica diferencial (<i>Differential Thermal Analysis</i>)
EA	Estudo acelerado de estabilidade

ELD	Estudo de longa duração de estabilidade
ENO	Enoxacino
ENRO	Enrofloxacino
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
ESPAR	Esparfloxacino
F_{calc}	Valor de F calculado
Filt Q	Filtro quantitativo
FL	Deteção por fluorescência
FM	Fase móvel
FQs	Fluorquinolonas
F_{tab}	Valor de F tabelado
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (<i>Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry</i>)
GL	Graus de liberdade
HAc	Ácido acético
I	Intensidade da radiação que emerge da amostra
I_0	Intensidade da radiação monocromática incidente na amostra
IV	Infravermelho
IVIVC	Correlação <i>in vitro in vivo</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (<i>Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i>)
LD	Limite de deteção
LEVO	Levofloxacino
log P	Coeficiente de partição
LOME	Lomefloxacino
LQ	Limite de quantificação
M	Molaridade
m/z	Razão massa carga
MARBO	Marbofloxacino
MetOH	Metanol
MIR	Infravermelho médio (<i>Medium Infrared</i>)
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>); Deteção por Espectrometria de Massas
MSq	Analisador quadrupolo simples
NOR	Norfloxacino

OFLO	Ofloxacino
ORBI	Orbifloxacino
ORBI-comp.	Orbifloxacino comprimidos
ORBI-DEG.	Orbifloxacino degradado
ORBI-SQR	Orbifloxacino substância química de referência
P	Padrão
p/p	Peso por peso
PD	Produto de degradação
PD/PK	Farmacodinâmica/Farmacocinética
PDA	Detector por fotodiodo
PE	Pefloxacino
pl	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de dissociação
QM	Soma dos quadrados médios
<i>r</i>	Coefficiente de correlação ou de Pearson
R ²	Coefficiente de determinação
Rf	Índice de retenção de um composto (<i>Retention factor</i>)
RMN (NMR)	Ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
rpm	Rotação por minuto
SARA	Sarafloxacino
SIA	Análise de Injeção Sequencial (<i>Sequential-Injection Analysis</i>)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
Sol.	Solução
SPS	Espectroscopia em fase sólida (<i>Solid-Phase Spectroscopy</i>)
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
TF	Tampão fosfato
TFA	Ácido trifluoracético
TG	Termogravimetria
TIC	<i>Total Ion Current plot</i>
UR	Umidade relativa
USP	Farmacopeia americana
UV	Ultravioleta; detecção por UV
v/v	Volume em volume
VIS	Visível

RESUMO

O orbifloxacino é uma fluorquinolona antimicrobiana de terceira geração aprovada para o uso veterinário em vários países. Este antimicrobiano possui excelente farmacocinética, com biodisponibilidade oral quase completa e é utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo *Enterobacteriaceae* e espécies *Pseudomonas*-resistentes e também por microorganismos Gram-positivos e *Mycoplasma* sp. Muitos estudos têm demonstrado que o orbifloxacino é eficaz contra diversos patógenos apresentando baixa concentração inibitória mínima. A importância de se desenvolver e validar métodos analíticos para este fármaco é justificada por seu potencial terapêutico e grande emprego em terapias anti-microbianas, assim como pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos está relacionada ao desenvolvimento de cepas resistentes, como consequência da administração de doses subterapêuticas. Neste trabalho foram desenvolvidos ensaios para a análise qualitativa de orbifloxacino utilizando a espectrofotometria nas regiões do UV/VIS/IV, cromatografia líquida de alta eficiência, análise térmica, cromatografia em camada delgada e outros métodos gerais para caracterização da substância química de referência (SQR) e comprimidos de orbifloxacino. Técnicas analíticas, espectrofotométrica no UV, indicativa de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência e microbiológicas – difusão em ágar e turbidimétrica foram utilizadas para o desenvolvimento e validação dos métodos para determinação quantitativa deste fármaco na forma farmacêutica comprimido. Todos os parâmetros de validação alcançaram as exigências dos principais guias e compêndios. Os métodos desenvolvidos apresentaram diferença estatística para nível de significância de 5%. O teste de Tukey indicou diferença entre as médias dos métodos microbiológicos. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e aparato 2 a 50 rpm. O perfil de dissolução obtido foi satisfatório e a cinética de dissolução foi calculada. Estudos de estabilidade de orbifloxacino foram realizados avaliando-se a suscetibilidade deste fármaco à hidrólise ácida, alcalina e neutra, à oxidação e fotólise em soluções aquosas ácidas, básicas e neutras, além da fotólise e degradação térmica do pó da SQR. Também foram realizados estudos preliminares acelerados e de longa duração de estabilidade. Os 11 produtos de degradação majoritários de orbifloxacino foram identificados utilizando técnica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, também desenvolvida e validada neste trabalho.

Palavras-chave: orbifloxacino, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, espectrofotometria, doseamento microbiológico, dissolução, estabilidade, produtos de degradação.

ABSTRACT

Orbifloxacin, a new synthetic third-generation fluoroquinolone antimicrobial drug, was developed exclusively for use in veterinary medicine. This antimicrobial agent has an excellent pharmacokinetics with oral bioavailability almost complete and it is used in treatment of infections caused by Gram-negative bacteria, including *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*-resistant species and also by Gram-positive microorganisms and *Mycoplasma* sp. Many studies have shown that orbifloxacin is effective against many pathogens and has low minimum inhibitory concentration. Analytical methods for quantitative determination of orbifloxacin are important due to its therapeutic potential and wide use in antimicrobial therapy. Moreover, it is known that the poor quality of antibiotic product is direct related to development of resistant strains, as consequence of sub therapeutic doses administration. Thus, it is important to develop efficient analytical methods for quality control commercialized products. In this work were developed methods for qualitative analysis of orbifloxacin using UV/VIS/IR spectrophotometry, high performance liquid chromatography, thermal analysis, thin-layer chromatography and other general methods for characterization of API and tablets of orbifloxacin. Analytical methods such as UV spectrophotometry, stability-indicating high performance liquid chromatography and microbiological – agar diffusion and turbidimetry were developed and validated for quantitation of this drug in tablets. All validation parameters reached the requirements of the major guides and pharmacopoeias. The developed methods present statistical difference for a significant level of 5%. The Tukey test indicated difference between the means of microbiological methods. Dissolution test was developed and validated using phosphate buffer pH 6.8 as dissolution medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and apparatus 2 at 50 rpm. The dissolution profile was satisfactory and the dissolution kinetics was calculated. Stability studies of orbifloxacin were conducted to evaluate the susceptibility of this drug to acid, basic and neutral hydrolysis, oxidation and photolysis in acid, basic and neutral aqueous solutions, besides the photolysis and thermal degradation of API powder. Preliminary studies of accelerated stability and long-term stability were also performed. The 11 majority degradation products were identified using liquid chromatography–mass spectrometry method also developed and validated in this work.

Key-words: orbifloxacin, high performance liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry, microbiological assays, dissolution, stability, degradation products.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral e justificativa

As doenças infecciosas causadas por bactérias constituem um amplo problema dentro da medicina veterinária, afetando as espécies de companhia, de produção, esportivas e silvestres. Os danos causados por estas enfermidades são difíceis de se avaliar economicamente e, apesar de ser possível valorizar as despesas relacionadas à medicação, honorários de médico veterinário e baixa dos animais, é mais complexo avaliar as perdas por produção inadequada, má performance esportiva ou simplesmente, pela perda sentimental do dono do animal (CARRILLO, 2008).

O uso de antimicrobianos é necessário e, devido à diversidade de micro-organismos patogênicos, é importante contar com fármacos adequados. Os antimicrobianos são um dos grupos mais importantes de produtos farmacêuticos. Os fármacos da classe das fluorquinolonas são frequentemente utilizados na medicina veterinária e na medicina humana para tratamento de infecções causadas por organismos Gram-negativos e Gram-positivos, sendo rapidamente bactericidas contra uma ampla variedade de micro-organismos (IHRKE *et al.*, 1999; HAINES *et al.*, 2001; DAVIS *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2005, 2007).

Uma crescente preocupação com relação aos antimicrobianos é a elevada incidência de bactérias multirresistentes. No intuito de contornar esta situação, intensas pesquisas na área farmacêutica têm visado o desenvolvimento de agentes antimicrobianos efetivos para tratar infecções.

Whittem e Gaon (1998) relatam que em condições normais a frequência de mutação em uma população bacteriana é de 1 organismo em 1 milhão, sendo influenciada pelo uso abusivo de antibióticos e diretamente correlacionada com a concentração inibitória mínima (CIM) do fármaco em seu sítio de ação, enfatizando-se a importância das dosagens apropriadas.

O orbifloxacino é uma fluorquinolona de terceira geração desenvolvida exclusivamente para uso na medicina veterinária (MATSUMOTO *et al.*, 1998b, 1999b; IHRKE *et al.*, 1999; O'NEIL, 2006; MARÍN *et al.*, 2007, 2008; REYNOLDS, 2007; GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008).

A forma farmacêutica comprimido, contendo orbifloxacino, foi aprovada pelo US-FDA sob o registro NADA 141-081 em novembro de 1997 (FEDERAL REGISTER, 1997) e a forma farmacêutica suspensão oral, sob o registro NADA 141-305, foi aprovada em março de 2010 (FEDERAL REGISTER, 2010). Em ambas as formulações o medicamento se destina ao tratamento de infecções de pele, tecidos moles e trato urinário em cães, e infecções de pele e de tecidos moles em gatos.

No Brasil este fármaco foi liberado para comercialização, na forma farmacêutica comprimido, para tratamento de cães e gatos, em julho de 1999 para as dosagens de 22,7 mg e 68 mg e em julho de 2002 para a dosagem de 5,7 mg, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008).

No Japão, o orbifloxacino tem sido utilizado com grande sucesso, na forma farmacêutica injetável, em infecções gastrintestinais e respiratórias em bovinos e suínos e em infecções de pele em cães e gatos (MATSUMOTO *et al.*, 1998a, 1998b, 1999b).

Estudos farmacocinéticos têm revelado que o orbifloxacino apresenta boa penetração tecidual seguido à administração oral ou parenteral em diversos animais (FEDERAL REGISTER, 1997; HAINES *et al.*, 2001; MARÍN *et al.*, 2007, 2008). O orbifloxacino é lipofílico e solúvel e tem suas características definidas pelo *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) como fármaco classe I (altamente solúvel e permeável). Os fármacos da classe I podem, teoricamente, ter vantagens para absorção oral por causa da alta solubilidade e alta permeabilidade favorecendo a absorção gastrintestinal, a qual tem sido notoriamente um problema para antibióticos orais (DAVIS *et al.*, 2006).

Outra importante vantagem deste fármaco inclui sua atividade bactericida em baixas concentrações teciduais, grande volume de distribuição, baixa ligação às proteínas e boa penetração nas células fagocitárias. O orbifloxacino se acumula nos leucócitos, o que permite a ação no interior da bactéria, além de ser transportado para liberação final no local da infecção (IHRKE *et al.*, 1999; HAINES *et al.*, 2001; SCOTT *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2007, 2008).

A boa absorção com biodisponibilidade oral quase completa, excelentes propriedades farmacocinéticas e baixa toxicidade fazem do orbifloxacino o fármaco de primeira escolha para o tratamento de várias infecções bacterianas em cães e gatos (HEINEN, 2002).

Em comparação com as outras fluorquinolonas de uso veterinário, o orbifloxacino apresenta vantagens como dose diária recomendada relativamente baixa (2,5 a 7,5 mg/kg), maior concentração plasmática máxima depois de dose oral única e percentagem absorvida após a dose oral de 97 a 100% (IHRKE *et al.*, 1999).

O orbifloxacino é dificilmente metabolizado. Aparentemente, o anel 3,5-dimetilpiperazínico do orbifloxacino na posição 7 previne este fármaco de sofrer metabolização (MATSUMOTO *et al.*, 1998b, 1999b).

Muitos estudos têm demonstrado que o orbifloxacino é eficaz contra diversos patógenos apresentando baixa concentração inibitória mínima (NAKAMURA, 1995; HAINES *et al.*, 2001; GANIÈRE *et al.*, 2004; MORIOKA *et al.*, 2005; SCOTT *et al.*, 2006).

Para um tratamento adequado, métodos analíticos devem garantir a qualidade e a dosagem correta dos medicamentos contendo esta substância ativa.

Poucos métodos têm sido descritos na literatura para o orbifloxacino. Dentre as metodologias analíticas encontradas, a maioria está relacionada a ensaios para a determinação da concentração inibitória mínima e estudos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos de orbifloxacino em animais. Alguns artigos trazem metodologias de análise para este fármaco, porém a grande maioria é em fluidos biológicos (MORIMURA *et al.*, 1995a, 1995b; MORIMURA *et al.*, 1997a, 1997b; GARCÍA *et al.*, 1999; MATSUMOTO *et al.*, 1998a, 1998b; MATSUMOTO *et al.*, 1999a, 1999b; HAINES *et al.*, 2001; HEINEN, 2002; JOHNSTON *et al.*, 2002; KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; SCHNEIDER e DONOGUE, 2002, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2006; YAMADA *et al.*, 2006; HUNG *et al.*, 2007; MARÍN *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2007; CHONAN *et al.*, 2008; FUJITA *et al.*, 2008; KAJITA *et al.*, 2008; GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008; LORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2008; MARÍN *et al.*, 2008; SAITO *et al.*, 2008; TABASI *et al.*, 2008a, 2008b, 2008c; ABD EL-ATY *et al.*, 2009; ELIAS *et al.*, 2009; GEBRU *et al.*, 2009; GOUDAH *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009; SANTOKE *et al.*, 2009; IBRAHEM *et al.*, 2010; CHO *et al.*, 2010; BP, 2011b; CAZEDEY *et al.*, 2011; CAZEDEY e SALGADO, 2011; USP, 2011f).

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para identificação do teor da substância ativa, o estudo das características físicas e químicas do fármaco e os estudos de estabilidade e de dissolução são de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final.

Devido à comprovada eficácia e segurança do tratamento realizado com orbifloxacino e do conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos está relacionada ao desenvolvimento de cepas resistentes, como consequência da administração de doses subterapêuticas, fica justificada a necessidade de novas pesquisas para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, bem como a análise químico-farmacêutica e estudos de estabilidade e de dissolução para o orbifloxacino produto acabado.

A meta deste trabalho consiste em colaborar com a literatura científica internacional, através da publicação dos resultados obtidos durante a fase experimental, contribuir com órgãos governamentais (ANVISA e Farmacopeia Brasileira), bem como com a indústria farmacêutica nacional, através da qualificação de seus processos e produtos.

1.2 Desenvolvimento dos métodos

Métodos de análise são desenvolvidos normalmente baseando-se em técnicas e métodos existentes na literatura, usando a mesma instrumentação ou similares. O desenvolvimento de um método geralmente requer a seleção dos parâmetros a serem avaliados, a escolha do tipo de instrumentação a ser utilizada e a justificativa (SWARTZ e KRULL, 1997; SNYDER *et al.*, 1998).

Há várias razões válidas para o desenvolvimento de novos métodos analíticos:

- Método adequado não disponível para um analito particular em matriz específica;
- Métodos existentes apresentam erros, são propensos à contaminação ou apresentam baixa exatidão e precisão;
- Métodos existentes são caros, demandam longo tempo para execução e/ou não são facilmente automatizados;
- Métodos existentes não fornecem adequada sensibilidade ou seletividade do analito em amostras de interesse;
- Novas instrumentações e técnicas podem ser envolvidas para fornecer oportunidades de aperfeiçoar o método, incluindo melhorias na identificação do analito (limite de detecção, exatidão ou precisão);
- Necessidade de um método alternativo para confirmar, por razões legais ou científicas, dados analíticos originalmente obtidos por métodos existentes.

1.3 Validação dos métodos

Qualquer método desenvolvido pode ser influenciado por variáveis como diferentes tempos de ensaio, diferentes dias, lotes de reagentes, equipamentos, condições ambientais como temperatura, umidade entre outros. É esperado que depois que o método tenha sido desenvolvido e antes que ele seja divulgado ou transferido de um laboratório para outro, ele seja corretamente validado e o resultado dos testes de validação relatados.

A validação é um processo de estabelecimento de dados documentados, os quais corroboram com alto grau de garantia que uma atividade específica consistentemente produz um resultado ou produto desejado, encontrando suas especificações e características de qualidade predeterminadas (ICH, 2005; FDA, 2011). A validação de método analítico é o processo que demonstra que o método é adequado ao uso pretendido e que ele garante a identidade, qualidade, pureza e potência do fármaco e produto farmacêutico. De uma maneira simples, a validação de um método é o processo no qual se prova que um método analítico é aceitável para sua proposta pretendida.

Para a validação de métodos analíticos, guias da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 899 (BRASIL, 2003a), ICH - *International Conference Harmonization* (ICH, 2005) e USP (USP, 2011e) fornecem diretrizes para a realização de tais validações de uma maneira eficiente e produtiva.

1.4 Estudos de dissolução

Embora a dissolução intrínseca da substância ativa seja importante no desenvolvimento de formulações farmacêuticas orais sólidas, o perfil de dissolução da forma farmacêutica fornece informações importantes para garantir a qualidade do produto farmacêutico. Assim, o teste de dissolução tem sido estabelecido como valiosa ferramenta para monitorar o desenvolvimento de novas formulações, a consistência lote-a-lote, e para indicar mudanças ocorridas no produto, tais como mudanças no processo de fabricação, degradações etc.

A utilidade primária do teste de dissolução é, portanto, o estabelecimento das especificações da dissolução dos produtos farmacêuticos para a garantia de qualidade.

Além disto, a absorção das formas farmacêuticas depende da liberação adequada da substância ativa do produto. Fatores físico-químicos, como dissolução ou solubilidade do fármaco em condições fisiológicas e sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal, desempenham um papel fundamental a este respeito. Devido à natureza crítica destes fatores, a dissolução de um produto farmacêutico *in vitro*, em certos casos, pode ser relevante para prever as características/resultados *in vivo*.

Em resumo, os ensaios de dissolução são executados:

- Como parte essencial do desenvolvimento do produto farmacêutico;
- Em apoio para a substituição de testes de bioequivalência;
- Para obter informações dos lotes-teste usados em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência e estudos clínicos essenciais para auxiliar as especificações para o controle de qualidade;
- Para demonstrar a uniformidade lote-a-lote durante a fabricação e para indicar problemas potenciais de biodisponibilidade, ou seja, como ferramenta de controle de qualidade.

1.5 Estudos de estabilidade

A importância e significância de um programa de testes de estabilidade bem organizado para a avaliação da estabilidade química e física da substância química de referência (SQR) e da forma farmacêutica não pode ser subestimada. Estudos de estabilidade são indicativos de atributos dos produtos farmacêuticos que são suscetíveis

a mudanças durante a estocagem ou decorrentes de interações entre os excipientes e a substância ativa, os quais, provavelmente, influenciam a qualidade, segurança e eficácia do produto. Testes de estresse têm como objetivo provar a qualidade do fármaco ou produto farmacêutico com o tempo sob a influência de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz e permitem recomendar apropriadas condições de estocagem, períodos de reteste e estabelecer o prazo de validade. Em adição, permitem estabelecer possíveis caminhos de degradação.

O teste de estresse é uma importante ferramenta para prever problemas relacionados à estabilidade. Os resultados do teste de estresse podem ser úteis em diversas áreas da pesquisa e desenvolvimento farmacêutico além das áreas analítica, de formulação e de embalagens. Estudos de estabilidade bem projetados podem levar ao entendimento das características de estabilidade intrínseca da molécula do fármaco. Para tanto, uma abordagem química guiada para o estudo de estresse é defendida, na qual as estruturas dos maiores produtos de degradação são determinadas e os caminhos de degradação são propostos e testados.

O desenvolvimento de um protocolo científico para estudos de estabilidade requer o entendimento das condições sob as quais o fármaco se degrada, bem como do mecanismo de degradação (repartição/fragmentação). Isto é estabelecido através de uma série de estudos de estresse propostos para elucidar a estabilidade intrínseca de novas moléculas por estabelecimento dos seus caminhos de degradação (RHODES, 2000). Os resultados destes estudos são a base para o apropriado desenvolvimento de formas farmacêuticas, formulações e processos de fabricação, selecionando as condições adequadas de embalagem e estocagem e os métodos analíticos a serem utilizados nos estudos de estabilidade (MATTHEWS, 2000).

1.5.1 Requerimentos para os testes de estresse

O guia da ICH, o guia para realização de estudos de estabilidade da ANVISA e o guia da WHO (*World Health Organization*), requerem que os testes de estresse sejam conduzidos para elucidar as características de estabilidade inerentes da substância ativa (ICH, 2003; BRASIL, 2005; WHO, 2009). Estes guias indicam a necessidade de identificação dos produtos de degradação formados sob variadas condições e o estabelecimento dos caminhos de degradação. Eles sugerem que os testes devem abranger o efeito da temperatura, umidade, oxidação, fotólise e suscetibilidade à hidrólise numa ampla faixa de valores de pH. Nestes guias, é sugerido ainda, que o efeito da temperatura seja estudado em incrementos de 10 °C acima da condição de temperatura do teste acelerado de estabilidade (por exemplo, 50 °C, 60 °C) e umidade relativa de 75% ou mais. O comitê europeu de especialidades farmacêuticas (CPMP –

Committee for Proprietary Medicinal Products) recomenda que o teste de estresse deve ser feito quando não há dados disponíveis na literatura científica ou em farmacopeias oficiais (CPMP, 1998).

Além dos guias, muitas abordagens direcionadas à conduta prática dos estudos de estresse podem ser encontradas na literatura (FDA, 1998, 2008; ALSANTE *et al.*, 2001; WINGER e KEMP, 2001; BAKSHI e SINGH, 2002; ROY, 2002; AHUJA e ALSANTE, 2003; ALSANTE *et al.*, 2007; ARGENTINE *et al.*, 2007; AHUJA, 2007; BRETNALL e CLARKE, 2011; SINGH *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade de orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido.

2.2 Objetivos específicos

Realizar análise qualitativa de orbifloxacino SQR e comprimidos pelos métodos tradicionais de controle de qualidade: características organolépticas, peso médio, desintegração, resistência mecânica – dureza e friabilidade, faixa de fusão, análise térmica, umidade e cromatografia em camada delgada.

Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta, visível e infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência, para identificação de orbifloxacino.

Desenvolver e validar método analítico para a determinação quantitativa de orbifloxacino, na forma farmacêutica comprimido, empregando a espectrofotometria na região do UV.

Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade para a determinação quantitativa de orbifloxacino, na forma farmacêutica comprimido, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.

Desenvolver e validar método analítico para a determinação quantitativa de orbifloxacino, na forma farmacêutica comprimido, empregando o ensaio microbiológico por difusão em ágar.

Desenvolver e validar método analítico para a determinação quantitativa de orbifloxacino, na forma farmacêutica comprimido, empregando o ensaio microbiológico por turbidimetria.

Comparar estatisticamente os métodos propostos para a análise quantitativa de orbifloxacino.

Desenvolver e validar ensaio de dissolução para comprimidos contendo orbifloxacino.

Verificar a estabilidade intrínseca do fármaco, frente às condições de degradação - estudos de degradação forçada e estudos acelerado e de longa duração de estabilidade.

Identificar os produtos de degradação de orbifloxacino utilizando método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) desenvolvido e validado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Introdução

É importante que o regime terapêutico seja designado de modo a maximizar a eficácia e minimizar o risco de desenvolvimento de resistência a patógenos (IBRAHEM *et al.*, 2010).

As fluorquinolonas (FQs) tornaram-se uma classe dominante de agentes antimicrobianos na última década. Nenhuma outra classe de antimicrobianos tem crescido tão rapidamente (COX, 2007). Este grande grupo de agentes sintéticos tem despertado extensivo interesse e rápida aceitação na medicina humana e veterinária (IHRKE *et al.*, 1999). As FQs têm revolucionado tratamentos contra bactérias patogênicas resistentes aos agentes antimicrobianos tradicionais (WALKER, 2000).

Como classe, as FQs têm demonstrado eficácia clínica no tratamento de infecções bacterianas invasivas e sistêmicas como infecções de pele, tecidos moles, cavidade oral, trato urinário, próstata, ouvido médio, interno e externo, trato respiratório superior e inferior e ossos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (DUAN e YUAN, 2001; PAPICH e RIVIERE, 2001). Adicionalmente, as FQs são excelentes antimicrobianos contra bactérias multirresistentes (tais como *Pseudomonas aeruginosa*) devido ao seu amplo espectro de atividade contra ambas as bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando ainda boa penetração tecidual, longa meia-vida, grande volume de distribuição, quase completa biodisponibilidade sistêmica depois de administração pelas vias parenteral e gastrintestinal, baixa percentagem de ligação às proteínas plasmáticas e baixa toxicidade (HAINES *et al.*, 2001; MCKAY *et al.*, 2007; ABO-EL-SOUD e GOUDAH, 2009).

Existem numerosas novas FQs e as modificações estruturais têm permitido a esta classe ter um extraordinário espectro de atividade. As mais recentes FQs exibem propriedades farmacocinéticas melhoradas, tais como maior tempo de meia-vida, mais altos níveis de concentração e aumento no volume de distribuição, quando comparadas com os compostos mais antigos (COX, 2007). Albarellós e Landoni (2009) também afirmam que este grupo de antimicrobianos tem se tornado popular recentemente e possuem importantes vantagens, tais como, efeito bactericida contra uma grande faixa de importantes patógenos veterinários – apresentam ação contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, algumas espécies de *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*) e algumas bactérias Gram-positivas tais como *Staphylococcus* spp., *Chlamydia*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma* spp.

A absorção oral das FQs é quase completa na maioria das espécies estudadas e não é afetada pela presença de alimento, embora a absorção possa ser retardada neste

caso. A absorção destes fármacos após administração parenteral é rápida e também quase completa. As FQs são amplamente distribuídas para muitas áreas do corpo e atingem concentrações que são, no mínimo, tão altas quanto às encontradas no plasma em uma ampla gama de tecidos, com exceção do sistema nervoso central (SNC) e olhos. Estes antimicrobianos rapidamente se acumulam nos macrófagos e neutrófilos, mas ao contrário de outros fármacos que se concentram em locais subcelulares, dentro das células fagocíticas, as quinolonas são distribuídas dentro do citoplasma onde podem alcançar patógenos intracelulares. Esta acumulação nos leucócitos pode explicar a mais alta concentração das FQs nos tecidos infectados comparados com tecidos saudáveis (ALBARELLOS e LANDONI, 2009).

As FQs são bactericidas e impedem a replicação e transcrição do DNA bacteriano, uma vez que são inibidoras das enzimas DNA-girase bacteriana (topoisomerase II) e topoisomerase IV (DAVIS *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2006; MCKAY *et al.*, 2007; ALBARELLOS e LANDONI, 2009).

As principais rotas de excreção das FQs são a via renal, pela filtração glomerular e secreção tubular, e o metabolismo hepático. As reações metabólicas e os produtos formados (os quais podem ser metabólitos ativos ou inativos) variam entre os compostos. (MARTINEZ *et al.*, 2006; COX, 2007; ALBARELLOS e LANDONI, 2009).

A toxicidade das FQs é dose e espécie dependentes. A maioria das reações é considerada menor e reversível após a descontinuação do tratamento. Na medicina humana há relatos de fotossensibilidade, neurotoxicidade e cristalúria e muitas destas reações tóxicas também têm sido relatadas em cães e gatos. Toxicidades adicionais incluem distúrbios gástricos (por exemplo, náusea, vômito e diarreia) e artropatias em animais jovens, especialmente cães. Toxicidade ocular tem sido relatada em gatos e algumas FQs podem produzir cegueira por degeneração difusa da retina. Estas degenerações parecem estar relacionadas com altas doses e foram descritas particularmente para enrofloxacino (>5 mg/kg em 24 h) (GELATT *et al.*, 2001; GRAHN *et al.*, 2002; WIEBE e HAMILTON, 2002; FORD *et al.*, 2007). Outras quinolonas, como ácido nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino e orbifloxacino, também podem induzir cegueira quando administradas em altas doses (ALBARELLOS e LANDONI, 2009).

Com o aumento da utilização de FQs, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, o surgimento de resistência bacteriana é uma preocupação (LINDER *et al.*, 2005; HARIHARAN *et al.*, 2006; AUTHIER *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2007, RUBIN *et al.*, 2008), embora seja difícil estimar a quantidade de tempo que deve transcorrer antes do aparecimento da resistência (MCKAY *et al.*, 2007). A resistência às FQs ocorre, frequentemente, devido ao ponto de mutação na enzima DNA-girase (*gyrA* e *gyrB*) e

topoisomerase IV (parC e parE). A resistência mediada por plasmídios e sistema de efluxo têm sido relatadas como mecanismos de resistência alternativos (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998; IHRKE *et al.*, 1999; BOOTHE *et al.*, 2006; RUBIN *et al.*, 2008).

De acordo com Ihrke e colaboradores (1999), as FQs disponíveis compartilham a mesma estrutura quinolônica, entretanto várias substituições químicas e de grupos laterais geram diferentes características físicas para cada fármaco. Estas diferenças podem gerar variações na lipofilicidade e farmacocinética, mas não muda o espectro antimicrobiano apreciavelmente.

Nos anos 1980, a adição da molécula de flúor na posição 6 da estrutura quinolônica básica e a substituição do anel piperazínico na posição 7 foram cruciais para a melhora da atividade antimicrobiana das quinolonas, ganhando eficácia contra micro-organismos como *Pseudomonas aeruginosa* e cocos Gram-positivos e aumentando a extensão da absorção oral destes fármacos e distribuição nos tecidos (BALL, 2000).

Em geral, as FQs são moléculas anfotéricas com estrutura química eletricamente neutra (*zwitteriônica*), mas que possuem cargas opostas em diferentes átomos. Estes fármacos contêm dois grupos ionizáveis. O valor de pK_{a1} , mais baixo, é associado ao grupamento ácido carboxílico, enquanto o segundo, pK_{a2} , é atribuído à amina terciária básica. Quando os valores de pH são mais baixos que o pK_{a1} , as quinolonas apresentam carga positiva. Estes valores de pKa mais baixos determinam a faixa de pH dentro da qual o fármaco é solúvel nos fluidos aquosos. Isto é particularmente importante para a dissolução de suspensões e comprimidos. Em valores de pH entre pK_{a1} e pK_{a2} , estes *zwitterions* apresentam a carga neutra. Conseqüentemente, eles podem se difundir livremente através das membranas biológicas, mas exibem pobre solubilidade nos fluidos aquosos. Nos valores de pH acima de pK_{a2} , as quinolonas mostram carga negativa (MARTINEZ *et al.*, 2006).

A primeira FQ aprovada para uso na medicina clínica foi o norfloxacin, no início dos anos 1980, seguida logo depois pelo ciprofloxacino no meio desta mesma década. Para uso em animais, a primeira FQ autorizada, enrofloxacin, foi aprovada no final dos anos 1980. Desde então, cinco outras FQs (danofloxacin, orbifloxacin, difloxacin, sarafloxacin e marbofloxacino) têm sido comercializadas para uso em animais nos Estados Unidos (EUA), com outras atualmente sob investigação (SÁRKÖZY, 2001; BOOTHE *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2006).

Globalmente, as FQs aprovadas para uso na medicina veterinária em pequenos animais incluem enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin e marbofloxacino. Danofloxacin, enrofloxacin e sarafloxacin são aprovados para pecuária

e avicultura. FQs rotuladas para uso humano com potencial interesse veterinário incluem ciprofloxacino, enoxacino, lomefloxacino e ofloxacino.

FQs, tais como orbifloxacino e enrofloxacino, são geralmente reservadas para tratamento de pioderma crônico e recorrente e infecções de ouvido causadas por *Pseudomonas* ou onde o pioderma tem sido recorrente à adequada primeira linha de antimicrobianos (IHRKE *et al.*, 1999).

O orbifloxacino, único análogo do esparfloxacino, foi sintetizado no Japão em 1987 pela indústria farmacêutica *Dainippon Pharmaceutical* e foi desenvolvido como quimioterápico veterinário para uso em pecuária e em animais domésticos (KUMAZAWA e YAGISAWA, 2002). O orbifloxacino pertence à terceira geração de FQs, as quais exibem melhor atividade antimicrobiana contra Enterobacteriaceae, bactérias Gram-negativas (tais como *P. aeruginosa*), bactérias Gram-positivas, anaeróbios e micobactérias (IHRKE *et al.*, 1999; PAPICH e RIVIERE, 2001; GARNIÈRE *et al.*, 2004; MCKAY *et al.*, 2007). A terceira geração destes compostos também exhibe excelente biodisponibilidade oral e foram associadas com prolongada meia-vida de eliminação (melhor distribuição sistêmica). Estas FQs apresentam menor toxicidade no sistema nervoso central e exibem menor interação com o sistema citocromo P450 (CYP 450) (BALL, 2000).

Comparado com o enrofloxacino, o orbifloxacino apresenta a vantagem de absorção rápida e completa no trato gastrointestinal de cães e gatos (CHO *et al.*, 2007). Davis e colaboradores (2006), baseados no trabalho de Amidon *et al.* (1995) e Martinez *et al.* (2002), afirmaram que o orbifloxacino é lipofílico e solúvel e tem suas características definidas pelo *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) como fármaco Classe I (altamente solúvel, altamente permeável). Fármacos da Classe I, teoricamente, podem ter vantagens para absorção oral em cavalos, cães, gatos e outras espécies, uma vez que a alta solubilidade faz o fármaco passível de composições em formulações aquosas e alcança boa dissolução no trato gastrointestinal dos animais. Além disto, a alta permeabilidade favorece a absorção gastrointestinal, a qual tem sido notoriamente um problema para antimicrobianos orais (HEINEN, 2000, 2002; DAVIS *et al.*, 2006).

O orbifloxacino (Figura 3.1) (ácido 1-ciclopropil-5,6,8-trifluór-1,4-dihidro-7-(*cis*-3,5-dimetil-1-piperazinil)-4-oxoquinolino-3-carboxílico) foi desenvolvido exclusivamente para o tratamento de infecções gastrointestinais e respiratórias em animais (NAKAMURA, 1995; MATSUMOTO *et al.*, 1998b; IHRKE *et al.*, 1999; MATSUMOTO *et al.*, 1999b; MARTINEZ *et al.*, 2006; O'NEIL, 2006; MARÍN *et al.*, 2007, 2008; REYNOLDS, 2007; GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008). Este fármaco apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{20}F_3N_3O_3$, CAS 113617-63-3 e massa molecular igual a 395,38 g/mol (O'NEIL, 2006; BP, 2011b; USP, 2011f).

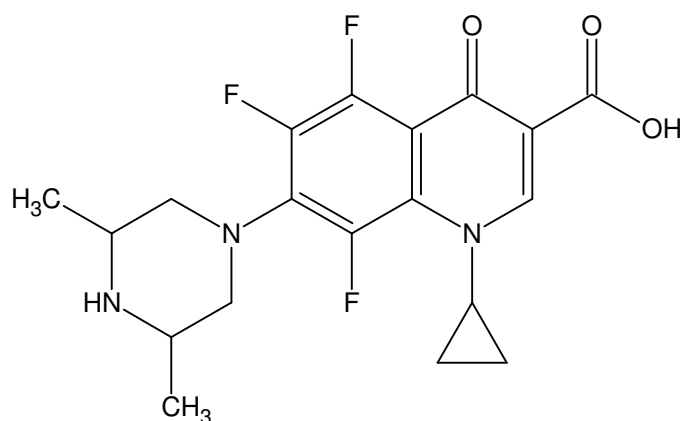


Figura 3.1. Estrutura química de orbifloxacino.

De acordo com o The Index Merck, o orbifloxacino é um pó cristalino levemente amarelado, livremente solúvel em água, solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol, éter, acetato de etila e clorofórmio (O'NEIL, 2006). Segundo a Farmacopeia Britânica, o orbifloxacino apresenta-se como cristais ou pó cristalino branco a amarelo pálido, muito pouco solúvel em água, solúvel em ácido acético glacial e praticamente insolúvel em etanol anidro (BP, 2011b).

Este fármaco apresenta duas constantes de dissociação (pKa's), 5,60 e 8,90, relacionadas ao grupo 3-carboxílico e ao grupo 7-dimetilpiperazinil, respectivamente (MORIMURA *et al.*, 1995a, 1995b; O'NEIL, 2006). Entretanto, outros valores de pKa's foram encontrados na literatura para esta fluoroquinolona. Como relatado por Tabasi e colaboradores (2008a), o orbifloxacino demonstra os valores 5,95 e 9,01 como pKa₁ e pKa₂, respectivamente. De acordo com Llinàs e colaboradores (2008), o orbifloxacino apresenta os valores 5,903 e 8,822 como pKa's. O coeficiente de partição deste fármaco é 3,5. O orbifloxacino entra em fusão na faixa de 259 a 260 °C (O'NEIL, 2006).

O orbifloxacino é rotulado nos EUA para o tratamento de infecções de pele, tecidos moles e trato urinário em cães e infecções de pele e tecidos moles em gatos (DAVIS *et al.*, 2006). A primeira forma farmacêutica de orbifloxacino aprovado neste país foi comprimido, com o nome comercial ORBAX[®], da Schering-Plough (NADA 141-081) (FEDERAL REGISTER, 1997; MCKAY *et al.*, 2007). Mais recentemente, em março de 2010, o FDA aprovou orbifloxacino em suspensão oral com o mesmo nome comercial (NADA 141-305) (FEDERAL REGISTER, 2010). Nos EUA, o orbifloxacino não é aprovado para uso em animais que se destinam à alimentação humana, entretanto, Nakamura (1995) afirma que as FQs são eficientes e seguras em animais e desaparecem dos tecidos comestíveis depois de apropriado tempo de retirada do fármaco.

No Brasil este fármaco foi liberado para comercialização, na forma farmacêutica comprimido para tratamento de cães e gatos, em 08 de julho de 1999 para as dosagens

22,7 mg e 68 mg e em 07 de julho de 2002 para a dosagem de 5,7 mg, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008).

No Japão, segundo Nakamura (1995) e Matsumoto e colaboradores (1998a, 1998b, 1999b), o orbifloxacino é administrado intramuscularmente (Victas[®] Injeção 5% - *Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd*, Osaka, Japão) para o tratamento de infecções no trato gastrointestinal e respiratório de bovinos e suínos e em infecções de pele em cães e gatos, mas não é autorizado para o tratamento de doenças aviárias. Como afirmado por Engberg e colaboradores (2001), no Japão, o orbifloxacino foi licenciado para uso em bovinos e suínos desde 1993.

O orbifloxacino e outras FQs não são aprovados para uso em cavalos, entretanto, apesar disto, o uso extra-rotulado (*off-label*) destes fármacos é comum na prática equina, como descrito por Haines e colaboradores em 2001.

3.2 Aplicações clínicas

A atividade *in vitro* e a eficácia clínica de orbifloxacino contra infecções bacterianas que ocorrem naturalmente na pele, ouvido, tecidos moles, úbere, sistemas gastrointestinal e respiratório em diferentes animais foram avaliadas por diferentes pesquisadores (NAKAMURA, 1995; KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; GANIÈRE *et al.*, 2004; DAVIS *et al.*, 2006; SCOTT *et al.*, 2006; FUJII *et al.*, 2007; MARÍN *et al.*, 2007; MCKAY *et al.*, 2007; MARÍN *et al.*, 2008; GOUDAH *et al.*, 2009; IBRAHEM *et al.*, 2010).

As doenças de pele estão entre as mais importantes e, frequentemente, apresentam condições na prática veterinária em animais de companhia (SCOTT *et al.*, 2001). A espécie bacteriana predominante, isolada de pele canina normal e lesionada, associada com infecções de pele e tecidos moles em cães, é o *Staphylococcus intermedius* (BERG *et al.*, 1984; COX *et al.*, 1984; LLOYD *et al.*, 1991; TAMURA *et al.*, 1993; YURI *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 2006). Infecções secundárias em lesões de pele com *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. e *E. coli* também são comuns (IHRKE, 1984).

O sucesso do tratamento das infecções caninas de pele e ouvido, causadas por *S. intermedius*, requer o uso de um antimicrobiano apropriado, que seja preferencialmente bactericida, apresente boa penetração cutânea e capacidade de acumulação nos leucócitos. Estas características foram previamente demonstradas para o orbifloxacino em cães e a sua farmacocinética também foi estabelecida (MATSUMOTO *et al.*, 1997; IHRKE *et al.*, 1999; HEINEN, 2002; KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; GEBRU *et al.*, 2009).

A piodermite situa-se entre as dermatopatias mais frequentemente observadas na clínica de pequenos animais, principalmente na espécie canina. As vantagens oferecidas pelas FQs no gerenciamento de pioderma canina incluem dose única diária, excelente

penetração tecidual, atividade contra ambos *S. intermedius* e múltiplos invasores Gram-negativos secundários e raridade de resistência (IHRKE *et al.*, 1999).

Outro problema dermatológico comum com múltiplas causas é a otite canina externa. As causas primárias comuns incluem distúrbios de hipersensibilidade (por exemplo, reação adversa ao alimento ou dermatite atópica), ectoparasitas, corpos estranhos e distúrbios de queratinização (ROSSER, 2004). A otite externa é frequentemente complicada por infecções secundárias com organismos bacterianos ou fúngicos que perpetuam a otite uma vez que a inflamação tenha sido estabelecida (MCKAY *et al.*, 2007).

O orbifloxacino pode ser eficientemente usado no tratamento de infecções dérmicas. Em ensaio clínico de campo, 88% de 56 cães com infecções dérmicas bacterianas (feridas e abscessos) foram clinicamente curados dentro de 11 dias com múltiplas doses diárias; 43% destes cães foram considerados completamente curados dentro de 5 dias. Neste ensaio, 95% dos patógenos isolados (incluindo *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas* spp, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* grupo G β -hemolítico, *Enterobacter* spp, e *Enterococcus* spp) foram eliminados depois de 5 a 10 dias de terapia com orbifloxacino (FEDERAL REGISTER, 1997). Outro tratamento bem sucedido usando orbifloxacino em infecções dérmicas bacterianas em cães e gatos foi descrito por Fujii e colaboradores (2007). Estes pesquisadores descreveram um estudo feito com 56 cães que apresentavam sinais de doenças dérmicas incluindo eritema, exsudato, pústula(s) e/ou inchaço e os quais foram diagnosticados como apresentando uma infecção de pele/tecidos moles (pioderma superficial, pioderma profundo, abscessos ou feridas). O orbifloxacino foi administrado oralmente, uma vez ao dia, na dosagem de 5 mg/kg de peso corpóreo. Após 7 dias de tratamento, 44,4% dos casos tratados com este fármaco foram considerados um sucesso clínico. No ponto de avaliação final no 14º dia, 73,3% dos casos tratados com orbifloxacino demonstraram êxito.

Scott e colaboradores (2006) também estudaram a eficácia de comprimidos de orbifloxacino para o tratamento de pioderma superficial e profundo devido à infecção por *S. intermedius* em 23 cães. A resposta à terapia foi excelente em 95,6% (22) dos animais. A duração da terapia variou de 21 a 40 dias (média de 29 dias) para cães apresentando somente infecções superficiais, e de 25 a 150 dias (média de 72 dias) para cães apresentando infecções profundas. *S. intermedius* foi isolado na cultura dos 23 cães e todos os isolados foram suscetíveis ao orbifloxacino *in vitro*.

Kay-Mugford e colaboradores (2002) afirmaram que a acumulação de orbifloxacino na pele doente pode contribuir para a eficácia deste composto para o tratamento de infecções dérmicas bacterianas.

Apesar de orbifloxacino ser aprovado somente para uso em doenças de cães e gatos, este fármaco tem sido utilizado para outros animais. Marín e colaboradores (2007) afirmam que orbifloxacino poderia ser útil no tratamento de infecções sistêmicas severas e aquelas afetando o úbere de cabras após avaliação específica da suscetibilidade dos micro-organismos. Na Europa, o problema de mastite é altamente relevante, não somente pelas perdas econômicas dos produtores, mas também pela produção higiênica e segura dos produtos lácteos destinados ao consumo humano, principalmente com relação à qualidade bacteriológica. Infecções intramamárias em cabras leiteiras são, principalmente, de origem bacteriana (MARÍN *et al.*, 2007).

Goudah e colaboradores (2009) também declararam que orbifloxacino pode ser eficaz contra patógenos suscetíveis à mastite em ovelhas após administração parenteral. Adicionalmente, este fármaco pode ser útil no tratamento de infecções urinárias sistêmicas em ovelhas após avaliação específica dos micro-organismos sensíveis.

Recentemente, Ibrahem e colaboradores (2010) provaram que orbifloxacino é seguro quando aplicado em água para o tratamento de edwardsiellose causada por *Edwardsiella tarda* em peixe-gato (bagre africano). De acordo com os autores, os resíduos de orbifloxacino nos músculos dos peixes diminuíram gradualmente após a interrupção do tratamento e desapareceram em 10 dias após o tratamento.

3.3 Farmacodinâmica do orbifloxacino

A relação entre a farmacocinética (PK) e a atividade microbiológica (farmacodinâmica - PD) das FQs pode ser usada para ajudar a determinar a dose necessária para alcançar os resultados clínicos desejados. A partir de uma perspectiva farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD), FQs são associadas com a dose letal concentração-dependente (ZHANEL e NOREDDIN, 2001).

A atividade *in vivo* de um agente antimicrobiano, bem como a capacidade do fármaco de se transferir do sangue para os tecidos, é dependente da concentração livre do fármaco. Portanto, quando usando os princípios de farmacocinética e farmacodinâmica para avaliar uma dose de FQ apropriada, é essencial que avaliações sejam feitas com base na concentração livre do fármaco ao invés da concentração total deste (CRAIG e EBERT, 1989; BERGOGNE-BEREZIN, 2002; DRUSANO, 2002). A este respeito, é também importante notar que os valores da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* são determinadas com base nas concentrações do fármaco livre.

A CIM de orbifloxacino tem sido determinada em vários diferentes patógenos e alguns resultados são mostrados na Tabela 3.1.

Em 2000, Riddle e colaboradores procuraram determinar se as CIMs encontradas usando ciprofloxacino forneciam uma alternativa aceitável para as três FQs usadas na medicina veterinária: enrofloxacino, marbofloxacino e orbifloxacino. Os pesquisadores escolheram quatro cepas representativas de controle de qualidade (CQ): *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Estes autores também estudaram 10 isolados clínicos de *P. aeruginosa* e testaram a CIM de cada um dos quatro antimicrobianos. As CIMs encontradas para orbifloxacino são mostradas na Tabela 3.1.

No ano seguinte, Shryock (2001), membro do subcomitê CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* antigo *National Committee on Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) *Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI VAST), enviou uma carta ao *Journal of Clinical Microbiology* em resposta ao artigo escrito por Riddle e colaboradores (2000), na qual afirmou que o CLSI aprovou os valores das CIMs de controle de qualidade para FQs comparadas com o ciprofloxacino. As faixas de CIM para orbifloxacino foram 0,25-2 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 1-8 µg/mL para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 2-16 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e 0,016-0,12 µg/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922.

Boothe e colaboradores (2006) estudaram 246 isolados (180 bactérias Gram-negativas e 66 bactérias Gram-positivas) representando 31 organismos contra 5 FQs, enrofloxacino, orbifloxacino, difloxacino, marbofloxacino e ciprofloxacino. Estes autores determinaram a CIM em patógenos veterinários selecionados e encontraram para orbifloxacino: CIM_{*Proteus mirabilis*} = 0,72 µg/mL (n = 15), CIM₅₀[§] = 1,0 µg/mL e CIM₉₀^{**} = 8,0 µg/mL; CIM_{*P. aeruginosa*} = 1,30 µg/mL (n = 34), CIM₅₀ = 2,0 µg/mL e CIM₉₀ = 16,0 µg/mL; CIM_{*E. coli*} = 0,66 µg/mL (n = 29), CIM₅₀ = 0,125 µg/mL e CIM₉₀ ≥ 64 µg/mL; CIM_{*Staphylococcus spp*} = 0,72 µg/mL (n = 15), CIM₅₀ = 1,0 µg/mL e CIM₉₀ = dado não disponível; CIM_{*S. intermedius*} = 0,87 µg/mL (n = 15), CIM₅₀ = 0,5 µg/mL e CIM₉₀ = 2,0 µg/mL e CIM_{*Streptococcus*} = 0,50 µg/mL (n = 10), CIM₅₀ = 0,25 µg/mL e CIM₉₀ ≥ 64 µg/mL. Para isolados Gram-negativos, 22% foram resistentes ao orbifloxacino e para isolados Gram-positivos, 16% foram resistentes a este fármaco. As bactérias Gram-negativas mais frequentemente encontradas (média ± desvio padrão da percentagem de FQs resistentes) foram *E. coli* (n = 61; 39 ± 5%), *P. aeruginosa* (n = 58; 16 ± 3%) e *P. mirabilis* (n = 28; 10 ± 7%), e dentre os organismos Gram-positivos foram: *Streptococcus spp.* (n = 20; 17 ± 10%), *S. intermedius* (n = 19; 6 ± 5%) e *Staphylococcus spp.* (n = 7; 24 ± 13%).

[§]CIM₅₀: concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% das cepas estudadas

^{**}CIM₉₀: concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% das cepas estudadas

Estudo similar foi realizado por Gottlieb e colaboradores em 2008. As mesmas cinco FQs (enrofloxacino, orbifloxacino, difloxacino, marbofloxacino e ciprofloxacino) foram analisadas contra isolados caninos (n = 59) e felinos (n = 17) de *E. coli* e isolados caninos (n = 21) de *S. intermedius*. Diferentemente do estudo conduzido por Boothe e colaboradores (2006), neste trabalho todos os isolados felinos de *E. coli* e isolados caninos de *S. intermedius* foram suscetíveis a todas as FQs. Seis dos 32 isolados caninos de *E. coli* coletados entre outubro de 2004 e junho de 2005 foram resistentes a todas as FQs (GOTTLIEB *et al.*, 2008). Os dados de CIM para estas cepas contra orbifloxacino foram apresentadas em forma de figura e os exatos valores numéricos não puderam ser coletados.

A CIM de orbifloxacino também foi determinada por Gebru e colaboradores (2009) em caldo Mueller-Hinton e soro livre de fármaco contra isolados clínicos de cães e cepas padrão (ATCC), de acordo com o método padrão de microdiluição em caldo (CLSI, 2006). Nenhuma diferença foi observada entre os dois meios (caldo e soro). Quatro isolados de origem canina (*S. intermedius*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. mirabilis*) foram usados. Os microorganismos de controle de qualidade incluídos em cada determinação da CIM foram *E. coli* ATCC 25922/KCCM 11234 e *S. aureus* ATCC 29213. A CIM para orbifloxacino para ambas as cepas de *E. coli* foi 0,06 µg/mL. Os isolados de *S. aureus* e *S. intermedius* tiveram ambos os valores de CIM para orbifloxacino de 0,25 µg/mL. A cepa ATCC de *S. aureus* obteve o valor mais alto de CIM, 0,5 µg/mL, e a CIM para *P. mirabilis* foi de 0,5 µg/mL.

Elias e colaboradores (2009) determinaram a CIM e CBM (concentração bactericida mínima) para orbifloxacino em caldo e soro contra três isolados de campo e seus respectivos controles. Novamente, nenhuma diferença entre os dois meios foi observada, correspondendo a insignificante ligação às proteínas observada para este composto. A CIM e a CBM de orbifloxacino contra a cepa teste *Mannheimia haemolytica* foram 0,06 µg/mL e 0,12 µg/mL, respectivamente, enquanto que para as cepas controle foram 0,03 µg/mL e 0,06 µg/mL, respectivamente. As CIM e CBM para as cepas de *E. coli* isolados de campo e cepas controle foram 0,06 µg/mL, e para as cepas de *S. aureus* foram 0,5 e 1,12 µg/mL, respectivamente.

De acordo com Garnière e colaboradores (2004), o orbifloxacino expressa atividade bactericida concentração-dependente contra *S. aureus* cepa de referência, mas atividade bactericida tempo-dependente contra *S. intermedius*. O orbifloxacino induz efeito bactericida em cepas testadas de *S. intermedius* com concentração igual ou duas vezes à CIM.

A suscetibilidade de 361 cepas de campo pertencentes a cinco gêneros, isolados em 1998 de materiais clínicos e necrosados, foram determinadas contra enrofloxacino, orbifloxacino, marbofloxacino e difloxacino. As CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ para *E. coli* foram 0,015-

64, 0,125 e 0,125 µg/mL, para *S. intermedius* foram 0,06-0,5, 0,25 e 0,25 µg/mL e para *P. aeruginosa* foram 0,06-8,0, 4,0 e 8,0 µg/mL, respectivamente (PIRRO *et al.*, 1999).

Esaki e colaboradores (2005) examinaram a suscetibilidade de 27 isolados clínicos de *Mannheimia haemolytica* em bovinos no Japão de 2001 a 2002 contra 25 agentes antimicrobianos, incluindo orbifloxacino. As CIMs destes fármacos foram determinadas pelo método de diluição em ágar de acordo com o guia do CLSI. *M. haemolytica*, a qual foi anteriormente descrita como *Pasteurella haemolytica* biotipo A, é um patógeno causador de pasteurelose pneumônica em bovinos e é também um isolado do trato respiratório de gados com doença bovina respiratória complexa, bem como *P. multocida* e *Haemophilus somus*. Os valores encontrados neste estudo são mostrados na Tabela 3.1.

Morioka e colaboradores (2005) testaram orbifloxacino e outros agentes antimicrobianos em 88 cepas de *Staphylococcus* e 61 cepas de *Streptococcus* isolados de doenças animais no Japão e encontraram as CIMs. A CIM para estafilococos foi de 0,2 a 50 µg/mL de orbifloxacino com CIM₅₀ e CIM₉₀ igual a 0,39 e 0,78 µg/mL, e para estreptococos o intervalo foi de 0,39 a 3,13 µg/mL, com CIM₅₀ e CIM₉₀ igual a 1,56 e 3,13 µg/mL, respectivamente. Somente um isolado de suíno mostrou resistência. Em isolados de estreptococos 100% das cepas foram suscetíveis ao orbifloxacino.

A determinação *in vitro* da CIM de orbifloxacino contra *Edwardsiella tarda* foi realizada por Ibrahim e colaboradores (2010). A cepa de *E. tarda* foi isolada em bagres africanos (*Clarias gariepinus*) clinicamente doentes e identificada usando ágar MacConkey. As CIMs testadas contra *E. tarda* foram realizadas de acordo com o guia da CLSI – teste de suscetibilidade por diluição em ágar, com ajustes necessários. A CIM de orbifloxacino contra *E. tarda* foi de 0,016 µg/mL com CIM₅₀ igual a 0,5 e CIM₉₀ igual a 1,0 µg/mL.

O nível de suscetibilidade de *S. intermedius* ao orbifloxacino, relatado por Coelho-Baptista e colaboradores (2003), demonstra que as FQs ainda são uma boa escolha na terapia de infecções associadas com este patógeno. Os dados deste estudo são mostrados na Tabela 3.1.

Fujii e colaboradores (2007) determinaram as CIMs por microdiluição em caldo, utilizando placas de microdiluição personalizadas. Um total de 169 bactérias, isoladas de pele de cães, foram obtidas e identificadas a partir de amostras microbiológicas coletadas antes do tratamento. Os patógenos predominante isolados foram *S. intermedius*, *S. aureus* e *P. mirabilis*. Os valores das CIM₅₀ e CIM₉₀ de orbifloxacino para *S. intermedius* foram 0,25 e 0,5 µg/mL (intervalo de 0,25–0,5 µg/mL); para *S. aureus*, 0,25 e 1 µg/mL (intervalo de 0,25–2 µg/mL) e para *P. mirabilis*, 1 e 4 µg/mL (intervalo de 0,5–4 µg/mL) (Tabela 3.1).

Salmonella dublin e *Salmonella typhimurium* isoladas de bovinos foram testadas e as CIMs de orbifloxacino, fosfomicina e vários outros agentes antimicrobianos foram

determinadas por Matsumoto e colaboradores (1999a). Para 90% dos isolados testados as CIMs de orbifloxacino foram 1,56 µg/mL contra *S. dublin* e 0,2 µg/mL contra *S. typhimurium*. A potência antimicrobiana de orbifloxacino contra os organismos testados foram mais altas que aquelas para ácido oxolínico, canamicina, gentamicina, oxitetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol, trimetoprima, fosfomicina e bicozamicina. Todos os isolados foram considerados suscetíveis ao orbifloxacino, fosfomicina, gentamicina, trimetoprima e bicozamicina.

Matsumoto e colaboradores (1998b) também determinaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de orbifloxacino e seu metabólito N-hidróxi-orbifloxacino pelo método de determinação da concentração inibitória mínima da *Japanese Society of Chemotherapy*. Os valores de CIM para N-hidróxi-orbifloxacino contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas variaram de 0,39 a 6,25 µg/mL e de 0,05 a 25 µg/mL, respectivamente. A atividade antimicrobiana *in vitro* de N-hidróxi-orbifloxacino foi mais fraca que a de orbifloxacino (Tabela 3.1).

Um total de 100 isolados de *P. aeruginosa* foi pesquisado por McKay e colaboradores (2007). As amostras foram coletadas durante o período de um ano e meio a partir de casos de otite canina. A sensibilidade ao enrofloxacino, marbofloxacino e orbifloxacino foram determinadas usando o teste de concentração inibitória mínima. O teste de CIM para orbifloxacino identificou 15 cepas sensíveis, 65 cepas resistentes e 20 cepas intermediárias. Baseado no teste de CIM, os isolados de *P. aeruginosa* foram significativamente mais sensíveis ao marbofloxacino que ao enrofloxacino ou orbifloxacino. Os isolados foram também significativamente mais suscetíveis ao enrofloxacino que ao orbifloxacino. Este estudo está em concordância com a especificação do fabricante, o qual afirma a relativamente baixa sensibilidade de orbifloxacino (15%) a este patógeno.

Rubin e colaboradores (2008) também determinaram a suscetibilidade antimicrobiana de 106 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de cães com otite e pioderma de 2003 a 2006 nos Estados Unidos. Trinta e dois agentes antimicrobianos, incluindo seis classes, foram usados. Uma ampla faixa de sensibilidade foi notada com alguns isolados (entre 8 a 28 (média de 16) dos antimicrobianos testados foram resistentes). Entre as quinolonas e fluorquinolonas, a maioria dos isolados foi resistente ao ácido nalidíxico (96%), seguido por orbifloxacino (52%), difloxacino (43%), enrofloxacino (31%), marbofloxacino (27%), gatifloxacino (23%), levofloxacino (21%) e ciprofloxacino (16%). Estes resultados sugerem que muitos agentes antimicrobianos comumente usados em animais de companhia podem não constituir a terapia apropriada para infecções caninas por *Pseudomonas* (Tabela 3.1).

Cho e colaboradores (2007) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (n = 83) isoladas de fazendas leiteiras orgânicas, fazendas leiteiras convencionais e feiras de Minnesota contra 17 agentes antimicrobianos, incluindo orbifloxacino. Estes autores encontraram quatro isolados (dois de fazendas convencionais e dois de fazendas orgânicas) que demonstraram resistência a este fármaco. É possível que a resistência ao orbifloxacino seja reflexo da resistência inerente, uso extra-rotulado (*off-label*) ou exposição a animais de companhia recentemente tratados.

A suscetibilidade *in vitro* de cepas de *E. coli* ao orbifloxacino também foi verificada por Gebru e colaboradores (2012). Um total de 54 cepas de *E. coli* foram isoladas de infecções de pele, do trato gastrointestinal e urinário de cães doentes. As CIMs de orbifloxacino contra todos os isolados clínicos e cepas de controle de qualidade (*E. coli* ATCC 25922) foram determinadas em triplicata usando o método de diluição em caldo do CLSI. A atividade antimicrobiana de orbifloxacino contra os isolados clínicos de *E. coli* de cães estão apresentados na Tabela 3.1. Este fármaco mostrou valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ iguais a 0,13 µg/mL e 0,5 µg/mL, respectivamente, e número de isolados resistentes de 7,4%.

As CIMs para orbifloxacino também foram determinadas para todas as espécies de culturas bacterianas de equinos (n = 120) submetidas ao laboratório de microbiologia da *University of Florida Veterinary Medical Teaching Hospital* de junho de 1998 a maio de 1999. As culturas foram obtidas de fontes como fluido sinovial, fluido pleural, lavagem transtraqueal, abscessos e feridas. As concentrações de orbifloxacino testadas foram de 0,12 a 8,0 µg/mL. As CIM₅₀ e CIM₉₀ para *Enterobacter cloacae* foram ≤ 0,12 e ≤ 4 µg/mL, para *Enterococcus* spp. foram ≤ 2,0 e > 8,0 µg/mL, para *Klebsiella pneumoniae* foram ≤ 0,12 e ≤ 0,25 µg/mL, para *Providencia* spp foram ≤ 0,25 e ≤ 0,5 µg/mL, para *Rhodococcus equi*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus* grupo D e *Streptococcus zooepidemicus* foram ≤ 2,0 e ≤ 4,0 µg/mL e para *Pseudomonas* spp. foram ≤ 1,0 e ≤ 2,0 µg/mL, respectivamente. *E. coli* apresentou ambas CIM₅₀ e CIM₉₀ ≤ 0,12 µg/mL e *S. aureus* mostrou valores ≤ 0,5 µg/mL para ambas as CIMs. O ensaio foi validado uma vez ao mês para a determinação dos valores de CIM para os organismos-padrão *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922 (HAINES *et al.*, 2001).

Tabela 3.1. Concentrações inibitórias mínimas de orbifloxacino em isolados bacterianos e cepas-controle descritos na literatura

<i>Micro-organismos</i>	<i>Origem dos isolados</i>	<i>Número de isolados</i>	<i>CIM (µg/mL)</i>	<i>Referência</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Equinos	1	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Actinobacillus equuli</i>	Equinos	1	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Equinos	1	0,5	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Equinos	2	2,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Citrobacter diversus</i>	Equinos	2	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Equinos	1	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Edwardsiella tarda</i>	Peixes	-	0,016	Ibrahim <i>et al.</i> , 2010
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Cepas controle	-	0,2	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Equinos	1	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Enterobacter cloacae</i>	Equinos	2	0,12 – 4,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 2473	Cepas controle	-	6,25	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Cepas controle	-	2,5	Riddle <i>et al.</i> , 2000
	Cepas controle	-	1,0 - 8,0	Shryock <i>et al.</i> , 2001
<i>Enterococcus</i> spp.	Equinos	6	2,0 – 8,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	NI	-	0,39	Ihrke <i>et al.</i> , 1999*
	Caninos	-	0,06	Geburu <i>et al.</i> , 2009
	Caninos	54	0,01–32	Geburu <i>et al.</i> , 2012
	Equinos	22	0,12 – 8,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
	Material veterinário clínico e necrosado	25	0,015 – 64	Pirro <i>et al.</i> , 1999
	Caninos e felinos	29	0,66	Boothe <i>et al.</i> , 2006
	Bovinos	3	0,06	Elias <i>et al.</i> , 2009

Tabela 3.1. cont. Concentrações inibitórias mínimas de orbifloxacino em isolados bacterianos e cepas-controle descritos na literatura

<i>Micro-organismos</i>	<i>Origem dos isolados</i>	<i>Número de isolados</i>	<i>CIM (µg/mL)</i>	<i>Referência</i>
<i>Escherichia coli</i>	Caninos	32	NI	Gottlieb <i>et al.</i> , 2008
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Cepas controle	-	0,06	Marín <i>et al.</i> , 2008
	Cepas controle	-	0,066	Riddle <i>et al.</i> , 2000
	Cepas controle	-	0,016 – 0,12	Shryock <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922/KCCM 11234	Cepas controle	-	0,06	Gebru <i>et al.</i> , 2009
	Cepas controle	-	0,06	Elias <i>et al.</i> , 2009
<i>Escherichia coli</i> JC-2	Cepas controle	-	0,05	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Escherichia coli</i> Kp	Cepas controle	-	0,0125	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Equinos	9	0,12 – 0,25	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13	Cepas controle	-	0,2	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Bovinos	27	0,125 – 0,5	Esaki <i>et al.</i> , 2005
<i>Mannheimia haemolytica</i> ATTC 55518	Cepas controle	-	0,03	Elias <i>et al.</i> , 2009
<i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A1	Bovinos	3	0,06	Elias <i>et al.</i> , 2009
<i>Pasteurella multocida</i>	NI	-	0,05	Ihrke <i>et al.</i> , 1999*
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Equinos	4	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Pasteurella</i> spp.	Equinos	3	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Proteus mirabilis</i>	Caninos	-	0,5	Gebru <i>et al.</i> , 2009
	Caninos e felinos	15	0,72	Boothe <i>et al.</i> , 2006
	Caninos	11	0,5 – 4,0	Fujii <i>et al.</i> , 2007
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849-4	Cepas controle	-	3,13	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Proteus vulgaris</i>	Equinos	1	0,25	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Providencia</i> spp.	Equinos	2	0,25 – 0,5	Haines <i>et al.</i> , 2001

Tabela 3.1. cont. Concentrações inibitórias mínimas de orbifloxacino em isolados bacterianos e cepas-controle descritos na literatura

<i>Micro-organismos</i>	<i>Origem dos isolados</i>	<i>Número de isolados</i>	<i>CIM (µg/mL)</i>	<i>Referência</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caninos	106	0,015 – 32	Rubin <i>et al.</i> , 2008
	Equinos	3	1,0 – 4,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
	Material veterinário clínico e necrosado	25	0,06 – 8,0	Pirro <i>et al.</i> , 1999
	Caninos e felinos	34	1,30	Boothe <i>et al.</i> , 2006
	Caninos e tartarugas marinhas	10	5,0	Riddle <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Cepas controle	-	10,0	Riddle <i>et al.</i> , 2000
	Cepas controle	-	2 – 16	Shryock <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tsuchijima	Cepas controle	-	3,13	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Pseudomonas</i> spp.	Equinos	2	1,0 – 2,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	Equinos	2	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhodococcus equi</i>	Equinos	4	2,0 – 4,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmonella dublin</i>	Bovinos	-	1,56	Matsumoro <i>et al.</i> , 1999a
<i>Salmonella enteritidis</i> 1891	Cepas controle	-	0,025	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Salmonella</i> spp.	Equinos	6	0,12	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmonella typhi</i> 901	Cepas controle	-	0,05	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bovinos	-	0,2	Matsumoro <i>et al.</i> , 1999a
<i>Salmonella typhimurium</i> S-9	Cepas controle	-	0,1	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW 10	Cepas controle	-	0,1	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coelhos	30	0,5 - 64	Marín <i>et al.</i> , 2008

Tabela 3.1. cont. Concentrações inibitórias mínimas de orbifloxacino em isolados bacterianos e cepas-controle descritos na literatura

<i>Micro-organismos</i>	<i>Origem dos isolados</i>	<i>Número de isolados</i>	<i>CIM (µg/mL)</i>	<i>Referência</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caninos	-	0,25	Gebru <i>et al.</i> , 2009
	Equinos	13	0,25 – 1,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
	Caninos	19	0,25 – 2,0	Fujii <i>et al.</i> , 2007
	Bovinos	-	0,5	Elias <i>et al.</i> , 2009
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 JC-1	Cepas controle	-	0,78	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Cepas controle	-	1,0	Marín <i>et al.</i> , 2008
	Cepas controle	-	0,5	Gebru <i>et al.</i> , 2009
	Cepas controle	-	1,25	Riddle <i>et al.</i> , 2000
	Cepas controle	-	0,25 – 2,0	Shryock <i>et al.</i> , 2001
	Cepas controle	-	0,5	Elias <i>et al.</i> , 2009
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 8	Cepas controle	-	0,39	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Staphylococcus intermedius</i>	-	-	0,39	Ihrke <i>et al.</i> , 1999*
	Caninos	-	0,25	Gebru <i>et al.</i> , 2009
	Caninos	91	0,125 – 4,0	Coelho-Baptista <i>et al.</i> , 2003
	Caninos	240	0,016 – 8,0	Ganière <i>et al.</i> , 2004
	Material veterinário clínico e necrosado	25	0,06 – 0,5	Pirro <i>et al.</i> , 1999
	Caninos e felinos	15	0,87	Boothe <i>et al.</i> , 2006
	Caninos	25	0,25 – 0,5	Fujii <i>et al.</i> , 2007
<i>Staphylococcus</i> spp	Animais doentes	88	0,2 – 50	Morioka <i>et al.</i> , 2005
	Equinos	1	0,5	Haines <i>et al.</i> , 2001

Tabela 3.1. cont. Concentrações inibitórias mínimas de orbifloxacino em isolados bacterianos e cepas-controle descritos na literatura

<i>Micro-organismos</i>	<i>Origem dos isolados</i>	<i>Número de isolados</i>	<i>CIM (µg/mL)</i>	<i>Referência</i>
<i>Staphylococcus</i> spp	Caninos e felinos	8	1,7	Boothe <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptococcus</i> spp	Animais doentes	61	0,39 – 3,13	Morioka <i>et al.</i> , 2005
	Caninos e felinos	10	0,5	Boothe <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptococcus equisimilis</i>	Equinos	5	2,0 – 4,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus</i> grupo D	Equinos	5	0,12 – 4,0	Haines <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus pyogenes</i> A65	Cepas controle	-	3,13	Matsumoto <i>et al.</i> , 1998b
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Equinos	21	0,5 – 4,0	Haines <i>et al.</i> , 2001

NI = não informado; *os valores de CIM listados representam a média dos valores disponíveis publicados na literatura ou das informações técnicas dos fabricantes.

A concentração inibitória mínima é a mais baixa concentração de um antimicrobiano requerida para inibir o crescimento de um micro-organismo particular (IHRKE *et al.*, 1999). A Tabela 3.1 contém uma lista das CIMs de orbifloxacino contra bactérias estudadas na literatura.

Acinetobacter baumannii, *Actinobacillus equuli*, *Citrobacter diversus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella* spp., *Providencia* spp., *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Salmonella* spp. e *Shigella flexneri*, tais como as cepas encontradas em equinos e cães, são as mais suscetíveis. Os bacilos entéricos Gram-negativos, como, por exemplo, *E. coli*, apresentam baixos valores de CIM. Cocos Gram-positivos, tais como *Staphylococcus* spp., mostram os mais altos valores de CIM. *P. aeruginosa*, se sensível, mostra as mais altas CIMs contra as bactérias suscetíveis.

A visão predominante é que orbifloxacino é bactericida em uma maneira concentração-dependente (Ihrke *et al.*, 1999).

O orbifloxacino acumula-se nos leucócitos, os quais permitem que ele aja no interior da bactéria e seja transportado e liberado nos locais de infecção. Segundo Kay-Mugford e colaboradores (2002), as concentrações teciduais de orbifloxacino são, no mínimo, tão altas

como aquelas encontradas no plasma. Cães com pododerma apresentaram média significativamente maior de concentração na derme e significativamente mais alta razão derme/plasma de orbifloxacino que cães clinicamente normais (IHRKE *et al.*, 1999; KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; MARÍN *et al.*, 2008).

Como antimicrobiano altamente lipofílico, as FQs apresentam mais alta taxa de acumulação e mais lento efluxo das células, assim, as concentrações intracelulares são de 3 a 11 vezes mais altas que as concentrações do soro (IHRKE *et al.*, 1999).

As médias das concentrações de orbifloxacino na pele de cães com pododerma foram de aproximadamente 1,4 vezes as concentrações em plasma seguido por uma dose única ou múltipla de orbifloxacino 7,5 mg/kg de peso corpóreo. De acordo com os dados do CLSI (2008), o ponto de corte (*breakpoint*) da concentração inibitória mínima para orbifloxacino é de 1,0 µg/mL. Este é o ponto no qual isolados dérmicos de cães e gatos (incluindo *Staphylococcus* spp, bacilos entéricos Gram-negativos e outras bactérias) poderiam ser considerados suscetíveis e poderia se esperar boas respostas a baixas dosagens (2,5 mg/kg) de orbifloxacino (KAY-MUGFORD *et al.*, 2002). O ponto de corte flexível de CIM no qual elevadas doses de 5,0 a 7,5 mg/kg de peso corpóreo podem ser aconselháveis é de 2 a 4 µg/mL (KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; CLSI, 2008). O ponto de corte para a mais alta dosagem de orbifloxacino é ≥ 8 µg/mL, de acordo com o CLSI (CLSI, 2008).

3.4 Farmacocinética do orbifloxacino

A farmacocinética do orbifloxacino foi avaliada em cabras (MARÍN *et al.*, 2007), cavalos (HAINES *et al.*, 2001; DAVIS *et al.*, 2006), porcos (MATSUMOTO *et al.*, 1998a, 1999b), coelhos (MARÍN *et al.*, 2008), cães (MATSUMOTO *et al.*, 1998b; IHRKE *et al.*, 1999; HEINEN, 2002; KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; GEBRU *et al.*, 2009), gatos (MATSUMOTO *et al.*, 1998b), camelos (GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008), gado (ELIAS *et al.*, 2009), ovelhas (GOUDAH *et al.*, 2009) e, mais recentemente, em bagres africanos (IBRAHEM *et al.*, 2010).

Heinen (2002) comparou a farmacocinética de enrofloxacino, difloxacino, marbofloxacino e orbifloxacino após administração oral em estudos independentes em cães da raça *beagle*. As análises foram realizadas pelo ensaio de difusão em ágar. Todas as FQs foram rapidamente absorvidas e alcançaram pico de concentração média no soro de 1,41; 1,11; 1,47 e 1,37 µg/mL para enrofloxacino, difloxacino, marbofloxacino e orbifloxacino, respectivamente. Enrofloxacino foi eliminado com meia-vida terminal ($t_{1/2}$) de 4,1 h, difloxacino com 6,9 h, orbifloxacino com 7,1 h e marbofloxacino com 9,1 h. Enquanto a área sob a curva da concentração no soro, no intervalo de dosagem de 24 h (AUC_{0-24}), para

marbofloxacino e orbifloxacino foi similar (aproximadamente 13 $\mu\text{g h/mL}$), enrofloxacino atingiu uma AUC_{0-24} de 8,7 e difloxacino de 9,3 $\mu\text{g h/mL}$.

Níveis similares de médias de pico de concentração no soro foram encontrados seguindo a administração oral das mais baixas doses aprovadas para enrofloxacino, marbofloxacino e orbifloxacino (2,5 mg/kg de peso corpóreo). Comparado com estes compostos, a $C_{\text{máx}}$ (concentração máxima atingida no plasma) e o $t_{\text{máx}}$ (tempo para atingir a $C_{\text{máx}}$) de difloxacino após administração foram significativamente mais baixa e mais longo, respectivamente. A média do $t_{\text{máx}}$ para orbifloxacino foi alcançada em mais de 30 minutos após aquela para enrofloxacino e marbofloxacino. Contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Com relação à meia-vida de eliminação, o maior valor foi encontrado para marbofloxacino, seguido por orbifloxacino e difloxacino (HEINEN, 2002).

Gebru e colaboradores (2009) também estudaram a farmacocinética de orbifloxacino em cães da raça *beagle* após administração intravenosa (i.v.) e intramuscular (i.m.) na dose de 2,5 mg/kg de peso corpóreo. A biodisponibilidade (F) absoluta de $100,1\% \pm 4,76\%$, meia-vida terminal de $4,23 \pm 0,2$ h e $3,95 \pm 0,15$ h após administração i.v. e i.m., volume de distribuição no estado estacionário de $1,61 \pm 0,13$ L/kg e *clearance* de $0,31 \pm 0,03$ L/h/kg foram observados.

As concentrações de orbifloxacino no plasma e na derme foram avaliadas em 14 cães clinicamente normais e em 14 cães com pioderma após a administração oral deste fármaco (Orbax[®] comprimidos, Schering-Plough Animal Health), na dose de 7,5 mg/kg de peso corpóreo uma vez ao dia pelo período de 5 a 7 dias (KAY-MUGFORD *et al.*, 2002). As análises das amostras de pele e sangue completo foram obtidas antes da administração e no tempo esperado para atingir a concentração máxima na pele (3 horas após a administração) no primeiro e no quinto para sétimo dia de administração. As amostras de pele e de plasma foram analisadas para obtenção das concentrações de orbifloxacino. Cães com pioderma tiveram concentrações médias de orbifloxacino na pele significativamente maiores dentro de 3 horas de administração (dia 0: $7,80 \pm 3,40$ $\mu\text{g/g}$, dias 4 a 6: $9,47 \pm 6,23$ $\mu\text{g/g}$) que aqueles cães com pele normal (dia 0: $3,85 \pm 1,08$ $\mu\text{g/g}$, dias 4 a 6: $5,43 \pm 1,02$ $\mu\text{g/g}$). Após a administração diária, no dia 0 e após cinco a sete dias de tratamento, os cães com pioderma tiveram maior média da razão derme:plasma (1,40 e 1,44, respectivamente) que aqueles cães com pele clinicamente normal (0,81 e 0,96, respectivamente). Não houve diferença significativa entre as concentrações médias de orbifloxacino no plasma em cães clinicamente normais e cães com pioderma após a administração única ou múltipla de orbifloxacino (KAY-MUGFORD *et al.*, 2002).

Haines e colaboradores (2001) estudaram a farmacocinética e a distribuição de orbifloxacino nos fluidos corporais e endométrio em seis éguas, após administração

intragástrica (i.g.), na dose única de 7,5 mg/kg de peso corpóreo. As concentrações de orbifloxacino foram medidas serialmente em soro, fluido sinovial, fluido peritonial, urina, fluido cerebroespinal e tecidos endometriais por mais de 24 horas. A concentração máxima média de orbifloxacino no soro ($C_{máx}$) foi de $2,41 \pm 0,30$ µg/mL em 1,5 horas após a administração e diminuiu até $0,17 \pm 0,01$ µg/mL (C_{min}) em 24 horas. O orbifloxacino foi uniformemente absorvido nas seis éguas e foi bem distribuído nos fluidos corporais e tecido endometrial.

Davis e colaboradores (2006) estudaram a farmacocinética e as características físico-químicas de orbifloxacino também em equinos, entretanto, após administração oral e intravenosa. Seguindo a administração i.v., orbifloxacino teve meia-vida terminal de 5,1 horas e volume de distribuição ($V_{d(ss)}$) de 1,58 L/kg. Seguindo administração oral, a média da concentração plasmática ($C_{máx}$) foi de 1,25 µg/mL com $t_{1/2}$ de 3,4 h. A biodisponibilidade sistêmica foi de 68,35%. A ligação às proteínas plasmáticas foi de 20,64%. Nenhum efeito adverso pela administração do fármaco foi notado durante este estudo.

A absorção oral de orbifloxacino, relatada por Davis e colaboradores (2006), foi no mínimo tão alta ou mais alta que as absorções relatadas para outras FQs em equinos. A solubilidade em água deste fármaco é também uma vantagem. A absorção oral de fármacos é facilitada quando estes são capazes de se dissolver nos fluidos gastrintestinais. A dissolução pobre dos compostos pode resultar em absorção sistêmica insignificante. A boa solubilidade em água de orbifloxacino contribui para favorecer a absorção oral e também faz este fármaco passível de compor várias formulações aquosas (DAVIS *et al.*, 2006).

Marín e colaboradores (2007, 2008) estudaram a cinética de uma dose única de orbifloxacino em cabras lactantes clinicamente normais ($n = 6$) e em coelhos ($n = 6$) após administração intravenosa, subcutânea (s.c.) e intramuscular de 2,5 mg e 5,0 mg de orbifloxacino/kg de peso corpóreo, respectivamente. As concentrações de orbifloxacino em plasma e leite de cabras e em plasma de coelhos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os dados plasmáticos obtidos neste estudo estão sumarizados na Tabela 3.2.

Goudah e Abo-El-Sooud (2008) relataram a disposição cinética plasmática, a biodisponibilidade absoluta e a penetração no leite de orbifloxacino em camelos lactantes saudáveis seguindo a administração i.v e i.m. de uma dose única do fármaco na dosagem de 2,5 mg/kg de peso corpóreo. Os dados são mostrados na Tabela 3.2.

Mais recentemente, Goudah e colaboradores (2009) investigaram o perfil farmacocinético de orbifloxacino em ovelhas em lactação ($n = 6$) após administração i.v. e i.m. de 2,5 mg/kg de peso corpóreo do fármaco. As amostras foram analisadas para determinar as respectivas concentrações do fármaco pelo ensaio microbiológico usando

Klebsiella pneumoniae como micro-organismo teste. Após administração i.m., orbifloxacino foi rapidamente absorvido com $C_{m\acute{a}x}$ de 1,53 $\mu\text{g/mL}$ alcançada em 1,25 h ($t_{m\acute{a}x}$). O tempo de residência média (MRT) foi de 5,88 h e a biodisponibilidade foi de 114,63%. A percentagem de orbifloxacino ligado às proteínas plasmáticas no plasma de ovelhas lactantes variou de 21,3% a 24,5% com média de 22,5%.

No mesmo ano, Elias e colaboradores (2009) publicaram um estudo sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica de orbifloxacino em seis vacas clinicamente saudáveis após administração i.v. e i.m. na dose de 3 mg/kg de peso corpóreo. As concentrações de orbifloxacino foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. O volume de distribuição no estado estacionário e o *clearance* de orbifloxacino depois da administração i.v. foram 0,92 L/kg e 0,24 L/h/kg, respectivamente. Seguindo a administração i.m., uma absorção lenta e completa, com biodisponibilidade absoluta de 101,4% e $C_{m\acute{a}x}$ de 1,17 $\mu\text{g/mL}$ em 1,04 h foram observadas. A ligação às proteínas do soro, *in vitro*, foi de 14,76%.

Outro estudo farmacocinético foi realizado por Ibrahim e colaboradores em 2010. Estes autores estudaram a farmacocinética de orbifloxacino em bagres africanos, *Clarias gariepinus*. O resíduo de orbifloxacino nos músculos dos peixes foi determinado por bioensaio modificado de difusão em ágar. Nos primeiros 2 dias após o fim do tratamento, o nível de orbifloxacino nos músculos alcançou 0,03 mg/g de tecido. No sétimo dia após o tratamento, traços de orbifloxacino (0,015 mg/g de tecido) foram detectados, e no décimo dia após o tratamento, nenhum resíduo de orbifloxacino nos tecidos musculares foi encontrado. A segurança na utilização de FQs em animais que se destinam ao consumo humano foi anteriormente descrito por Nakamura em 1995.

A Tabela 3.2 apresenta, resumidamente, os parâmetros farmacocinéticos de orbifloxacino, em diferentes espécies, encontrados na literatura.

Tabela 3.2. Parâmetros farmacocinéticos de orbifloxacin, em diferentes espécies, encontrados na literatura

Espécies	Via	F (%)	$t_{1/2}$ (h)	$V_{d(ss)}$ (L/kg)	CI (L/h·kg)	$C_{máx}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$ASC_{0-\infty}$	TMP (h)	$t_{máx}$ (h)	Dose	Referência
Cabra	i.v.	-	4,12 \pm 0,32	1,13 \pm 0,08	0,40 \pm 0,11	-	6,15 \pm 1,42	2,75 \pm 0,41	-	2,5	MARÍN <i>et al.</i> , 2007
Cabra	s.c.	108,96 \pm 17,61	4,99 \pm 0,09	-	-	1,85 \pm 0,20	6,47 \pm 1,24	3,58 \pm 0,54	1,25 \pm 0,22	2,5	MARÍN <i>et al.</i> , 2007
Cabra	i.m.	105,01 \pm 15,61	3,34 \pm 0,05	-	-	1,66 \pm 0,14	5,98 \pm 0,62	2,82 \pm 0,37	0,87 \pm 0,38	2,5	MARÍN <i>et al.</i> , 2007
Camelo	i.v.	-	5,74 \pm 1,16	1,73 \pm 0,31	0,23 \pm 0,02	-	11,21 \pm 0,96	6,42 \pm 1,14	-	2,5	GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008
Camelo	i.m.	97,47 \pm 11,32	5,95 \pm 1,21	-	-	1,93 \pm 0,61	11,64 \pm 1,34	7,54 \pm 1,45	1,52 \pm 0,41	2,5	GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008
Cão	i.v.	-	4,23 \pm 0,2	1,61 \pm 0,13	0,31 \pm 0,03	-	8,21 \pm 0,6	4,71 \pm 0,13	-	2,5	GEBRU <i>et al.</i> , 2009
Cão	i.m.	100,1 \pm 4,76	3,95 \pm 0,15	-	-	1,15 \pm 0,14	8,49 \pm 0,93	5,31 \pm 0,17	1,15 \pm 0,37	2,5	GEBRU <i>et al.</i> , 2009
Cão	i.g.	NI	7,14 \pm 0,42	-	-	1,37 \pm 0,10	-	11,17 \pm 0,58	2,42 \pm 0,36	2,5	HEINEN, 2002

Tabela 3.2. cont. Parâmetros farmacocinéticos de orbifloxacin, em diferentes espécies, encontrados na literatura

Espécies	Via	F (%)	t_{1/2} (h)	V_{d(ss)} (L/kg)	Cl (L/h·kg)	C_{máx} (µg/mL)	ASC_{0-∞}	TMP (h)	t_{máx} (h)	Dose	Referência
Cavalo	i.g.	NI	9,06 ± 1,33	4,04 ± 0,59	0,38 ± 0,03	2,41 ± 0,30	19,80 ± 1,70	10,60 ± 1,14	1,5	7,5	HAINES <i>et al.</i> , 2001
Cavalo	i.g.	68,35 ± 27,32	3,4 ± 1,2	-	-	1,25 ± 0,5	6,16 ± 2,35	5,2 ± 0,8	1,21 ± 0,6	2,5	DAVIS <i>et al.</i> , 2006
Cavalo	i.v.	-	5,08 ± 2,06	1,58 ± 0,42	0,28 ± 0,03	-	9,04 ± 0,9	5,81 ± 2,11	-	2,5	DAVIS <i>et al.</i> , 2006
Coelho	i.v.	-	2,50	1,71 ± 0,38	0,91 ± 0,20	-	5,74 ± 1,17	1,88 ± 0,13	-	5,0	MARÍN <i>et al.</i> , 2008
Coelho	s.c.	110,67 ± 11,02	5,14	-	-	2,95 ± 0,82	7,00 ± 1,29	2,80 ± 0,65	0,67 ± 0,20	5,0	MARÍN <i>et al.</i> , 2008
Coelho	i.m.	109,87 ± 8,36	2,54	-	-	3,24 ± 1,33	6,75 ± 1,47	2,36 ± 0,39	0,65 ± 0,12	5,0	MARÍN <i>et al.</i> , 2008
Gado	i.v.	-	3,20 ± 0,47	0,92 ± 0,18	0,24 ± 0,07	-	13,76 ± 3,98	3,99 ± 0,63	-	3,0	ELIAS <i>et al.</i> , 2009
Gado	i.m.	101,4 ± 20,9	6,71 ± 3,25	-	-	1,21 ± 0,23	13,23 ± 1,72	9,85 ± 3,9	1,36 ± 0,56	3,0	ELIAS <i>et al.</i> , 2009
Gado	i.g.	-	3,99	-	-	1,92	10,04	5,93	1,10	2,5	HEINEN, 2000

Tabela 3.2. cont. Parâmetros farmacocinéticos de orbifloxacino, em diferentes espécies, encontrados na literatura

Espécies	Via	F (%)	$t_{1/2}$ (h)	$V_{(d(ss))}$ (L/kg)	Cl (L/h·kg)	$C_{máx}$ (µg/mL)	$ASC_{0-\infty}$	TMP (h)	$t_{máx}$ (h)	Dose	Referência
Ovelha	i.v.	-	3,16 ± 0,43	1,31 ± 0,12	0,32 ± 0,12	-	8,73 ± 1,41	4,12 ± 0,91	-	2,5	GOUDAH et al., 2009
Ovelha	i.m.	114,63 ± 11,39	3,84 ± 0,59	-	-	1,53 ± 0,34	10,65 ± 1,56	5,88 ± 1,21	1,25 ± 0,21	2,5	GOUDAH et al., 2009

Via = via de administração; i.g.: intragástrica; i.v.: intravenosa; i.m.: intramuscular; s.c.: subcutânea; F (%): biodisponibilidade; $t_{1/2}$ (h): meia-vida de eliminação; $V_{(d(ss))}$ (L/kg): volume aparente de distribuição no estado estacionário; Cl (L/h·kg): clearance; $C_{máx}$ (µg/mL): concentração máxima do fármaco; $ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL): área sob a curva da concentração plasmática do fármaco versus o tempo (de 0 ao infinito); TMP (h): tempo médio de permanência; $t_{máx}$ (h): tempo para atingir a concentração máxima; Dose (mg/kg peso corpóreo).

As FQs são metabolizadas por várias reações de fase I e fase II no fígado. A N-desalquilação é um processo muito importante na reação de fase I da maioria das FQs. Adicionalmente, oxidação, hidroxilação, desmetilação e desetilização dos compostos parentes podem acontecer (LEFEBVRE *et al.*, 1998; ANADÓN *et al.*, 2002).

As principais vias de eliminação são a excreção renal (para FQs como enrofloxacino, orbifloxacino, ofloxacino, temafloxacino e lomefloxacino), o metabolismo hepático (para difloxacino e pefloxacino) ou ambos os mecanismos, renal e hepático (para marbofloxacino, danofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino e enoxacino (MARTINEZ *et al.*, 2006; COX, 2007).

Matsumoto e colaboradores estudaram a farmacocinética de orbifloxacino em gatos e cães após administração deste fármaco subcutaneamente e em porcos e vacas depois de administração por via intramuscular. De acordo com estes autores, estas rotas de administração são as mais comumente usadas em todas as espécies. Estes autores descobriram que as recuperações urinárias de orbifloxacino em gatos, cães, porcos e vacas, recebendo uma dose única s.c. ou i.m. de 5,0 mg/kg de peso corpóreo de orbifloxacino, foram 28, 45, 71 e 37%, e as recuperações fecais foram 15, 18, 9 e 5%, respectivamente (MATSUMOTO *et al.*, 1997, 1998a, 1999b). No geral, as recuperações urinárias de orbifloxacino foram maiores que as recuperações fecais para estas espécies.

A Tabela 3.3 apresenta os valores e os metabólitos encontrados em amostras de urina de gatos, cães, porcos e vacas (MATSUMOTO *et al.*, 1997, 1998a, 1999b).

Tabela 3.3. Metabólitos encontrados em amostras de urina, em estudos farmacocinéticos de orbifloxacino, em felinos, caninos, suínos e bovinos

	<i>ORBI</i>	<i>ORBI-glicuronídeo</i>	<i>ORBI N-hidroxi</i>
Gatos	96%	-	4%
Cães	87%	13%	-
Porcos	97%	3%	-
Vacas	94%	1%	5%

Matsumoto e colaboradores (1999b) sugeriram que o orbifloxacino não é facilmente metabolizado nas espécies estudadas (gatos, cães, porcos e vacas). Esparfloxacino, o qual possui um anel 3,5-dimetilpiperazínico na posição 7, como orbifloxacino, é conhecido por ser metabolizado somente em pequena extensão. Desta maneira, parece que o anel 3,5-dimetilpiperazínico na posição 7 previne que orbifloxacino e esparfloxacino sejam metabolizados.

A pequena taxa de metabolização de orbifloxacino e a comparativamente alta concentração plasmática deste fármaco em cães, gatos, porcos e vacas sugere que este composto pode apresentar bons efeitos clínicos em várias infecções bacterianas nestas espécies (MATSUMOTO *et al.*, 1997, 1998a, 1998b, 1999b).

Os efeitos inibitórios de várias FQs nas atividades do fígado foram examinados por testes em cães. A taxa de hidroxilação de midazolam foi usada para determinar as atividades do citocromo CYP3A[‡] nos cromossomos do fígado. Enrofloxacino, ofloxacino, orbifloxacino e ciprofloxacino foram testados. Os resultados *in vitro* sugeriram que não houve possibilidade de interação fármaco-fármaco entre as FQs e o substrato CYP3A em cães (REGMI *et al.*, 2007). Entretanto, estudo realizado por Shimoda e colaboradores (2003) mostrou que enrofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino e orbifloxacino inibem a atividade hepática de CYP1A[§] em cães. Assim muita atenção deve ser tomada quando FQs são co-administradas com o substrato CYP1A, devido ao efeito inibitório do fármaco nas atividades deste (REGMI *et al.*, 2006).

A farmacocinética de orbifloxacino foi estudada em várias espécies animais e com diferentes rotas de administração. Este fármaco apresentou características de distribuição bem similares, entretanto, as taxas de eliminação diferiram consideravelmente entre as espécies (MATSUMOTO *et al.*, 1997, 1998a, 1999b). Menor variação foi observada com relação às taxas de absorção ($C_{\text{máx}}$ e F). Orbifloxacino foi rapidamente absorvido ($t_{\text{máx}}$) e bem distribuído nos diferentes tecidos, exceto SNC e tecidos oculares, com volume de distribuição maior que 0,98 L/kg em todas as espécies descritas (Tabela 3.2).

Após administração i.m. de orbifloxacino em cães, a biodisponibilidade foi completa (100,1%) segundo relatado por Gebru e colaboradores (2009). Valores similares de biodisponibilidade i.m. para este fármaco foram relatados em cabras (105,01%), coelhos (109,87%), camelos (97,47%), vacas (101,4%) e ovelhas (114%) (MARÍN *et al.*, 2007, 2008; GOUDAH e ABO-EL-SOUD, 2008; ELIAS *et al.*, 2009; GOUDAH *et al.*, 2009). A biodisponibilidade oral de orbifloxacino em cavalos foi menor (68,35%), como relatado por Davis *et al.* (2006). Outros estudos conduzidos com orbifloxacino em diferentes animais administrando orbifloxacino por via oral não informaram a sua biodisponibilidade (HAINES *et al.*, 2001; HEINEN, 2002).

Quando orbifloxacino foi administrado em coelhos (110,67%) e cabras (108,96%), por via subcutânea, excelente biodisponibilidade também foi encontrada (MARÍN *et al.*, 2007, 2008).

[‡] CYP3A - Citocromo P450, família 3, subfamília A.

[§] CYP1A - Citocromo P450, família 1, subfamília A.

A ligação às proteínas plasmáticas variou pouco entre as espécies e, de um modo geral, estes valores foram baixos. O orbifloxacino foi excretado, principalmente, pela via renal.

A forma farmacêutica de orbifloxacino comprimido é apresentada em diversas doses (5,7 a 68 mg), o que permite a administração baseada na sensibilidade bacteriana e na penetração deste fármaco no local de infecção. Bactérias que se mostram altamente sensíveis nos testes *in vitro* podem ser tratadas com baixas dosagens.

Uma vez que orbifloxacino apresenta ação bactericida concentração-dependente, uma dose diária com alta concentração pode ser mais eficaz que várias doses deste antimicrobiano. Isto pode ser considerado uma vantagem, visto que este fármaco se destina ao uso veterinário.

Altos picos de concentração, como apresentados por orbifloxacino, também constituem vantagem, já que são menos prováveis de induzir resistência bacteriana.

Orbifloxacino apresentou alto tempo de permanência na maioria das espécies estudadas na literatura, o que significa a persistência do seu efeito, apesar de, como já citado anteriormente, o orbifloxacino apresentar ação bactericida concentração-dependente.

3.5 Métodos analíticos

Até o momento, todos os métodos descritos na literatura científica para a determinação de orbifloxacino em diferentes matrizes envolvem a cromatografia líquida com detecção por fluorescência (GARCÍA *et al.*, 1999; KAY-MUGFORD *et al.*, 2002; SCHNEIDER e DONOGHUE, 2002, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2005, 2007; HUNG *et al.*, 2007; MARÍN *et al.*, 2007; CHONAN *et al.*, 2008; MARÍN *et al.*, 2008; ABD EL-ATY *et al.*, 2009; ELIAS *et al.*, 2009; GEBRU *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2010) e/ou a espectrometria de massas (MS) (MORIMURA *et al.*, 1997a, 1997b; MATSUMOTO *et al.*, 1998a, 1998b, 1999a, 1999b; JOHNSTON *et al.*, 2002; SCHNEIDER e DONOGHUE, 2002, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2005, 2007; YAMADA *et al.*, 2006; FUJITA *et al.*, 2008; KAJITA *et al.*, 2008; SAITO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009; SANTOKE *et al.*, 2009; KANTIANI *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012) e/ou a detecção por UV (MORIMURA *et al.*, 1995a, 1995b, 1997a, 1997b; MATSUMOTO *et al.*, 1998a, 1998b, 1999a, 1999b; DAVIS *et al.*, 2006; HUNG *et al.*, 2007; BP, 2011b; CAZEDEY *et al.*, 2011; USP, 2011f; YU *et al.*, 2012). Outras técnicas incluem o trabalho de Llorent-Martínez e colaboradores (2008), os quais descrevem a determinação de orbifloxacino por análise sequencial de amostras luminescentes sensibilizadas com térbio e o método microbiológico por difusão em ágar, descrito por Cazedey e Salgado (2011).

Vários artigos têm descrito a análise de multirresíduos de FQs, mas poucos incluem orbifloxacino nos estudos. Schneider e Donoghue (2002, 2003) e Schneider e colaboradores (2005, 2007) relataram métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise multiresidual de 8 FQs (desetileno ciprofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, orbifloxacino, sarafloxacino e difloxacino) em tecidos e soro de galinhas, ovos e camarões nos quais a quantificação por fluorescência e a confirmação por espectrometria de massas em múltiplos estágios (MS^n) foi alcançada simultaneamente (Tabela 3.4). O espectrômetro de massas nestes estudos foi operado no modo positivo com ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*) (APCI). Os íons precursores da MS^n (m/z) foram os seguintes para orbifloxacino: ORBI MS^2 396,0, MS^3 352,0, respectivamente.

Outro método apresentado na literatura foi a CLAE em fase reversa acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray para análise simultânea de 8 quinolonas e FQs (ácido oxolínico, flumequina, ácido piromídico, enrofloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, sarafloxacino e orbifloxacino) em tecido de trutas, camarões e abalone. O orbifloxacino foi detectado em detector MS/MS usando a transição 396,36>352,11 (m/z), com cone de voltagem de 32 V e energia de colisão de 16 eV (JOHNSTON *et al.*, 2002).

Ainda com relação à métodos-multirresíduo, Yamada e colaboradores (2006), utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização eletrospray (LC-ESI-MS/MS) realizaram a determinação simultânea de 130 fármacos (incluindo orbifloxacino) e seus metabólitos em bovinos, suínos e músculos de galinha. Os parâmetros utilizados no ensaio deste método são mostrados na Tabela 3.4. A mesma técnica (LC-ESI-MS/MS) foi utilizada para a quantificação e confirmação de 19 quinolonas (incluindo orbifloxacino, enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, flumequina, ácido oxolínico, difloxacino, sarafloxacino, esparfloxacino, danofloxacino, fleroxacino, marbofloxacino, enoxacino, pefloxacino, ácido nalidíxico, ácido pipemídico, lomefloxacino e cinoxacino) em porcos e tecidos musculares de peixe (LI *et al.*, 2009).

Em 2008, Chonan e colaboradores descreveram o método multirresíduo por CLAE com detecção por fluorescência para a determinação de 12 quinolonas (ciprofloxacino, danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino, flumequina, marbofloxacino, ácido nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino, orbifloxacino, ácido oxolínico e sarafloxacino) em músculo, fígado e ovos de galinha, leite, camarões e trutas. Este método foi eficaz e adequado para a triagem das quinolonas em produtos animais e da pesca (Tabela 3.4). No mesmo ano, Saito e colaboradores (2008) desenvolveram métodos utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria

de massas (LC-MS/MS) para a detecção de 342 pesticidas e fármacos veterinários, incluindo orbifloxacino, em leite bovino. Trabalhos similares foram descritos por Fujita e colaboradores (2008) e Kajita e colaboradores (2008). Estes autores desenvolveram métodos por LC-MS/MS para a determinação simultânea de 89 fármacos veterinários residuais em alguns alimentos processados e 98 fármacos veterinários em produtos pecuários e peixes, respectivamente.

Cho e colaboradores (2010) publicaram método para a extração e determinação de sete resíduos de FQs (danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino, marbofloxacino, orbifloxacino, ofloxacino e sarafloxacino) e três quinolonas (ácido oxolínico, flumequina e ácido nalidíxico) em músculos de porco, ovos e leite comercial integral por cromatografia líquida com detecção por fluorescência (Tabela 3.4).

Kantiani e colaboradores (2011) desenvolveram método *online* totalmente automatizado utilizando SPE-LC-ESI-MS/MS (extração em fase sólida-cromatografia líquida-ionização por eletrospray-espectrômetro de massas) para a detecção e quantificação de 15 FQs (orbifloxacino, marbofloxacino, norfloxacino, sarafloxacino, danofloxacino, ofloxacino, enoxacino, fleroxacino, flumequina, enrofloxacino, ciprofloxacino, pazufloxacino, difloxacino, esparfloxacino, lomefloxacino) e uma quinolona (ácido oxolínico) em leite integral natural e leite desnatado comercial.

Mais recentemente, Yu e colaboradores (2012) descreveram método quantitativo por HPLC-UV e LC-MS/MS com processo de extração acelerada por solvente (ASE) para determinação simultânea de 15 FQs (marbofloxacino, enoxacino, fleroxacino, ofloxacino, pefloxacino, lomefloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, orbifloxacino, cinoxacino, gatifloxacino, sarafloxacino, difloxacino, ácido nalidíxico e flumequina) em várias amostras de alimentos de origem animal.

Ainda acerca de métodos analíticos multirresíduo, em 2012, Tang e colaboradores descreveram método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) para a simultânea detecção e confirmação de 23 fármacos veterinários de várias classes (12 macrolídeos, 7 β -lactâmicos, 2 lincosamídeos e 2 outros fármacos veterinários (morantel e orbifloxacino) em leite.

Método para determinação de orbifloxacino em plasma de coelhos foi desenvolvido por García e colaboradores (1999). Estes autores usaram CLAE em fase reversa com detecção por fluorescência para determinar o fármaco. A preparação das amostras foi realizada pela adição de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e extração com triclorometano. Os dados referentes a este método analítico estão descritos na Tabela 3.4.

Abd El-Aty e colaboradores (2009) usaram as técnicas de extração por fluido sub e supercrítico e CLAE com detecção por fluorescência para isolar, identificar, quantificar e

realizar estudo farmacocinético de orbifloxacino em plasma e leite coletados de sete coelhas lactantes após administração i.v. e i.m. do fármaco. Os detalhes relativos a este método estão apresentados na Tabela 3.4.

Em 2007, Hung e colaboradores desenvolveram método utilizando a CLAE com detecção UV-fluorescência para detectar quatro FQs (enrofloxacino, ofloxacino, danofloxacino e orbifloxacino) –conjugadas com albumina do soro bovino (BSA). O método foi designado de acordo com as diferentes características de absorção das FQs e da BSA. O método desenvolvido foi eficiente em detectar os conjugados FQs-BSA. Segundo os autores, este método não somente detecta traços da conjugação de FQs e BSA, mas também pode ser usado para estimar o nível de conjugação de FQs-BSA e como ferramenta para a detecção de antígenos conjugados fármaco-carreador, especialmente para conjugados FQs-BSA durante a produção de anticorpos monoclonais anti-FQs (Tabela 3.4).

Morimura e colaboradores, em 1995b, investigaram a cinética de fotodegradação de orbifloxacino em soluções aquosas em vários valores de pH (1,2-12,5) na força iônica de 0,5 e, em 1997b, eles descreveram a estrutura destes produtos de degradação após irradiação com luz solar e lâmpada química. Três produtos de degradação foram separados, quantificados e identificados usando a CLAE preparativa, a espectrometria de massas LSI (*Liquid-Secondary-Ion*), EI (*Electron-Impact*) e a ressonância magnética nuclear (H-NMR - (*Nuclear Magnetic Resonance*). Este estudo também estabeleceu as constantes de dissociação aparente (pKa's) de orbifloxacino que foram determinadas espectrofotometricamente (MORIMURA *et al.*, 1995b).

No mesmo ano (1995a), Morimura e colaboradores estudaram a cinética de degradação de orbifloxacino em função do pH (1,5-10,5) com concentração total do tampão de 0,1 M e força iônica de 0,5, da temperatura (100-120 °C) e da concentração do tampão (0,05-0,2 M) usando CLAE-UV para analisar as amostras (Tabela 3.4).

Outro estudo realizado por estes autores envolveram orbifloxacino e seus fotoprodutos substituídos com cloro na posição 8, pela fotorreação deste fármaco em soluções aquosas contendo o íon cloro, e por processos de fotodegradação de orbifloxacino no qual ele gera oxigênios ativos. A geração de oxigênio ativo pela fotosensibilização de orbifloxacino foi medida pela determinação da taxa de clareamento do *p*-nitrosodimetil-anilina e pela medida da taxa de redução do citocromo C (MORIMURA *et al.*, 1997a).

Em 2009, Santoke e colaboradores relataram a cinética de reação de orbifloxacino e 5 outras FQs (flumequina, marbofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino e o composto modelo ácido 6-flúor-4-oxo-1,4-dihidro-3-quinolina carboxílico) com radicais hidróxi e elétrons hidratados, os quais são as maiores espécies reativas envolvidas nos processos de

oxidação/redução avançada (AO/RPs - *advanced oxidation/reduction processes*). Em adição, os produtos da degradação pela irradiação das FQs foram analisados por LC-MS para elucidar os prováveis caminhos de degradação dos AO/RPs.

Matsumoto e colaboradores (1998a, 1998b, 1999a, 1999b) determinaram orbifloxacino e seus metabólitos na urina de quatro espécies (gatos, cães, porcos e vacas). O composto parente e os metabólitos na urina foram determinados por CLAE e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS) (Tabela 3.4).

As concentrações de orbifloxacino em plasma canino foram ensaiadas utilizando a CLAE com detecção de fluorescência (dados cromatográficos não disponíveis). O processo de extração envolveu a desproteinização usando tampão fosfato e acetonitrila seguido pela centrifugação. O sobrenadante foi particionado com hexano. Água foi adicionada para a extração e a acetonitrila foi removida usando evaporador de nitrogênio. O extrato filtrado foi analisado em coluna polimérica (KAY-MUGFORD *et al.*, 2002).

A farmacocinética de orbifloxacino em vários animais também foi estudada usando CLAE com diferentes detectores, conforme pode ser visto na Tabela 3.4 (DAVIS *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2007; MARÍN *et al.*, 2008; ELIAS *et al.*, 2009; GEBRU *et al.*, 2009).

Em trabalho principalmente farmacotécnico, para monitorar a produção de comprimidos, Tabasi e colaboradores (2008a, 2008b, 2008c) desenvolveram um método utilizando a espectrofotometria de infravermelho próximo (NIRS - *near infrared spectroscopy*). Para estes estudos, orbifloxacino foi escolhido como fármaco modelo. Este trabalho engloba um estudo em três partes que descrevem o projeto. A parte I examinou as aplicações da NIRS para prever a força de compressão dos comprimidos, o limite de resistência e a uniformidade de conteúdo da compressão direta no núcleo dos comprimidos. Em adição, a NIRS foi usada para identificar e discriminar defeitos nos comprimidos durante a fabricação. A parte II examinou o uso da espectrofotometria durante o revestimento da liberação sustentada para prever a espessura da cobertura e a liberação do fármaco a partir do revestimento variando a composição da cobertura e a parte III usou o NIRS para prognosticar e monitorar a extensão da cobertura da película de revestimento.

A Farmacopeia Britânica (BP, 2011b) e a Farmacopeia Americana (USP, 2011f) descrevem método por CLAE-UV para a determinação de substâncias relacionadas de orbifloxacino. Em ambas as farmacopeias a cromatografia líquida é equipada com detector UV a 290 nm e fase móvel composta por tampão citrato (pH 3,5), metanol e dioxano (86:11:4, v/v/v) com vazão de 1,0 mL/min. A USP usa coluna de 4,6 x 30 mm, 3 µm, enquanto a Farmacopeia Britânica utiliza coluna octadecilsilil sílica gel de base-desativada com tamanho de 4,6 x 33 mm, 3 µm.

Para a determinação de orbifloxacino matéria prima, a Farmacopeia Britânica sugere método titulométrico usando ácido acético anidro e ácido perclórico 0,1 M para determinar o ponto final potenciométricamente (BP, 2011b) e a Farmacopeia Americana sugere o mesmo método cromatográfico utilizado no ensaio de substâncias relacionadas (USP, 2011f). Para a determinação de orbifloxacino em comprimidos a USP (2011f) apresenta outro método utilizando a CLAE-UV, como descrito na Tabela 3.4.

Além do método descrito na Farmacopeia Americana para análise de orbifloxacino comprimidos, somente poucos outros métodos estão descritos na literatura para a análise deste fármaco em formas farmacêuticas. Cazedey e colaboradores (2011) desenvolveram método cromatográfico (CLAE) indicativo de estabilidade para quantificação de orbifloxacino em comprimidos utilizando ácido acético 5% e metanol (80:20, v/v) como fase móvel (Tabela 3.4). Método alternativo foi publicado por Cazedey e Salgado (2011) utilizando o ensaio de difusão em ágar para a quantificação de orbifloxacino em comprimidos. O ensaio foi baseado no efeito inibitório de orbifloxacino contra a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 usado como micro-organismo teste.

De acordo com Llorent-Martínez e colaboradores (2008), orbifloxacino foi determinado em comprimidos e em amostras de urina obtidas de cães e cavalos por acoplamento de análise de injeção sequencial (SIA - *sequential-injection analysis*) e espectroscopia em fase sólida (SPS - *solid-phase spectroscopy*). Os oxigênios carboxílicos e cetônicos da molécula de orbifloxacino foram envolvidos na complexação com íons de térbio (Tb(III)) dando origem a um quelato fortemente luminescente. O complexo luminescente ternário, Tb(III)-ORBI-EDTA, foi determinado com o auxílio de espectrofotômetro.

A Tabela 3.4 apresenta o resumo dos parâmetros analíticos dos sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino.

Tabela 3.4. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Determinar a cinética de degradação e fotodegradação de ORBI	Tampão citrato 0,1 M (pH 3,5): MetOH: dioxano (84): 12: 5, v/v/v	Develosil® ODS-7 (250 x 4 mm; 7 µm)	UV	290 nm	1,5	NI*	Isocrático Temperatura 40 °C	Sol. aquosa	MORIMURA <i>et al.</i> , 1995a, b
Separar produtos de fotodegradação de ORBI	Tampão citrato 0,1 M (pH 3,5): MetOH: dioxano (84): 12: 5, v/v/v	Develosil® ODS-7 (250 x 8 mm; 7 µm)	UV	290 nm	4,0	≈ 5	Isocrático Temperatura 40 °C	Sol. aquosa	MORIMURA <i>et al.</i> , 1997a,b
Determinar a quantidade residual de ORBI em estudo de fotodegradação	Tampão citrato 0,1 M (pH 3,5): MetOH: dioxano (84): 12: 5, v/v/v	Develosil® ODS-7 (250 x 4 mm; 7 µm)	UV	290 nm	1,2	≈ 6	Isocrático	Sol. aquosa	MORIMURA <i>et al.</i> , 1997a

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacin

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Determinar ORBI e seus metabólitos	Tampão citrato 0,15 M: (metanol: DMF, 9:1, v/v) (43,5:56,5, v/v)	YMC Pack A- 312 [®] , ODS (150 x 6 mm; 3 µm)	UV	340 nm	1,0	≈ 23,5	Isocrático Temperatura 32 °C	Urina de gatos, cães, porcos e vacas	MATSUMOTO <i>et al.</i> , 1998b, 1999b
Determinar ORBI em plasma	Tampão fosfato: ACN (80:20, v/v)	Novapack [®] C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 5 µm)	FL	338 nm _(exc) /425 nm _(em)	1,0	3,09	Isocrático Temperatura ambiente (25 °C)	Plasma de coelhos	GARCÍA <i>et al.</i> , 1999
Analisar 8 quinolonas e FQs (ácido oxolínico, ácido piromídico, FLU, ENRO, CIPRO, DANO, SARA e ORBI)	(A) ácido fórmico 2% (B) ACN (C) água Milli-Q	Zorbax [®] Extend C (150 x 2,1 mm; 5 µm),	MS	396,36 (m/z)	0,2	2,57	Gradiente Temperatura 30 °C	Tecidos comestíveis de truta, camarão e abalone	JOHNSTON <i>et al.</i> , 2002

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Determinar 8 FGs (CIPRO desetileno, NOR, CIPRO, DANO, ENRO, ORBI, SARA, DI)	(A) ácido fórmico 1%, pH 3,0 ajustado com sol. de amônia (B) ACN	Zorbax® Eclipse XDB-Phenyl (150 x 3,0 mm; 3,5 µm)	FL	278 nm _(exc) /440 nm _(em)	0,5	≈ 14	Gradiente Temperatura 30 °C	Tecido de frango e ovos	SCHNEIDER e DONOGHUE, 2002, 2003
Determinar 8 FGs (CIPRO desetileno, NOR, CIPRO, DANO, ENRO, ORBI, SARA, DI)	(A) ácido fórmico 1%, pH 3,0 ajustado com sol. de amônia (B) ACN	Zorbax® Eclipse XDB-Phenyl (150 x 3,0 mm; 3,5 µm)	FL	278 nm _(exc) /465 nm _(em)	0,5	≈ 13,5	Gradiente Temperatura 30 °C	Tecido de camarão	SCHNEIDER et al., 2005
Determinar a PK e as características físico-químicas de ORBI	Água: ACN (77: 23, v/v), TFA 0,02% como modificador de pH	Zorbax® RX-C ₈ (150 x 4,6 mm; 3,5 µm)	UV	279 nm	1,0	≈ 6-7	Isocrático	Plasma equino	DAVIS et al., 2006

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Determinar simultaneamente 130 fármacos veterinários (incluindo ORBI) e seus metabólitos	(A) acetato de amônio 10 mM contendo HAc 0,3% (B) ACN: MetOH (2:8, v/v)	TSK® gel ODS-100S (150 x 2,1 mm; 3 µm)	MS (ESI)	295,2 (m/z)	0,22	14,1	Gradiente Temperatura 35 °C	Músculos bovino, suíno e de frango	YAMADA <i>et al.</i> , 2006
Detectar FQs (ENRO, OFLO, DANO e ORBI) conjugados com BSA	ACN (com TFA 0,05%): água (com TFA 0,05%), (60:40, v/v)	Cosmosil® 5C18-AR-300 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	UV/FL	280 nm; 290 nm _(exc) /450 nm _(em)	1,0	12,235 (ORBI); 17,335 (ORBI-BSA)	Isocrático	Sol. de FQs-BSA	HUNG <i>et al.</i> , 2007
Determinar a PK de ORBI	ACN: sulfato de hidrogênio tetrabutilamônio 0 5 g/L, (14: 86, v/v)	Discovery® RP C ₁₈ (250 x 4 mm; 5 µm)	FL	338 nm _(exc) /425 nm _(em)	1,0	≈ 10,3	Isocrático Temperatura 5 °C	Plasma e leite de cabras	MARÍN <i>et al.</i> , 2007

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Determinar 8 FGs (CIPRO desetileno, NOR, CIPRO, DANO, ENRO, ORBI, SARA e DI)	(A) ácido fórmico 1%, pH 3,0 ajustado com sol. de amônia (B) ACN	Zorbax® Eclipse XDB-Phenyl (150 x 3,0mm; 3,5 µm)	FL	275 nm _(exc) /440 nm _(em)	0,5	≈ 16,5	Gradiente Temperatura 30 °C	Soro de frango	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2007
Determinar 12 quinolonas	(A) ácido fosfórico 0,1% (B) ACN	Inersil® ODS-3V (250 x 4,6 mm; 5 µm)	FL	295 nm _(exc) /450 nm _(em)	1,0	≈ 19	Gradiente Temperatura 35 °C	músculo, fígado e ovos de galinha, leite, camarões e truta	CHONAN <i>et al.</i> , 2008**
Determinar a PK de ORBI	ACN: sulfato de hidrogênio TBA 5 g/L, (15: 85, v/v)	Discovery® RP C ₁₈ (250 x 4mm; 5 µm)	FL	338 nm _(exc) /425 nm _(em)	1,0	≈ 7,1	Isocrático Temperatura 5 °C	Plasma de coelhos	MARÍN <i>et al.</i> , 2008

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Isolar, identificar e quantificar ORBI	Tampão fosfato 0,04 M (pH 3): MetOH (8:2, v/v)	Apollo® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	FL	278 nm _(exc) /450 nm _(em)	1,0	≈ 8,8	Isocrático Temperatura 40 °C	plasma e leite de coelhas	ABD EL-ATY et al., 2009
Determinar a PK de ORBI	Tampão fosfato de potássio 50 µM: ACN (85: 15, v/v), pH 3,0 ajustado com HCl	HP® ODS Hypersil (200 x 4,6 mm; 5 µm)	FL	287 nm _(exc) /470 nm _(em)	1,0	7,5	Isocrático	soro de bovinos	ELIAS et al., 2009
Determinar a PK de ORBI	Tampão fosfato de potássio 50 µM: ACN (85: 15, v/v), pH 3,0 ajustado com HCl	HP® C ₁₈ (200 x 4,6 mm; 5 µm)	FL	287 nm _(exc) /470 nm _(em)	1,0	6,5	Isocrático	soro de cães	GEBRU et al., 2009

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão de (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Quantificar 19 quinolonas	(A) ácido fórmico 0,1% (B) MetOH	Agilent® SB C ₁₈ (150 x 2,1 mm; 3 µm)	MS/MS (ESI)	352/295 (m/z)	0,2	5,7	Gradiente Temperatura 20 °C	Tecidos de porcos e peixes	LI et al., 2009
Determinar 7 FQs (DANO, DI, ENRO, MARBO, ORBI, OFLO e SARA) e 3 quinolonas (FLU, ácido oxolínico e ácido nalidíxico)	(A) ACN (B) ácido oxálico 0,01 M (pH 3,5)	XBridge® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	FL	278 nm _(exc) /455 nm _(em)	1,0	10,1	Gradiente Temperatura 25 °C	Musculo de porcos, ovos e leite integral comercial	CHO et al., 2010
Detectar e quantificar 15 FQs (inclusive ORBI) e 1 quinolona (ácido oxolínico)	(A) Água ultra-pura (B) ACN Ambos acidificados com ácido fórmico 0,2%	Synergi Hydro-RP C ₁₈ (50 mm x 2 mm, 4 µm)	MS/MS ESI	396 (m/z)	0,6	4,37	Gradiente	Leite integral natural e leite desnatado comercial	KANTIANI et al., 2011

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orfibloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	Condições	Vazão de (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Matrizes	Referência
Determinar as substâncias relacionadas ao ORBI	Sol. tampão (pH 3,5): MetOH: dioxano (86: 11: 4, v/v/v)	Base- deactivated C ₁₈ silica gel (33 x 4,6 mm; 3 µm)	UV	290 nm	1,0	NI*	Isocrático	Sol. aquosa	BP, 2011b
Determinar as substâncias relacionadas e de ORBI matéria prima	Sol. tampão (pH 3,5): MetOH: dioxano (84: 11: 4, v/v/v)	30 x 4,6 mm; 3 µm packing L1	UV	290 nm	1,0	NI*	Isocrático	ORBI matéria prima	USP, 2011f
Determinar ORBI em comprimidos	Sol. tampão (pH 3,5): MetOH: dioxano (91: 6: 4, v/v/v)	30 x 4,6 mm; 3 µm packing L1	UV	290 nm	0,8	-	Isocrático	Comprimidos	USP, 2011f
Determinar ORBI em comprimidos	HAc 5%: MetOH, (80:20, v/v)	Symmetry Shield RP-18 Waters® (250 x 4,6 mm; 5 µm)	UV-PDA	290 nm	0,7	7,9	Isocrático	Comprimidos	CAZEDEY et al., 2011

Tabela 3.4. cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de orbifloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Detecção	Condições	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)		Observações	Matrizes	Referência
Determinar 15 FQs (inclusive ORBI)	(A) MeOH (B) ACN (C) ácido cítrico 0,02 M e acetato de amônio 0,03 M	ZORBAX SB-aq- C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	UV	278 nm	0,8	≈ 9		Gradiente Temperatura 35 °C	Alimentos de origem animal	YU <i>et al.</i> , 2012
	Determinar 23 fármacos veterinários (inclusive ORBI)	(A) ácido fórmico 0,05% (B) ACN	UPLC HSS T3 (10 x 2,1 mm, 1,8 µm)	MS/MS	396,3>295,1 (m/z)	0,3	3,9	Gradiente	Leite	TANG <i>et al.</i> , 2012

ACN: acetonitrila; BSA: albumina de soro bovino; DMF: dimetilformamida; MeOH: metanol; NI: não informado; PK: farmacocinética; TBA: tetrabutilamônio; m/z: razão massa/carga (ion precursor ou ion produto); ORBI: orbifloxacino; MARBO: marbofloxacino; NOR: norfloxacino; SARA: sarafloxacino; DANO: danofloxacino; OFLO: ofloxacino; FLU: flumequina; ENRO: enrofloxacino; CIPRO: ciprofloxacino; DI: difloxacino
 **Texto completo disponível somente em japonês, resumo em inglês

4 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

4.1 Descrição geral de orbifloxacin^{*}

Nome: Orbifloxacin; Orbifloxacin

Nome no CAS: *rel*-1-Cyclopropyl-7-[(3*R*,5*S*)-3,5-dimethyl-1-piperazinyl]-5,6,8-trifluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid

CAS[†]: 113617-63-3

DCI[‡]: Orbifloxacin

Nomes químicos: 1-cyclopropyl-5,6,8-trifluoro-(*cis*-3,5-dimethyl-1-piperazinyl)-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid; ácido 1-ciclopropil-5,6,8-trifluór-1,4-dihidro-7-(*cis*-3,5-dimetil-1-piperazinil)-4-oxoquinolina-3-carboxílico.

Código do fabricante: CP-104594

Nome comercial: Orbax[®] (Schering-Plough)

Fórmula molecular: C₁₉H₂₀F₃N₃O₃

Massa molecular: 395,38 g/mol

Composição percentual: C 57,72%; H 5,10%; F 14,42%; N 10,63%; O 12,14%

Propriedades: cristais formados a partir de solução com clorofórmio-etanol; apresenta polimorfismo.

Ponto de fusão: 259-260 °C

pKas: pKa₁; pKa₂ 5,60; 8,90[§], 5,95; 9,01^{**} e 5,903; 8,822^{††}

pl: 7,25[§]; 7,48^{**}; 7,3625^{††}

Log P: 3,5

Descrição física: de acordo com o The Index Merck (O'NEIL, 2006), o orbifloxacin é um pó cristalino levemente amarelado, livremente solúvel em água, solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol, éter, acetato de etila e clorofórmio. Segundo a Farmacopeia Britânica (2011b), o orbifloxacin apresenta-se como cristais ou pó cristalino branco a amarelo pálido, muito pouco solúvel em água, solúvel ácido acético glacial e praticamente insolúvel em etanol anidro.

Categoria: Antimicrobiano

Identificadores:

Código identificador ATCvet^{‡‡}: QJ01MA95

PubChem^{§§}: CID60605

^{*} EMEA, 2002; O'NEIL, 2006; BP, 2011b; USP, 2011f

[†] *Chemical Abstracts Service*

[‡] Denominação Comum Internacional (EMEA, 2002)

[§] MORIMURA *et al.*, 1995a, 1995b; O'NEIL, 2006

^{**} TABASI *et al.*, 2008a

^{††} LLINÀS *et al.*, 2008

^{‡‡} *Anatomical Therapeutic Chemical Classification System for veterinary medicinal products* (ATCvet) é usado para classificar fármacos veterinários

UNII^{*}**: 660932TPY6

KEGG^{†††}: D08299

ChEMBL ou ChEMBLdb^{†††}: ChEMBL295433

A estrutura química numerada de orbifloxacino é apresentada na Figura 4.1.

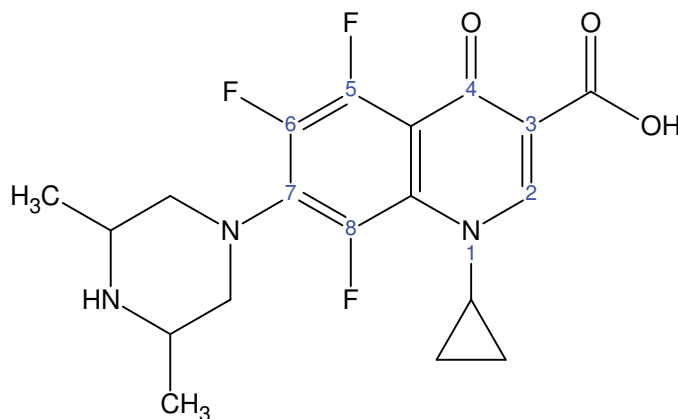


Figura 4.1. Estrutura química numerada de orbifloxacino.

4.2 Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) não oficial, padrão de trabalho, utilizada neste trabalho foi o orbifloxacino, Vetrinal[®] (Sigma-Aldrich), com teor declarado de 99,80%.

4.3 Amostra da forma farmacêutica comprimido

Foram utilizados comprimidos contendo 22,7 mg de orbifloxacino (teor rotulado), sob nome comercial de Orbax[®] e identificado pelo lote de número 004/07. Este medicamento é produzido pela Schering-Plough Canadá Inc. (Pointe-Claire, Canadá) e importado pela Schering-Plough Saúde Animal Ind. Com. Ltda. Os comprimidos foram adquiridos no mercado local.

^{§§}É um banco de dados de moléculas químicas e suas atividades em ensaios biológicos. O sistema é mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), um componente da *National Library of Medicine*, a qual faz parte do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos.

^{***}**UNIQUE Ingredient Identifier (UNII)** é um identificador alfanumérico ligados à estrutura molecular de uma substância e/ou informações descritivas pelo sistema de registros de substâncias da Food and Drug Administration (FDA).

^{†††}**Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes** é uma coleção de um banco de dados online que envolve genomas, vias enzimáticas e produtos químicos e biológicos.

^{†††}É um banco de dados de substâncias químicas de moléculas bioativas mantido pela *European Bioinformatics Institute* (EBI), baseado no *Wellcome Trust Genome Campus*, Hinxton, UK.

4.4 Equipamentos

Agitador de Tubos, Phoenix[®], modelo AP56
Analisador de umidade por infravermelho, Gehaka[®], modelo IV 2000
Aparelho de ponto de fusão, Stuart Scientific Melting Point Apparatus SMP3
Autoclave vertical, Phoenix[®]
Balança analítica, Mettler[®], modelo H10
Balança analítica, Shimadzu[®], modelo AUW220D (NZ)*
Banho de ultrassom, Elma[®], modelo S100 Elmasonic (NZ)*
Banho de ultrassom, Unique[®]
Câmara climática, Binder[®] (NZ)*
Câmara climática, Marconi[®], MA 835/UR
Coluna analítica Phenomenex[®] C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Coluna analítica SymmetryShield[®] RP18 Waters[®], 250 x 4,6 mm, 5 µm (NZ)*
Cromatógrafo a líquido, Shimadzu[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária (LC10AD), degaseificador online (DGU-14A), injetor automático com refrigeração (4 °C) (SIL-10AC), detector PDA (SPD-M20A) e forno de coluna (CTO-10S) (NZ)*
Cromatógrafo a líquido, Waters[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-VIS Waters 2487
Cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico
Desintegrador, Ética[®]
Dissolutor Erweka[®], modelo DT700 (NZ)*
Durômetro, Dr. Schleuniger Pharmatron[®], Modelo 6D Tablet Tester
Equipamento de análise térmica, TA Instruments[®], modelo SDT 2960
Espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu[®], modelo UV-1700 (NZ)*
Espectrofotômetro UV/VIS, Shimadzu[®], modelo UVmini-1240 (UV)*
Espectrofotômetro, Beckman[®], modelo DU[®] 530 (MICRO)*
Espectrofotômetro, Hitachi[®], U-2000 (VIS)*
Espectrofotômetro, Shimadzu[®], modelo FTIR-8300 (IV)*

*Equipamentos utilizados durante o período de doutorado sanduíche na Nova Zelândia; AnQual Labs, The University of Auckland – supervisão do Prof. Dr. Sanjay Garg.

*Equipamento utilizado no desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico na região do ultravioleta

*Equipamento utilizado no desenvolvimento e validação dos métodos microbiológicos – difusão em ágar e turbidimétrico

*Equipamento utilizado no ensaio qualitativo por espectrofotometria na região do visível

*Equipamento utilizado no ensaio qualitativo por espectrofotometria na região do infravermelho

Estufa bacteriológica, Odontobrás[®], modelo ECB 1.2

Estufa de esterilização, Nova Ética[®]

Forno LabServ[®], modelo Overlay 27 (NZ)*

Friabilômetro, Nova Ética[®]

Incubadora Shaker, Marconi[®], modelo MA420

LC-MS - Cromatógrafo a líquido, Shimadzu[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária (LC20AD), degaseificador online (DGU-20A5), injetor automático com refrigeração (4 °C) (SIL-20AC), detector PDA (SPD-M20A), módulo de comunicação (CBM-20A) e forno de coluna (CTO-20AC) acoplado ao espectrômetro de massas também da Shimadzu[®], modelo LCMS-2010EV, utilizando APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) como interface no modo positivo. A faixa de varredura das razões massa/carga (m/z) foi de 50 a 650. Nitrogênio foi usado como gás nebulizador com vazão de 1,5 L/min. A temperatura em CDL e para o *Heat block* foram ambos 400 °C. A voltagem do detector foi regulada em 1,5 kV e a corrente de interface foi de 38 µA. O volume injetado foi de 5 µL. O sistema operacional utilizado foi o LCMS Solutions *software* (Shimadzu[®]) (NZ)*

Membranas de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro, Sartorius[®]

Membranas de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro, Millipore[®] (NZ)*

Micropipetas, Boeco[®]

Paquímetro, Starret[®], modelo digital eletrônico série 727

Peagômetro digital, Micronal[®], modelo B474

Peagômetro Denver Instrument[®], modelo 215 (NZ)*

Placas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), com espessura de 0,20 mm, Alugram[®] SIL G/UV₂₅₄

Pré-coluna C₁₈ Phenomenex[®] (4 x 3 mm)

Seringa, Hamilton[®], 25 µL

4.5 Solventes e reagentes

Acetato de etila (Synth[®])

Ácido fórmico (Synth[®])

Acetonitrila (J.T. Baker[®])

Ácido fosfórico (Merck[®])

Acetonitrila grau CLAE (Merck[®])

Ácido perclórico (Synth[®])

Ácido acético (Merck[®])

Ágar Casoy

Ácido bórico (Merck[®])

Água ultrapura (Milli-Q[®])

Ácido clorídrico (Merck[®])

Anidrido acético (Synth[®])

Ácido clorídrico 0,01 M (pH 1,2)

Butanol (Synth[®])

Clorofórmio (Merck®)	Meio nº 11 de Grove-Randall (Merck®)
Diclorometano (Merck®)	Metanol (Merck®)
Dioxano (Synth®)	Metanol grau CLAE (Merck®, J.T. Baker®)
Etanol (Synth®)	<i>n</i> -butanol (Synth®)
Hexano (Synth®)	Peróxido de hidrogênio (Acros Organics®)
Hidróxido de amônio (Synth®)	Tampão acetato (pH 4,5)
Hidróxido de sódio (Merck®)	Tampão fosfato (pH 6,8)
Isobutanol (Synth®)	
Isopropanol (Synth®)	
Meio nº 1 de Grove-Randall (Merck®)	

4.6 Micro-organismos

Bacillus subtilis ATCC 9372 IAL 1027

Kocuria rhizophila ATCC 9341

Staphylococcus aureus ATCC 25923 IAL 1606

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 IAL 2150

5 ANÁLISE QUALITATIVA

5.1 Introdução

A pureza das substâncias utilizadas como referência é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Para tanto, materiais de referência bem caracterizados e com pureza documentada devem ser utilizados para o estudo de validação (ICH, 2005).

De acordo com a definição da OMS, padrões de referência farmacopeicos são produtos de uniformidade reconhecida, destinados ao uso em ensaios onde uma ou mais de suas propriedades será(ão) comparada(s) com a(s) da substância em exame. Possuem um grau de pureza adequado ao uso ao qual se destinam (FB 5, 2010).

A análise criteriosa de um medicamento envolve inúmeras avaliações que incluem desde a análise visual mais subjetiva até o completo estudo de estabilidade desta formulação. No controle de qualidade das formas farmacêuticas é necessária a realização de testes de identificação do fármaco além da sua quantificação. Estes testes são realizados através de métodos instrumentais (espectrofotometria na região do UV/VIS, cromatografia líquida) e não instrumentais (como a cromatografia em camada delgada).

5.2 Características organolépticas de orbifloxacino SQR e comprimidos

As características organolépticas constituem bom indicativo para avaliar a substância ativa e a forma farmacêutica sob ponto de vista de alterações na qualidade do produto.

5.2.1 Método

A substância química de referência e os comprimidos íntegros de orbifloxacino foram observados quanto ao aspecto, cor e odor.

5.2.2 Resultados e discussão

O orbifloxacino SQR apresenta-se sob a forma de pó, com odor imperceptível e cor amarelo pálido (Figura 5.1).



Figura 5.1. Pó da substância química de referência de orbifloxacino.

As características organolépticas observadas na SQR estão de acordo com a literatura que indica o orbifloxacino como sendo um pó cristalino branco a levemente amarelado (O'NEIL, 2006; BP, 2011b).

Os comprimidos de orbifloxacino apresentam coloração verde claro, superfície polida (brilhante) e marcações bem visíveis (números 11/41 e vinco) (Figura 5.2).



Figura 5.2. Comprimido íntegro de orbifloxacino (Orbax[®]).

5.3 Determinação do peso médio dos comprimidos de orbifloxacino

A verificação da variação de peso das unidades de determinado lote de um produto farmacêutico é indicativo importante da homogeneidade e, conseqüentemente, da variação do teor da substância ativa contida no mesmo (SAKR, 1972).

O teste de determinação do peso médio se aplica a formas farmacêuticas sólidas. As pesagens são feitas em balanças de sensibilidade adequada.

Na Tabela 5.1 são apresentados os limites de variação permitidos pela Farmacopeia Brasileira, sendo admitido não mais que duas unidades em desacordo com o estabelecido, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das percentagens indicadas (FB 5, 2010).

Tabela 5.1. Variação de peso de comprimidos segundo a FB 5 (2010)

Formas farmacêuticas em dose unitária	Peso médio (mg)	Limites de variação (%)
Comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes,	até 80 ou menos	± 10,0
comprimidos sublinguais,	mais que 80 e menos que 250	± 7,5
comprimidos vaginais e pastilhas	250 ou mais	± 5,0

5.3.1 Método

A determinação do peso médio foi realizada conforme a FB 5 (2010). Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos escolhidos aleatoriamente dentro do mesmo lote.

5.3.2 Resultados e discussão

A Tabela 5.2 relaciona o peso individual de vinte comprimidos com o peso médio e o desvio padrão relativo percentual (DPR%).

Tabela 5.2. Relação do peso individual dos comprimidos de orbifloxacino

<i>Comprimido</i>	<i>Peso individual (mg)</i>	<i>Peso médio (mg)</i>	<i>DPR (%)</i>
1	296,2		
2	290,8		
3	297,6		
4	293,5		
5	290,9		
6	299,8		
7	309,0		
8	292,6		
9	296,2		
10	295,7		
11	294,1	294,76	1,57
12	289,1		
13	292,0		
14	296,7		
15	292,7		
16	290,6		
17	289,6		
18	299,1		
19	297,3		
20	291,6		

A Figura 5.3 ilustra as variações de peso de vinte comprimidos de orbifloxacino.

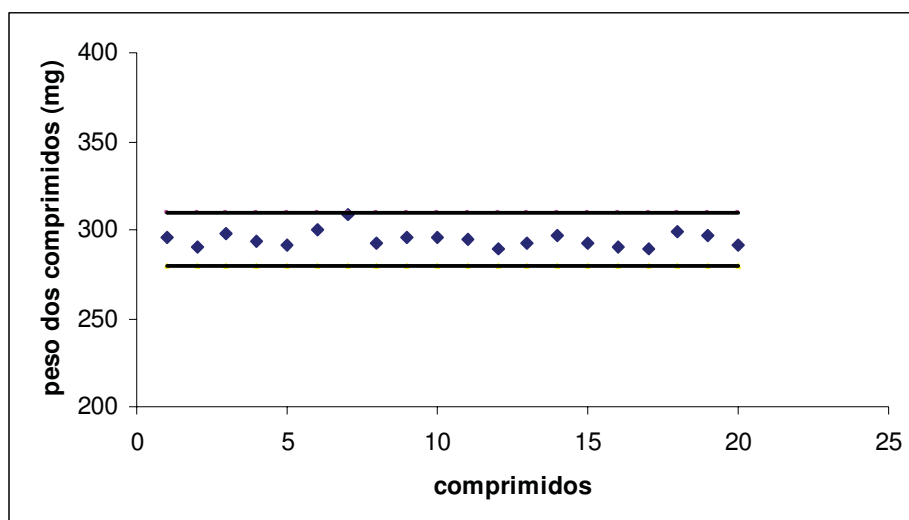


Figura 5.3. Variações de peso de vinte comprimidos de orbifloxacino.

As variações de peso dos comprimidos de orbifloxacino encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010), variação permitida de $\pm 5,0\%$, entre o peso máximo de 309,54 mg e o peso mínimo de 280,06 mg. O desvio padrão relativo percentual apresentou valor aceitável.

5.4 Desintegração

A desintegração é definida como o estado no qual nenhum resíduo do comprimido, salvo fragmentos de revestimento, permanece na tela metálica do aparelho de desintegração (FB 5, 2010). No entanto, uma rápida desintegração da forma farmacêutica não significa que o fármaco será absorvido, pois ele deverá estar solubilizado no meio para que ocorra a absorção. Ainda assim, a avaliação deste parâmetro é importante, uma vez que, caso não haja desintegração, provavelmente, o fármaco não poderá ser absorvido pelo organismo e, portanto, não exercerá a ação terapêutica desejada.

5.4.1 Método

Determinou-se o tempo de desintegração em água, mantida a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando seis unidades do produto. Considerou-se como resultado o tempo em minutos e segundos em que foi observada a desintegração total de todos os comprimidos (FB 5, 2010).

5.4.2 Resultados e discussão

Todos os comprimidos se desintegraram em até 5 minutos e 43 segundos. Este resultado está de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira (2010) que preconiza o tempo limite de 30 minutos para desintegração de todos os comprimidos.

5.5 Determinação da resistência mecânica dos comprimidos de orbifloxacino

Os testes de resistência mecânica, tais como dureza e friabilidade, são considerados oficiais dentro do contexto legal da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010), constituindo-se em elementos úteis na avaliação da qualidade integral dos comprimidos.

Estes testes visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção (FB 5, 2010).

5.5.1 Dureza

Toda forma farmacêutica deve apresentar resistência mecânica adequada tendo em vista as operações de embalagem, transporte e manuseio. No caso da forma farmacêutica comprimido, esta resistência é dada pela dureza ou capacidade do comprimido de opor-se à ruptura. A determinação deste parâmetro é importante, tendo em vista sua possível relação com a desintegração e, conseqüentemente, com a dissolução da substância ativa (HIGUCHI e HIESTAND, 1963).

5.5.1.1 Método

Submeteram-se, individualmente, dez comprimidos a ação do aparelho durômetro, medindo em Newton a força necessária para esmagá-los (FB 5, 2010).

5.5.2 Friabilidade

O teste de friabilidade permite determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. O teste se aplica, unicamente, a comprimidos não revestidos (FB 5, 2010). A friabilidade de um comprimido está relacionada com a resistência deste à abrasão, oriunda de processos de embalagem, do transporte e manuseio do medicamento (BURLINSON, 1971). Em geral, este parâmetro está associado à dureza do comprimido. Obtendo-se uma dureza elevada, a friabilidade será reduzida e vice-versa (SAKR, 1972).

5.5.2.1 Método

Para a determinação da friabilidade pesaram-se vinte comprimidos que foram colocados no aparelho friabilômetro e submetidos a 100 rotações por 5 minutos. Removeram-se os resíduos de poeira e pesou-se novamente. A diferença entre o peso inicial e o peso final dos comprimidos representou a friabilidade que foi expressa em percentagem (FB 5, 2010).

5.5.3 Resultados e discussão

A Tabela 5.3 apresenta os valores obtidos no teste de dureza.

Tabela 5.3. Dureza dos comprimidos de orbifloxacino

<i>Comprimido</i>	<i>Dureza (N)</i>	<i>Dureza média (N)</i>	<i>DPR (%)</i>
1	114,8		
2	122,6		
3	122,6		
4	114,8		
5	124,6		
6	125,6	122,5	3,88
7	120,7		
8	126,5		
9	123,6		
10	129,5		

A Tabela 5.4 apresenta os valores obtidos no teste de friabilidade.

Tabela 5.4. Valores obtidos no teste de friabilidade

	<i>Resultado^a</i>
Peso inicial (mg)	5,90
Peso final (mg)	5,90
Perda (%)	0,0

^aValor médio de 20 comprimidos

Através dos resultados obtidos pelo teste de dureza e friabilidade pode-se observar que os comprimidos apresentam alta dureza e baixa ou nenhuma friabilidade, uma vez que não houve perda.

Segundo a FB 5 (2010), a dureza mínima aceitável é de 30 N para a medida realizada com aparelho movido por bomba de ar e para a friabilidade consideram-se

aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso, portanto os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

5.6 Determinação do intervalo de fusão

O ponto de fusão é uma análise indicativa de pureza de compostos, pois cada substância apresenta um intervalo de fusão característico e a presença de qualquer outra substância altera o resultado. A simplicidade, rapidez e baixo custo do equipamento são algumas das vantagens da aplicação da medida do ponto de fusão.

5.6.1 Método

Preencheram-se tubos capilares de vidro com uma das extremidades seladas até cerca de 3,0 mm de altura com orbifloxacino SQR (seção 4.2). Colocou-se o tubo capilar no aparelho para a determinação do ponto de fusão e iniciou-se o aquecimento a temperatura de 10 °C/min. A temperatura na qual a coluna da amostra fundiu-se sobre a parede do tubo em qualquer ponto, foi definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra tornou-se completamente líquida, foi definida como o final da fusão ou o ponto de fusão (FB 5, 2010). As determinações foram realizadas em triplicata.

5.6.2 Resultados e discussão

Como pode ser verificado na Tabela 5.5, o intervalo de fusão médio encontrado para o orbifloxacino, 260,2 - 262,2 °C, está de acordo com o intervalo descrito para o fármaco no The Index Merck (O'NEIL, 2006), com o laudo de análise do fornecedor e com os resultados encontrados pela análise térmica.

Tabela 5.5. Faixas de fusão do orbifloxacino

<i>Substância</i>	<i>Especificação¹</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>Valor obtido^a</i>	<i>Valor obtido^b</i>
ORBI	259 – 260 °C	263,1 – 263,6 °C	260,2 – 262,2 °C	265 – 282 °C (270 °C)

¹Index Merck (O'NEIL, 2006); ^aAparelho Stuart Scientific Melting Point apparatus SMP3; ^bTG/DTA

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a pureza da SQR, entretanto, esta técnica por si só não possibilita a conclusão definitiva da identidade do composto, sendo necessária a utilização de testes complementares de identificação.

5.7 **Análise térmica de orbifloxacino***

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (MACKENZIE, 1979; IONASHIRO e GIOLITO, 1980; GIOLITO e IONASHIRO, 1988).

A termogravimetria (TG) é uma técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Já na análise térmica diferencial (DTA) o que se acompanha é a variação na temperatura da amostra, em relação a um material que não apresenta variação de absorção ou liberação de calor (termicamente inerte), a referência (IONASHIRO, 2004).

As curvas obtidas na análise térmica podem fornecer informações referentes à estabilidade térmica e à pureza das substâncias. A estabilidade térmica permite a determinação da capacidade de uma substância de manter suas propriedades sob variações térmicas.

5.7.1 **Método**

As curvas da análise térmica - termogravimetria/análise térmica diferencial (TG/DTA) foram obtidas a partir de termobalança utilizando cadinho de alumina, massa de amostra de aproximadamente 5,0 mg, atmosfera dinâmica de ar (100 mL/min) e razão de aquecimento de 20 °C/min até 800 °C.

5.7.2 **Resultados e discussão**

A Figura 5.4 mostra a curva TG/DTA obtida para orbifloxacino SQR. Observou-se que este composto é estável até 265 °C, temperatura na qual começa a sua fusão com posterior decomposição. O orbifloxacino SQR perde massa em duas etapas pela TG (verde), mas pela DTA (azul), perde em 5 etapas sobrepostas. Todo composto foi carbonizado.

A técnica de análise térmica chamada calorimetria exploratória diferencial (DSC) não pôde ser utilizada para a avaliação de orbifloxacino, uma vez que as moléculas de flúor presentes na estrutura química deste fármaco atacam o cadinho e todo o sistema de prata que compõe o equipamento.

*As análises térmicas foram realizadas no laboratório de Análise Térmica Ivo Giolito (LATIG) do Instituto de Química da UNESP em Araraquara – SP sob orientação do Prof. Dr. Massao Ionashiro

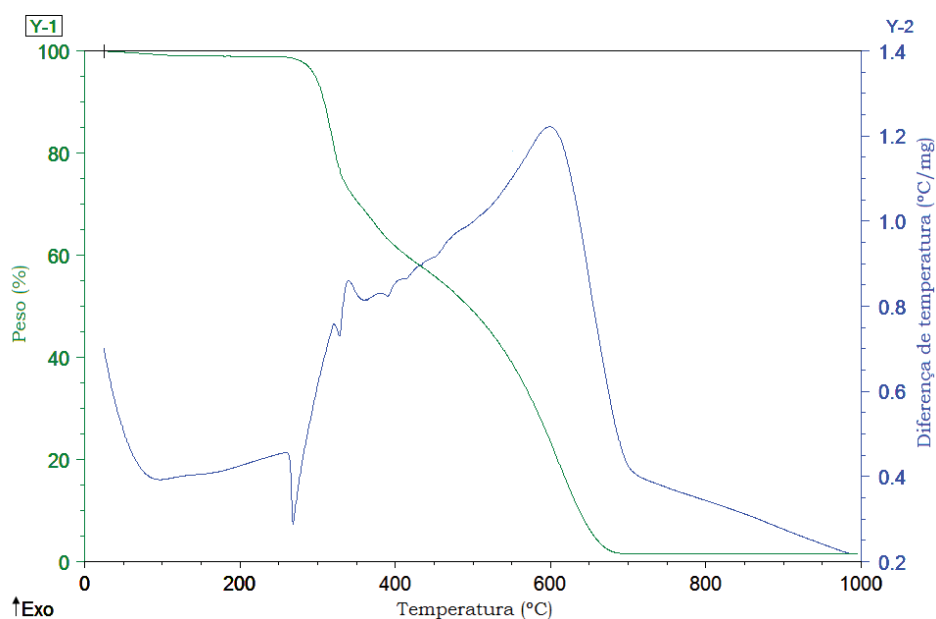


Figura 5.4. Curvas TG/DTA de orbifloxacino SQR.

Similarmente, a Figura 5.5 mostra a curva obtida por análise térmica (TG/DTA) para o orbifloxacino amostra. Esta por sua vez apresenta água em sua composição, sendo perdida até 150 °C. Em seguida, percebeu-se a decomposição do fármaco e excipientes, o que mascarou a fusão. Entretanto, realizando-se teste complementar, aquecendo-se certa quantidade da amostra em tubo de ensaio, observou-se visualmente a fusão. Todo o composto foi carbonizado.

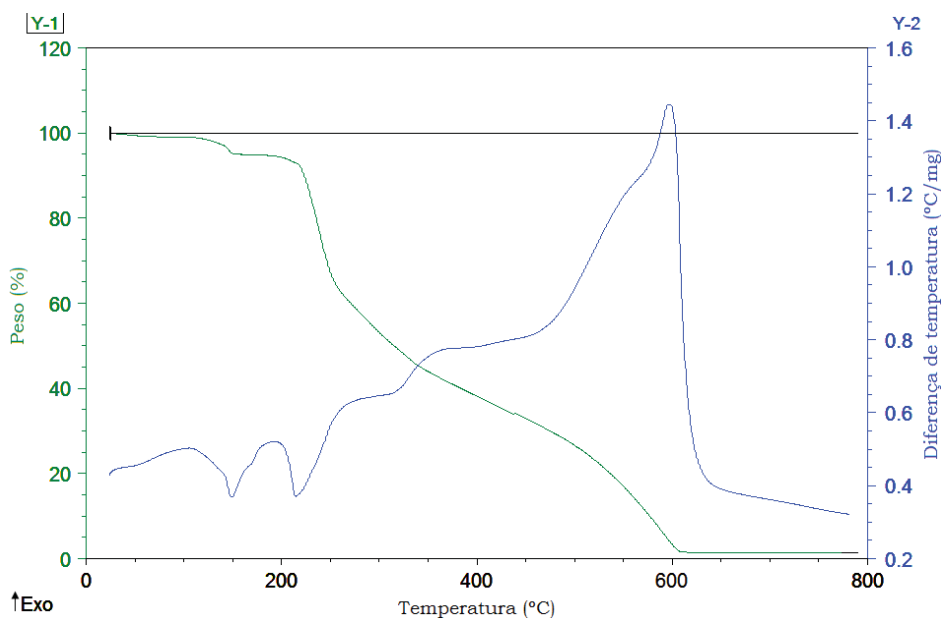


Figura 5.5. Curvas TG/DTA de orbifloxacino amostra.

Deve-se salientar que as respectivas curvas mostram um pico endotérmico referente à fusão do orbifloxacino, evidenciando sua presença na forma farmacêutica.

O comportamento semelhante verificado através das curvas de TG e DTA para o orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido, quando comparado àquele observado através das respectivas curvas para a substância química de referência, nas mesmas condições, comprova a autenticidade da amostra.

5.8 Determinação da umidade – método gravimétrico

O teor de água foi estudado pelo método gravimétrico (FB 5, 2010). Tal método consiste em secar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada, geralmente a 105 °C e por um determinado tempo (geralmente 2 horas).

Segundo a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, a expressão *dessecação até peso constante* significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após uma hora de secagem adicional nas condições específicas (FB 5, 2010).

5.8.1 Método

O orbifloxacino foi exatamente pesado em equipamento contendo infravermelho automático e seco até peso constante à temperatura de 105 °C.

As análises foram realizadas em triplicata. As determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela FB 5 (2010).

5.8.2 Resultados e discussão

Os resultados obtidos demonstraram total ausência de umidade em orbifloxacino SQR, resultado que corrobora com aqueles obtidos na análise térmica (seção 5.7).

5.9 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma técnica flexível através da qual podem-se identificar substâncias, impurezas e produtos de degradação. Apresenta como vantagens ser de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Esta técnica de identificação baseia-se na comparação de valores de R_f (índice de retenção de um composto) obtidos quando o fármaco é cromatografado juntamente com a substância de referência (WATSON, 2005).

5.9.1 Método

As placas utilizadas para identificação do fármaco foram cromatofolhas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), com espessura de 0,20 mm, adquiridas comercialmente e ativadas em estufa a 105 °C por uma hora.

- Para o preparo da solução padrão, pesaram-se 5,0 mg de orbifloxacino SQR que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol, para obtenção de solução com concentração final de 100,0 µg/mL.

- Para a solução degradada, parte da solução padrão descrita acima, foi exposta à luz UVC direta para degradação por 30 dias.

- Para o preparo da solução amostra, pesou-se quantidade equivalente a 5,0 mg de orbifloxacino a partir do pó dos comprimidos deste fármaco e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de metanol. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos para garantir sua total solubilização e completou-se com metanol. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, obtendo-se a concentração teórica de 100,0 µg/mL.

Foram testados vários sistemas de fases móveis com soluções de orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada em luz UVC utilizando placas de sílica gel (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Fases móveis utilizadas na CCD para caracterização de orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada em luz UVC

Sistema	Fase móvel
1	ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25, v/v/v)
2	clorofórmio: metanol (80:20, v/v)
3	clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:7:1, v/v/v)
4	ácido acético 5%: metanol: acetonitrila (10:5:5, v/v/v)
5	clorofórmio: metanol: ácido fórmico: água (16:7:3:0,5, v/v/v/v)
6	clorofórmio: metanol: ácido fórmico: água (33:7:3:0,5, v/v/v/v)
7	diclorometano: metanol: ácido acético 5%: água (3:3:1:3, v/v/v/v)
8	diclorometano: metanol: hidróxido de amônio (6:4:2, v/v/v)
9	diclorometano: metanol: acetonitrila: ácido acético 5%, v/v (6:4:2:2, v/v/v/v)
10	diclorometano: metanol: acetonitrila: ácido acético 5%, v/v (6:4:4:2, v/v/v/v)
11	diclorometano: metanol: hidróxido de amônio: acetonitrila (4:4:2:1, v/v/v/v)
12	diclorometano: metanol: hidróxido de amônio: acetonitrila (6:4:2:1, v/v/v/v)
13	diclorometano: metanol: hidróxido de amônio: ácido fórmico (10:10:2:1, v/v/v/v)
14	hexano: acetato de etila (10:10, v/v)
15	ácido acético 5%: metanol: acetonitrila (14:3:3, v/v/v)
16	isopropanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v)
17	metanol: acetato de etila (85:15, v/v)
18	metanol: acetonitrila (70:30, v/v)
19	metanol: hexano (50:50, v/v)
20	metanol: isopropanol (80:20, v/v)
21	<i>n</i> -butanol: ácido acético: água (40:10:50, v/v/v)
22	ácido acético 1%: metanol (70:30, v/v)
23	ácido acético 5%: metanol (70:30; v/v)
24	ácido acético 5%: metanol (75:25; v/v)
25	ácido acético 5%: metanol (80:20; v/v)

Para o ensaio da CCD procedeu-se, inicialmente, à saturação da cuba cromatográfica com o sistema de fase móvel. Com auxílio de seringa de 25 µL foram transferidas as soluções de orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada para as placas procedendo-se a cromatografia.

Após a migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, deixando o solvente evaporar. As placas foram reveladas na câmara UV (254 nm), para a

comparação das manchas quanto à forma, posição e tamanho. Foi determinado o Rf do fármaco em cada análise.

5.9.2 Resultados e discussão

As fases móveis foram testadas de acordo com as características de polaridade do orbifloxacino e de sua solubilidade, além da verificação de fases móveis utilizadas para outras quinolonas.

A Tabela 5.7 mostra os Rfs dos diversos sistemas solventes empregados na análise de orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada.

As melhores fases móveis encontradas para a separação e identificação de orbifloxacino nos comprimidos e dos produtos de degradação do orbifloxacino foram os sistemas 3, 5 e 6, compostos pela mistura de solventes polares e apolares, estando os solventes apolares em maior proporção. Os sistemas 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 16 e 21 são ótimas opções para a identificação de orbifloxacino na forma farmacêutica. O fármaco exposto ao sistema 8 mostrou migração excessiva e os sistemas 14, 17, 18, 19 e 20 não mostraram migração com as respectivas fases móveis utilizadas. Apesar de poderem ser utilizados, os sistemas 1, 4, 15 e 22 devem ser evitados, já que as manchas nos cromatogramas apresentaram cauda. Com os sistemas 12, 23, 24 e 25, as manchas do padrão demonstraram tamanho e forma diferentes da mancha da amostra, além dos três últimos sistemas exibirem cauda, assim, também não são fases móveis aconselhadas para a identificação de orbifloxacino.

Tabela 5.7. Valores de Rf obtidos com os sistemas de fases móveis testados para orbifloxacino SQR, amostra e solução degradada

<i>Sistema solvente</i>	<i>ORBI SQR (Rf)</i>	<i>ORBI comp. (Rf)</i>	<i>ORBI DEG. (Rf)</i>
1	0,600	0,612	0,594/0,700
2	0,222	0,222	0,222*
3	0,560	0,560	0,377/0,899
4	0,658	0,664	0,667/0,772
5	0,698	0,692	0,629/0,918
6	0,868	0,862	0,531/0,992
7	0,072	0,078	0,238
8	0,914	0,914	0,858/0,914
9	0,765	0,765	0,778/0,889
10	0,215	0,218	0,222*
11	0,692	0,692	0,577/0,692
12	0,743	0,728	0,728/0,657
13	0,829	0,835	0,888*
14	**	**	**
15	0,616	0,604	0,597
16	0,626	0,628	0,629/0,767
17	0,110**	0,093**	0,099**
18	0,128**	0,100**	0,072**
19	0,043**	0,036**	0,036**
20	0,062**	0,055**	0,048**
21	0,250	0,269	0,281*
22	0,480	0,480	0,480/0,536
23	0,557	0,528	0,500*
24	0,493	0,437	0,437*
25	0,544	0,515	0,500*

*Não houve separação dos produtos de degradação; **Não migrou

A seguir são apresentadas as fotografias das cromatofolhas em cada sistema de fase móvel (Figura 5.6).



Figura 5.6. Cromatografias em camada delgada dos sistemas de fases móveis testados descritos na seção 5.9.1.

5.10 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria no infravermelho médio (MIR – *medium infrared*) é um ensaio de identificação por excelência sendo capaz de distinguir substâncias com diferenças estruturais. Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante) a região compreendida entre 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio) é a mais empregada para fins de identificação (FB 5, 2010). Esta técnica caracteriza-se por provocar vibrações de átomos ou grupos de átomos, que podem ter amplitudes e velocidades diferentes. Estas vibrações ocorrem em torno das ligações covalentes que unem os átomos ou grupos de átomos (WATSON, 2005).

A partir dos espectros podem-se identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes na amostra (PAVIA *et al.*, 2001; WATSON, 2005).

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

5.10.1 Método

Os espectros foram obtidos com 1,0 mg de orbifloxacino SQR e orbifloxacino pó dos comprimidos (seções 4.2 e 4.3, respectivamente), utilizando-se pastilhas de 150 mg de brometo de potássio dessecado a 105 °C durante duas horas.

5.10.2 Resultados e discussão

A Figura 5.7 apresenta o espectro na região do infravermelho médio de orbifloxacino SQR.

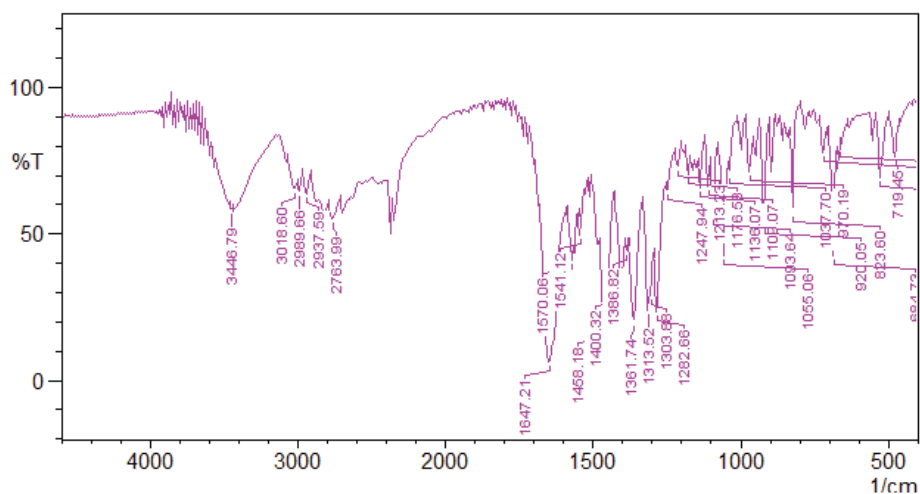


Figura 5.7. Espectro de orbifloxacino SQR na região do infravermelho.

A Figura 5.8 apresenta o espectro na região média do infravermelho de orbifloxacino amostra.

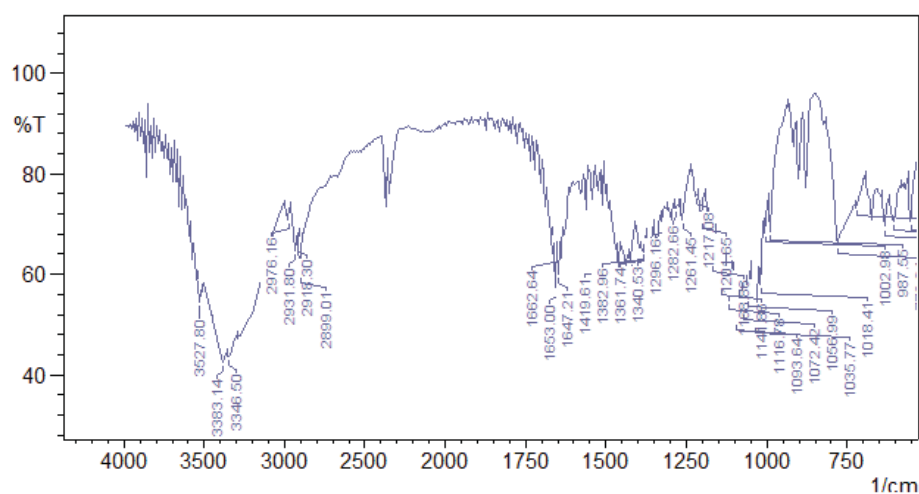


Figura 5.8. Espectro de orbifloxacino amostra na região do infravermelho.

A Figura 5.9 apresenta a sobreposição dos espectros na região média do infravermelho de orbifloxacino SQR e amostra.

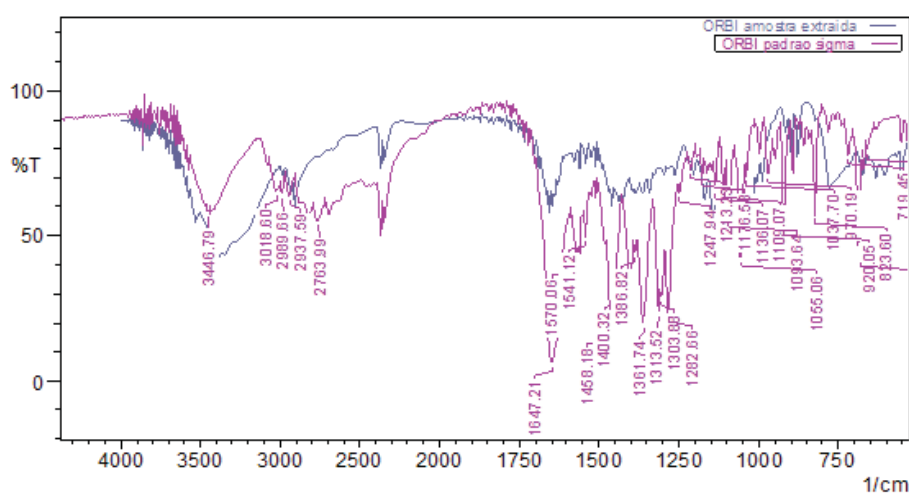


Figura 5.9. Sobreposição dos espectros de orbifloxacino SQR e amostra na região do infravermelho.

As atribuições das bandas características foram encontradas na literatura pelos trabalhos de outras quinolonas.

A banda na região de 3446 cm^{-1} refere-se às vibrações -OH do radical carboxila, enquanto as bandas entre 3018 e 2763 cm^{-1} podem ser atribuídas às deformações axiais de ligação C-N da piridina. A banda de forte intensidade na região

de 1700 cm^{-1} pode ser referente ao radical C=O do ácido carboxílico. Na faixa abaixo de 1000 cm^{-1} encontram-se as deformações angulares pertencentes ao radical -CH fora do plano do anel aromático.

As deformações das bandas indicadas nos espectros na região de IV estão melhor relacionadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Bandas do espectro de orbifloxacino na região de infravermelho com as respectivas deformações

Banda (cm^{-1})	Deformação	Referência
3600-3250	Deformação axial dos grupamentos N-H e O-H	MAZUEL, 1991; BRION <i>et al.</i> , 1992; EV, 1997; MARONA, 2000; BONILLA, 2004
3000-2200	Deformação axial C-H da piridina	BONILLA, 2004
2963	Deformação axial de C-H assimétrico em metila e etileno do grupo piperazínico	MAZUEL, 1991; MARONA, 2000
1716-1705	Deformação axial do grupamento C=O (carboxila)	BRION <i>et al.</i> , 1992; EV, 1997; MARONA, 2000; BONILLA, 2004
1642-1622	Deformação axial de C=O em C4 (cetona)	BRION <i>et al.</i> , 1992; EV, 1997; MARONA, 2000
1460/1481	Deformação C-N	MAZUEL, 1991; EV, 1997
1450-1439	Deformação axial de C-H da ciclopropila, de C-N e de C-C do anel quinolínico	MARONA, 2000; BONILLA, 2004
1290/1260	Deformação axial de C-F e C-O do ácido carboxílico	MAZUEL, 1991; EV, 1997; MARONA, 2000
962	Deformação angular de CH ₂ da ciclopropila	MARONA, 2000
725-800	Deformação angular de C-C aromático	BONILLA, 2004
449	Deformação angular de C-C do anel aromático	MARONA, 2000

Conforme observado nos dados da Tabela 5.8 e na Figura 5.9, ainda que as intensidades difiram um pouco, os dois espectros na região de IV, tanto para orbifloxacino SQR quanto para orbifloxacino amostra apresentaram as bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química das moléculas das fluorquinolonas. Além disto, os espectros foram praticamente idênticos. Deste modo, fica confirmado o propósito desta técnica, que é a identificação da molécula por verificação das bandas características e comparação com um padrão de referência.

5.11 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A identificação de um fármaco pode ser feita através da análise do seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200-400 nm). Com a utilização de alguns solventes (água, metanol, ácido acético 5%, ácido clorídrico 0,5 M, hidróxido de sódio 0,1 M), visou-se observar as bandas de absorção máxima de orbifloxacino, assim como a influência do pH em suas características de absorção.

5.11.1 Método

A substância química de referência (SQR) e amostras da forma farmacêutica comprimido utilizadas neste trabalho estão descritas no Capítulo 4, seções 4.2 e 4.3, respectivamente.

- Para o preparo da solução padrão, pesaram-se 5,0 mg de orbifloxacino SQR que foi transferido para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com ácido clorídrico 0,5 M, para obtenção de solução com concentração final de 100,0 µg/mL.
- Para o preparo da solução amostra, pesou-se quantidade equivalente a 5,0 mg de orbifloxacino, a partir do peso médio dos comprimidos, e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL com auxílio do mesmo solvente.

Prepararam-se todas as soluções de orbifloxacino SQR e amostra em ácido clorídrico 0,5 M, pois somente neste solvente a extração do fármaco da forma farmacêutica foi satisfatória, como pode ser observado na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Taxa de extração de orbifloxacino da forma farmacêutica comprimido

Solvente	Taxa de orbifloxacino extraído (%) [*]
Água	≈ 78
Etanol	≈ 68
Etanol: água (50:50, v/v)	≈ 87
Metanol	≈ 89
HCl 0,1 M	≈ 90
HCl 0,5 M	≈ 102
NaOH 0,1 M	≈ 12

^{*}As soluções foram sonicadas por 30 minutos.

As soluções posteriores foram preparadas a partir da solução inicial em ácido clorídrico 0,5 M com concentração de 100,0 µg/mL. Os solventes utilizados para a segunda diluição foram: água, metanol, hidróxido de sódio 0,1 M, ácido acético 5% e o próprio ácido clorídrico 0,5 M. As soluções, na concentração de 10,0 µg/mL, foram analisadas entre 200 e 400 nm, para obtenção dos espectros.

5.11.2 Resultados e discussão

Na Tabela 5.10 são apresentados os valores de absorção e os comprimentos de onda determinados para a solução de orbifloxacino SQR, 10,0 µg/mL, em diferentes solventes.

Tabela 5.10. Comprimento de onda e absorção de orbifloxacino em diferentes solventes

<i>Solvente</i>	<i>Comprimento de onda (λ) (nm)</i>	<i>Absorção</i>
Água	290	0,9934
Metanol	291	1,0313
Hidróxido de sódio 0,1 M	288	1,4901
Ácido acético 5%	290	1,1724
Ácido clorídrico 0,5 M	290	1,1888

Nas Figuras 5.10 a 5.14 são apresentados os espectros de orbifloxacino SQR nos diferentes solventes.

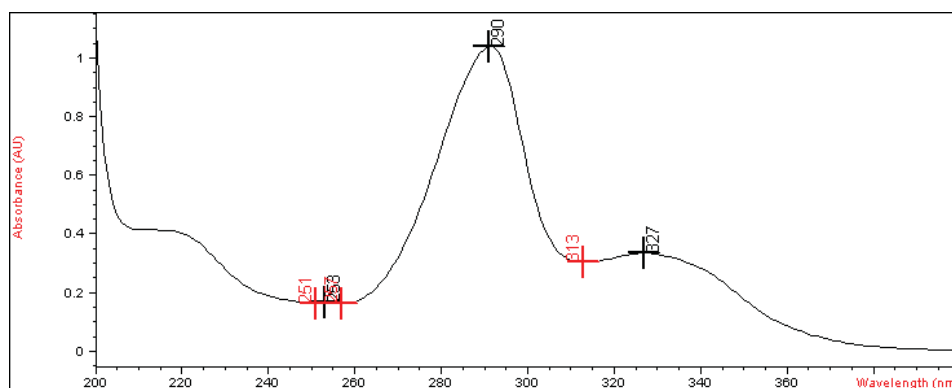


Figura 5.10. Espectro de absorção da solução de orbifloxacin SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.

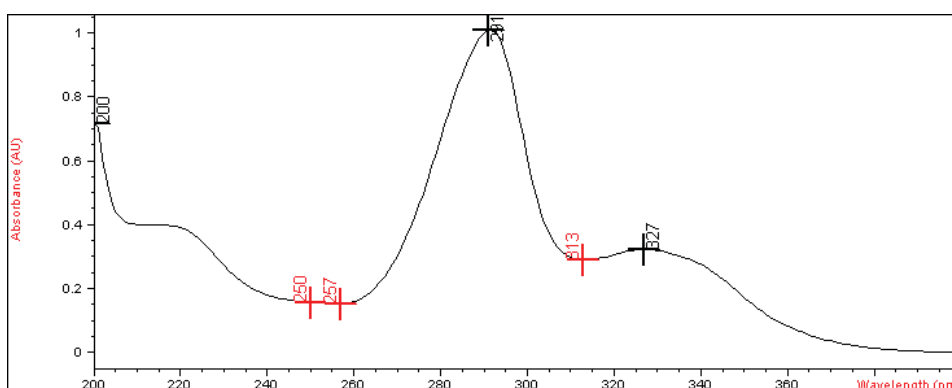


Figura 5.11. Espectro de absorção da solução de orbifloxacin SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente.

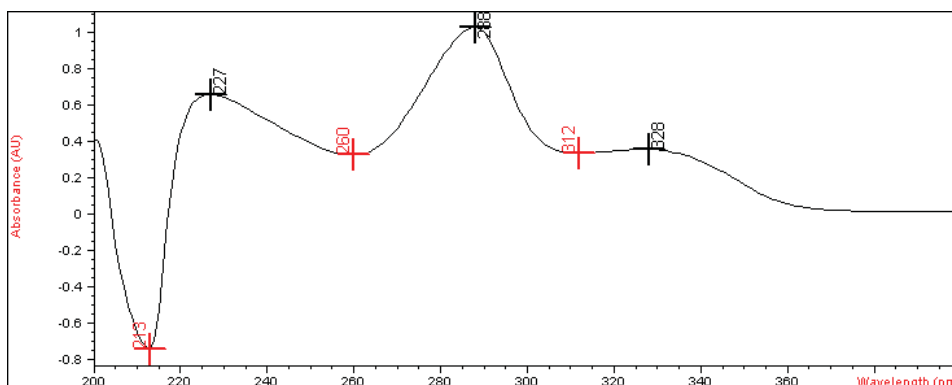


Figura 5.12. Espectro de absorção da solução de orbifloxacin SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.

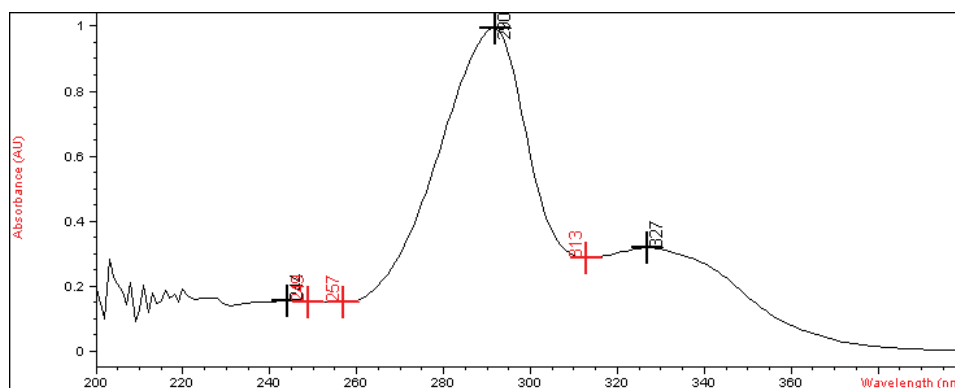


Figura 5.13. Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$, na região do ultravioleta, utilizando ácido acético 5% como solvente.

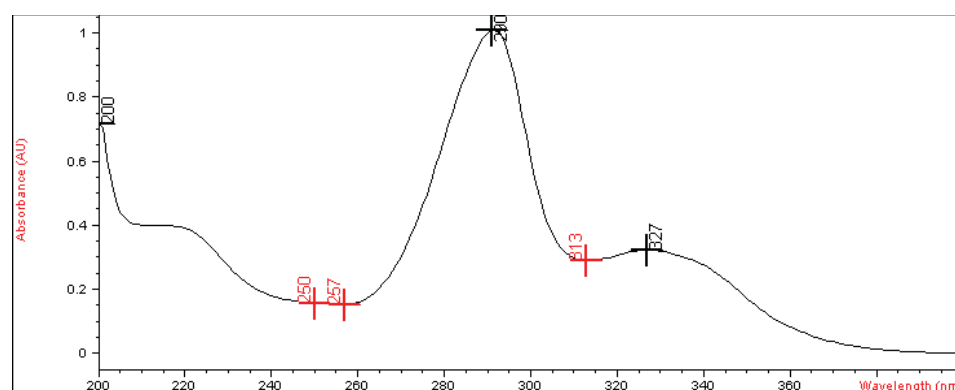


Figura 5.14. Espectro de absorção da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$, na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente.

A absorção molecular na região do ultravioleta do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula, assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes no espectro (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Como observado nos espectros, a absorção de orbifloxacino em todos os solventes se deu de forma regular, exceto utilizando hidróxido de sódio 0,1 M. Nesse solvente pode ter ocorrido a degradação da molécula de orbifloxacino ou a ionização do grupo próximo ao anel quinolônico (cromóforo).

Para a análise quantitativa, optou-se pelo ácido clorídrico 0,5 M como solvente uma vez que o fármaco apresenta maior absorvância neste solvente, além da taxa de extração do fármaco ser a melhor nesta solução.

5.12 Espectrofotometria de absorção na região do visível (VIS)

A análise colorimétrica é a determinação quantitativa de uma substância colorida ou complexo colorido que tem a capacidade de absorver a luz. Uma solução parece colorida quando ela transmite ou absorve somente parte da radiação do espectro visível.

Os ensaios colorimétricos são simples e acessíveis e fornecem um meio prático para monitorar rapidamente a qualidade dos fármacos em áreas com recursos escassos.

5.12.1 Reação com vermelho congo

O orbifloxacino reage com o corante vermelho congo por pareamento iônico. Nesta reação, o anel piperazínico (grupo amina), na sua forma protonada, interage como um local catiônico para a ligação do corante aniônico, como o vermelho congo, e assim, produzem o complexo colorido de vermelho que possui absorção em comprimento de onda característico ($[VC] + [ORBI] \rightarrow [VC][ORBI]^+$).

Desta maneira, este método pode ser utilizado para a identificação de orbifloxacino.

5.12.1.1 Método

Em balão volumétrico âmbar de 10 mL adicionou-se alíquota de 1,0 mL da solução de orbifloxacino SQR (seção 4.2) em metanol com concentração de 500 µg/mL, em seguida 5 mL de tampão universal pH 3,5 foram adicionados. Volume de 0,6 mL de solução reagente de vermelho congo $2 \times 10^{-3} M$ foi acrescentado e o volume do balão foi completado com o mesmo tampão para obtenção de solução com concentração final de 50,0 µg/mL. A leitura foi realizada após 20 minutos, em espectrofotômetro contra branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

A solução estoque de vermelho congo ($2 \times 10^{-3} M$) foi preparada por dissolução de apropriada quantidade do corante em 10 mL de metanol seguido pela diluição com água em balão volumétrico de 100 mL.

O tampão Universal Britton-Robinson (BR) foi preparado adicionando-se 2,3 mL de ácido acético, 2,473 g de ácido bórico e 2,30 mL de ácido fosfórico em 1 L de água. Para o ajuste de pH foi utilizado hidróxido de sódio 0,02 M.

5.12.1.2 Resultados e discussão

A Figura 5.15 mostra o espectro de absorção obtido para o produto resultante da reação de orbifloxacino SQR com o reagente vermelho congo.

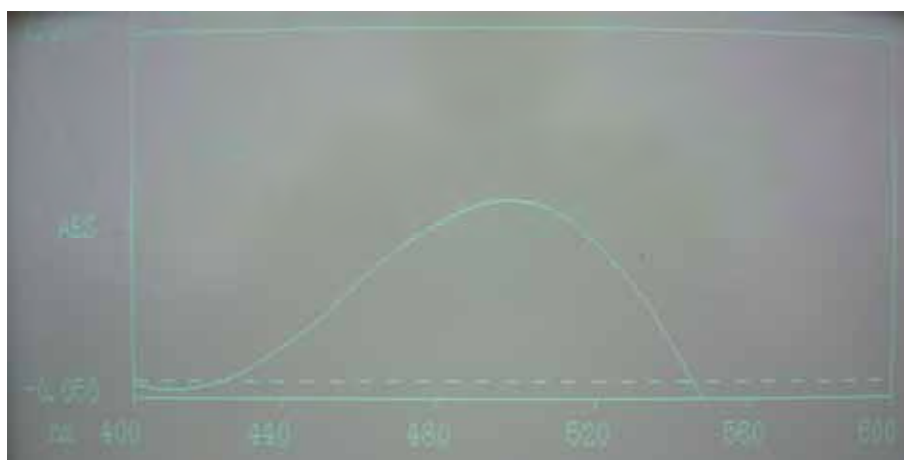


Figura 5.15. Espectro de absorção do produto gerado pela reação de orbifloxacino SQR (50,0 µg/mL) com o reagente vermelho congo na região do visível.

Os testes preliminares revelaram que o orbifloxacino reage com o vermelho congo gerando um complexo de pareamento iônico solúvel, por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, exibindo absorção máxima em 500 nm.

5.12.2 Reação com cloreto férrico

A reação entre o ferro (III) e o orbifloxacino é uma reação rápida, na qual, possivelmente, o Fe^{3+} entra em contato com o ácido carboxílico adjacente ao grupo ceto na posição 3 e 4, respectivamente, formando-se assim um anel de 6 membros, como representado na Figura 5.16.

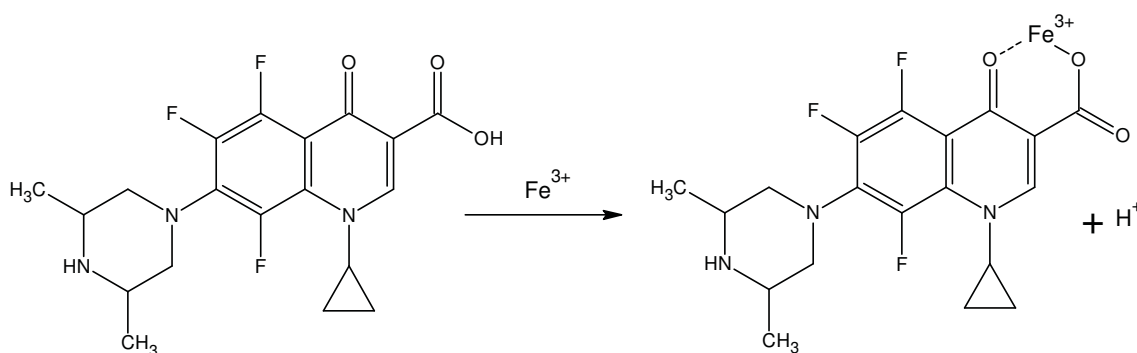


Figura 5.16. Reação do ferro (III) com orbifloxacino.

5.12.2.1 Método

Em balão volumétrico âmbar de 10 mL, adicionou-se alíquota de 4,0 mL da solução de orbifloxacino SQR (100 µg/mL) (seção 4.2) em água e 2,0 mL de solução reagente de cloreto férrico $1 \times 10^{-3} M$. O volume foi completado com água para obtenção de solução com concentração final de 40,0 µg/mL. As leituras foram efetuadas imediatamente em espectrofotômetro contra branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

5.12.2.2 Resultados e discussão

Nesta reação, a coloração amarela alcança intensidade máxima imediatamente em temperatura ambiente ($\lambda_{\text{máx}}$: 420 nm), e permanece estável por, no mínimo, 60 minutos (Figura 5.17).

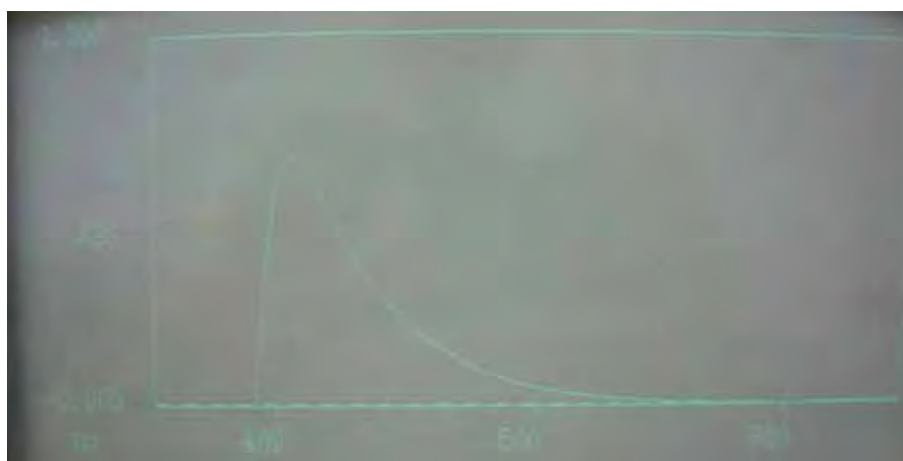


Figura 5.17. Espectro de absorção do produto gerado pela reação de orbifloxacino SQR (40,0 µg/mL) com o reagente cloreto férrico $1 \times 10^{-3} M$ na região do visível.

5.13 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Apesar de ser mais frequentemente aplicado para a análise quantitativa, o método por cromatografia líquida pode ser muito útil na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da respectiva SQR. Se as substâncias analisadas são idênticas, obrigatoriamente apresentarão o mesmo tempo de retenção, quando analisadas sob as mesmas condições.

5.13.1 Método

Prepararam-se soluções de orbifloxacino SQR (seção 4.2) e amostra (seção 4.3) em ácido clorídrico 0,5 M, na concentração de 100,0 µg/mL. A solução amostra, além de ser levada ao ultrassom por 30 minutos, foi filtrada em papel de filtro

quantitativo. Diluíram-se as soluções transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos âmbar de 10 mL e completando-se o volume com fase móvel para obter soluções com concentrações finais de 3,5 µg/mL. A partir destas soluções obtiveram-se cromatogramas no comprimento de onda de 290 nm, utilizando coluna SymmetryShield RP18 Waters®, (250 x 4,6 mm, 5 µm) e ácido acético 5%: metanol (80:20, v/v) como fase móvel na vazão de 0,7 mL/min.

5.13.2 Resultados e discussão

A identificação de orbifloxacino no produto acabado foi determinada pelo seu respectivo tempo de retenção, comparado com o tempo de retenção do orbifloxacino SQR (Figura 5.18).

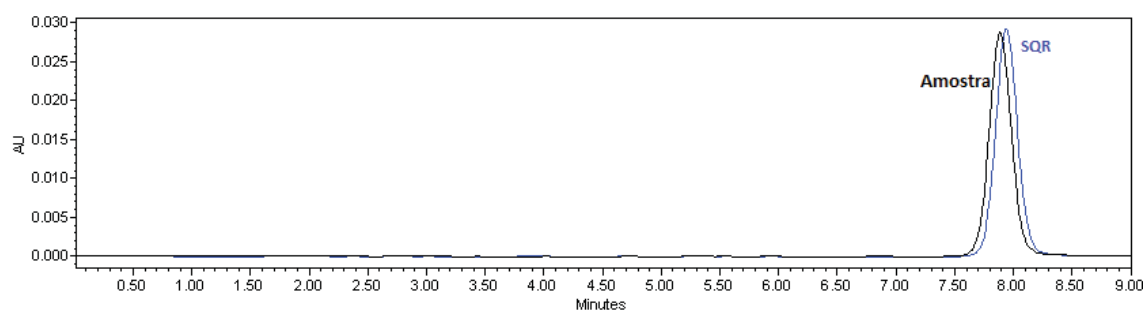


Figura 5.18. Sobreposição de cromatogramas de orbifloxacino SQR e amostra, nas mesmas concentrações (3,5 µg/mL), para identificação pelo método por CLAE, no comprimento de onda de 290 nm, utilizando coluna SymmetryShield RP18 Waters®, (250 x 4,6 mm, 5 µm) e ácido acético 5%: metanol (80:20, v/v) como fase móvel na vazão de 0,7 mL/min.

Ambos os cromatogramas, da solução da SQR e da amostra, apresentaram tempo de retenção de, aproximadamente, 7,9 minutos.

6 ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria é um dos métodos instrumentais de maior simplicidade em termos de execução e custo, já que os solventes e equipamentos necessários possuem um custo relativamente baixo, além da rapidez de execução das análises.

O princípio fundamental da maior parte dos métodos de absorção quantitativos reside na comparação entre a quantidade de energia radiante de determinado comprimento de onda que é absorvida por uma solução do produto em análise e a que é absorvida por uma série de soluções padrões (WILLARD *et al.*, 1979).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta (UV), visível (VIS) e infravermelho (IV) do espectro eletromagnético.

Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon bc \quad \text{Equação 6.1}$$

em que A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. ϵ representa a absortividade molar e é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração (mol/L) da espécie absorvente e b , a distância (cm) percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

A fim de obter informação útil do espectro de uma substância no UV ou no VIS, deve-se medir o comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e a intensidade de absorção. A substância em análise deve ser dissolvida em solvente adequado que não absorva luz na região estudada.

6.1.1 Método

A substância química de referência (SQR) e amostras da forma farmacêutica comprimido de orbifloxacino utilizadas neste trabalho foram descritas no Capítulo 4, seções 4.2 e 4.3, respectivamente.

- Para o preparo da solução padrão de orbifloxacino, pesaram-se 5,0 mg de orbifloxacino SQR, transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 50 mL e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,5 M, para a obtenção de solução com concentração de 100,0 µg/mL. A solução foi levada ao ultrassom por 30 minutos para garantir a total solubilização do fármaco. Alíquotas desta solução padrão foram

transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda máximo, 290 nm, como descrito anteriormente na análise qualitativa, utilizando o solvente puro para zerar o aparelho.

- No preparo da solução amostra de orbifloxacino partiu-se do peso médio de 20 comprimidos de orbifloxacino. Pesou-se o equivalente a 5,0 mg do fármaco e transferiu-se com o auxílio de ácido clorídrico 0,5 M para balão volumétrico âmbar de 50 mL, o qual foi levado ao ultrassom por 30 minutos para garantir a total solubilização da substância ativa. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo gerando solução amostra de orbifloxacino com concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL. Em seguida, o volume foi completado com ácido clorídrico 0,5 M. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda máximo de 290 nm como descrito anteriormente para a solução padrão.

Para a validação do método por espectrofotometria na região do UV foram determinados os seguintes parâmetros (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2007; USP, 2011e):

- *Linearidade*: seis níveis de concentração foram avaliados em triplicata. As curvas foram obtidas em três dias diferentes. Os resultados foram analisados pelo cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

- *Precisão*: foram realizadas seis análises de orbifloxacino SQR com concentração teórica de 3,5 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para a precisão intradia e, por diferentes analistas e/ou em três dias diferentes para a precisão intermediária. As precisões intradia e intermediária (interdia) do método foram avaliadas pelos valores de desvio padrão relativo percentual.

- *Robustez*: foi determinada pela variação dos comprimentos de onda. Foram analisadas seis replicatas na concentração de 3,5 µg/mL de orbifloxacino para cada variação.

- *Exatidão*: foi determinada pelo método de adição de padrão para o cálculo de recuperação. Foram adicionados três níveis de concentração, 80, 100 e 120% de padrão às amostras. O estudo foi realizado em triplicata nas concentrações finais de 2,8; 3,5 e 4,2 µg/mL como mostrado na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	<i>Volume adicionado de ORBI SQR (100,0 µg/mL) (mL)</i>	<i>Volume adicionado de amostra (100,0 µg/mL) (mL)</i>	<i>Concentração final (µg/mL)*</i>
P	0,20	-	2,0
R₁	0,08	0,20	2,8
R₂	0,15	0,20	3,5
R₃	0,22	0,20	4,2
A	-	0,20	2,0

*Cada nível de concentração foi preparada em triplicata em BV de 10 mL.

A percentagem de orbifloxacino recuperada foi calculada para cada caso segundo a equação 6.2 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left[\frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right] \times 100 \quad \text{Equação 6.2}$$

em que:

Cr = concentração da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Cp = concentração teórica da SQR adicionada (µg/mL)

- *Seletividade*: foi avaliada pela possível interferência dos adjuvantes na determinação quantitativa de orbifloxacino através da comparação das inclinações das curvas de padrão e amostra, nas concentrações de 1,0 a 6,0 µg/mL, como relatado por Bruce e colaboradores (1998) e Bonfilio e colegas (2012) e, pelo cálculo estatístico F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e t (*Student*) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

- *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*: foram estimados baseados no desvio padrão dos valores de intercepto e média dos valores de inclinação das três curvas analíticas, como descrito pela ICH (2005).

Os LD e LQ podem ser expressos pelas equações 6.3 e 6.4, respectivamente (ICH, 2005).

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad \text{Equação 6.3}$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 6.4}$$

em que:

σ = é o desvio padrão dos interceptos

S = é a media dos valores de inclinação das curvas analíticas

6.1.2 Resultados e discussão

As características do espectro de absorção de orbifloxacino SQR em ácido clorídrico 0,5 M foram discutidas na análise qualitativa deste trabalho (Cap. 5, seção 5.11).

Na Tabela 6.2 são mostrados os resultados obtidos na determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta para orbifloxacino.

Tabela 6.2. Valores obtidos na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para orbifloxacino SQR, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente no comprimento de onda de 290 nm

	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)*	Absorvância	100-T%
1	0,1	0,0137	3,10531
2	0,2	0,0243	5,44163
3	0,3	0,0387	8,52551
4	0,4	0,0448	9,80136
5	0,5	0,0557	12,03701
6	0,6	0,0657	14,03929
7	0,7	0,0709	15,06240
8	0,8	0,0831	17,41522
9	0,9	0,0948	19,61038
10	1,0	0,1069	21,81922
11	2,0	0,2041	37,49712
12	3,0	0,3060	50,56893
13	4,0	0,4121	61,28315
14	5,0	0,4767	66,63432
15	6,0	0,5757	73,43560
16	7,0	0,6787	79,04440
17	8,0	0,8058	84,36132
18	9,0	0,8815	86,86289
19	10,0	1,0059	90,13493

*diluída em balão volumétrico âmbar de 10 mL

Na Figura 6.1 está representada a curva de Ringbom, indicando o intervalo linear obtido para o método espectrofotométrico na região do UV para orbifloxacino.

Mediante a curva de Ringbom pode-se verificar se um determinado sistema obedece a lei de Lambert-Beer e qual o intervalo de absorvância no qual o erro relativo da concentração é mínimo (GONÇALVES, 1990).

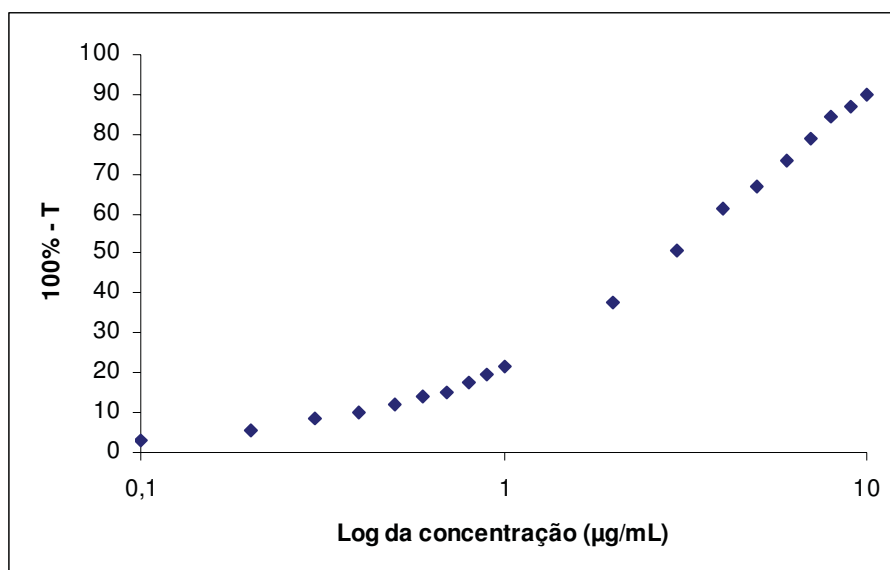


Figura 6.1. Curva de Ringbom utilizada na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para orbifloxacino, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente no comprimento de onda de 290 nm.

Observou-se pelos resultados da curva de Ringbom que a melhor faixa de trabalho foi de 1,0 a 6,0 µg/mL para orbifloxacino utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente.

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de orbifloxacino SQR, em ácido clorídrico 0,5 M, para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de orbifloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente a 290 nm

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância*	Absorvância média \pm e.p.m.	DPR (%)
1,0	0,104	0,107 \pm 0,001	1,98
	0,107		
	0,109		
2,0	0,217	0,218 \pm 0,001	1,01
	0,216		
	0,220		
3,0	0,330	0,332 \pm 0,001	0,59
	0,334		
	0,333		
4,0	0,438	0,440 \pm 0,003	1,07
	0,437		
	0,446		
5,0	0,542	0,550 \pm 0,005	1,69
	0,547		
	0,560		
6,0	0,660	0,660 \pm 0,003	0,74
	0,656		
	0,665		

*Cada valor corresponde à média de três determinações; e.p.m.: erro padrão da média

A curva analítica de orbifloxacino SQR (Figura 6.2) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

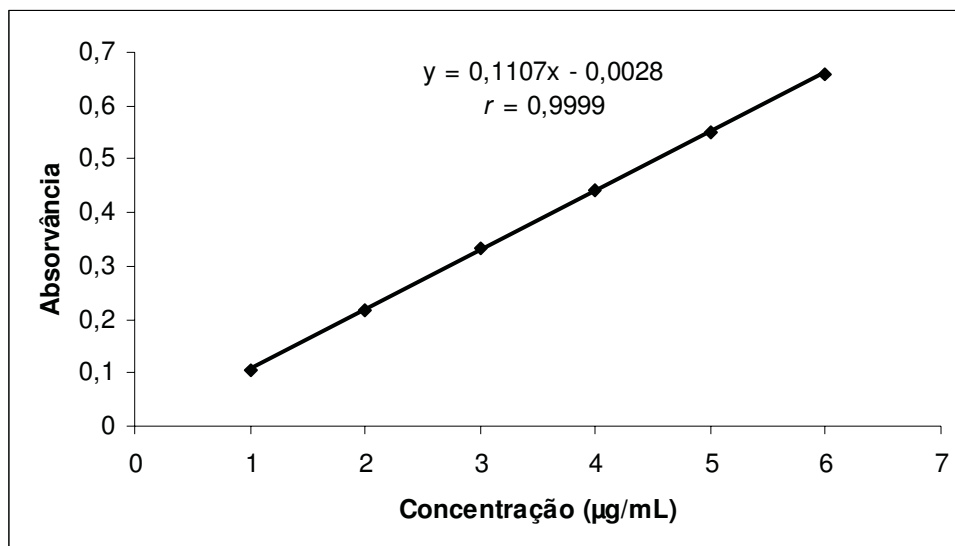


Figura 6.2. Curva analítica de orbifloxacino SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente a 290 nm.

A análise de variância (ANOVA) calculada para os dados da curva analítica de orbifloxacino é mostrada na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de orbifloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

<i>Fontes de variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>F_{tab}</i>
Entre	5	0,64304	0,12861	443,09*	3,11
Regressão linear	1	0,64296	0,64296	2215,15*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00008	0,00002	0,07	4,79
Resíduo	12	0,00029	0,00002	-	-
Total	17	0,64333	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: soma dos quadrados médios

A absorvidade molar (ϵ) de orbifloxacino, nas condições estudadas, foi calculada pela equação 6.1.

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 6.5.

Tabela 6.5. Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV para quantificação de orbifloxacino em comprimidos

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	290
ϵ (L/mol.cm)	$4,33 \times 10^4$
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	1,0 – 6,0
Equação: $y = ax + b$	
a	0,1107
b	-0,0028
r (coeficiente de correlação)	0,9999
n	6

Os valores de teor de orbifloxacino em comprimidos, determinados durante a análise da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.6.

Tabela 6.6. Valores determinados pelo doseamento de orbifloxacino em comprimidos, pelo método espectrofotométrico na região do UV

Dia	Teor de ORBI comp*		Teor médio	DPR (%)
	$\mu\text{g/mL}$	%		
1	3,50	99,99		
2	3,54	101,25	100,74	0,66
3	3,53	100,98		

Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.7 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente a 290 nm.

Tabela 6.7. Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	ORBI SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	ORBI SQR encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R₁	0,8	0,78	98,04	
R₂	1,5	1,52	101,58	99,77
R₃	2,2	2,19	99,70	

O método proposto para a quantificação de orbifloxacino em comprimidos foi desenvolvido utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente, baseado na excelente taxa de extração e boa intensidade de absorção do fármaco neste meio, assim como na simplicidade que representa a utilização de solvente de baixo custo e na pequena geração de resíduos.

Pelos parâmetros apresentados na Figura 6.2 e Tabela 6.3 é possível observar que a linearidade do método, obtida na faixa de concentração de 1,0 a 6,0 µg/mL, apresenta coeficiente de correlação de 0,9999, com desvio padrão relativo entre as determinações inferior a 2%, demonstrando haver excelente correlação linear entre os dados analisados.

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intradia e intermediária) realizados durante três dias diferentes, nos quais foram analisadas seis amostras preparadas individualmente. As médias das absorvâncias nas leituras estão próximas, com valores de desvio padrão relativo de 1,23 e 1,31% no ensaio intradia e intermediária, respectivamente, estando os desvios dentro do permitido, comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2011e).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo teste *F* (de homogeneidade de variâncias) e *t* (de comparação das médias), sendo os valores encontrados, 0,86 e 1,74, menores que os tabelados, 5,05 e 1,81, respectivamente. Valores calculados menores que os tabelados indicam a ausência de interferência do excipiente (INMETRO, 2007). Adicionalmente, foram comparadas as inclinações das curvas analíticas obtidas com a SQR e as amostras. Os resultados obtidos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de inclinação das duas curvas. Este resultado corrobora com o já encontrado de que não há interferência do excipiente nas análises (Figura 6.3).

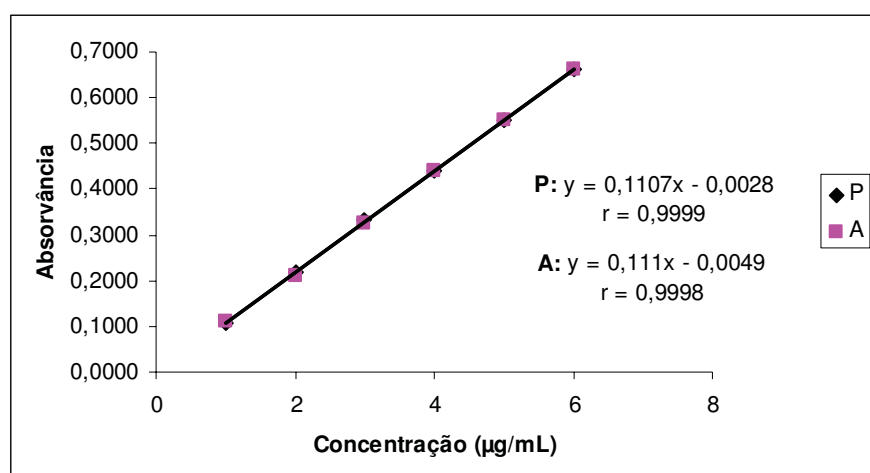


Figura 6.3. Comparação das curvas analíticas padrão e amostra para determinação da seletividade do método por espectrofotometria na região do UV.

Segundo Bruce *et al.* (1998) e Bonfilio *et al.* (2012), se a matriz sem o analito (placebo) não está disponível, a determinação da seletividade pode ser realizada através da comparação do valor de inclinação de duas curvas analíticas, do padrão e amostra. Se elas forem similares o método é considerado seletivo e a matriz não interfere no método.

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do comprimento de onda de 290 (**N**) para 289 (**A**) e 291 (**B**) nm. Os valores obtidos estão dentro do especificado, sendo os valores *t* calculados menores que o valor tabelado ($t_{\text{tab}} = 1,81$) para todas as variações (*N-A* e *N-B*), com 5 graus de liberdade e 95% de confiança, demonstrando que o método é robusto para este atributo (Tabela 6.8).

Tabela 6.8. Valores de absorvância obtidos para a determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV

	N	A	B
	0,3883	0,3834	0,3891
	0,3894	0,3850	0,3911
	0,3910	0,3872	0,3952
	0,3944	0,3851	0,3918
	0,3949	0,3886	0,3902
	0,3869	0,3836	0,3893
média	0,3908	0,3883	0,3911
DPR (%)	0,83	1,60	0,58
t	-	0,88	0,19

N: condição nominal: 290 nm; **A:** 289 nm; **B:** 291 nm

O teor encontrado de orbifloxacino nos comprimidos, em média, 100,74%, é um valor adequado. Geralmente para antimicrobianos, aceitam-se valores variando entre 90 a 110%, que é também a faixa de valor especificado para o orbifloxacino na USP (2011f) e para outras fluorquinolonas.

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação obtendo-se a média de 99,77%. Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

Os valores dos limites de detecção e quantificação calculados segundo a ICH (2005) foram 0,04 e 0,12 µg/mL, respectivamente.

Desta maneira, o método por espectrofotometria na região do UV apresenta-se adequado para a quantificação de orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido.

6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método de análise que nos últimos anos domina as técnicas analíticas em determinação de medicamentos, alimentos, ensaios biológicos, entre outros. As Farmacopeias Americana e Britânica (BP, 2011; USP, 2011) dedicam a esta técnica a análise da maior parte de fármacos em produtos com monografias nestes compêndios. Atualmente, prioriza-se a análise de produtos farmacêuticos por CLAE, devido à especificidade e seletividade relacionadas à utilização desta técnica.

Uma das limitações da utilização de CLAE é o alto custo da análise de um medicamento por este método, que emprega solventes orgânicos de alta pureza admitidos para uso e padrões de referências. Entretanto, este método analítico é altamente específico, pois possui coluna de separação que determina o composto analisado, originando uma identificação mais específica.

Com o objetivo de desenvolver e validar o método por CLAE indicativo de estabilidade, diversos sistemas eluentes foram testados, compostos por ácido acético e metanol, em proporções variadas. O sistema que demonstrou pico simétrico, tempo de retenção adequado, bem como, separação dos produtos de degradação do pico principal, foi o sistema escolhido para identificação e posterior validação do método analítico.

6.2.1 Método

A SQR e amostras da forma farmacêutica comprimido utilizadas neste trabalho foram descritas no Capítulo 4, seções 4.2 e 4.3, respectivamente.

- Para o preparo da fase móvel, primeiramente obteve-se a solução aquosa de ácido acético na concentração de 5,0%, (v/v). Em seguida, esta solução foi misturada a metanol, na proporção 80:20. A fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom para desgaseificação por 30 minutos antes do uso.

- No preparo das soluções de padrão, 5,0 mg de orbifloxacino SQR foram transferidos para balão volumétrico âmbar de 50 mL com auxílio de ácido clorídrico 0,5 M. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente para a obtenção de solução com concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar, que foram completados com fase móvel para gerar soluções com a concentração final requerida.

- No preparo da solução de orbifloxacino amostra partiu-se do peso médio de 20 comprimidos de orbifloxacino. Pesou-se o equivalente 5,0 mg do fármaco e transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 50 mL com ácido clorídrico 0,5 M. Esta

solução foi levada a ultrassom por 30 minutos para garantir a solubilização total do fármaco e, em seguida, filtrada em papel de filtro quantitativo, gerando solução amostra de orbifloxacino com concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL. Posteriormente, o volume foi completado com fase móvel.

Todas as amostras foram filtradas em filtro com membranas de *nylon* com 0,45 µm de poro antes das injeções.

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados visando a validação do método de análise de orbifloxacino por CLAE (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2011e):

- Linearidade: foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em dias diferentes e contendo seis níveis de concentração em cada uma delas. Os resultados foram analisados pelo cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

- Precisão: foram realizadas seis análises de orbifloxacino SQR com concentração teórica de 3,5 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para a precisão intradia e, por diferentes analistas e/ou em três dias diferentes para a precisão intermediária. As precisões intradia e intermediária do método foram avaliadas pelos valores de desvio padrão relativo percentual.

- Robustez: foi determinada por pequenas mudanças como variação do comprimento de onda de 290 para 288 e 292 nm, percentagem de metanol na fase móvel de 20% para 22 e 18%, temperatura da coluna de 25 °C para 30 °C e especificações da coluna (testou-se a coluna Symmetry Waters® C₁₈, 5 µm (150 x 3,9 mm). Foram analisadas 6 replicatas na concentração de 3,5 µg/mL de orbifloxacino para cada modificação e os valores de desvio padrão relativo foram calculados.

Exatidão: foi determinada pelo método de adição de padrão para o cálculo de recuperação. Foram adicionados três níveis de concentração, 80, 100 e 120% de padrão às amostras. O estudo foi realizado em triplicata nas concentrações finais teóricas de 2,8; 3,5 e 4,2 µg/mL, como mostrado na Tabela 6.9.

Tabela 6.9. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico indicativo de estabilidade

	Volume adicionado de ORBI SQR (100,0 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de amostra (100,0 µg/mL) (mL)	Concentração final (µg/mL)*
P	0,20	-	2,0
R₁	0,08	0,20	2,8
R₂	0,15	0,20	3,5
R₃	0,22	0,20	4,2
A	-	0,20	2,0

*Cada nível de concentração foi preparada em triplicata em BV de 10 mL.

A percentagem de orbifloxacino recuperada foi calculada para cada caso segundo a equação 6.2 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left[\frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right] \times 100 \quad \text{Equação 6.2}$$

em que:

Cr = concentração da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Cp = concentração teórica da SQR adicionada (µg/mL)

- Seletividade: determinada pelas degradações ácida, básica, oxidativa e fotolítica das soluções de orbifloxacino.

No intuito de determinar se o método analítico é indicativo de estabilidade, orbifloxacino padrão e amostra foram estressados sobre várias condições para conduzir ao estudo de degradação forçada (ICH, 2003). Todas as soluções preparadas para o uso no estudo de degradação forçada foram preparadas para gerar concentração de 1,0 mg/mL de orbifloxacino, pesando-se 10,0 mg da SQR e transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 10 mL com o auxílio do solvente apropriado para o teste. Todas as amostras foram posteriormente diluídas em fase móvel para concentração de 50 µg/mL e filtradas antes das injeções.

- *Hidrólise ácida, alcalina e neutra:* a degradação ácida foi realizada em HCl 0,1 M na concentração de 1,0 mg/mL de orbifloxacino. Os estudos na condição alcalina foram conduzidos de forma similar, com o fármaco na concentração de 1,0 mg/mL em NaOH 0,1 M. Estas soluções foram expostas à temperatura de 80 °C por 8 dias. Adicionalmente, orbifloxacino em água (1,0 mg/mL) foi aquecido em estufa a 80 °C pelo mesmo período de tempo.

○ *Degradação oxidativa*: a solução para o estudo de estresse oxidativo foi preparada em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. Essa solução foi estocada protegida da luz, em temperatura ambiente por 48 horas.

○ *Fotólise ácida, básica e neutra*: orbifloxacino SQR (pó) e soluções de orbifloxacino em HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M e em água foram expostos à luz para determinar os efeitos da radiação na estabilidade do fármaco em solução e no estado sólido. Todas as amostras do teste fotolítico de estabilidade foram colocadas em câmara climática e expostas à luz ultravioleta por 2 dias (no mínimo 200 watt horas/m²) e à luz visível por 8 dias, resultando em iluminação ≥ 1,2 Million Lux horas a 25 °C e 60% de umidade relativa (ICH, 2003). Seguindo a coleta das amostras da câmara, todas as soluções foram preparadas para análise como descrito anteriormente.

○ *Degradação térmica*: para teste de estresse térmico, o pó da substância química de referência foi exposto à temperatura de 60 °C por 15 dias em forno.

• *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*: foram estimados baseados no desvio padrão dos valores de intercepto e média dos valores de inclinação das três curvas analíticas, como descrito pela ICH (2005).

Os LD e LQ podem ser expressos pelas equações 6.3 e 6.4, respectivamente (ICH, 2005).

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad \text{Equação 6.3}$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 6.4}$$

em que:

σ = é o desvio padrão dos interceptos

S = é a media dos valores de inclinação das curvas analíticas

6.2.2 Resultados e discussão

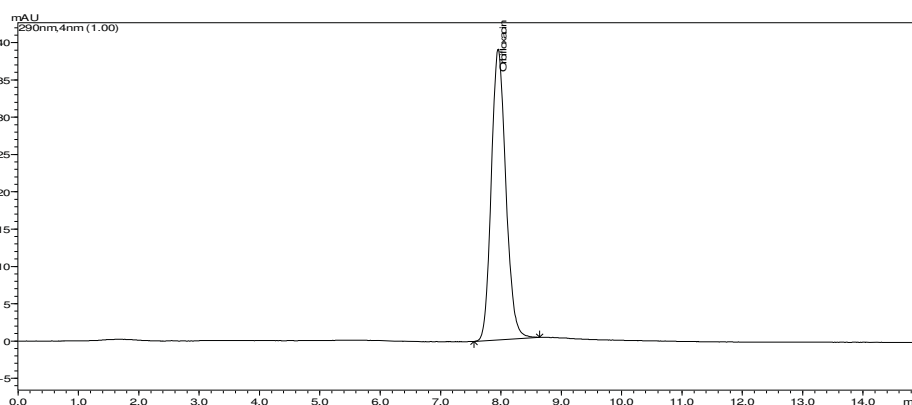
As condições cromatográficas do método indicativo de estabilidade estabelecidas para a determinação de orbifloxacino em comprimidos estão apresentadas na Tabela 6.10.

Tabela 6.10. Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino em comprimidos pelo método cromatográfico indicativo de estabilidade

Fase móvel	Ácido acético 5%, v/v: metanol (80:20, v/v)
Coluna	SymmetryShield RP18 Waters® 5 µm, 250 x 4,6 mm
Pré-coluna	C ₁₈ Phenomenex (4 x 3 mm)
Deteção	PDA, λ = 290 nm
Vazão	0,7 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	25 °C
Tempo de retenção	≈ 7,9 minutos

O teste de adequação do sistema (*system suitability*) foi realizado para garantir que o mesmo era apropriado para a aplicação pretendida. Foram injetadas 6 vezes a mesma amostra de orbifloxacino SQR e obteve-se desvio padrão relativo de 0,68%. Outros parâmetros avaliados foram área do pico do fármaco, tempo de retenção, fator de capacidade, pratos, assimetria e resolução. Todos os parâmetros avaliados encontraram-se dentro do especificado pelos guias e compêndios oficiais e garantem o bom desempenho do equipamento cromatográfico.

No cromatograma obtido utilizando-se fase móvel composta por ácido acético 5%, v/v e metanol (80:20, v/v) é possível observar a formação de pico simétrico com tempo de retenção adequado para análises de rotina (Figura 6.4).

**Figura 6.4.** Cromatograma da solução de orbifloxacino SQR com concentração de 3,5 µg/mL, utilizando como fase móvel ácido acético 5%: metanol (80:20, v/v).

Na Tabela 6.11 são apresentados os valores das áreas e seus respectivos desvios (DPR) obtidos pelas diferentes concentrações de orbifloxacino SQR.

Tabela 6.11. Valores das áreas referentes ao pico de orbifloxacino SQR para construção da curva analítica, utilizando como fase móvel ácido acético 5% e metanol (80:20, v/v)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas*	Área média \pm e.p.m.	DPR (%)
	193716		
1,0	193897	194571 \pm 766,3	0,68
	196100		
	382521		
2,0	373255	376327 \pm 3097,1	1,43
	373204		
	575306		
3,0	563275	566907 \pm 4212,4	1,29
	562140		
	782062		
4,0	770466	768448 \pm 8502,9	1,92
	752815		
	974862		
5,0	951686	957802 \pm 8643,1	1,56
	946858		
	1157609		
6,0	1126775	1138017 \pm 9831,5	1,50
	1129666		

*Cada valor corresponde à média de três determinações.

A curva analítica de orbifloxacino SQR (Figura 6.5) foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 190377x + 692,33$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999.

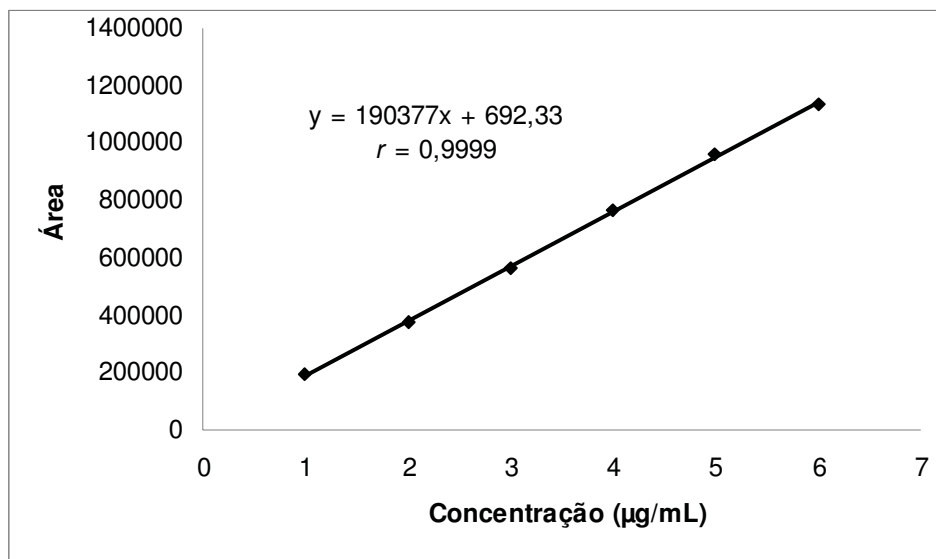


Figura 6.5. Curva analítica de orbifloxacino SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando como fase móvel ácido acético 5% e metanol (80:20, v/v) a 290 nm.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de orbifloxacino SQR é mostrada na Tabela 6.12.

Tabela 6.12. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de orbifloxacino SQR, utilizando o método cromatográfico indicativo de estabilidade

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F_{calc}	F_{tab}
Entre	5	1903238936229,07	380647787245,81	233,60*	3,11
Regressão	1	1902318794987,95	1902318794987,95	1167,41*	4,75
Desvio da linearidade	4	920141241,12	230035310,28	0,14	4,79
Resíduo	12	1629516185,85	135793015,49	-	-
Total	17	1904868452414,92	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: soma dos quadrados médios

Para determinar a aplicabilidade do método, os teores de orbifloxacino em comprimidos foram determinados durante a análise da precisão do método proposto, em que compararam-se as médias das áreas do padrão com as médias das áreas das amostras, em seis réplicas (Tabela 6.13).

Tabela 6.13. Valores determinados para o doseamento de orbifloxacino em comprimidos, pelo método cromatográfico indicativo de estabilidade

<i>Dia</i>	<i>Teor de ORBI comprimidos*</i>		<i>Teor médio</i>	<i>DPR (%)</i>
	<i>µg/mL</i>	<i>%</i>		
1	3,46	98,95		
2	3,55	101,56	100,34	1,31
3	3,52	100,50		

*Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.14 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método cromatográfico indicativo de estabilidade.

Tabela 6.14. Valores do teste de recuperação do método cromatográfico indicativo de estabilidade

	<i>ORBI SQR adicionada (µg/mL)</i>	<i>ORBI SQR encontrada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média (%)</i>
R₁	0,80	0,79	98,98	
R₂	1,50	1,49	99,92	99,15
R₃	2,20	2,17	98,54	

A seletividade do método e a avaliação da sua capacidade de separar o orbifloxacino dos seus produtos de degradação foi determinada através da degradação ácida, básica, neutra, oxidativa, fotolítica e térmica da solução e pó de orbifloxacino SQR. A Figura 6.6a-i mostra os cromatogramas obtidos do estudo de degradação forçada, realizado conforme descrito em Método (seção 6.2.1). As soluções de orbifloxacino degradado (50 µg/mL) foram injetadas três vezes. Os parâmetros avaliados foram área do pico do orbifloxacino, tempo de retenção, fator de capacidade, pratos, assimetria e resolução. Em todas as medições a área do pico variou menos que 2,0%, o tempo médio de retenção foi de 7,9 minutos, o fator de capacidade foi superior a 2, pratos foram maior que 4700 e a assimetria foi inferior a 2 para o pico principal. O método proposto oferece alta sensibilidade e orbifloxacino pode ser detectado com precisão. Em todos os casos, o pico principal foi bem separado dos produtos de degradação (resolução maior que 2,7). Os resultados numéricos obtidos nesse estudo de degradação estão apresentadas na Tabela 6.15.

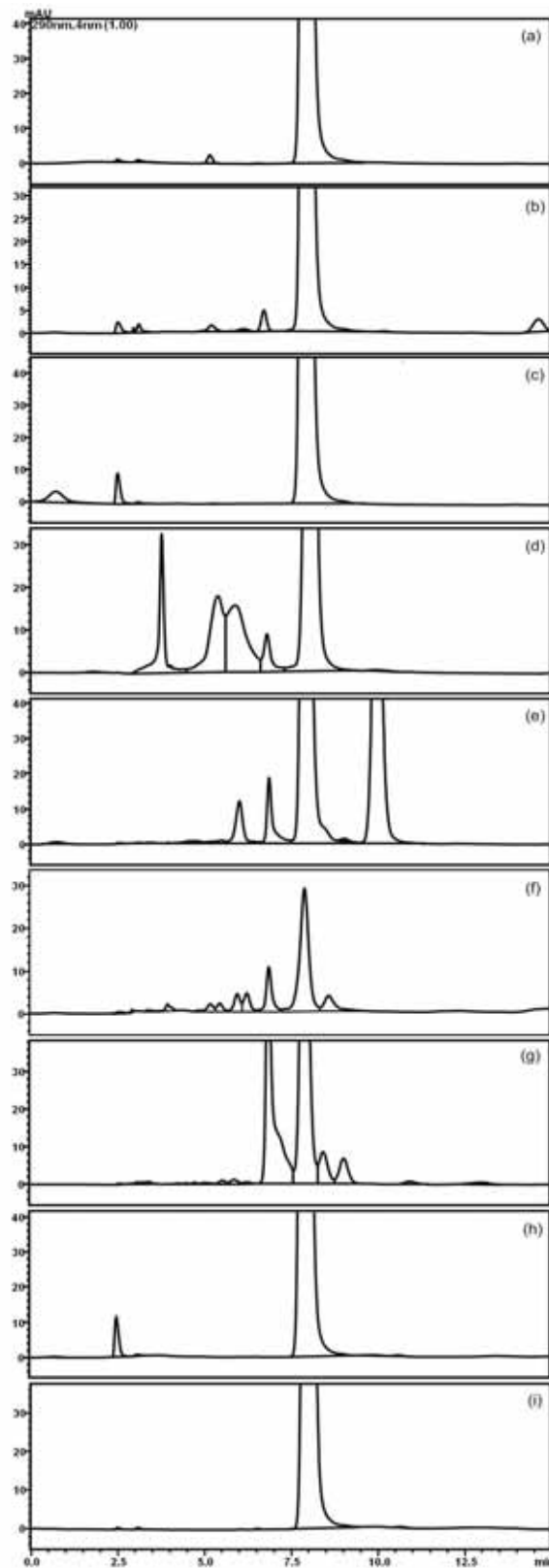


Figura 6.6. Cromatogramas típicos de: (a) hidrólise ácida; (b) hidrólise básica; (c) hidrólise neutra; (d) degradação oxidativa; (e) fotodegradação ácida; (f) fotodegradação básica; (g) fotodegradação neutra; (h) degradação térmica (pó) e (i) degradação fotolítica (pó).

Tabela 6.15. Dados do pico principal de orbifloxacino, em relação aos picos vizinhos, em diferentes estudos de degradação

<i>Estudos de degradação</i>	<i>Resolução</i>	<i>Pureza do pico</i>	<i>Assimetria</i>	<i>Fator de capacidade</i>	<i>Pratos</i>
Hidrólise ácida	4,04	0,999	1,25	2,17	5532
Hidrólise básica	3,40	0,997	1,22	2,17	6139
Hidrólise neutra	6,06	0,999	1,25	10,17	5598
Degradação oxidativa	2,91	0,996	1,16	3,39	4748
Fotodegradação ácida	3,06	0,999	1,24	9,91	5351
Fotodegradação básica	2,78	0,998	1,00	2,08	4747
Fotodegradação neutra	2,93	0,999	1,19	2,08	5602
Degradação térmica*	4,19	0,999	1,22	2,20	5576
Fotodegradação*	13,16	0,996	1,25	10,17	5662

*Refere-se à degradação de orbifloxacino na forma sólida.

Os valores de F e t também foram calculados, sendo F igual a 0,80 e t igual a 0,87, para cinco graus de liberdade e 95% de confiança, estando ambos os valores encontrados abaixo dos tabelados ($F_{\text{tab}} = 4,28$; $t_{\text{tab}} = 1,78$).

Os valores dos limites de detecção e quantificação calculados segundo a ICH (2005) foram 0,004 e 0,013 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 1,0 a 6,0 $\mu\text{g/mL}$. Os valores para o intercepto e a inclinação da curva analítica foram 692,33 e 190377, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade nas concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, no limite de confiança de 95% (Tabela 6.12).

O teor médio determinado de orbifloxacino em comprimidos foi de 100,34%, os valores de desvio padrão relativo dentro dos dias de análise tiveram média de 1,33 e entre os dias de 1,36% para o ensaio de precisão.

A exatidão do método, expressa pela percentagem de recuperação de orbifloxacino, foi de 99,15% com desvio padrão relativo de 0,71%.

A robustez do método foi avaliada pelo ensaio da solução de orbifloxacino SQR, em seis replicatas, em diferentes condições analíticas deliberadamente modificadas, e comparadas com da condição original. O comprimento de onda foi alterado para 288 **(A)** e 292 **(B)** nm, a percentagem de metanol na fase móvel foi variada para a razão de 78:22 (v/v) **(C)** e 82:18 **(D)** de ácido acético 5%: metanol, a temperatura da coluna foi elevada para 30 °C **(E)** e a coluna foi mudada para uma

Symmetry Waters C₁₈, 5 µm (150 x 3,9 mm) (**F**). Os resultados obtidos pelo ensaio das amostras não foram afetados pelas variações das condições e estão de acordo com os resultados obtidos utilizando-se as condições originais. Os valores de desvio padrão relativo determinados apresentaram valor menor que 2,0% indicando que o método desenvolvido é robusto para estes parâmetros (Tabela 6.16).

Tabela 6.16. Valores de área obtidos para a determinação da robustez do método cromatográfico indicativo de estabilidade

	N	A	B	C	D	E	F
	672440	653311	662394	682770	680295	672194	649980
	670479	651883	660803	687797	673842	667600	668155
	665923	648078	657528	685036	668882	665496	656103
	680342	660561	660520	672829	655245	651157	655509
	673690	655359	662557	689247	679060	669860	647162
	665519	646220	655773	680057	664273	658555	665049
Média	671399	652569	659929	682956	670266	664144	656993
DPR (%)	0,82	0,79	0,41	0,87	1,42	1,19	1,25
DPR (%)_{x-y}	-	1,12	0,73	0,80	0,74	0,75	1,01

N: condição nominal; **A:** 288 nm; **B:** 292 nm, **C:** 78:22, (v/v) HAc 5%: MetOH; **D:** 82:18, (v/v) HAc 5%: MetOH; **E:** temperatura da coluna 30 °C; **F:** coluna Symmetry Waters C18, 5 µm (150 x 3,9 mm).

A seletividade do método desenvolvido foi determinada pela análise das amostras de degradação forçada na concentração de 50 µg/mL. A capacidade de indicação da estabilidade do método foi estabelecida pelos valores de pureza do pico de orbifloxacino nas amostras degradadas obtidos utilizando-se o *software* LCSolutions. A pureza do pico de orbifloxacino em todos os casos foi maior de 0,99 (Tabela 6.15). Os cromatogramas típicos obtidos pelos ensaios de estresse estão apresentados na Figura 6.6a-i.

Pode-se perceber através do método cromatográfico indicativo de estabilidade que o pó da SQR de orbifloxacino mostrou-se bastante estável sob altas temperaturas e luz UV/VIS. Por outro lado, as soluções de orbifloxacino em condições ácidas, básicas e neutras sofreram degradação bem proeminente, tanto sob aquecimento quanto sob influência da luz. Quando soluções contendo orbifloxacino foram expostas à temperatura de 80 °C por 8 dias, a maior taxa de degradação observada foi em solução alcalina, seguida pela solução ácida e com menor degradação em meio neutro. Orbifloxacino também apresentou-se instável sob a condição de oxidação com quase 40% do fármaco sendo degradado em 48 horas à temperatura ambiente. Quando as soluções de orbifloxacino foram expostas à luz ultravioleta e visível por 8

dias a maior degradação observada foi em solução básica e neutra, sendo aproximadamente 94 e 77%, do fármaco degradado, respectivamente. Estudo posterior demonstrou que a fotólise de orbifloxacino acontece mais rapidamente em solução neutra, mas a degradação em meio alcalino é mais agressiva (Capítulo 9). Fotodegradação também foi observada na solução ácida de orbifloxacino, embora em menor extensão quando comparada às outras condições.

A estabilidade da solução padrão estoque de orbifloxacino e da fase móvel também foram testadas. Os valores de desvio padrão relativo dos resultados obtidos pelo ensaio de estabilidade das soluções padrão do fármaco e da fase móvel foram menores que 2%. Os resultados confirmam que a solução de orbifloxacino foi estável até 48 h à temperatura ambiente e até 3 meses à temperatura de 4 °C. A fase móvel não sofreu variação em nenhum tempo.

O principal objetivo do desenvolvimento deste método cromatográfico foi, além de quantificar orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido, separar os produtos de degradação gerados durante o estudo de degradação forçada do pico principal do fármaco.

O método proposto permite a separação do orbifloxacino de todos os seus produtos de degradação. Este método também permite realizar estudo de estabilidade para cinética de degradação do fármaco, efetuar estudos de dissolução e quantificar orbifloxacino em comprimidos.

6.3 Métodos microbiológicos

Os ensaios microbiológicos são preconizados em vários códigos oficiais como a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (FB 5, 2010), Farmacopeia Americana (USP, 2011), Farmacopeia Britânica (BP, 2011) e Farmacopeia Europeia (EP, 2011).

Os principais ensaios de doseamento microbiológicos disponíveis atualmente englobam o método de difusão em ágar e o ensaio turbidimétrico.

O método de difusão em ágar é utilizado para a determinação da potência, especialmente de antibióticos, e foi preconizado por Heatley quando publicou, em 1944, este método para estimar a potência da penicilina (HEWITT, 2004).

Este método relaciona o tamanho da zona de inibição com a dose da substância ensaiada. É fundamentalmente um método físico, no qual o micro-organismo é usado como revelador. O método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, através do qual a substância teste se difunde.

O primeiro relato publicado para o ensaio turbidimétrico parece ser o trabalho de Foster (1942) que descreveu a análise da penicilina, como descrito por Hewitt (2004). O ensaio turbidimétrico baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados/sensível ao agente antimicrobiano contido em um meio. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa.

- *Ensaio preliminares para o estabelecimento dos parâmetros analíticos* - Para a quantificação de orbifloxacino pelos métodos de difusão em ágar e turbidimétrico, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas verificando-se parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente e concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 6.17).

Tabela 6.17. Parâmetros testados durante o desenvolvimento dos ensaios microbiológicos – difusão em ágar e turbidimétrico para determinação de orbifloxacino em comprimidos

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meios de cultura	Meio nº 1 de Grove-Randall*
	Meio nº 11 de Grove-Randall*
	Caldo BHI** Caldo Casoy** Caldo Mueller-Hinton**
Concentração do inóculo	0,5%*
	1,0%*
	2,0%*
	4,0%**
	8,0%**
	10,0%**
Diluyente	Água
	Solução tampão fosfato pH 6,0 Solução tampão fosfato pH 8,0
Concentrações das soluções	1,0; 2,0; 4,0 µg/mL
	8,0; 16,0; 32,0 µg/mL
	16,0; 32,0; 64,0 µg/mL

*Testado para ensaio de difusão em ágar; **Testado para ensaio turbidimétrico

Realizados os testes preliminares, alguns parâmetros foram estabelecidos por apresentarem melhor desempenho nas análises. No desenvolvimento de ambos os métodos os parâmetros estabelecidos foram similares, exceto pela concentração das soluções padrão e amostra e pelos componentes inerentes aos métodos, como demonstrado nas Tabelas 6.18 e 6.19.

Tabela 6.18. Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino em comprimidos pelo ensaio de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meio de cultura	Meio nº 1 de Grove-Randall para camada base Meio nº 11 de Grove-Randall para camada inoculada
Concentração do inóculo	1,0%
Diluyente	Solução tampão fosfato pH 6,0
Concentrações das soluções	16,0; 32,0 e 64,0 µg/mL

Tabela 6.19. Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino em comprimidos pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meio de cultura	Caldo BHI
Concentração do inóculo	10,0%
Diluyente	Solução tampão fosfato pH 6,0
Concentrações das soluções	8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL

- *Preparo do meio de cultura* - Foram utilizados meio de cultura ágar Casoy, para a manutenção e caldo BHI para o crescimento dos micro-organismos-teste. Os meios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

- *Preparo do inóculo* - As culturas de *S. aureus* foram repicadas com alça de platina para caldo BHI e mantidas, para seu desenvolvimento, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C, durante as 24 horas anteriores a realização dos experimentos. Padronizou-se o inóculo a 580 e 530 nm em espectrofotômetro, para o ensaio de difusão em ágar e turbidimétrico, respectivamente, obtendo-se transmitância de 25,0% ± 2,0%. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (FB 5, 2010).

- *Preparo da solução de orbifloxacino SQR* - Foram pesados 5,0 mg de orbifloxacino SQR (seção 4.2) e transferidos para balão volumétrico âmbar de 50 mL. O balão volumétrico foi deixado em ultrassom por 30 minutos e, em seguida, o volume foi completado com ácido clorídrico 0,5 M para a obtenção de solução com

concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL que foram completados com solução tampão fosfato pH 6,0 para gerar soluções com as concentrações finais requeridas em cada ensaio.

- *Preparo das amostras de orbifloxacino em comprimidos* – A partir do peso médio de 20 comprimidos (seção 4.3), pesou-se o equivalente a 5,0 mg de orbifloxacino e transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 50 mL. O volume foi completado com ácido clorídrico 0,5 M. Esta solução foi levada ao ultrassom para a total dissolução do fármaco e filtrada em papel de filtro quantitativo. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL, completando-se o volume com solução tampão fosfato pH 6,0 e obtendo-se soluções com as concentrações finais teóricas requeridas.

6.3.1 Ensaio de difusão em ágar

6.3.1.1 Método

Foram empregadas 21 placas de Petri para o doseamento de orbifloxacino em comprimidos. Em cada ensaio foram utilizadas 7 placas de Petri e os resultados foram analisados estatisticamente. Em capela de fluxo laminar foram transferidos para cada placa, com auxílio de pipetador automático, 20,0 mL de meio nº 1 de Grove-Randall para a camada base. Após a solidificação desta camada foram adicionados, por meio de pipetador automático, 5,0 mL de meio nº 11 de Grove-Randall contendo 1,0% de inóculo. Após a solidificação da camada inoculada foram distribuídos *templates* de aço inoxidável, previamente esterilizados, em cada placa. Cada orifício recebeu 200,0 µL das soluções do padrão (SQR) ou da amostra, em delineamento 3 x 3 (Figura 6.7).

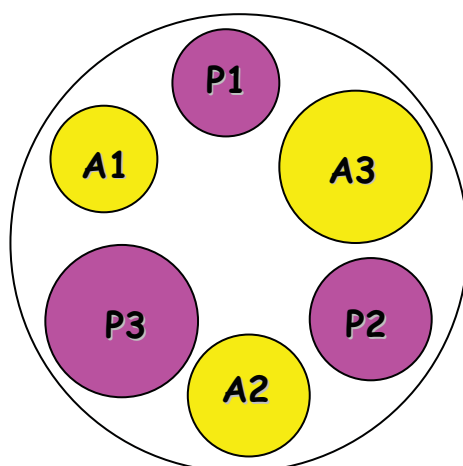


Figura 6.7. Delineamento 3 x 3 demonstrando a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri*.

*P1 (16,0 µg/mL); P2 (32,0 µg/mL); P3 (64,0 µg/mL) e A1 (16,0 µg/mL); A2 (32,0 µg/mL); A3 (64,0 µg/mL).

As placas foram colocadas em estufa incubadora a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 18 horas foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição, ao centésimo de milímetro, com auxílio de paquímetro.

- *Cálculo da potência do medicamento*

A potência do fármaco foi determinada pela equação (Equação 6.5) de Hewitt (2004). Os ensaios foram realizados em dias diferentes e cada resultado corresponde à média de sete determinações.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Anti log } M \times 100^{\dagger} \quad \text{Equação 6.5}$$

Para a validação do método microbiológico por difusão em ágar os seguintes parâmetros foram determinados (HEWITT, 2004; ICH, 2005; FB 5, 2010):

- *Linearidade*: três níveis de concentração foram avaliados com sete réplicas cada. As curvas foram obtidas em três dias diferentes.

- *Precisão*: foram realizadas sete análises de orbifloxacino SQR com concentração teórica de $32,0\text{ }\mu\text{g/mL}$, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para a precisão intradia e, por diferentes analistas e em três dias diferentes para a precisão intermediária. As precisões intradia e intermediária do método foram avaliadas pelos valores de desvio padrão relativo das medidas de diâmetro dos halos de inibição obtidos.

- *Exatidão*: foi determinada pelo método de adição de padrão para o teste de recuperação. Foram adicionados três níveis de concentração, 80, 100 e 120% de padrão às amostras. O estudo foi realizado em triplicata nas concentrações finais teóricas de $25,6$; $32,0$ e $38,4\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6.20).

Tabela 6.20. Preparo das soluções para o teste de recuperação do ensaio de difusão em ágar

	<i>Volume adicionado de ORBI SQR (100,0 $\mu\text{g/mL}$) (mL)</i>	<i>Volume adicionado de amostra (100,0 $\mu\text{g/mL}$) (mL)</i>	<i>Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)*</i>
P	0,80	-	16,0
R₁	0,48	0,80	25,6
R₂	0,80	0,80	32,0
R₃	1,12	0,80	38,4
A	-	0,80	16,0

*Cada nível de concentração foi preparada em triplicata em BV de 5 mL.

$\dagger M = F/b$; $b = E/I$; $I = \log R$, R é a razão das doses;

$$F = \frac{1}{3} [(\bar{A}_1 + \bar{A}_2 + \bar{A}_3) - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2 + \bar{P}_3)]; \quad E = \frac{1}{4} [(\bar{A}_3 + \bar{P}_3) - (\bar{A}_1 + \bar{P}_1)]$$

A percentagem de orbifloxacino recuperada foi calculada para cada caso segundo a equação 6.2 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left[\frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right] \times 100 \quad \text{Equação 6.2}$$

em que:

Cr = concentração da solução amostra adicionada de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

Ca = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

Cp = concentração teórica da SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

- **Robustez:** foi determinada pela variação do tempo de incubação do teste e volume de solução padrão e amostra adicionada aos orifícios do *template*. Os resultados foram avaliados pelo teste *t* (*Student*).

6.3.1.2 Resultados e discussão

Os valores de diâmetro dos halos de inibição encontrados pelas diferentes concentrações de orbifloxacino SQR e amostra são mostrados na Tabela 6.21.

Tabela 6.21. Valores dos diâmetros dos halos de inibição determinados para a construção da curva analítica de orbifloxacino, pelo ensaio de difusão em ágar

Dias	Diâmetro dos halos de inibição (mm)*					
	16,0 $\mu\text{g/mL}$		32,0 $\mu\text{g/mL}$		64,0 $\mu\text{g/mL}$	
	P_1	A_1	P_2	A_2	P_3	A_3
1	14,16	13,68	20,20	20,45	26,96	26,74
2	15,05	14,87	20,07	19,65	25,87	24,77
3	14,17	14,24	19,98	18,84	26,01	25,76
Média	14,46	14,26	20,08	19,65	26,28	25,76
DPR (%)	3,53	4,17	0,55	4,10	2,29	3,82

P = padrão; A = amostra; *cada valor corresponde a média de 7 determinações

As curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra (Figura 6.8) foram construídas com as médias dos valores dos diâmetros dos halos de inibição de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = 8,5263\text{Ln}(x) - 9,2756$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9996, para o orbifloxacino SQR e $y = 8,2907\text{Ln}(x) - 8,8444$, com r de 0,9993, para o fármaco em comprimidos.

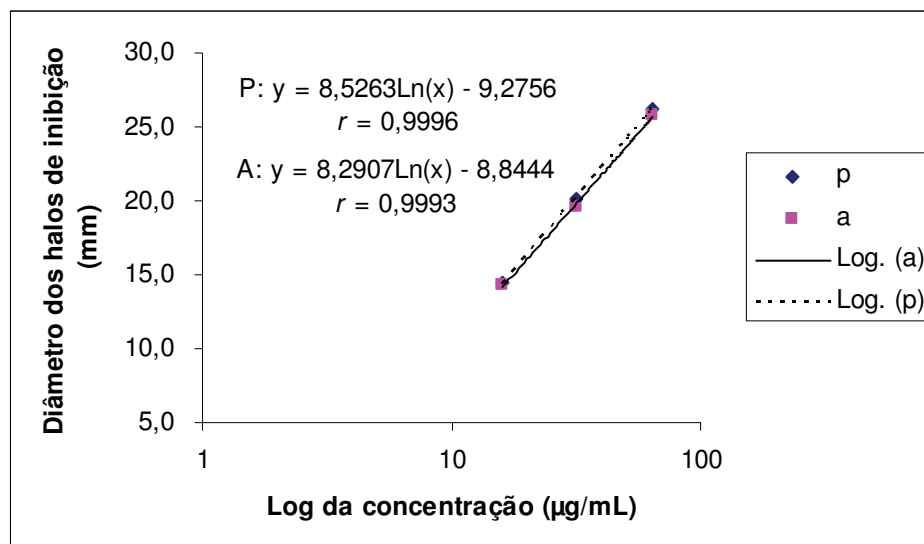


Figura 6.8. Curvas analíticas de soluções de orbifloxacino SQR e amostra, nas concentrações de 16,0; 32,0 e 64,0 µg/mL, obtidas pelo ensaio de difusão em ágar.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra é mostrada na Tabela 6.22.

Tabela 6.22. Análise de variância dos valores de diâmetro dos halos determinados na obtenção das curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra, utilizando o ensaio de difusão em ágar

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F_{cal}	F_{tab}
Preparação	1	0,67	0,67	3,86	4,24
Regressão	1	407,63	407,63	2350,05*	4,24
Desvio de paralelismo	1	0,08	0,08	0,46	4,24
Quadrático	1	0,42	0,42	2,44	4,24
Diferença de quadrático	1	0,01	0,01	0,03	4,24
Desvio da linearidade	2	0,43	0,21	1,23	3,38
Tratamentos	5	408,81	81,76	471,37*	2,60
Entre placas	5	0,86	0,17	0,99	2,60
Dentro (erro)	25	4,34	0,17	-	-
Total	35	414,01	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: soma dos quadrados médios

Segundo afirmado por Hewitt (2004) em seu livro, os requerimentos farmacopeicos para validar um ensaio microbiológico por linhas paralelas englobam somente os 3 seguintes critérios: (1) a “regressão linear” deve ser significativa. Isto demonstra que a inclinação da curva das doses *versus* o efeito é satisfatória; (2) o “desvio de paralelismo” deve ser não significativo e; (3) o “desvio de linearidade” deve ser não significativo. Este parâmetro é atestado se os dois valores de quadráticos forem não significativos.

A razão de variância (F) para outros parâmetros também é calculada, entretanto, não há nenhum requerimento oficial com relação a estes valores. Os dados numéricos obtidos das “preparações”, “tratamentos” e “entre placas” são apenas informativos e podem fornecer um alerta de que as condições do ensaio podem ser melhoradas.

Os valores da potência de orbifloxacino na forma farmacêutica, determinados pela equação de Hewitt (2004), equação 6.5, encontram-se na Tabela 6.23.

Tabela 6.23. Potências de orbifloxacino em comprimidos, obtidas pela equação de Hewitt, para o ensaio por difusão em ágar

<i>Dia</i>	<i>Teor de ORBI comp (%)</i>	<i>Teor médio</i>	<i>DPR (%)</i>
1	99,32		
2	98,33	98,78	0,51
3	98,69		

Na Tabela 6.24 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo ensaio de difusão em ágar.

Tabela 6.24. Valores do teste de recuperação do ensaio de difusão em ágar

	<i>ORBI SQR adicionada (µg/mL)</i>	<i>ORBI SQR encontrada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média (%)</i>
R₁	9,6	9,74	101,50	
R₂	16,0	15,96	99,76	100,31
R₃	22,4	22,32	99,65	

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do tempo de ensaio de 18 horas (**N**) para 17 horas e meia (**A**) e 18 horas e meia (**B**) e pela variação do volume de solução padrão e amostra adicionadas, de 200 µL (**N**) para 198 (**C**) e 201 (**D**) µL. Os valores de desvio padrão relativo encontrados para todas as variações estão abaixo de 2% e os valores do teste

t (*Student*) estão abaixo do tabelado ($t_{\text{tab}} = 1,78$ para 12 graus de liberdade e 95% de confiança), indicando que o ensaio é robusto para estes parâmetros (Tabela 6.25).

Tabela 6.25. Valores de diâmetro dos halos obtidos para a determinação da robustez do ensaio de difusão em ágar

	N	A	B	C	D
	20,74	19,64	21,42	19,40	19,59
	19,62	20,00	19,44	20,49	20,65
	19,50	20,35	20,78	20,27	20,68
	19,76	20,35	20,54	20,56	20,49
	20,39	19,95	19,84	20,67	19,54
	19,00	21,07	20,21	19,85	20,24
	20,83	20,14	19,45	19,67	19,98
Média	19,98	20,214	20,240	20,130	20,167
DPR (%)	3,44	2,23	3,61	2,44	2,37
t	-	0,76	0,48	0,69	0,60

N: condição nominal; **A:** 17 horas e meia; **B:** 18 horas e meia; **C:** 198 μL ; **D:** 201 μL

As precisões intradia e intermediária avaliadas pelos valores de desvio padrão relativo foram de 2,88 e 3,33%, respectivamente. A seletividade do método foi comprovada pelo teste F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e t (*Student*) de comparação de médias, obtendo-se os valores 0,26 e 0,19, respectivamente, valores abaixo do tabelado ($t_{\text{tab}} = 1,78$, $F_{\text{tab}} = 4,28$, 95% de confiança), comprovando a seletividade do método de difusão em ágar (INMETRO, 2007).

6.3.2 Ensaio turbidimétrico

6.3.2.1 Método

Inicialmente procedeu-se o preparo do inóculo, como descrito anteriormente (seção 6.3). Em seguida, distribuiu-se em tubos idênticos contendo 10,0 mL de caldo BHI estéril, 200 µL de cada uma das soluções do padrão e da amostra. Adicionou-se em cada tubo 1,0 mL de caldo nutriente inoculado. Foram usados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas 3 X 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de orbifloxacino) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas 3 réplicas (Figura 6.9).

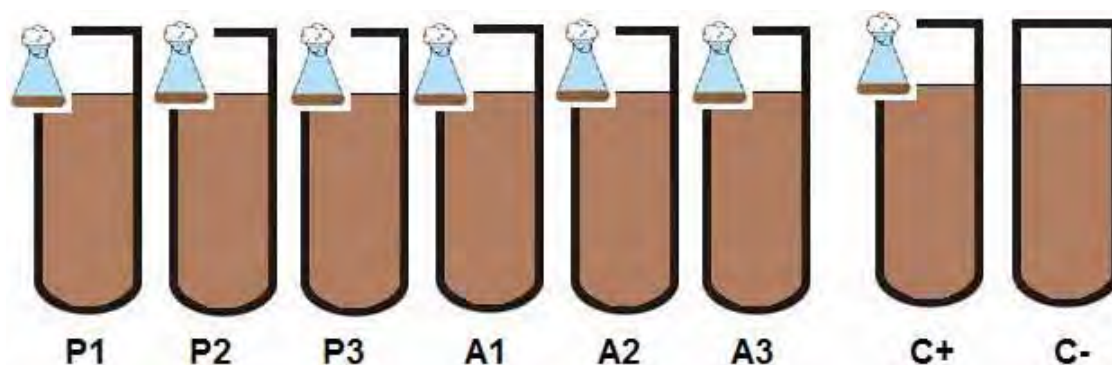


Figura 6.9. Desenho esquemático do delineamento 3 x 3 do ensaio microbiológico turbidimétrico[‡].

Os tubos foram incubados em banho aquecido com agitador orbital, à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

Determinou-se a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm. O aparelho foi padronizado em absorvância zero através de branco contendo 10,0 mL de caldo e 0,5 mL de formaldeído 12% (controle negativo).

Para a validação do método microbiológico por turbidimetria foram determinados os seguintes parâmetros (HEWITT, 2004; ICH, 2005; FB 5, 2010):

- *Linearidade*: três níveis de concentração foram avaliados com 3 réplicas cada. As curvas foram obtidas em sete dias diferentes.

[‡] Padrão (**P**) e amostra (**A**) nos tubos: P1 (8,0 µg/mL); P2 (16,0 µg/mL); P3 (32,0 µg/mL) e A1 (8,0 µg/mL); A2 (16,0 µg/mL); A3 (32,0 µg/mL); C+ (controle positivo); C- (controle negativo).

- **Precisão:** foram realizadas sete análises de orbifloxacino SQR com concentração teórica de 16,0 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para a precisão intradia e, por diferentes analistas e em três dias diferentes para a precisão intermediária. As precisões intradia e intermediária do método foram avaliadas pelos valores de desvio padrão relativo dos resultados de absorvâncias obtidos.

- **Exatidão:** foi determinada pelo método de adição de padrão para o teste de recuperação. Foram adicionados três níveis de concentração, 80, 100 e 120% de padrão às amostras. O estudo foi realizado em triplicata nas concentrações finais teóricas de 12,8; 16,0 e 19,2 µg/mL (Tabela 6.26).

Tabela 6.26. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico

	Volume adicionado de ORBI SQR (100,0 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de amostra (100,0 µg/mL) (mL)	Concentração final (µg/mL)*
P	0,40	-	8,0
R₁	0,24	0,40	12,8
R₂	0,40	0,40	16,0
R₃	0,56	0,40	19,2
A	-	0,40	8,0

*Cada nível de concentração foi preparada em triplicata em BV de 5 mL.

A percentagem de orbifloxacino recuperada foi calculada para cada caso segundo a equação 6.2 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left[\frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right] \times 100 \quad \text{Equação 6.2}$$

em que:

Cr = concentração da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Cp = concentração teórica da SQR adicionada (µg/mL)

- **Robustez:** foi determinada pela variação do tempo de incubação do teste. Os resultados foram avaliados pelo teste t (*Student*).

6.3.2.2 Resultados e discussão

Os valores das absorvâncias obtidos pelas diferentes concentrações de orbifloxacino SQR e amostra no ensaio turbidimétrico são mostrados na Tabela 6.27.

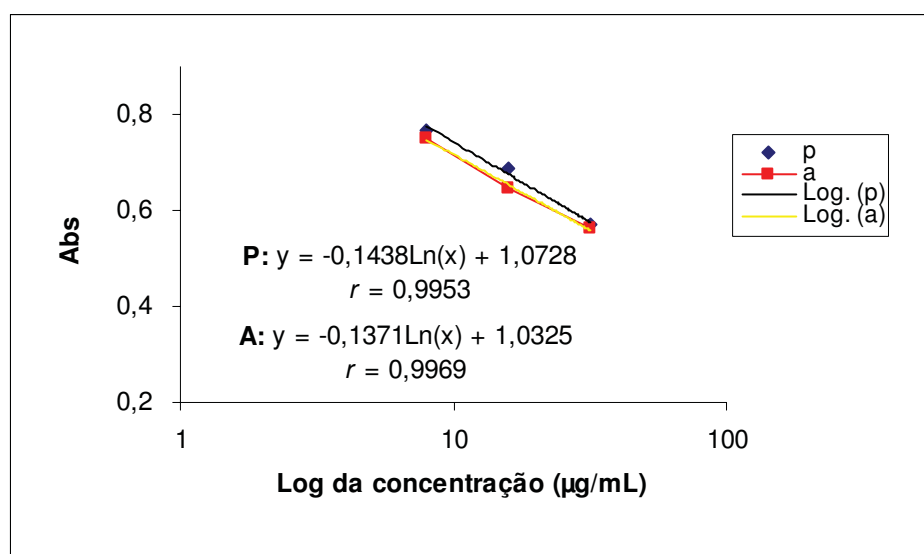
Tabela 6.27. Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de orbifloxacino, pelo método turbidimétrico

Dias	Absorvâncias*					
	8,0 µg/mL		16,0 µg/mL		32,0 µg/mL	
	P ₁	A ₁	P ₂	A ₂	P ₃	A ₃
1	0,757	0,737	0,668	0,668	0,521	0,530
2	0,781	0,756	0,683	0,660	0,553	0,568
3	0,786	0,743	0,732	0,642	0,568	0,562
4	0,812	0,829	0,727	0,735	0,635	0,630
5	0,806	0,795	0,764	0,754	0,603	0,601
6	0,720	0,701	0,614	0,563	0,585	0,557
7	0,716	0,702	0,610	0,485	0,518	0,485
Média	0,768	0,752	0,685	0,644	0,569	0,562
DPR (%)	5,04	6,24	8,67	14,61	7,50	8,34

P = padrão; A = amostra; *cada valor corresponde a média de 3 determinações

As curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra (Figura 6.10) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de sete curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,1438\ln(x) + 1,0728$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9953, para orbifloxacino SQR e $y = -0,1371\ln(x) + 1,0325$, com r de 0,9969, para o fármaco em comprimidos.

**Figura 6.10.** Curvas analíticas de soluções de orbifloxacino SQR e amostra, em concentrações de 8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra é mostrada na Tabela 6.28.

Tabela 6.28. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de orbifloxacino SQR e amostra, utilizando o método turbidimétrico

<i>Fontes de variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F_{cal}</i>	<i>F_{tab}</i>
Preparação	1	0,0050	0,0050	5,27*	4,17
Regressão	1	0,2652	0,2652	282,48*	4,17
Desvio de paralelismo	1	0,0002	0,0002	0,16	4,17
Quadrático	1	0,0000	0,0000	0,04	4,17
Diferença de quadrático	1	0,0021	0,0021	2,20	4,17
Desvio de Linearidade	2	0,000157	0,000078	1,12	3,32
Tratamentos	5	0,27	0,05	58,03*	2,53
Tubos	6	0,09	0,02	16,40*	2,53
Dentro (erro)	30	0,03	0,00	-	-
Total	41	0,39	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

Os resultados encontrados pela ANOVA do ensaio turbidimétrico validam o método, uma vez que os valores de razão de variância (F) dos três parâmetros críticos estão de acordo com os requerimentos farmacopeicos, a saber: (1) “regressão linear” significativa; (2) “desvio de paralelismo” não significativo e; (3) “desvio de linearidade” não significativo.

Os valores da potência de orbifloxacino em comprimidos, determinados pela equação de Hewitt (Equação 6.5) encontram-se na Tabela 6.29.

Tabela 6.29. Potências de orbifloxacino em comprimidos, obtidas pela equação de Hewitt, para o método turbidimétrico

<i>Dia</i>	<i>Teor de ORBI comp (%)</i>	<i>Teor médio</i>	<i>DPR (%)</i>
1	101,11		
2	101,54	102,11	1,35
3	103,69		

Na Tabela 6.30 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método turbidimétrico.

Tabela 6.30. Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico

	<i>ORBI SQR adicionada (µg/mL)</i>	<i>ORBI SQR encontrada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média (%)</i>
R₁	4,8	4,84	100,85	
R₂	8,0	8,02	100,31	99,87
R₃	11,2	11,03	98,45	

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo, os valores da precisão intradia e intermediária foram de 2,50 e 3,45%, respectivamente. A seletividade do método foi comprovada pelo teste *F* (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e *t* (*Student*) de comparação de médias, obtendo-se os valores 0,16 e 1,72, respectivamente, valores abaixo do tabelado ($F_{\text{tab}} = 4,28$; $t_{\text{tab}} = 1,78$, com 95% de confiança), comprovando a seletividade do ensaio turbidimétrico.

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do tempo de ensaio de 4 horas (**M**) para 3 horas e meia (**A**) e 4 horas e meia (**B**). Os valores de *t* (*Student*) encontrados para ambas as variações ($t_{N-A} = 6,44$ e $t_{N-B} = 7,28$, $t_{\text{tab}} = 1,81$) estão acima do valor tabelado, indicando que o teste não é robusto para este parâmetro, salientando a necessidade do cumprimento do tempo de ensaio (4 horas) (Tabela 6.31).

De fato, segundo Hewitt (2004), os fatores críticos na determinação da concentração final do ensaio em um tubo individual incluem: (1) concentração inicial, uma vez que, de acordo com os fundamentos teóricos, a concentração final deve ser diretamente proporcional à concentração inicial; (2) temperatura de incubação e; (3) tempo de incubação.

Tabela 6.31. Valores de absorvância obtidos para a determinação da robustez do método turbidimétrico

	N	A	B
	0,756	0,714	0,770
	0,747	0,718	0,771
	0,746	0,734	0,759
	0,744	0,707	0,780
	0,733	0,718	0,770
	0,746	0,711	0,775
	0,738	0,717	0,771
média	0,744	0,717	0,771
DPR (%)	0,98	1,19	0,83
t	-	6,44	7,28

N: condição nominal: 4 horas; **A:** 3 horas e meia; **B:** 4 horas e meia

Os ensaios microbiológicos permitem a determinação da potência do fármaco, através da medida do diâmetro do halo e da turbidez (absorvância), causada pela inibição do micro-organismo pelo antimicrobiano.

No desenvolvimento destes métodos foram escolhidas as concentrações 8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL, para o ensaio turbidimétrico e, 16,0; 32,0 e 64,0 µg/mL, para o ensaio de difusão em ágar, uma vez que apresentaram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010). A utilização de *S. aureus* baseia-se na sua sensibilidade frente ao orbifloxacino e na facilidade de crescimento e manutenção deste micro-organismo.

A linearidade dos métodos foi comprovada pelos componentes de paralelismo, regressão, termos quadráticos e desvio linear, bem como pelos coeficientes de correlação das curvas analíticas.

As análises estatísticas demonstraram que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de correlação, todos acima de 0,99, são excelentes tratando-se de ensaios biológicos. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra, para ambos os métodos.

A quantidade de orbifloxacino presente nas amostras analisadas, 98,78 e 102,11%, para os ensaios de difusão em ágar e turbidimétrico, respectivamente, estão de acordo com as monografias para antimicrobianos e com a monografia de

orbifloxacino comprimidos publicada na USP em 2011, que é de 90,0 a 110,0% (FB 5, 2010; BP, 2011b; USP, 2011f).

A exatidão dos métodos foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada a média de 100,31 e 99,87%, para os ensaios de difusão em ágar e turbidimétrico, respectivamente.

Os parâmetros estudados para a validação dos métodos microbiológicos difusão em ágar e turbidimétrico atenderam às especificações para a adequada quantificação de orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido.

6.4 Análise comparativa dos métodos desenvolvidos

É frequentemente necessária a comparação de metodologias para determinar se a variabilidade dos métodos difere de forma significativa. Os ensaios de comparação devem prover dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP, 2011). Para comparação de métodos, a Farmacopeia Americana (USP, 2011) recomenda avaliar os parâmetros de precisão e exatidão.

A Tabela 6.32 apresenta os diferentes parâmetros determinados para os quatro métodos quantitativos validados neste trabalho.

Tabela 6.32. Aplicabilidade, exatidão, precisão e seletividade dos métodos propostos

Parâmetro	Métodos			
	CLAE ¹	UV ²	DIF ³	TURB ⁴
λ (nm)	290	290	580	530
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	1,0-6,0	1,0-6,0	16,0-64,0	8,0-32,0
Equação: $y = ax + b$				
a	190377	0,1107	8,5263Ln	-0,1438Ln
b	692,33	-0,0028	-3,3656	1,0728
r	0,9999	0,9999	0,9996	0,9953
n	6	6	3	3
Exatidão (%)	99,15	99,77	100,31	99,87
Precisão intradia (DPR%)	1,33	1,23	2,88	2,50
Precisão intermediária (DPR%)	1,36	1,31	3,33	3,45
F (<i>Snedecor</i>)	0,80	0,86	0,26	0,16
t (<i>Student</i>)	0,87	1,74	0,19	1,72

¹CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência

²UV: método espectrofotométrico na região do ultravioleta

³DIF: ensaio microbiológico – método difusão em ágar

⁴TURB: ensaio microbiológico – método turbidimétrico

A comparação entre os métodos em questão mostra que, quanto aos parâmetros apresentados na validação, todos os métodos são considerados satisfatórios, pois a exatidão é próxima a 100%, e os valores de desvio padrão relativo para precisão são menores que 2% para os resultados obtidos pelos métodos físico-químicos e menores que 15% para os valores obtidos pelos métodos microbiológicos (BRASIL, 2003a).

A comparação também pode ser feita através da análise dos dados de doseamento obtidos neste trabalho (Tabela 6.33), utilizando-se a análise de variância.

Tabela 6.33. Valores obtidos na determinação do teor de orbifloxacino comprimidos utilizando os métodos propostos

<i>Parâmetro</i>	<i>Métodos</i>			
	<i>CLAE¹</i>	<i>UV²</i>	<i>DIF³</i>	<i>TURB⁴</i>
	98,95	99,99	99,32	101,11
Teor (%)	101,56	101,25	98,33	101,54
	100,50	100,98	98,69	103,69
Teor médio (%)	100,34	100,74	98,78	102,11
DPR (%)	1,31	0,66	0,51	1,35

¹CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência

²UV: método espectrofotométrico na região do ultravioleta

³DIF: ensaio microbiológico – método difusão em ágar

⁴TURB: ensaio microbiológico – método turbidimétrico

A análise de variância simples foi utilizada considerando-se como fator a variação entre os tratamentos. Foram utilizados os valores de teor de orbifloxacino comprimidos determinados durante os ensaios de doseamento. Os resultados mostraram a eficiência dos métodos. Os dados do tratamento estatístico são apresentados na Tabela 6.34.

Tabela 6.34. Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de orbifloxacino comprimidos pelos métodos desenvolvidos

<i>Fontes de variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>F_{tab}*</i>
Entre	3	17,18	5,73	5,29*	4,07
Dentro (erro)	8	8,67	1,08	-	-
Total	11	25,84	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

Os resultados obtidos através da ANOVA demonstraram haver diferença estatisticamente significativa entre os métodos propostos, para o nível de significância de 5%. Desta forma, foi realizado o teste de Tukey (de comparação de médias dos tratamentos) para avaliar a magnitude das diferenças entre os métodos desenvolvidos.

O valor da diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey foi 2,72. Assim, as únicas médias que diferem ao nível de significância de 5% são as relativas

aos métodos microbiológicos, difusão em ágar e turbidimétrico (contraste maior que a DMS).

Entretanto, apesar dos outros métodos demonstrarem que não há diferença estatisticamente significativa entre si, cada método possui suas características próprias.

O método espectrofotométrico na região do UV apresenta menor tempo de análise em comparação a todos os outros, mas apresenta baixa seletividade em relação a possíveis produtos de degradação. No método por CLAE há necessidade de pessoal especializado e equipamento de alto custo, além do uso de solventes também de custo elevado, entretanto, é o método mais específico e seletivo. Os ensaios microbiológicos apresentam técnica simples, pouco consumo de reagentes e baixa toxicidade, porém a análise requer maior tempo de execução, muito embora, o método microbiológico turbidimétrico necessite de um tempo muito menor, quando comparado com o método de difusão em ágar.

7 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

7.1 Introdução[§]

Formulações sólidas de administração oral têm se tornado a maior rota de administração por mais de um século. Mais de 80% dos produtos farmacêuticos mais vendidos são administrados por via oral (LENNERNAS e ABRAHAMSSON, 2005).

Devido aos avanços da química combinatória e triagem de alto rendimento mais de 40% das mais recentes substâncias ativas descobertas exibem alta lipofilicidade e frequentemente apresentam também alta atividade, entretanto, baixa solubilidade em água é percebida (CONNORS e ELDER, 2004). Como resultado, a dissolução no trato gastrointestinal, a qual é reconhecida como pré-requisito para absorção no sistema sanguíneo tem se tornado o maior desafio para formas farmacêuticas orais sólidas (DRESSMAN *et al.*, 2007; STEGMAN *et al.*, 2007).

A percepção prévia dos problemas de biodisponibilidade é fundamental o mais cedo possível no desenvolvimento do fármaco, uma vez que, considerando os longos ciclos de desenvolvimento, de 8 a 12 anos, e os altos custos com pesquisa e desenvolvimento (P&D), mais de US\$800 milhões (DIMASI *et al.*, 2003), falhas nas fases finais de pesquisa clínica poderiam ser economicamente desastrosas, isto sem mencionar a exposição desnecessária de voluntários saudáveis a estudos farmacocinéticos. Para auxiliar o desenvolvimento de fármacos orais, ensaios de dissolução *in vitro* têm emergido como método de preferência para avaliar o desenvolvimento de novas substâncias ativas e formulações farmacêuticas.

A qualidade de formas farmacêuticas orais sólidas depende de sua capacidade em liberar a substância ativa em meio aquoso de uma maneira consistente e reprodutível, tornando o fármaco disponível para absorção gastrointestinal. Deste modo, o teste de desempenho de dissolução da forma farmacêutica deve ser verificado preferencialmente com o ensaio de dissolução *in vitro* antes do produto ser liberado no mercado. Os ensaios de dissolução fornecem também informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento, como para a produção e controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Para os requerimentos de dissolução, a Farmacopeia Americana provê informações no capítulo geral de dissolução, bem como nos capítulos relacionados à desintegração e liberação de fármacos (USP, 2011a, 2011b, 2011c, 2011d). As Farmacopeias Europeia e Britânica juntamente com o FDA e a ICH também fornecem guias para o desenvolvimento e a validação de procedimentos de dissolução (FDA, 1997a, 1997b; 2000a; ICH, 2005; BP, 2011a; EP, 2011).

[§]O desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução foi realizado no *AnQual Laboratories, School of Pharmacy, Faculty of Medical and Health Sciences, Grafton Campus, The University of Auckland*, Auckland, Nova Zelândia, sob orientação do Prof. Dr. Sanjay Garg.

7.1.1 Conceitos de dissolução

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida interage com o solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição é mais adequada com a aplicação nos ensaios de dissolução, estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico o libera (COSTA e LOBO, 1999).

A expressão teórica mais frequentemente utilizada para descrever a taxa de dissolução é a equação de Noyes-Whitney (NOYES e WHITNEY, 1897), a qual foi publicada há mais de cem anos atrás, mas que ainda é válida:

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C_t) \quad \text{Equação 7.1}$$

Em que k representa o coeficiente de dissolução ou de transferência de massa, C_s é a solubilidade de saturação (solubilidade máxima no meio de dissolução) e C_t é a concentração em massa no tempo t .

Em 1904, Nernst, Brunner e seus respectivos colaboradores modificaram a equação de Noyes e Whitney, tendo incluído como parâmetros influentes no processo o coeficiente de difusão (D), a área de superfície (S), a espessura da camada de difusão (h) e o volume do meio de dissolução (V):

$$\frac{dC}{dt} = k \frac{DS}{Vh} (C_s - C_t) \quad \text{Equação 7.2}$$

Esta é a teoria da velocidade de dissolução com maior aceitação e dela se constata que quando o volume do meio de dissolução é suficientemente grande, considera-se que a concentração do soluto no solvente não afeta a velocidade de dissolução. As determinações da velocidade de dissolução têm que ser feitas respeitando sempre esta condição (FARINHA *et al.*, 1997).

A remoção contínua do fármaco do intestino, devido à absorção através da parede intestinal, normalmente garante que a concentração do fármaco *in vivo* é insignificante comparado à solubilidade de saturação (UNGELL e ABRAHAMSSON, 2000). Para encontrar resultados de dissolução fisiologicamente representativo deste

estado a denominada condição *sink* é amplamente recomendada para todos os ensaios de dissolução *in vitro* (FDA, 1997a; USP, 2011b, 2011d).

A seleção criteriosa das condições do ensaio de dissolução deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos. Os aparatos usados para dissolução são bem descritos nas farmacopeias (FB 5, 2010; BP, 2011a; EP, 2011; USP, 2011b, 2011d).

7.1.2 Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução

A validação de métodos analíticos para determinação de características de desempenho, como é o caso dos ensaios de dissolução, deve incluir a avaliação da linearidade, precisão, exatidão e seletividade (USP, 2011d, 2011e).

A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido *versus* tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos ensaios de dissolução (MANADAS *et al.*, 2002).

O ensaio de dissolução apresenta vários componentes distintos. Estes componentes incluem o meio de dissolução, aparato, protocolo de estudo (incluindo os critérios de aceitação) e o modo de ensaio. Todos estes componentes devem ser adequadamente escolhidos e desenvolvidos para prover um método que seja reproduzível para operações do dia-a-dia dentro do mesmo laboratório e robusto o bastante para permitir a transferência para outro laboratório.

7.1.2.1 Meio de dissolução

A seleção das condições de meio de dissolução mais apropriado é baseada na capacidade discriminatória, robustez, estabilidade do analito no meio teste e relevância para o desempenho *in vivo*. Para selecionar o meio de dissolução, dados físicos e químicos do fármaco e do produto farmacêutico devem ser considerados, por exemplo, a solubilidade e estabilidade da solução do fármaco como função do valor de pH. Outras propriedades críticas do produto farmacêutico incluem o mecanismo de liberação (imediate, lento ou modificado) e a taxa de desintegração afetadas pela dureza da formulação, friabilidade, presença de potencializadores de solubilidade e presença de outros excipientes. Para selecionar a composição do meio, a influência de tampões, molaridade, pH e surfactantes na solubilidade e estabilidade do fármaco também devem ser avaliados (USP, 2011b, 2011d).

O meio de dissolução mais comum é provavelmente o ácido clorídrico diluído, entretanto, outros meios utilizados incluem tampões na faixa de pH fisiológico de 1,2 a 7,5, fluidos gástrico e intestinal simulados (com ou sem enzimas), água e surfactantes

(com ou sem ácidos ou tampões). O uso de misturas de solventes aquosos-orgânicos, geralmente desencorajados, também podem ser usados se justificados. Algumas vezes enzimas também são usadas no meio quando se deseja testar cápsulas gelatinosas (MARQUES e BROWN, 2002).

O volume do meio está, normalmente, no intervalo de 500 a 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado. Volumes altos, tais como 2–4 L, são utilizados quando justificado. Volumes baixos, como 100 mL, também são usados para testar fármacos de alta potência (dosagem baixa) (USP, 2011b, 2011d).

Durante o desenvolvimento do ensaio de dissolução um dos objetivos gerais é encontrar as condições *sink*. Condições *sink* são definidas como o volume do meio que é, no mínimo, três vezes maior que aquele requerido para formar uma solução saturada do fármaco. Quando as condições *sink* estão presentes os resultados da dissolução irão refletir as propriedades da dosagem mais exatamente (USP, 2011b, 2011d).

A desaeração do meio é normalmente requerida e pode ser realizada pelo aquecimento do meio ou mais comumente pela filtração do meio. O capítulo 711 da Farmacopeia Americana contém informações adicionais sobre desaeração (USP, 2011b). Durante o desenvolvimento do método, os resultados obtidos das amostras dissolvidas em meio não desaerado *versus* aquelas dissolvidas em meio desaerado devem ser comparadas para determinar se este processo é necessário (USP, 2011b).

7.1.2.2 Aparatos de dissolução

O capítulo 711 da Farmacopeia Americana lista sete tipos de aparatos de dissolução (USP, 2011b), enquanto a Farmacopeia Brasileira descreve três aparatos diferentes (cestas, pás e cilindros alternantes) (FB 5, 2010). A escolha do aparato é baseada no desempenho da dosagem no sistema teste *in vitro*. Para formas de dosagem oral sólida, os aparatos mais frequentemente usados são aparato 1 (cesta) e aparato 2 (pás).

A agitação também é parte importante do processo de dissolução. Aparato 1 (cesta) a 100 rpm ou aparato 2 (pás) a 50 ou 75 rpm são os mais comumente usados. Outras velocidades de agitação e aparatos são aceitáveis com apropriada justificativa. Taxas mais altas ou baixas de rotação são normalmente inapropriadas devido a inconsistência hidrodinâmica abaixo de 25 rpm e ao aumento da turbulência acima de 150 rpm. A diminuição ou aumento da velocidade de rotação do aparato pode ser justificado se o perfil de dissolução refletir melhor o desempenho *in vivo* ou se o método resultar em melhor discriminação entre as propriedades do fármaco sem afetar

negativamente a reprodutibilidade (FDA, 1997a, 1997b; BP, 2011a; USP, 2011b, 2011d).

7.1.2.3 Protocolo de estudo de dissolução

A dissolução é avaliada pela medida da taxa de liberação ou quantidade de fármaco dissolvido através do tempo. Um único ponto ou pontos múltiplos no tempo podem ser medidos dependendo do tipo de dosagem ou dados desejados. Para o propósito de comparação, no desenvolvimento de formulações, os perfis de dissolução são requeridos e é comum a coleta de dados de vários pontos no tempo total do teste. Para comparação de perfis, um número suficiente de pontos através do tempo deve ser selecionado para caracterizar adequadamente a ascensão e o platô da curva de dissolução (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997a; MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2003c, 2004).

A amostragem é outro ponto importante a ser levado em consideração no desenvolvimento do ensaio de dissolução. Para muitos testes, particularmente aqueles para formulação de liberação imediata usando um único ponto em um curto período de tempo (menos de 1 h), a amostragem pode ser feita manualmente. Amostragens automáticas são uma alternativa útil para testes extensos, com múltiplas amostragens ou para aumentar o rendimento. Quando a amostragem automatizada é empregada é importante garantir que nenhuma tendência (desvio), comparada com o método manual, seja introduzida. Independentemente da forma de amostragem do método, o local de coleta deve estar em conformidade com as especificações dos compêndios oficiais (FB 5, 2010; USP, 2011b). Qualquer distúrbio hidrodinâmico nas cubas gerado pelas cânulas durante o processo de amostragem também deve ser considerado e validação adequada deve ser realizada para garantir que as cânulas não estão introduzindo uma mudança significativa na taxa de dissolução.

A filtração também deve ser considerada durante o desenvolvimento do método. A filtração da amostra do ensaio de dissolução é necessária para prevenir que partículas do fármaco e/ou adjuvantes não dissolvidos entrem na amostra analítica e se dissolvam posteriormente distorcendo os resultados do teste. A filtração também remove partículas insolúveis que poderiam causar interferências ou turbidez nas técnicas utilizadas nos ensaios das amostras (MARCOLONGO, 2003; LINDENBERG *et al.*, 2005).

Os critérios de aceitação também devem ser considerados durante o desenvolvimento do teste. Estes critérios devem ser representativos de vários lotes da mesma composição e processo de produção, incluindo lotes-chave usados nos

estudos preliminares e lotes que são representativos do desempenho do produto farmacêutico nos estudos de estabilidade.

Finalmente, o ensaio de dissolução deve ser discriminatório o suficiente para ser capaz de distinguir mudanças significantes na composição ou processo de produção que poderiam afetar o desempenho *in vivo*. Em geral, um ensaio de dissolução adequadamente projetado deve resultar em dados reprodutíveis (FDA, 1997a).

7.1.2.4 Análise dos resultados

Existem duas técnicas comuns utilizadas na análise das amostras do ensaio de dissolução: espectrofotometria na região do UV e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As determinações espectrofotométricas são as formas de análise mais comumente utilizadas, uma vez que são mais rápidas, mais simples e requerem menor quantidade de solventes que os métodos cromatográficos, o que diminui o valor da análise e a formação de resíduos.

Os métodos cromatográficos, entretanto, têm distintas vantagens, particularmente quando existe significativa interferência dos adjuvantes ou múltiplas substâncias ativas na formulação, quando aumento na sensibilidade é requerida e quando existe o desejo de automatizar o processo do ensaio de dissolução. A cromatografia também apresenta vantagens pelos diferentes modos de detecção (UV, fluorescência e MS, por exemplo) para ambos os propósitos, sensibilidade e seletividade. No desenvolvimento do ensaio de dissolução que inclui a análise por CLAE, a compatibilidade do meio de dissolução com a fase móvel deve ser considerada, especialmente se existe a necessidade de grande volume de injeção (acima de 100 µL). Independentemente do modo de ensaio utilizado o procedimento deve ser validado.

Com a introdução dos guias regulatórios relacionados ao *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) (FDA, 2000a) e ao estabelecimento da correlação *in vitro in vivo* (IVIVC) (FDA, 2000a, 2000b), o foco do ensaio de dissolução rapidamente mudou do tradicional teste de controle de qualidade de 'um ponto' para um indicador da performance *in vivo* dos medicamentos.

De acordo com a BCS, uma substância é classificada com base em sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal. Quatro classes de fármacos foram definidas:

Classe I: alta solubilidade/alta permeabilidade

Compostos de classe I são geralmente muito bem absorvidos. Para fármacos desta classe formulados como produtos de liberação imediata, a taxa de dissolução geralmente excede o esvaziamento gástrico. Além disto, aproximadamente 100% de absorção pode ser esperada se pelo menos 85% do produto se dissolve em 30 minutos da dissolução *in vitro* através de uma série de valores de pH (FDA, 2000a, 2000b). Assim, os dados de bioequivalência *in vivo* não são necessários para assegurar a comparabilidade de produtos (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997a; FDA, 2000a; MARTINEZ *et al.*, 2002; BRASIL, 2003b, 2003c).

Classe II: baixa solubilidade/alta permeabilidade

A biodisponibilidade de produtos contendo estes compostos é provavelmente limitada pela taxa de dissolução. Por esta razão, a correlação entre a biodisponibilidade *in vivo* e a taxa de dissolução *in vitro* pode ser observada (FDA, 2000a, 2000b; MARTINEZ *et al.*, 2002).

Classe III: alta solubilidade/baixa permeabilidade

A absorção é limitada pela taxa de permeabilidade, mas a dissolução irá, mais provavelmente, ocorrer muito rapidamente. Por esta razão, têm sido feitas algumas sugestões de que enquanto as formulações de referência e teste não contiverem agentes que possam modificar a permeabilidade do fármaco ou o trânsito do trato gastrointestinal, critérios de isenção semelhantes aos associados a compostos de classe I poderiam ser apropriados (FDA, 2000a; MARTINEZ *et al.*, 2002).

Classe IV: baixa solubilidade/baixa permeabilidade

Compostos de classe IV apresentam baixíssima biodisponibilidade oral. Estes compostos são não somente difíceis de dissolver, mas também uma vez dissolvidos, frequentemente exibem limitada permeabilidade através da mucosa do trato gastrointestinal. Estes fármacos tendem a ser muito difíceis para serem formulados e podem exibir uma grande variabilidade inter e intraespécie (FDA, 2000a, 2000b; MARTINEZ *et al.*, 2002).

De acordo com o The Index Merck (O'NEIL, 2006), o orbifloxacino é livremente solúvel em água, solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol, éter, acetato de etila e clorofórmio e, conforme a Farmacopeia Britânica (2011b), o orbifloxacino apresenta-se muito pouco solúvel em água, solúvel ácido acético glacial e praticamente insolúvel em etanol anidro.

Segundo a literatura, o orbifloxacino é lipofílico e solúvel, e tem suas características definidas pelo BCS como fármaco Classe I, altamente solúvel e altamente permeável (AMIDON *et al.*, 1995; MARTINEZ *et al.*, 2002; DAVIS *et al.*, 2006).

O único relato encontrado descrevendo um ensaio de dissolução para o orbifloxacino é a Farmacopeia Americana (2011f). Este compêndio descreve o ensaio de dissolução para orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido utilizando como meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 M e aparato 2 na velocidade de 50 rpm.

7.2 Método

A substância química de referência (SQR) e amostras da forma farmacêutica comprimido utilizadas neste trabalho foram descritas no Capítulo 4, seções 4.2 e 4.3, respectivamente.

Os ensaios de dissolução foram realizados em equipamento (seção 4.4) contendo 8 cubas de dissolução, sendo utilizadas somente 6, de acordo com as normas estabelecidas pelas Farmacopeias Brasileira (FB 5, 2010) e Americana (USP, 2011b). A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro na região de UV e cromatógrafo a líquido. Estes métodos foram validados previamente e os dados estão expostos no Capítulo 6, seções 6.1 e 6.2, respectivamente.

Soluções de ácido clorídrico 0,01 M (pH 1,2) e tampões acetato (pH 4,5) e fosfato (pH 6,8) foram preparadas de acordo com a USP (2011) e o pH foi medido em peagômetro.

7.2.1 Determinação das condições sink

O orbifloxacino possui alta solubilidade (classe I - BCS), assim, 900 mL de meio conferem as condições *sink* para o teste realizado em produtos contendo 22,7 mg do fármaco.

Para o FDA (1997a, 1997b), as condições *sink* são desejáveis, mas não mandatórias. A solubilidade em água não foi testada, desde que este não é um meio de dissolução ideal. Também segundo o FDA (1997a), o uso de água como meio de dissolução está desencorajado, uma vez que as condições do teste, como pH e tensão superficial podem variar dependendo da origem da água e podem mudar durante o teste de dissolução devido à influência dos ingredientes ativos e inativos.

7.2.2 Determinação do perfil de dissolução

Com a finalidade de desenvolver um método com melhor poder discriminatório para determinação da liberação de orbifloxacino em comprimidos, diversas condições foram testadas. O volume dos meios de dissolução utilizados foi de 900 mL. Os meios foram previamente desaerados em ultrassom por 30 minutos e mantidos à temperatura de $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

Foi utilizado somente o aparato 2 (pás), por ser este o mais indicado para a avaliação de comprimidos. A velocidade de agitação foi selecionada de acordo com faixa recomendada para pás (50-75 rpm) (FDA, 1997a, 1997b; BP, 2011a; USP, 2011b, 2011d). Considerando que os testes preliminares com 50 rpm foram satisfatórios, não foram testadas outras velocidades. Variaram-se os meios de dissolução utilizando-se três diferentes meios. As condições testadas encontram-se na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Condições testadas para o desenvolvimento do ensaio de dissolução de comprimidos contendo orbifloxacino

Condição	Aparato	Meio (900 mL)	Velocidade (rpm)	Tempo de coleta (minutos)
I	2	HCl 0,01 M	50	0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120
II	2	Tampão acetato pH 4,5	50	0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120
III	2	Tampão fosfato pH 6,8	50	0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120

As coletas de 10 mL do meio foram realizadas nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120 minutos, efetuando-se a reposição do mesmo volume de meio a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A percentagem do fármaco dissolvida foi determinada com posterior diluição; alíquotas de 1 mL filtradas em filtro quantitativo foram diluídas para concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ em fase móvel para análise por CLAE e em HCl 0,5 M para análise por espectrofotometria na região do UV. Para a avaliação cromatográfica as amostras foram adicionalmente filtradas em membrana de *nylon* com poro de 0,45 μm .

Nos cálculos da percentagem dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e as devidas correções referentes às retiradas de fármaco e reposições de meio em cada tempo.

7.2.3 Avaliação da influência do filtro

A avaliação do filtro é necessária para determinar se este poderia ser usado no ensaio de dissolução sem adsorção do fármaco e se ele remove excipientes insolúveis que poderiam causar interferências e turbidez (LINDENBERG *et al.*, 2005).

Para a avaliação da SQR foram pesados 5,0 mg de orbifloxacino SQR e transferidos para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de HCl 0,5 M. Alíquota de 250 μL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a

concentração final de 2,5 µg/mL. As amostras das soluções de orbifloxacino SQR foram utilizadas como referência.

Para avaliação das amostras, três comprimidos de orbifloxacino foram dissolvidos em 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 a 37 °C ± 0,5 °C, com velocidade de 50 rpm utilizando o aparato 2 (pás). Após 60 minutos de dissolução, alíquotas de 10 mL de cada cuba foram retiradas e diluídas em HCl 0,5 M para gerar a concentração final de 2,5 µg/mL.

As soluções de orbifloxacino SQR e amostra foram tratadas da seguinte maneira:

- Analisadas em espectrofotômetro na região do UV sem filtração prévia;
- Filtradas em papel de filtro quantitativo e analisadas em espectrofotômetro na região do UV;
- Filtradas em papel de filtro quantitativo e membrana de *nylon* com poro de 0,45 µm e analisadas em espectrofotômetro na região do UV.

A avaliação da influência do filtro no método proposto é muito importante e foi realizada visando verificar possíveis alterações na concentração do fármaco ou liberação de material para solução. Nessa avaliação foi utilizada somente a técnica da espectrofotometria na região do UV, pois na cromatografia líquida não é indicado o uso de amostras não filtradas, as quais podem danificar o equipamento e inutilizar a coluna cromatográfica.

A centrifugação não foi testada, uma vez que é desaconselhada pelo FDA (1997a, 1997b), visto que a dissolução pode continuar ocorrendo e pode haver formação de gradiente de concentração no sobrenadante.

7.2.4 Avaliação da estabilidade de orbifloxacino comprimidos no meio de dissolução

A avaliação da estabilidade dos comprimidos de orbifloxacino no meio de dissolução foi realizada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por um período de 24 horas e a temperatura de 37 °C ± 0,5 °C por 2 horas.

Um comprimido de orbifloxacino foi submetido às condições definidas no ensaio de dissolução. Decorridos 60 minutos, foram coletadas alíquotas da amostra. A amostra foi dividida em 3 porções, sendo a primeira porção diluída em HCl 0,5 M e fase móvel e quantificadas por espectrofotometria na região do UV e por CLAE, respectivamente. A segunda parte foi mantida por 2 horas a 37 °C ± 0,5 °C e a terceira porção foi armazenada em frasco âmbar à temperatura ambiente por 24 horas.

Decorrido os tempos determinados, estas amostras foram analisadas como descrito previamente.

7.2.5 Validação do ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução é classificado como teste de performance (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2011d, 2011e).

A validação do ensaio de dissolução incluiu a avaliação da seletividade, linearidade, precisão, exatidão, influência do filtro e estabilidade de orbifloxacino no meio de dissolução.

7.2.5.1 Seletividade

A seletividade foi inferida pela comparação dos cromatogramas, pureza do pico (PDA) e espectros da SQR e amostras.

7.2.5.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela curva analítica construída para o método por CLAE e espectrofotometria na região do UV, nos quais empregaram-se seis concentrações de orbifloxacino (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 µg/mL).

7.2.5.3 Precisão

Para a validação do ensaio de dissolução, a precisão foi medida em dois níveis, intradia e intermediária.

A precisão intradia foi determinada através da análise de seis comprimidos de orbifloxacino do mesmo lote no mesmo dia e a precisão intermediária foi encontrada analisando-se seis amostras em um segundo dia. Depois de decorridos 60 minutos do teste, a percentagem dissolvida do fármaco foi determinada por espectrofotometria na região do UV e cromatografia líquida. Foram calculadas as médias e os valores de desvio padrão relativo.

7.2.5.4 Exatidão

A exatidão foi obtida pelo teste de adição de padrão para o cálculo de recuperação. O teste foi estabelecido adicionando-se alíquotas da solução padrão estoque às amostras das cubas de dissolução. Foram utilizados três níveis de concentrações, 2,8; 3,5 e 4,2 µg/mL.

A percentagem de orbifloxacino recuperado foi calculada para cada caso segundo a equação 7.3 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left[\frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right] \times 100 \quad \text{Equação 7.3}$$

em que:

Cr = concentração da solução amostra adicionada de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

Ca = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

Cp = concentração teórica da SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

Segundo a ICH (2005) a recuperação medida, para testes de dissolução, deve estar entre 95 a 105% da quantidade adicionada.

7.2.6 Avaliação da cinética de liberação

Quatro modelos matemáticos foram aplicados para avaliar a cinética de liberação de orbifloxacino: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson–Crowell. As equações são mostradas na Tabela 7.2. As curvas foram construídas aplicando-se os modelos cinéticos citados, considerando-se somente os pontos que correspondiam à fase ascendente da liberação do fármaco, ou seja, até 15 minutos. Após este tempo observa-se a presença de um platô nos perfis de dissolução, indicando o término do processo. O modelo matemático que melhor expressa o perfil de dissolução de orbifloxacino comprimidos foi selecionado baseado no coeficiente de correlação (r) (COSTA e LOBO, 2001; USP, 2011d).

Tabela 7.2. Modelos matemáticos usados para determinar a cinética de dissolução de comprimidos contendo orbifloxacino

Cinética de ordem zero	$Q_t = Q_0 - K_0 t$	gráfico da fração de fármaco não dissolvido <i>versus</i> tempo será linear
Cinética de primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t$	gráfico do logaritmo neperiano da quantidade não liberada do fármaco <i>versus</i> tempo será linear
Modelo Higuchi	$f_t = K_H t^{1/2}$	gráfico da fração de fármaco dissolvido <i>versus</i> raiz quadrada do tempo será linear
Modelo Hixson-Crowell	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$	gráfico da raiz cúbica da fração não liberada do fármaco <i>versus</i> tempo será linear

Q_t é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução; K_0 e K_1 são as constantes de liberação de ordem zero e primeira ordem, respectivamente; f_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t por unidade de superfície; K_H é a constante de dissolução de Higuchi; W_0 é a quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica; W_t é a quantidade de fármaco que permanece na forma farmacêutica no tempo t ; K_s é a constante incorporando a relação superfície-volume.

A equação de ordem zero descreve o sistema onde a taxa de liberação é independente da concentração das espécies dissolvidas (SHAN-YANG, 1988). A equação de primeira ordem delinea o sistema de liberação na qual a taxa de dissolução é dependente da concentração das espécies dissolvidas (RANGA *et al.*, 1988). A equação de Higuchi apresenta o sistema de liberação onde o fármaco sólido é disperso em uma matriz insolúvel e a taxa de liberação do fármaco é relacionada com a taxa de difusão do mesmo (SCHWARTZ *et al.*, 1968; BAVEJA *et al.*, 1987). A lei de Hixson-Crowell descreve o sistema de liberação no qual há mudanças na área de superfície e diâmetro de partículas ou comprimidos (DESAI *et al.*, 1966; SINGH *et al.*, 1967).

7.2.7 Poder discriminatório do ensaio de dissolução

O poder discriminatório do ensaio de dissolução proposto foi avaliado. Amostras dos comprimidos de orbifloxacino foram expostas em câmaras climáticas à temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ de umidade relativa e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e não menos que $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa, nas condições de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade, respectivamente. As amostras foram analisadas quanto ao perfil e eficiência de dissolução, nas condições descritas na Tabela 7.3, nos tempos de coleta 0, 1 e 2, correspondendo à exposição dos comprimidos pelo período de 0, 3 e 6 meses, em ambos os testes de estabilidade.

A eficiência de dissolução ($ED\%$) é um parâmetro que pode ser utilizado para efetuar a comparação entre formulações ou entre uma formulação original e a sua correspondente degradada. Como afirmado por Skoug e colaboradores (1997) e Ofoefule e colaboradores (2001), a $ED\%$ permite a comparação mais fidedigna entre dois produtos ou situações.

A eficiência de dissolução foi calculada a partir dos valores obtidos de área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução de orbifloxacino em um intervalo de tempo (t), através do método dos trapezoides (KHAN e RHODES, 1975). Determinou-se a ED através da razão entre a área sob a curva de dissolução de orbifloxacino no intervalo de tempo compreendido entre zero e 60 minutos (ASC_{0-60}) e a área total do retângulo (ASC_{TR}) definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a 60 minutos). A ED foi expressa em percentagem e pode ser definida pela seguinte equação:

$$ED\% = \frac{ASC_{(0-60)}}{ASC_{TR}} \times 100 \quad \text{Equação 7.4}$$

7.3 Resultados e discussão

A solubilidade do fármaco e a estabilidade da solução de orbifloxacino são propriedades importantes a serem consideradas no momento da seleção do meio de dissolução (USP, 2011b). Os testes preliminares mostraram que orbifloxacino foi solúvel em todos os meios de dissolução selecionados (HCl 0,01 M, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8).

As Figuras 7.1, 7.2 e 7.3 apresentam os resultados obtidos a partir de ensaios de dissolução com comprimidos de orbifloxacino nos três meios de dissolução testados, utilizando aparato 2 (pás) e velocidade de rotação de 50 rpm. As soluções foram analisadas por CLAE e espectrofotometria no UV.

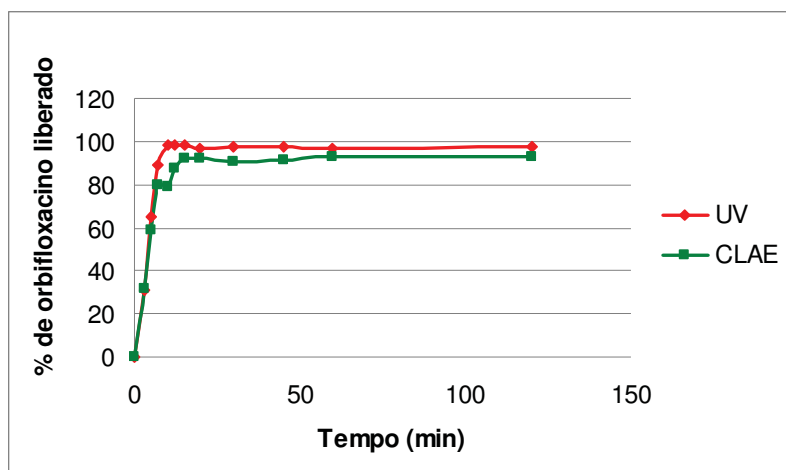


Figura 7.1. Perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos empregando aparato 2, 900 mL de meio HCl 0,01 M e velocidade de 50 rpm.

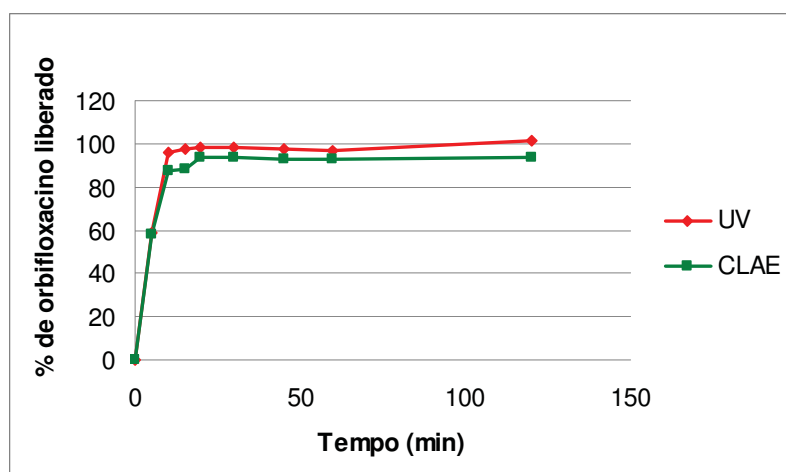


Figura 7.2. Perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos empregando aparato 2, 900 mL de meio tampão acetato pH 4,5 e velocidade de 50 rpm.

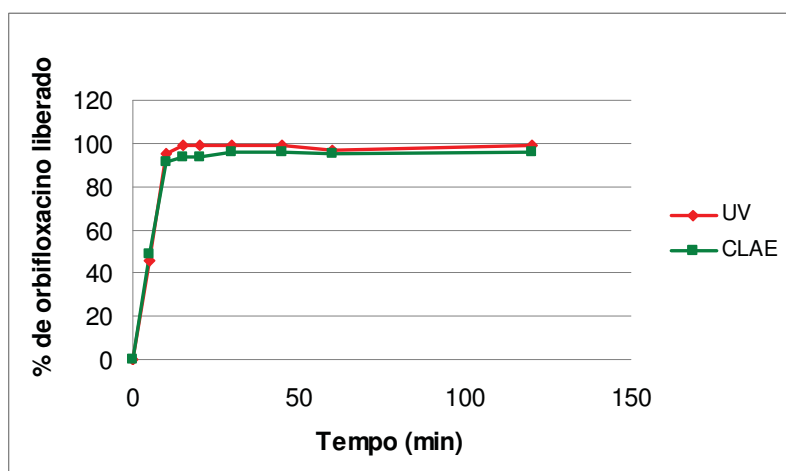


Figura 7.3. Perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos empregando aparato 2, 900 mL de meio tampão fosfato pH 6,8 e velocidade de 50 rpm.

Em todos os meios testados os comprimidos de orbifloxacino apresentaram praticamente o mesmo perfil de liberação.

Como esperado para compostos altamente solúveis (Classe I), a dissolução de orbifloxacino foi rápida e praticamente completa em 15 minutos sob todas as condições testadas. Os perfis de dissolução obtidos para os comprimidos contendo orbifloxacino foram satisfatórios.

Como especificação do teste, pode ser sugerida a análise de um ponto, por exemplo, em 30 minutos, no qual mais de 85% do fármaco deverá estar dissolvido. A literatura afirma que para fármacos altamente solúveis, uma especificação de único ponto, com no mínimo 85% de dissolução em 60 minutos ou menos é suficiente para comprovar a qualidade lote a lote do produto e garantir biodisponibilidade (AMIDON *et al.*, 1995; MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2003c).

O aparato 2 (pás) com velocidade de 50 rpm foi selecionada como aparato de dissolução e 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 foi escolhido como meio de dissolução para a validação do ensaio de dissolução (Tabela 7.3). Estas condições de teste foram escolhidas porque este meio apresentou os resultados mais similares entre as duas técnicas de análise utilizadas, CLAE e espectrofotometria no UV, entretanto, todos os meios de dissolução apresentados aqui podem ser utilizados para demonstrar a liberação de orbifloxacino através do tempo.

Tabela 7.3. Condições utilizadas para o desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução de orbifloxacino comprimidos

Características	Descrição
Aparato	Pás
Velocidade de agitação	50 rpm
Meio de dissolução	Tampão fosfato pH 6,8
Volume do meio	900 mL
Modo de desaeração	Banho de ultrassom – 15 minutos
Tempos de amostragem	5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos
Temperatura	37 °C ± 0,5 °C
Métodos de análise	Espectrofotometria no UV e CLAE

Os parâmetros iniciais de filtração e estabilidade da solução devem ser estabelecidos antes do início de qualquer ensaio de dissolução das amostras. (FORTUNATO, 2005), assim, estas avaliações foram realizadas. A avaliação dos filtros demonstrou que as soluções filtradas com filtros quantitativos e filtros de *nylon*

com poro de 0,45 μm estão entre 98 e 102% do valor inicial e podem ser utilizados nos ensaios de dissolução sem prejuízo às amostras (MARQUES e BROWN, 2002). (Tabela 7.4).

Tabela 7.4. Interferência dos filtros na filtração das amostras do ensaio de dissolução

Tipo de filtração	Absorção	
	SQR	Comp. (%)
Sem filtração	0,267	0,269 (100,75)
Filt Q	0,268	0,266 (99,36)
Filt Q+ Filtro com membrana de <i>nylon</i> (0,45 μm)	0,264	0,259 (98,18)

Filt Q: filtro quantitativo; SQR: substância química de referência; Comp.: comprimidos

De acordo com a literatura, o intervalo aceitável para a estabilidade da solução é de 98 a 102% do valor inicial (MARQUES e BROWN, 2002). O orbifloxacino permaneceu estável no meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 pelos períodos de tempo determinados e nenhum produto de degradação foi observado nos cromatogramas (Tabela 7.5).

Tabela 7.5. Estabilidade de orbifloxacino no meio de dissolução

Condições	UV	CLAE
0h	99,71	100,17
2h - 37 \pm 0,5 $^{\circ}\text{C}$	98,23	100,91
24h - temperatura ambiente	98,07	101,04

Os pHs dos meios de dissolução utilizados também foram verificados no início e fim dos ensaios e, em todas as soluções, os mesmos permaneceram inalterados.

7.3.1 Validação do ensaio de dissolução

A validação do ensaio de dissolução foi realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e interferência dos filtros e estabilidade das soluções como descrito anteriormente.

7.3.1.1 Seletividade

Uma vez que não se dispunha do placebo dos comprimidos de orbifloxacino (Orbax[®]), a seletividade do ensaio de dissolução foi verificada pela avaliação do pico cromatográfico de orbifloxacino na solução amostra, verificando-se sua pureza (pureza

do pico maior que 0,99) e pela comparação dos espectros da SQR e amostra. Além disto, a seletividade foi inferida pelos resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão (USP, 2011e; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2007).

7.3.1.2 Linearidade

Os métodos apresentaram linearidade na faixa de concentração de 1,0 a 6,0 µg/mL. Os resultados obtidos estão descritos no Capítulo 6, seções 6.1 e 6.2, para espectrofotometria na região do UV e CLAE, respectivamente.

7.3.1.3 Precisão

A precisão foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos com seis unidades de orbifloxacino comprimido no mesmo dia e em dias diferentes.

As quantidades de orbifloxacino dissolvidas no tempo de coleta de 60 minutos e os valores de desvio padrão relativo estão listados na Tabela 7.6.

Tabela 7.6. Valores obtidos no teste de precisão do ensaio de dissolução de orbifloxacino comprimidos

	<i>UV</i>		<i>CLAE</i>	
	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>
	0,2673	0,2594	421545	430718
	0,2670	0,2671	424174	440569
	0,2618	0,2634	429391	438673
	0,2634	0,2656	423067	427584
	0,2660	0,2630	431782	432195
	0,2690	0,2660	436223	438549
média	0,2657	0,2640	427697	434715
DPR (%) intradia	0,99	1,03	1,34	1,21
DPR (%) intermediária	0,68		0,99	

Os valores baixos de desvio padrão relativo obtidos garantem a precisão do ensaio de dissolução.

7.3.1.4 Exatidão

A exatidão foi obtida pelo teste de recuperação em que quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas às amostras dissolvidas nas cubas. A média das recuperações foi 95,17% no ensaio utilizando a espectrofotometria no UV e

96,83% para o ensaio utilizando CLAE. Todos os valores estão dentro do permitido e garantem a exatidão do teste.

7.3.2 Avaliação da cinética de liberação

Os perfis de dissolução (Tabelas 7.7 e 7.8 e Figuras 7.4 e 7.5) foram usados para avaliar a cinética de liberação do fármaco.

Tabela 7.7. Quantidade de orbifloxacino dissolvido no ensaio de dissolução (n = 6), dia 1, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, pás e velocidade de rotação de 50 rpm

Tempo (minutos)	% de fármaco dissolvido		DPR (%)	
	UV	CLAE	UV	CLAE
0	0	0	-	-
5	59,86	58,93	7,07	5,00
10	93,22	90,15	1,29	2,34
15	98,59	95,92	0,98	1,95
30	97,55	96,31	2,16	1,45
45	97,54	94,80	1,89	2,94
60	96,84	94,25	3,14	2,04

A Figura 7.4 mostra o perfil de liberação de comprimidos de orbifloxacino no dia 1.

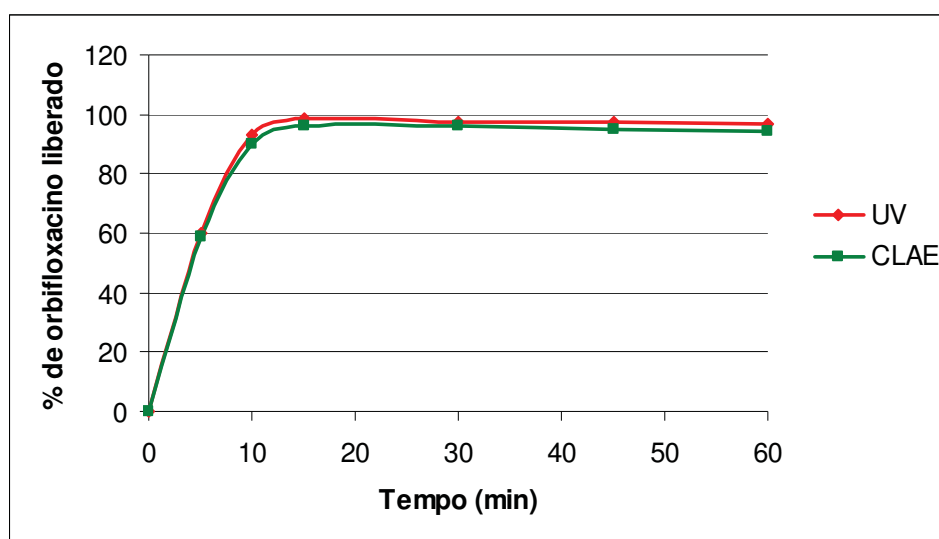


Figura 7.4. Perfis de dissolução de comprimidos de orbifloxacino, obtidos pelos métodos por CLAE e UV, dia 1, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.

Tabela 7.8. Quantidade de orbifloxacino dissolvido no ensaio de dissolução (n = 6), dia 2, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, pás e velocidade de rotação de 50 rpm

Tempo (minutos)	% de fármaco dissolvido		DPR (%)	
	UV	CLAE	UV	CLAE
0	0	0	-	-
5	62,52	61,40	3,86	3,61
10	92,94	92,30	1,94	3,11
15	97,66	97,67	1,44	1,20
30	98,03	97,94	1,79	2,50
45	95,78	96,10	2,30	2,96
60	96,22	95,79	2,60	3,05

A Figura 7.5 mostra o perfil de liberação de orbifloxacino contido nos comprimidos de Orbax[®], no dia 2.

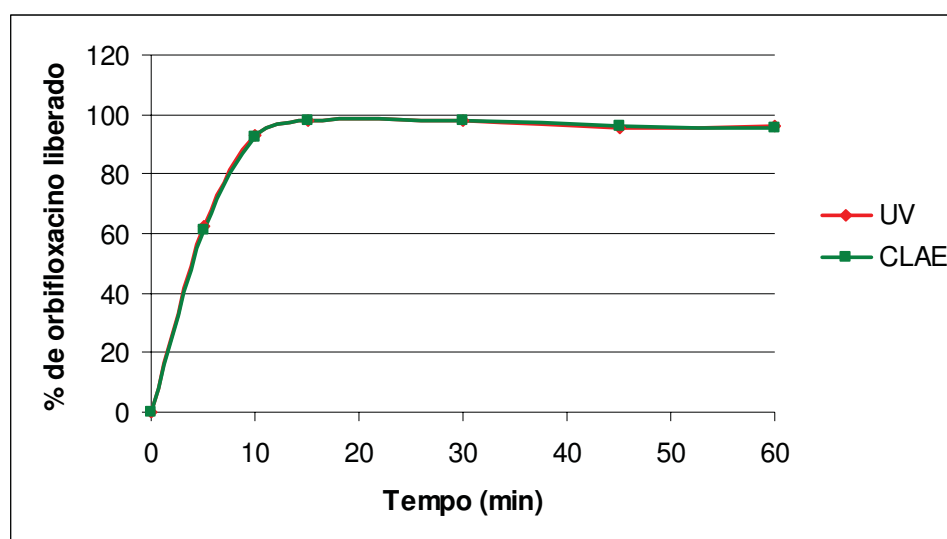


Figura 7.5. Perfis de dissolução de comprimidos de orbifloxacino, obtidos pelos métodos por CLAE e UV, dia 2, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.

Os coeficientes de correlação (r) foram obtidos pelas médias dos resultados dos dois dias de ensaio de dissolução e estão apresentados na Tabela 7.9.

Tabela 7.9. Coeficientes de correlação das equações matemáticas dos modelos de cinética de dissolução

Modelos matemáticos	r	
	UV	CLAE
Cinética de ordem zero	0,9333	0,9348
Cinética de primeira ordem	0,9945	0,9956
Modelo Higuchi	0,9919	0,9926
Modelo Hixson-Crowell	0,9900	0,9882

Através da linearização dos perfis de dissolução de orbifloxacino comprimidos obtiveram-se os coeficientes de correlação pelos diferentes modelos matemáticos, ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell. Conforme os resultados mostrados na Tabela 7.9, observou-se que o modelo mais adequado, isto é, aquele que forneceu maiores valores de r , foi o de primeira ordem.

As formas farmacêuticas que seguem este perfil de dissolução, tais como as que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MULYE e TURCO, 1995).

Modelos que se fundamentam em estudos da cinética de dissolução possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação, uma vez que permitem conhecer: a velocidade do processo; a quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução (FERRAZ, 1993; MOORE e FLANNER, 1996; POLLI *et al.*, 1996; O'HARA *et al.*, 1998; MARCOLONGO, 2003; DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006; SERRA e STORPIRTIS, 2007). Vários parâmetros cinéticos podem ser descritos a partir do modelo matemático, tais como: constante de velocidade de dissolução (k) e meia-vida de dissolução ($t_{50\%}$).

As constantes cinéticas da dissolução foram determinadas a partir das equações definidas pelo modelo matemático que apresentou índice de correlação maior e mais significativo, ou seja, o de primeira ordem. Dentre os parâmetros cinéticos foram calculados:

- *Meia-vida de dissolução ($t_{50\%}$):* tempo no qual se dissolvem 50% de orbifloxacino. Este parâmetro foi calculado após a obtenção dos valores de k , em função do modelo cinético do processo e a partir da seguinte equação:

$$t_{50\%} = \frac{0,693}{k} \quad \text{Equação 7.5}$$

- *Constante de velocidade de dissolução (k)*: corresponde ao coeficiente angular da inclinação da reta de regressão.

A Tabela 7.10 apresenta os parâmetros calculados pelo estudo da cinética de dissolução de orbifloxacino comprimidos pelos métodos por espectrofotometria no UV e CLAE

Tabela 7.10. Parâmetros calculados pelo estudo da cinética de dissolução de orbifloxacino comprimidos por espectrofotometria no UV e CLAE

Parâmetros	UV	CLAE
Modelo matemático	Primeira ordem	Primeira ordem
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9890	0,9912
Coeficiente de correlação (r)	0,9945	0,9956
Equação	$y = -0,2730x + 4,7546$	$y = -0,2367x + 4,6818$
Coeficiente linear	4,7546	4,6818
Coeficiente angular	-0,2730	-0,2367
$t_{50\%}$ (min)	2,54	2,93
k (min^{-1})	0,2730	0,2367

Embora os valores de k (constante de velocidade de dissolução) não possam ser utilizados para comparação direta, uma vez que os mesmos variam consideravelmente entre os modelos cinéticos, sua importância está no fato de que são empregados nos cálculos de $t_{50\%}$. Este último é de extrema importância, na medida em que se estabelece o tempo necessário para que 50% do fármaco esteja dissolvido. Assim, para produtos nos quais a liberação do fármaco é mais rápida, os valores de $t_{50\%}$ serão mais baixos. Verifica-se que, para este parâmetro, os comprimidos de orbifloxacino apresentaram valores baixos, de até, aproximadamente, 3 minutos. Esta observação sugere que em um curto espaço de tempo, a forma farmacêutica libera metade da quantidade do fármaco contido, fato este, realmente adequado para uma forma farmacêutica que contém um fármaco classe I (BCS – FDA, 2000a).

7.3.3 Poder discriminatório do método

O poder discriminatório do ensaio de dissolução depende da capacidade do método em detectar mudanças no produto farmacêutico (BROWN *et al.*, 2004; USP, 2011d). Se mudanças significativas nas características de dissolução do fármaco são observadas durante o tempo de estocagem da forma farmacêutica, o ensaio de

dissolução deveria indicar que mudanças funcionais estão acontecendo no produto farmacêutico e poderiam comprometer seu desempenho *in vivo* (YOSHIOKA e STELLA, 2002). Assim, o ensaio de dissolução desenvolvido foi testado quanto a este parâmetro.

Os comprimidos de orbifloxacino exibiram diminuição da concentração/teor após estocagem dos mesmos em câmara climática a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ UR}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ UR}$ por 6 meses como mostrado nas Figuras 7.6 a 7.9.

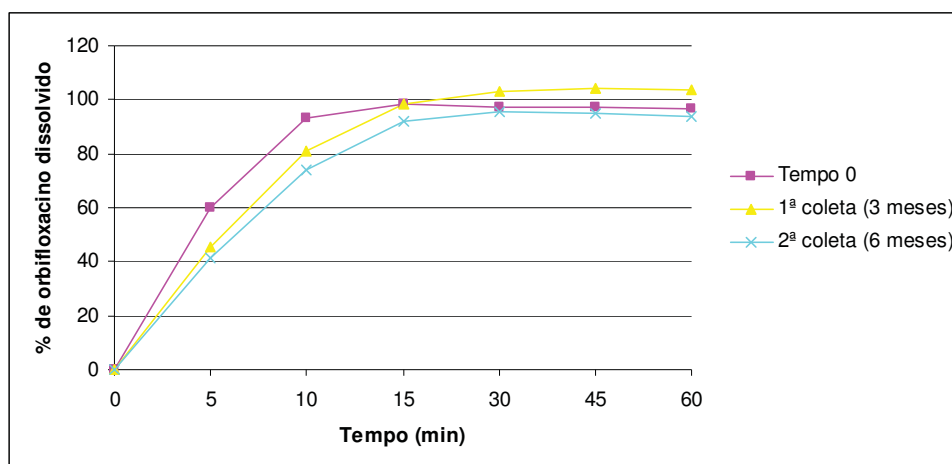


Figura 7.6. Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes acelerados de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por espectrofotometria na região do UV, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.

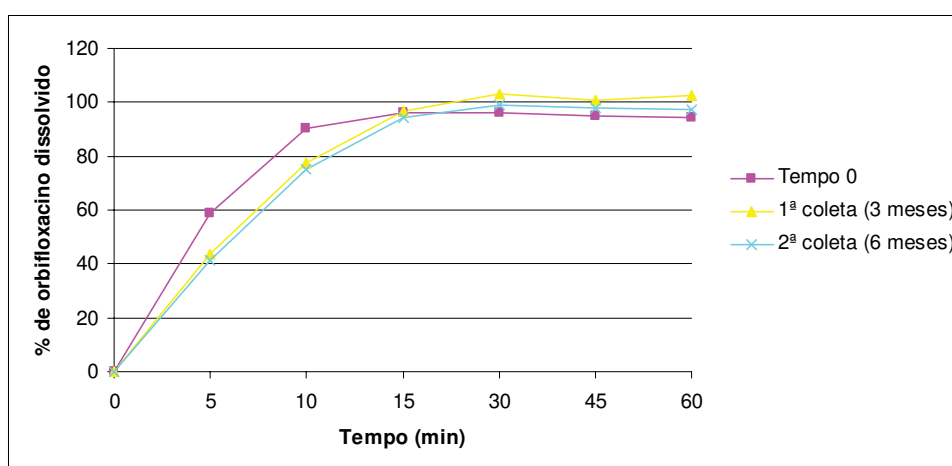


Figura 7.7. Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes acelerados de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por CLAE, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.

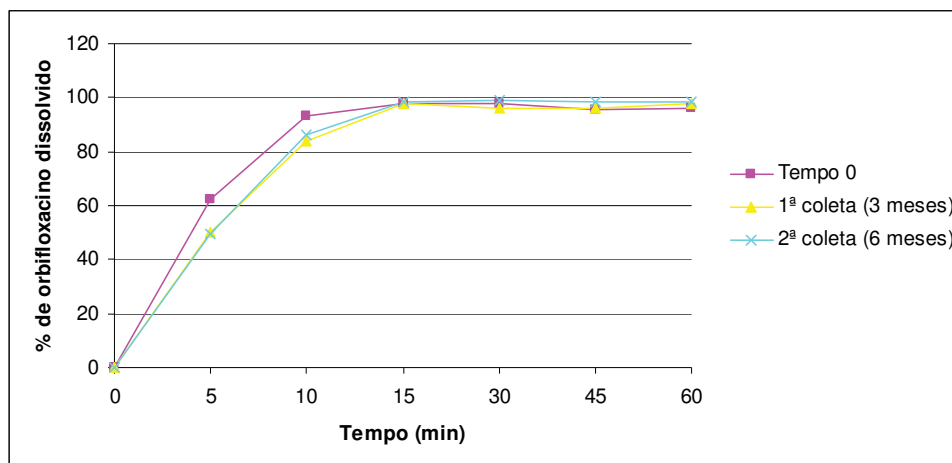


Figura 7.8. Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes de longa duração de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por espectrofotometria na região do UV, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.

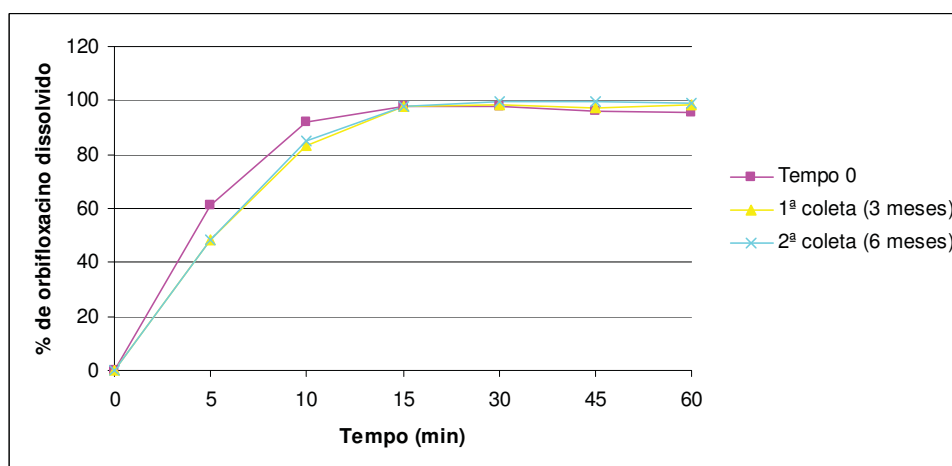


Figura 7.9. Perfis de dissolução de comprimidos degradados nos testes de longa duração de estabilidade de orbifloxacino, obtidos pelo método por CLAE, durante a avaliação do poder discriminatório do teste, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e velocidade de 50 rpm.

Os perfis de dissolução obtidos não puderam ser comparados usando os fatores de diferença (f_1) e semelhança (f_2), uma vez que orbifloxacino mostra dissolução muito rápida, apresentando mais de 85% do fármaco dissolvido em 15 minutos, portanto o poder discriminatório dos fatores f_1 e f_2 ficam invalidados (BRASIL, 2004). Desta maneira, somente a ferramenta de ED% foi utilizada.

As Tabelas 7.11 e 7.12 apresentam, respectivamente, os valores médios de eficiência de dissolução dos comprimidos de orbifloxacino nas condições testadas, nos

tempos zero, três e seis meses de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade e o resultado da análise de variância (ANOVA).

Tabela 7.11. Eficiência de dissolução percentual de comprimidos de orbifloxacino nos tempos zero, três e seis meses de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade

Parâmetro		0	1ª coleta (3 meses)	2ª coleta (6 meses)
ED _{EA} (%)	UV	90,06	91,68	84,34
	CLAE	87,97	89,94	86,85
ED _{ELD} (%)	UV	89,71	87,64	89,50
	CLAE	89,57	88,56	89,61

EA: estudos acelerados de estabilidade; ELD: estudos de longa duração de estabilidade

Tabela 7.12. Análise de variância da eficiência de dissolução de comprimidos de orbifloxacino nos tempos zero, três e seis meses de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade

Fonte da variação	GL	SQ	QM	F _{calc}	F _{tab}
Entre grupos	2	8,83	4,414608	1,29	4,26
Dentro dos grupos	9	30,70	3,411475	-	-
Total	11	39,53	-	-	-

Nível de significância de 5%

Apesar dos métodos analíticos detectarem a diminuição na concentração de orbifloxacino nos comprimidos devido à degradação pelas condições dos estudos acelerado e de longa duração de estabilidade, a eficiência de dissolução se mostrou a mesma para todas as condições analisadas, como pode ser visto na Tabela 7.12.

Não foi possível realizar a comparação de perfis de dissolução entre formulações, pois, até o momento, existe apenas uma indústria farmacêutica comercializando o orbifloxacino no mercado mundial.

O ensaio de dissolução desenvolvido e validado para comprimidos de orbifloxacino foi considerado apropriado para a quantificação *in vitro* deste fármaco nesta forma farmacêutica, obtendo-se resultados adequados para os parâmetros de validação. Este teste foi cuidadosamente estudado no intuito de garantir a estabilidade do fármaco durante todo o tempo de ensaio. As condições que melhor permitiram a

determinação do perfil de dissolução dos comprimidos de orbifloxacino foram 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, pás (aparato 2 USP), velocidade de rotação de 50 rpm e filtração com filtro quantitativo e membrana de *nylon* de $0,45\text{ }\mu\text{m}$, quando necessário. Entretanto, os perfis de dissolução de comprimidos de orbifloxacino foram satisfatório para todos os meios testados, uma vez que, no mínimo, 85% do fármaco foi dissolvido em 30 minutos.

O estudo da cinética de dissolução das amostras testadas indicou que o modelo mais adequado foi o de primeira ordem.

A comparação dos perfis de dissolução obtidos com as diferentes amostras degradadas sugere que não houve variação dos perfis de dissolução dos mesmos. Baseando-se na eficiência de dissolução (*ED%*), observou-se que os comprimidos de orbifloxacino expostos às condições de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ UR e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR, pelos tempos de 0, 3 e 6 meses, apresentaram perfis semelhantes em relação às percentagens de liberação do fármaco.

Este método demonstrou ser adequado para o controle de qualidade de orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido.

8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

8.1 Introdução

A estabilidade é definida como a capacidade do fármaco ou produto farmacêutico de permanecer dentro das especificações estabelecidas para manter sua identidade, potência, qualidade e pureza durante todo o período de reteste ou data de validade (FDA, 1998; ICH, 2003; WHO, 2009).

A estabilidade é um fator essencial de qualidade, segurança e eficácia do produto farmacêutico. Um medicamento que não é suficientemente estável, pode resultar em mudanças físicas (por exemplo, dureza, taxa de dissolução, separação de fases etc), bem como em mudanças nas características químicas (formação de substâncias de alto risco devido à decomposição, potencialmente tóxicas aos pacientes etc) (WHO, 2009; MARKENS, 2010).

A maioria dos fármacos é suscetível a algum tipo de decomposição.

Existem três maiores tipos de mudanças:

- **Mudanças físicas**, as quais podem afetar a aparência, ponto de fusão, limpidez e cor da solução, perda ou absorção de água, modificação do cristal (polimorfismo) ou tamanho de partícula etc;
- **Mudanças químicas**, as quais podem ser observadas como um aumento nos produtos de degradação ou diminuição do teor devido à hidrólise, oxidação, isomerização, descarboxilação etc;
- **Mudanças microbiológicas**, como crescimento de micro-organismos, mudança na eficiência do conservante etc.

A avaliação da estabilidade dos fármacos e produtos farmacêuticos é mandatória pelas agências regulatórias através do mundo todo. Os parâmetros utilizados nos estudos acelerados e de longa duração de estabilidade são indicados pela ICH (2003), pelo guia para realização de estudos de estabilidade da ANVISA (BRASIL, 2005) e pelo guia da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*) (WHO, 2009).

8.1.1 Proposta do estudo de estabilidade

A proposta do teste de estabilidade é fornecer evidências de como a qualidade da substância ativa ou produto acabado varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais tais como temperatura, umidade e luz (ICH, 2003). O programa de estabilidade também inclui o estudo de fatores relacionados ao produto que influenciam sua qualidade, por exemplo, a interação da substância ativa com os adjuvantes. Em produtos farmacêuticos acabados, a interação entre dois ou mais ingredientes ativos também tem sido considerada (ICH, 2003; WHO, 2009).

8.1.2 Testes de estresse

Os testes de estresse podem ajudar a identificar os prováveis produtos de degradação, os quais, por sua vez, podem ajudar a estabelecer os caminhos de degradação e a validar o poder indicativo de estabilidade do método analítico utilizado. A natureza do teste de estresse irá depender do tipo de substância ativa e produto acabado envolvido (ICH, 2003; WHO, 2009).

Os testes de estresse podem ser realizados em um único lote e devem incluir o efeito da temperatura, acima da temperatura utilizada para o teste acelerado de estabilidade (com aumentos de 10 °C; por exemplo, 50 °C, 60 °C), da umidade (por exemplo, 75% de umidade relativa (UR) ou maior) e, quando apropriado, o efeito da oxidação e fotólise. Os testes também devem avaliar a suscetibilidade do fármaco e produto acabado à hidrólise através de uma justificada faixa de valores de pH quando em solução ou suspensão (ICH, 2003; WHO, 2009).

8.1.3 Testes acelerados de estabilidade

No passado, era prática comum nas companhias produtoras de fármacos avaliar a estabilidade das preparações farmacêuticas pela observação destes por um ano ou mais, correspondendo ao tempo normal que eles permaneceriam em estoque e em uso. Tais métodos eram demorados e dispendiosos. Portanto, estudos acelerados de estabilidade foram desenvolvidos (JASTI e GHOSH, 2005).

O objetivo do estudo acelerado de estabilidade é prever o prazo de validade do produto pela aceleração da taxa de decomposição, preferivelmente por aumento da temperatura, e monitorar as reações de degradação (ICH, 2003; BRASIL, 2005; LEITE, 2005).

Segundo os principais guias, o estudo acelerado de estabilidade deve ser realizado a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ de temperatura e a $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa, durante seis meses, com análises em 0, 3 e 6 meses (BRASIL, 2005)

8.1.4 Testes de longa duração de estabilidade

Os testes de longa duração de estabilidade consistem de validações dos experimentos em relação às características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto, durante e depois do prazo de validade pretendido (LEITE, 2005).

As condições de armazenamento para a realização do estudo de longa duração de estabilidade definidas pela ANVISA (BRASIL, 2005) são as seguintes: $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ de temperatura e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa.

8.1.5 Cinética química

A cinética das reações é o estudo da taxa de mudança química e do modo como esta taxa é influenciada pelas condições de concentração dos reagentes, produtos e outras espécies químicas que possam estar presentes e, fatores tais como solvente, pressão e temperatura. No caso de medicamentos, tais informações permitem uma abordagem racional para a estabilização de produtos farmacêuticos e a previsão do prazo de validade, além de tomadas de decisão com relação às condições ótimas de estocagem (LEITE, 2005).

A maioria das reações de degradação dos fármacos é de natureza química e acontece com taxas definidas. Um estudo efetivo e eficiente destas reações requer a aplicação dos princípios de cinética química.

Muito do que se conhece sobre os mecanismos das reações provêm do estudo das velocidades de reação e de como as reações são influenciadas por vários fatores. Em geral, a velocidade de uma reação é determinada: (1) pelas propriedades dos reagentes, (2) pelas concentrações dos reagentes e (3) pela temperatura. A velocidade pode ser influenciada, ainda: (4) pelas concentrações de outras substâncias que não são os reagentes e (5) pelas áreas das superfícies em contato com os reagentes (RUSSEL, 1994).

A maior parte dos produtos farmacêuticos segue reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (ANSEL *et al.*, 2000).

8.1.5.1 Reação de ordem zero

Nas reações de ordem zero, a decomposição do fármaco acontece a uma velocidade constante e é independente da concentração de quaisquer reagentes.

Matematicamente, pode ser expresso como:

$$C = C_0 - kt^* \quad \text{Equação 8.1}$$

8.1.5.2 Reação de primeira ordem

A velocidade da reação depende da concentração do reagente. A degradação do fármaco é diretamente proporcional à concentração remanescente em relação ao tempo.

A expressão matemática se apresenta como:

$$\ln C = \ln C_0 - kt^* \quad \text{Equação 8.2}$$

* C é a concentração no tempo t ; C_0 é a concentração inicial, k é a constante de velocidade de reação.

8.1.5.3 Reação de segunda ordem

A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade da reação depende da concentração de dois reagentes.

A equação 8.3 representa, matematicamente, a reação de segunda ordem:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt^* \quad \text{Equação 8.3}$$

8.1.5.4 Determinação da ordem das reações

A ordem das reações pode ser determinada por vários métodos como, por exemplo, o método da substituição, o método de meia-vida, o método da velocidade inicial. Entretanto, o mais utilizado em análises farmacêuticas é o método gráfico.

Neste método, um gráfico representativo de ordem zero é obtido quando plotando-se um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) origina-se uma reta. Na reação de primeira ordem obtém-se uma reta, com a representação do logaritmo da concentração ($\log C$) em função do tempo (t). Para a reação de segunda ordem, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta. Em todos os casos, a inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação (k) de degradação do fármaco.

8.2 Métodos

Além dos testes preliminares de estabilidade descritos no desenvolvimento do método analítico indicativo de estabilidade por CLAE (capítulo 6, seção 6.2) e LC-MS (capítulo 9, seção 9.2.1) foram realizados os testes acelerados e de longa duração de estabilidade com os comprimidos triturados e íntegros de orbifloxacino.

As amostras dos comprimidos triturados e íntegros de orbifloxacino foram armazenadas em câmara climática nas condições de temperatura e umidade de $40\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ UR}$ e $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ UR}$, para cumprir com as condições dos testes acelerados e de longa duração de estabilidade, respectivamente. As amostras dos comprimidos foram coletadas e analisadas nos tempos 0, 3 e 6 meses (BRASIL, 2005). Foram analisados os teores químicos dos comprimidos através dos métodos cromatográfico, espectrofotométrico e microbiológicos (difusão em ágar e turbidimétrico) (capítulo 6) para as amostras dos estudos acelerados, e pelos métodos cromatográfico e espectrofotométrico para as amostras dos estudos de longa duração. Além disto, foram avaliadas as características organolépticas dos comprimidos triturados e íntegros de orbifloxacino quanto a aparência.

* C é a concentração no tempo t ; C_0 é a concentração inicial, k é a constante de velocidade de reação.

8.3 Resultados e discussão

8.3.1 Avaliação das características organolépticas dos comprimidos de orbifloxacino

As características organolépticas, apesar de desprovidas de avaliação analítica e de apresentar um caráter bastante subjetivo, servem principalmente como subsídio para a avaliação primária da estabilidade de preparações farmacêuticas. O pó dos comprimidos triturados de orbifloxacino que inicialmente apresentava-se branco tornou-se levemente amarelado com o passar do tempo, sendo que a tonalidade de amarelo aumentou gradativamente (Figura 8.1).

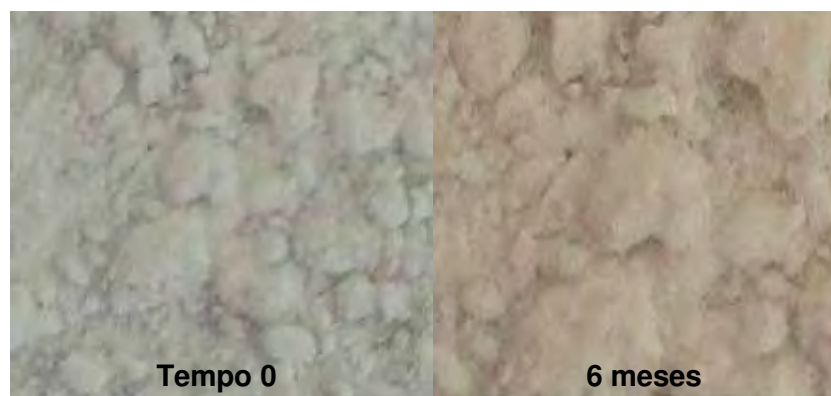


Figura 8.1. Avaliação das características organolépticas dos comprimidos triturados de orbifloxacino, submetidos às condições de estudo acelerado de estabilidade (40 °C/75% UR).

Os comprimidos íntegros de orbifloxacino passaram da coloração verde-claro para amarelados, como pode ser observado na Figura 8.2.



Figura 8.2. Avaliação das características organolépticas dos comprimidos íntegros de orbifloxacino, submetidos às condições de estudo acelerado de estabilidade (40 °C/75% UR).

8.3.2 Estudos acelerados de estabilidade

O método gráfico foi utilizado para o estudo e determinação da cinética de degradação dos comprimidos triturados e íntegros de orbifloxacino sob as condições de temperatura e umidade de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR.

8.3.2.1 Comprimidos triturados de orbifloxacino

As Tabelas 8.1, 8.2, 8.3 e 8.4 apresentam os valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) utilizados na definição da ordem das reações após a exposição dos comprimidos triturados de orbifloxacino às condições de estudo acelerado de estabilidade em diferentes tempos, 0, 3 e 6 meses. Foram utilizados os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do UV e microbiológicos – difusão em ágar e turbidimetria, previamente descritos no capítulo 6.

Tabela 8.1. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	99,95	3,51	0,54	0,285
3	94,14	3,29	0,52	0,304
6	92,20	3,22	0,51	0,310
r		0,9580	0,9604	0,9627

Tabela 8.2. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	100,67	3,53	0,55	0,283
3	94,79	3,31	0,52	0,302
6	92,06	3,22	0,51	0,311
r		0,9759	0,9783	0,9805

Tabela 8.3. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – difusão em ágar

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	98,72	31,60	1,50	0,032
3	85,18	27,26	1,44	0,037
6	82,45	26,39	1,42	0,038
r		0,9336	0,9382	0,9429

Tabela 8.4. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – método turbidimétrico

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	99,96	16,00	1,20	0,063
3	87,86	14,06	1,15	0,071
6	84,79	13,57	1,13	0,074
r		0,9459	0,9504	0,9549

Pela linearização das curvas de degradação dos comprimidos triturados de orbifloxacino, plotando-se a C , $\text{Log } C$ e $1/C$ versus o tempo, para as reações de ordem zero, primeira e segunda ordem, respectivamente, obtivemos os valores de coeficiente de correlação. Como pode ser verificado nas Tabelas 8.1, 8.2, 8.3 e 8.4, a melhor correlação, para todos os métodos analíticos empregados, foi a reação de segunda ordem.

A Figura 8.3 mostra o decaimento do teor dos comprimidos triturados de orbifloxacino expostos às condições de estudo acelerado de estabilidade analisados por CLAE, espectrofotometria no UV, ensaio microbiológico de difusão em ágar e ensaio microbiológico turbidimétrico.

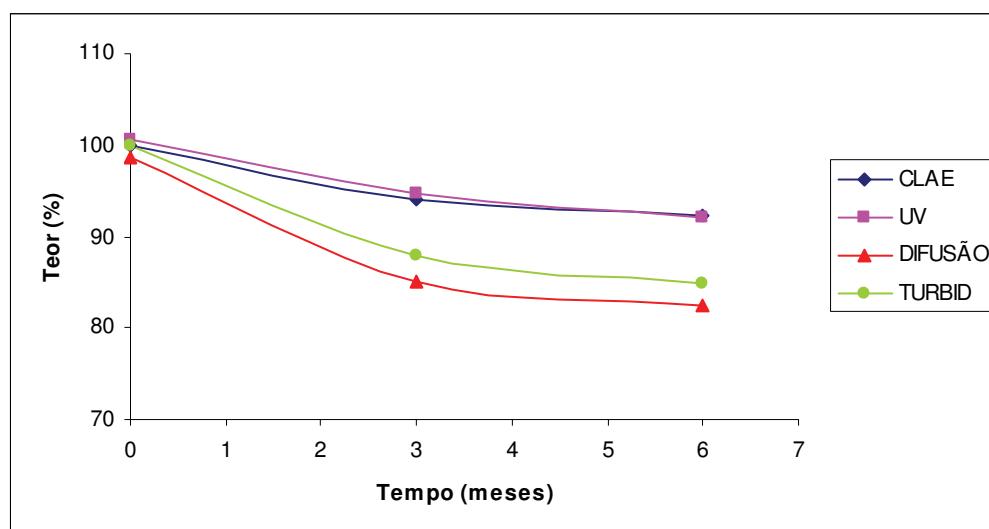


Figura 8.3. Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos triturados de orbifloxacino, expostos às condições de estudo acelerado de estabilidade, analisados por CLAE, por espectrofotometria no UV e por doseamento microbiológico - difusão em ágar e turbidimétrico.

A avaliação dos resultados expostos nas Tabelas 8.1 a 8.4 demonstrou que a reação de segunda ordem apresentou o melhor coeficiente de correlação para todos os métodos utilizados na avaliação da taxa de degradação dos comprimidos triturados de orbifloxacino sob as condições do estudo acelerado de estabilidade. Os coeficientes de regressão linear (r) mais próximos da unidade indicam a ordem da reação, segundo o método gráfico (LACHMAN *et al.*, 2001). Assim, sugere-se que a velocidade de reação é dependente de dois fatores.

Com base nos resultados obtidos, os quais demonstram alterações nas características organolépticas e na percentagem residual de orbifloxacino nas amostras, é possível afirmar que houve degradação do fármaco. Os métodos microbiológicos, tanto difusão em ágar quanto turbidimétrico, demonstraram maior sensibilidade quando comparados com os testes físico-químicos, cromatográfico e espectrofotométrico (Figura 8.3). Supõe-se que os grupamentos orgânicos degradados, provavelmente, são importantes para a atividade antimicrobiana de orbifloxacino.

8.3.2.2 Comprimidos íntegros de orbifloxacino

O estudo acelerado de estabilidade também foi realizado em comprimidos íntegros de orbifloxacino. As Tabelas 8.5, 8.6, 8.7 e 8.8 apresentam os valores encontrados para os parâmetros estudados na definição da ordem das reações após a exposição dos comprimidos íntegros de orbifloxacino às condições de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$

2 °C/75% \pm 5% UR durante 6 meses de estudos, utilizando os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do UV, difusão em ágar e turbidimétrico para a análise das amostras.

Tabela 8.5. Valores de teor, concentração (*C*), logaritmo da concentração (*Log C*), inverso da concentração (*1/C*) e coeficiente de correlação (*r*) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE

Tempo (meses)	Teor (%)	C (µg/mL)	Log C	1/C
0	99,44	3,49	0,54	0,287
3	93,18	3,26	0,51	0,307
6	95,01	3,32	0,52	0,301
<i>r</i>		0,6981	0,6927	0,6872

Tabela 8.6. Valores de teor, concentração (*C*), logaritmo da concentração (*Log C*), inverso da concentração (*1/C*) e coeficiente de correlação (*r*) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV

Tempo (meses)	Teor (%)	C (µg/mL)	Log C	1/C
0	99,50	3,49	0,54	0,287
3	93,32	3,26	0,51	0,306
6	93,69	3,28	0,52	0,305
<i>r</i>		0,8391	0,8381	0,8372

Tabela 8.7. Valores de teor, concentração (*C*), logaritmo da concentração (*Log C*), inverso da concentração (*1/C*) e coeficiente de correlação (*r*) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – difusão em ágar

Tempo (meses)	Teor (%)	C (µg/mL)	Log C	1/C
0	97,62	31,24	1,49	0,032
3	88,40	28,29	1,45	0,035
6	91,89	29,41	1,47	0,034
<i>r</i>		0,6154	0,6048	0,5940

Tabela 8.8. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos acelerados de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação pelo ensaio microbiológico – método turbidimétrico

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	97,68	15,63	1,19	0,064
3	93,99	15,04	1,18	0,066
6	96,66	15,47	1,19	0,065
r		0,2689	0,2650	0,2609

Analisando-se os resultados das Tabelas 8.5 a 8.8 pode-se verificar que os melhores coeficientes de correlação foram obtidos quando a concentração de orbifloxacino foi plotada contra o tempo, ou seja, a reação de cinética de degradação de ordem zero é a melhor representante matemática deste evento para comprimidos íntegros de orbifloxacino.

O decaimento do teor dos comprimidos íntegros de orbifloxacino expostos às condições de estabilidade acelerada e analisados por CLAE, espectrofotometria no UV, difusão em ágar e turbidimetria é mostrado na Figura 8.4.

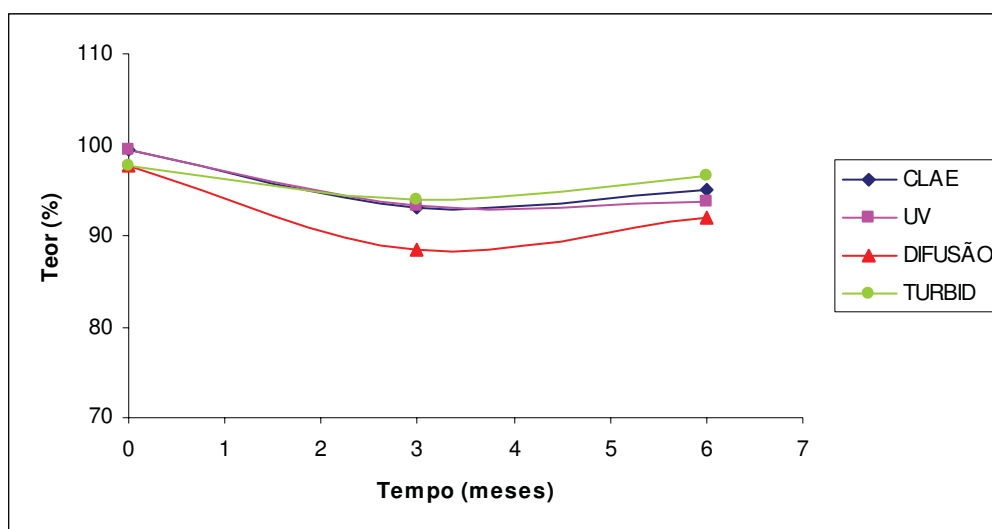


Figura 8.4. Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos íntegros de orbifloxacino, expostos às condições de estudo acelerado de estabilidade, analisados por CLAE, por espectrofotometria no UV e por doseamento microbiológico - difusão em ágar e turbidimétrico.

8.3.3 Estudos de longa duração de estabilidade

No estudo de longa duração de estabilidade, os comprimidos triturados e íntegros de orbifloxacino foram mantidos em câmara climática com temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75\% \pm 5\%$ (BRASIL, 2005) e analisados até 6 meses.

As amostras do estudo de longa duração de estabilidade foram analisadas somente por cromatografia e espectrofotometria na região do UV.

8.3.3.1 Comprimidos triturados de orbifloxacino

Nas Tabelas 8.9 e 8.10 estão dispostos os resultados obtidos para os comprimidos triturados de orbifloxacino expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade.

Tabela 8.9. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	99,56	3,49	0,54	0,286
3	94,92	3,32	0,52	0,301
6	92,62	3,24	0,51	0,309
r		0,9786	0,9804	0,9821

Tabela 8.10. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos triturados de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	99,80	3,50	0,54	0,286
3	99,83	3,49	0,54	0,286
6	97,86	3,42	0,53	0,292
r		0,9139	0,9135	0,9130

A Figura 8.5 mostra o decaimento do teor dos comprimidos triturados de orbifloxacino expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade analisados por CLAE e espectrofotometria no UV.

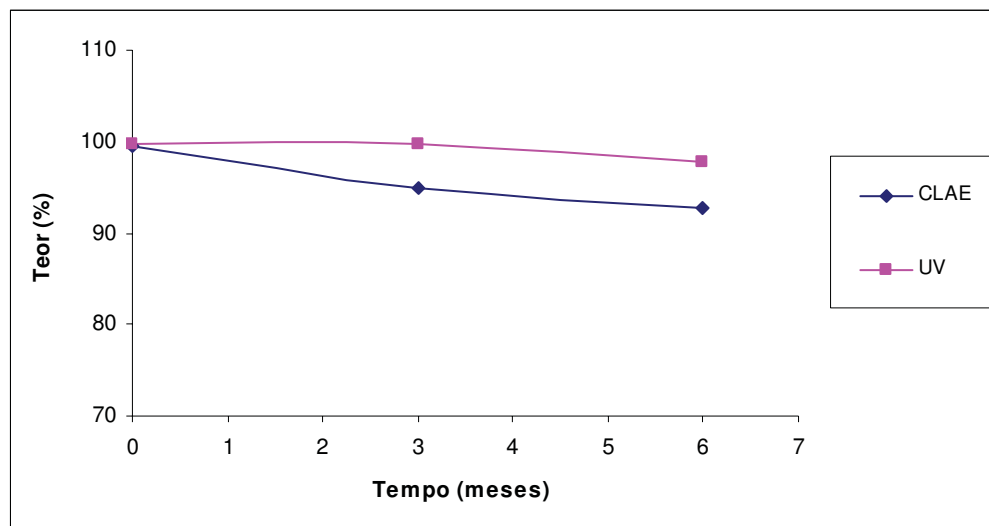


Figura 8.5. Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos triturados de orbifloxacino, expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade, analisados por CLAE e por espectrofotometria no UV.

8.3.3.2 Comprimidos íntegros de orbifloxacino

Os resultados obtidos para os comprimidos íntegros de orbifloxacino expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade, analisados por CLAE e espectrofotometria no UV, estão apresentados nas Tabelas 8.11 e 8.12, respectivamente.

Tabela 8.11. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por CLAE

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	99,56	3,49	0,54	0,286
3	93,46	3,27	0,54	0,306
6	92,13	3,22	0,51	0,310
r		0,9352	0,9373	0,9394

Tabela 8.12. Valores de teor, concentração (C), logaritmo da concentração ($\text{Log } C$), inverso da concentração ($1/C$) e coeficiente de correlação (r) obtidos após estudos de longa duração de estabilidade dos comprimidos íntegros de orbifloxacino para determinação da cinética de degradação por espectrofotometria na região do UV

Tempo (meses)	Teor (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	$\text{Log } C$	$1/C$
0	100,02	3,51	0,55	0,285
3	96,49	3,37	0,53	0,296
6	93,16	3,26	0,51	0,307
r		0,9994	0,9996	0,9998

O decaimento do teor dos comprimidos íntegros de orbifloxacino expostos às condições de estabilidade de longa duração e analisados por CLAE e por espectrofotometria no UV é mostrado na Figura 8.6.

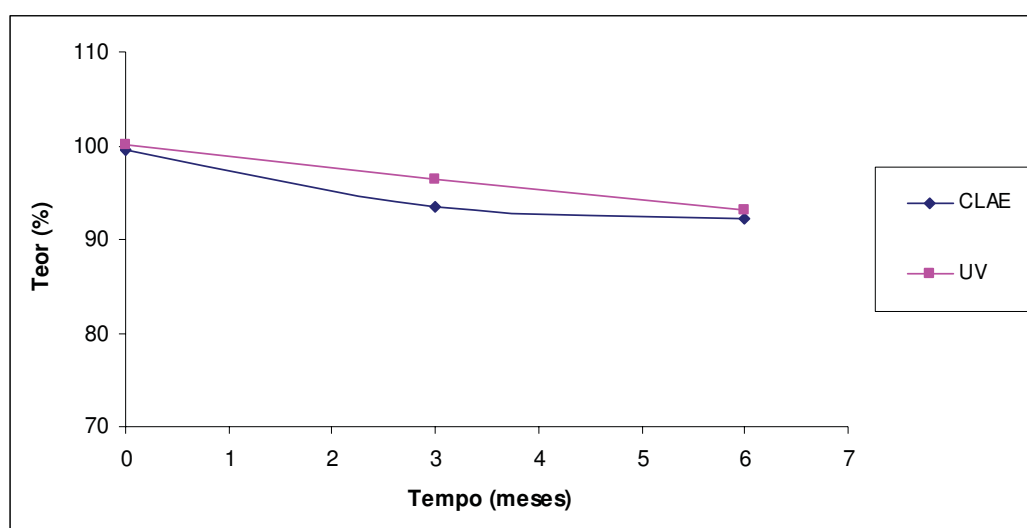


Figura 8.6. Análise comparativa das taxas de decaimento dos comprimidos íntegros de orbifloxacino, expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade, analisados por CLAE e por espectrofotometria no UV.

A cinética de degradação dos comprimidos triturados de orbifloxacino expostos às condições de estudo de longa duração de estabilidade apresentaram reação de segunda ordem para as amostras analisadas por CLAE e cinética de ordem zero quando analisadas por espectrofotometria no UV. As amostras íntegras dos comprimidos deste fármaco, analisadas por ambos os métodos, demonstraram cinética de segunda ordem. Entretanto, os resultados obtidos nestes ensaios não

diferiram grandemente entre si, assim, não é possível definir, com certeza, a ordem das reações.

De fato, como notado por Netz e Ortega (2002), quando a decomposição do fármaco é muito baixa, as ordens das reações tornam-se difíceis de serem diferenciadas, uma vez que todas se comportam como lineares.

Os comprimidos de orbifloxacino, degradados pelas condições dos estudos acelerados e de longa duração de estabilidade, foram também avaliados quando ao perfil de dissolução (capítulo 7, seção 7.3.3).

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da temperatura e umidade na estabilidade do fármaco e não o de calcular o prazo de validade, uma vez que este dado já foi estabelecido pelos fabricantes do medicamento Orbax[®].

Assim sendo, o orbifloxacino demonstrou ser sensível aos fatores de umidade e temperatura nas condições estabelecidas. Com isso, verifica-se a importância de proteger este fármaco destes fatores.

**9 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO DE ORBIFLOXACINO**

9.1 Introdução*

Impureza farmacêutica é qualquer componente que não é uma substância química definida como fármaco ou excipiente no produto farmacêutico. O perfil de impureza é definido como uma descrição das impurezas identificadas e não identificadas presentes no fármaco ou no produto farmacêutico.

Produto de degradação (PD) é definido como a molécula resultante de uma mudança química do fármaco gerada pela ação do tempo e/ou por ação de agentes como luz, temperatura, pH ou água e/ou por reação com os adjuvantes e/ou sistema de armazenamento.

É bem conhecido o fato de que fármacos sofrem degradação físico-química sob estocagem. Assim, testes de estabilidade de fármacos sob várias condições de temperatura e umidade são indispensáveis. Em adição, o guia de teste de estabilidade da ICH (*International Conference on Harmonization*) (2003) requer o relato, identificação e caracterização dos produtos de degradação. Entretanto, como os produtos de degradação gerados durante a estocagem geralmente apresentam valores muito baixos (0,1-0,5% p/p), estudos de estresse são sugeridos para gerar produtos de degradação com concentrações mais altas (BAKSHI e SINGH, 2002). Ainda assim, muitas vezes é muito difícil isolar essas espécies a partir da mistura estressada e submetê-las à análise espectral para a obtenção de informações estruturais devido a suas concentrações muito baixas.

O isolamento e a elucidação das estruturas dos produtos de degradação fazem parte da pesquisa colaborativa que envolve conhecimentos analítico, orgânico e físico-químico combinados com informações espectrométricas. Quando este processo é realizado em um estágio inicial, há amplo tempo para discutir vários aspectos do desenvolvimento do fármaco e prevenir ou controlar a produção de impurezas e produtos de degradação bem antes do arquivamento regular (inscrição do fármaco) e garantir, assim, a fabricação de produto farmacêutico de alta qualidade.

A ICH também sugere estudos de estresse em fármacos para estabelecer suas características de estabilidade inerente (ICH, 2003), não somente para identificação de produtos de degradação, mas também para o entendimento da estabilidade da molécula do fármaco.

*O estudo de estabilidade da molécula de orbifloxacino, incluindo a identificação dos produtos de degradação foi realizado no *AnQual Laboratories, School of Pharmacy, Faculty of Medical and Health Sciences, Grafton Campus, The University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia*, sob orientação do Prof. Dr. Sanjay Garg.

Estudos de degradação forçada são usualmente parte da estratégia de desenvolvimento, sendo empreendidas para elucidar a estabilidade intrínseca do fármaco. Tais estudos são, portanto, conduzidos sob condições mais severas e exageradas que aquelas normalmente utilizadas nos testes acelerado e de longa duração de estabilidade. A informação coletada nestes testes pode ajudar a estabelecer o caminho de degradação do fármaco bem como a desenvolver e validar método analítico adequado (BAKSHI e SINGH, 2002; ICH, 2003; ALSANTE *et al.*, 2007).

Na avaliação da estabilidade dos fármacos o uso de diferentes métodos pode ajudar na determinação do mecanismo de degradação. O entendimento do mecanismo de degradação pode ajudar no desenvolvimento de métodos de estabilização ou potencialmente na reformulação da substância ativa (WATERMAN e ADAMI, 2005).

O conhecimento das estruturas dos maiores produtos de degradação do fármaco é pré-requisito para entender o caminho de degradação. Entender o caminho de degradação permite uma avaliação a ser feita em lugares do composto que são suscetíveis à degradação sob diferentes condições. Tal informação é essencial para o entendimento da característica de estabilidade intrínseca do fármaco.

A determinação das estruturas dos maiores produtos de degradação também pode revelar se um composto carcinogênico ou tóxico conhecido pode ou não ser formado. A partir destas informações, pode-se prever um limite para possíveis impurezas não conhecidas. Determinar a estrutura dos produtos de degradação, que surgem durante os testes de estresse, pode ser útil para descobertas pré-clínicas durante as investigações da relação estrutura-atividade. O entendimento das partes da molécula que são suscetíveis à degradação pode ajudar no delineamento de análogos mais estáveis. O desenvolvimento de formulações estáveis é também objetivado com o entendimento das partes reativas da molécula do fármaco (BAKSHI e SINGH, 2002; ICH, 2006).

Vários artigos têm trazido abordagens e guias para o isolamento e identificação de impurezas e produtos de degradação usando a espectrometria de massas (MS), a ressonância magnética nuclear (RMN), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para substâncias farmacêuticas (ALSANTE *et al.*, 2001; WINGER e KEMP, 2001; ROY, 2002; AHUJA e ALSANTE, 2003; ARGENTINE *et al.*, 2007; AHUJA, 2007; BRETNALL e CLARKE, 2011).

O isolamento e a purificação de impurezas e produtos de degradação não conhecidos podem ser realizados por uma variedade de técnicas cromatográficas e

espectrométricas, isoladamente ou em combinação com outras técnicas. A cromatografia líquida de alta eficiência preparativa é, provavelmente, a técnica mais amplamente utilizada na indústria farmacêutica para a purificação de miligramas a gramas de impureza/produtos de degradação em baixas concentrações. Uma vez que um produto não conhecido é isolado, a caracterização por técnicas espectrométricas como MS, RMN e infravermelho (IV) são frequentemente usadas para identificar grupamentos funcionais específicos.

O advento de técnicas hífenadas revolucionou o perfil de impurezas, não só pela separação, mas também pela identificação estrutural das mesmas. Entre todas as técnicas hífenadas, as mais exploradas para prever o perfil de impurezas/produtos de degradação dos fármacos são LC-MS, LC-MS/MS, LC-RMN, LC-RMN-MS e GC-MS (BARI *et al.*, 2007).

A técnica da espectrometria de massas tem apresentado um impacto cada vez mais significativo no processo de desenvolvimento farmacêutico nas últimas décadas. Os avanços no desenho e na eficiência dos analisadores e interfaces, que, diretamente conectam as técnicas de separação com o espectrômetro de massas, têm proporcionado novas oportunidades para o monitoramento, caracterização e quantificação de substâncias relacionadas à substância ativa e formulações farmacêuticas.

O uso da moderna técnica de ionização à pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*) como a ionização química à pressão atmosférica (APCI - *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*) permite a medição *online* tanto de substâncias polares como de compostos não-polares, englobando as substâncias com moderada à baixa polaridade com massas moleculares pequenas a médias, de até 1500 Da. A APCI volatiliza os analitos por sua passagem através de um nebulizador aquecido e ioniza-os à pressão atmosférica por ionização química promovida por íons do solvente.

Assim, a APCI é uma técnica de ionização à pressão atmosférica utilizando uma descarga corona. As moléculas do solvente são ionizadas primeiro, e então uma reação íon-molécula entre os íons do solvente ionizados e as moléculas da amostra levam à produção de íons protonados ou desprotonados da amostra.

Grande interesse tem sido demonstrado no mecanismo de degradação de fármacos pertencentes à classe das fluorquinolonas (FQs), as quais são amplamente utilizadas na prática clínica como agentes antimicrobianos de amplo espectro tanto para uso humano como veterinário.

Estudos clínicos e experimentais da maioria das FQs desenvolvidos no passado têm relatado que esta classe causa fototoxicidade em vários graus de

gravidade (DOMAGALA, 1994; HORIO *et al.*, 1994; FERGUSON, 1995; SANCHEZ *et al.*, 1995; ARATA *et al.*, 1998; BLONDEAU, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Fototoxicidade e fotomutagenicidade induzidas por FQs parece estar relacionadas com suas características estruturais (BALL e TILLOTSON, 1995; LIETMAN, 1995).

Araki e Kitaoka (1998) informam que o radical centrado no carbono ($\cdot\text{C}$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) são gerados durante a fotodegradação de FQs em soluções aquosas neutras. Tais espécies reativas são relacionadas com o dano do DNA (UMEZAWA *et al.*, 1997).

Segundo Zoltan e colaboradores (2007), as quinolonas podem sofrer uma variedade de processos fotoquímicos como a geração de oxigênio singleto, produção de superóxido, descarboxilação, desfluorinação e oxidação do substituinte amino em C7 (ZOLTAN *et al.*, 2007). Dependendo da substância e das condições ambientais, tais como parâmetros da irradiação instrumental e tempo de irradiação, fotoprodutos com diferenças estruturais podem ser gerados (ESPINOSA-MANSILLA *et al.*, 2005).

A relação entre a estrutura de vários antimicrobianos da classe das FQs e sua atividade e efeitos colaterais tem sido estudada. A fototoxicidade das quinolonas parece ser particularmente dependente do substituinte na posição 8, aumentando na ordem $-\text{H} < \text{OCH}_3 < \text{F}, \text{Cl}$, que está relacionada à sua concentração máxima no soro (MATSUMOTO *et al.*, 1992; MARUTANI *et al.*, 1993; DOMAGALA, 1994; FASANI *et al.*, 1998; LORENZO *et al.*, 2008). De fato, muitos autores afirmam que FQs com halogênio na posição 8 provocam severas reações na pele em comparação com a baixa toxicidade exibida pelos derivados com 8-metóxi (FERGUSON e JOHNSON, 1990; MARUTANI *et al.*, 1993; DOMAGALA, 1994; FERGUSON, 1995; SANCHEZ *et al.*, 1995; ROSEN *et al.*, 1997a; MARUTANI *et al.*, 1998; FASANI *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c; VOUSDEN *et al.*, 1999; HAYASHI *et al.*, 2004).

Embora o exato mecanismo de fotossensibilização das FQs permaneça não claro, basicamente, os seguintes processos têm sido indicados para justificar a fotorreatividade das FQs:

- a produção do oxigênio singleto ou tripleto pela forma *zwitteriônica* (neutra) que resulta da dissociação do ácido carboxílico e da simultânea protonação do grupo piperazínico (BILSKI *et al.*, 1996; SORTINO *et al.*, 1998; CONDORELLI *et al.*, 1999);
- a formação das espécies de oxigênio reativo incluindo oxigênio singleto, radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (WAGAI e TAWARA, 1991, 1992a, 1992b; IWAMOTO *et al.*, 1992; ROSEN *et al.*, 1997b; UMEZAWA *et al.*, 1997; MORIMURA *et al.*, 1997a; MARTÍNEZ *et al.*, 1998; LORENZO *et al.*, 2008);

- a deshalogenação fotoquímica, a qual induz a geração de carbeno C-8 altamente reativo que reage com alguns componentes da célula (AITKEN, 1993; MARTÍNEZ *et al.*, 1997, 1998);
- o processo combinado em que a desfluorinação homolítica leva à formação do radical arila, o qual desencadeia o ataque ao substrato celular, enquanto que as espécies de oxigênio reativo poderiam operar em um processo secundário ou em um processo paralelo (FASANI *et al.*, 1998).

A fotorreatividade pode ser iniciada a partir do estado singleto excitado, como no caso de lomefloxacino ou mais geralmente a partir do estado tripleto, como descrito para norfloxacino e enoxacino (MONTI *et al.*, 2001; LORENZO *et al.*, 2008). Concluiu-se que o estado fundamental de cátions arila é um tripleto, quando ele é substituído com um grupo doador de elétrons na posição *para*. Quando o substituinte é um grupo retirador de elétrons, o estado fundamental é um singleto (FASANI *et al.*, 1998, 1999a, 1999b, 1999c).

Várias funções químicas são responsáveis por introduzir fotorreatividade nas moléculas e sua presença deve alertar sobre a possível fotoatividade. Funções típicas são (FASANI *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c):

- Ligações duplas (C=C), tais moléculas normalmente sofrem isomerização e podem sofrer adição polar ou ciclo-adição facilmente.
- Ligações duplas (C=O), a função carbonila comporta-se como um radical eletrofílico no estado excitado e é facilmente envolvido em transferência de hidrogênio inter ou intramolecular ou em reação de fragmentação.
- Aromáticos, derivados nitro assemelham-se a cetonas na sua reatividade radical e cloretos muitas vezes sofrem de cloração homolítica ou heterolítica.
- Heterocíclicos, anéis de 5 membros normalmente sofrem fácil rearranjo e N-óxidos são envolvidos em reações eletrocíclicas.
- Ligações fracas C-H, tais como são as α -C-H em aminas, alcoóis, éteres, sulfetos, podem ser envolvidos em processos oxidativos ou degradativos, frequentemente relacionados à ativação de oxigênio pela fotossensibilização.

As fotorreações das FQs descritas na literatura incluem a dimerização de ciprofloxacino (TIEFENBACHER *et al.*, 1994), a degradação da cadeia lateral alquilamino do levofloxacino (YOSHIDA *et al.*, 1993) e de 1-aminociclopropil do derivado T-3761 (DEMACHI *et al.*, 1995) e para FQs contendo o átomo de flúor na posição 8, a reação fotoquímica de desfluorinação nesta posição, foi observada para lomefloxacino (YOSHIDA *et al.*, 1993; CONDORELLI *et al.*, 1996; FASANI *et al.*, 1997; MARTÍNEZ *et al.*, 1997; FASANI *et al.*, 1999a, 1999b), fleroxacino (MARTÍNEZ *et al.*,

1997), esparfloxacino (ENGLER *et al.*, 1998) e também para orbifloxacino (MORIMURA *et al.*, 1995a, 1995b, 1997a, 1997b).

A desfluorinação também foi o processo de fotodegradação primária em enoxacino e norfloxacino (FASANI *et al.*, 1998), enquanto foi menos importante em ofloxacino e não ocorreu em rufloxacino (CONDORELLI *et al.*, 1999).

É uma característica notável, particularmente em FQs com flúor em C8 a habilidade de sofrer clivagem fotolítica e desfluorinação em consequência da exposição à luz UV (SMITH *et al.*, 2001; BUDAI *et al.*, 2008).

Hidalgo *et al.* (1993) e Engler *et al.* (1998) hipotetizaram que o alto grau de fluorização poderia resultar em baixa fotoestabilidade e, conseqüentemente, na formação de vários fotoprodutos os quais poderiam causar efeitos adversos.

Segundo Martínez e colaboradores (1997), FQs como lomefloxacino e fleroxacino que apresentam dois átomos de flúor aromático são, não somente mais fototóxicas que FQs como ciprofloxacino e norfloxacino, que apresentam somente um único átomo de flúor aromático, mas também mais fotomutagênicas e fotocarcinogênicas.

A grande maioria das (fluor)quinolonas apresenta no mínimo um átomo de flúor (na posição 6), em alguns casos flúor adicional ou átomo de cloro estão presentes nas posições 5 e 8. Muitas FQs investigadas têm demonstrado que a principal fotorreação ocorrendo sob condições neutras é a desfluorinação (fragmentação heterocíclica da ligação C-F) (YOSHIDA *et al.*, 1993; TORNIAINEN *et al.*, 1997a, 1997b; MARTÍNEZ *et al.*, 1997; FASANI *et al.*, 1997, 1998, 1999a, 2001; ALBINI e MONTI, 2003; FASANI *et al.*, 2004). Entretanto, a quantidade gerada neste processo depende da estrutura e varia sobre várias ordens de magnitude e, além disto, duas diferentes fotorreações envolvendo diferentes mecanismos ocorrem (ALBINI e MONTI, 2003): (1) com 6-monofluorderivados o processo é a fotossubstituição do átomo de flúor pelo grupo hidróxi para gerar o correspondente 6-hidroxiquinolonas, como demonstrado para norfloxacino, enrofloxacino, ciprofloxacino (FASANI *et al.*, 1998, 1999b; MELLA *et al.*, 2001; MONTI *et al.*, 2001); (2) similarmente, a presença de um segundo halogênio "X" na posição 8 faz da molécula muito mais sensível e é a ligação C-X nesta posição que é fragmentada (ALBINI e MONTI, 2003).

A eficiência da fotodecomposição aumenta quando substituintes aceptores de elétrons são inseridos, melhorando assim o caráter de transferência de carga interna. A ordem de fotorreatividade (lomefloxacino > enrofloxacino > norfloxacino > ofloxacino) é idêntica com a ordem de eletronegatividade para os substituintes na posição 8 (C-F, C-N, C-H, C-OMe) (YOSHIDA *et al.*, 1996; FASANI *et al.*, 1998).

Em 1997, Martínez e colaboradores relataram a formação de flúor a partir de lomefloxacino e fleroxacino, e propuseram que a fragmentação heterocíclica é o primeiro passo na fotorreação. No mesmo ano, Fasani e colaboradores (1997) relataram a identificação de fotoprodutos de lomefloxacino e mostraram que estes estão de acordo com a perda do flúor na posição 8 e com a abertura do anel lateral piperazínico. No ano seguinte, Fasani e colaboradores (1998) mostraram que a desfluorinação é a regra para 7-amino-6-fluorquinolonas. Na verdade, esta é a principal reação também para FQs que possuem um único átomo de flúor na posição 6, exceto quando um substituinte forte doador de elétrons está presente (FASANI *et al.*, 1997; ALBINI e MONTE, 2003).

A reação de desfluorinação da posição 8 para orbifloxacino foi anteriormente descrita por Morimura e colaboradores (1995a, 1995b, 1997a, 1997b). Segundo estes autores o carbocátion ataca ambos: i) o grupo N-ciclopropil, o qual é perdido em um dos produtos ou ii) a cadeia dimetilpiperazinil, a qual é degradada em uma segunda cadeia.

Algumas FQs também sofreram degradação da cadeia lateral do alquilamino na posição 7 pela luz (processo foto iniciado) (TORNIAINEN e MAKI, 1995; FASANI *et al.*, 1999a; BURHENNE *et al.*, 1997a, 1997b; ESPINOSA-MANSILLA *et al.*, 2005). A abertura do anel piperazínico, seguido pela clivagem, foi observada para temafloxacino, junto com a oxidação dos grupos amino secundários e terciários (ELROD *et al.*, 1990), para ciprofloxacino (TORNIAINEN *et al.*, 1996, 1997a; BURHENNE *et al.*, 1999), norfloxacino (NANGIA *et al.*, 1991; BURHENNE *et al.*, 1999), enrofloxacino (BURHENNE *et al.*, 1999), levofloxacino (YOSHIDA *et al.*, 1993), danofloxacino (BURHENNE *et al.*, 1999) e rufloxacino (CONDORELLI *et al.*, 1999).

Alguns autores afirmam que a degradação fotoquímica das quinolonas em soluções aquosas ocorre em duas etapas principais. A primeira etapa é a degradação do substituinte piperazínico formando o composto 7-amino o qual é mais estável contra fotólise que o composto original correspondente. Além disto, em uma segunda etapa, a degradação fotoquímica vai até CO₂ formando substâncias intermediárias polares (BURHENNE *et al.*, 1999; BUDAI *et al.*, 2008).

Segundo Hidalgo e colaboradores (1993), a descarboxilação pela fotodegradação acontece com as quinolonas ciprofloxacino, norfloxacino, ácido pipemídico, ácido nalidíxico, M-193324, rosoxacino e ácido oxolínico. Estes mesmos autores afirmam que a perda do grupo carboxílico é a principal rota de fotodegradação do ácido nalidíxico. A descarboxilação também foi observada para rufloxacino (CONDORELLI *et al.*, 1999), cinoxacino (VARGAS *et al.*, 1994) e esparfloxacino

(ENGLER *et al.*, 1998). Até o momento, na literatura, a descarboxilação térmica só foi observada para o orbifloxacino (MORIMURA *et al.*, 1995a).

O objetivo do desenvolvimento do método por LC-MS foi estudar o comportamento de degradação de orbifloxacino e elucidar estruturalmente os produtos de degradação gerados sob as condições de hidrólise ácida, básica e neutra, oxidação, fotólise ácida, básica e neutra e estresse térmico e fotolítico da SQR na forma sólida.

Nenhum procedimento analítico foi encontrado relatando o isolamento e elucidção da estrutura de produtos de degradação encontrados durante a hidrólise ácida, alcalina, neutra e oxidação de orbifloxacino. Somente o trabalho de Morimura e colaboradores (1995a, 1995b, 1997a, 1997b) descreve a cinética de degradação de orbifloxacino sob luz em diferentes pHs, entretanto estes autores não caracterizaram todos os maiores produtos de degradação.

9.2 Método

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi o orbifloxacino, descrito no capítulo 4, seção 4.2. Os equipamentos estão indicados na seção 4.4 e os solventes e reagentes na seção 4.5.

A fase móvel foi formada por dois solventes. Para o solvente A, obteve-se a solução aquosa de ácido acético na concentração 5,0%, (v/v). O solvente B consistiu de metanol 100% grau cromatográfico. Os dois solventes foram filtrados separadamente e levados ao ultrassom para desgaseificação por 30 minutos antes do uso.

No preparo das soluções-padrão, 10,0 mg de orbifloxacino SQR foram transferidos para balão volumétrico âmbar de 10 mL com auxílio de ácido clorídrico 0,5 M. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente para a obtenção de solução com concentração de 1,0 mg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar, que foram completados com fase móvel para gerar soluções com as concentrações finais requeridas.

9.2.1 Estudos de degradação forçada de orbifloxacino

O perfil de degradação de orbifloxacino foi estudado sob várias condições como descrito a seguir:

Todas as soluções para o estudo de degradação de orbifloxacino foram preparadas para gerar concentração final de 1,0 mg/mL do fármaco. Todas as amostras foram posteriormente diluídas em fase móvel para concentração de 100 µg/mL e filtradas antes das injeções.

- *Hidrólise ácida, alcalina e neutra:* degradação ácida foi realizada em HCl 0,1 M na concentração de 1,0 mg/mL de orbifloxacino. Os estudos na condição alcalina foram conduzidos de forma similar, com o fármaco na concentração de 1,0 mg/mL em NaOH 0,1 M. Estas soluções foram expostas à temperatura de 80°C por 8 dias em forno. Adicionalmente, orbifloxacino em água (1,0 mg/mL) foi mantido aquecido a 80°C pelo mesmo período de tempo, nas mesmas condições.

- *Degradação oxidativa:* a solução para o estudo de estresse oxidativo foi preparada em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. A solução foi estocada protegida da luz, em temperatura ambiente por 24 horas.

- *Degradação fotolítica:* orbifloxacino pó da SQR e soluções de orbifloxacino em HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M e em água foram expostos à luz ultravioleta (UV) por 2 dias (no mínimo 200 watt horas/m²) e à luz visível (VIS) por 8 dias, resultando em iluminação ≥ 1,2 Million Lux horas, para determinar os efeitos da radiação na estabilidade do fármaco em solução e no estado sólido. Todas as amostras para o teste de fotoestabilidade foram mantidas em câmara climática a 25 °C e 60% de umidade relativa. A cada hora, alíquotas das soluções foram retiradas e analisadas para determinação da cinética de fotodegradação de orbifloxacino. O pó da substância química de referência foi mantido nestas mesmas condições e ao final de 8 dias foi preparada solução com concentração final de 100 µg/mL em fase móvel.

- *Degradação térmica:* para o teste de estresse térmico, o pó da substância química de referência foi exposto à temperatura de 60 °C por 15 dias em forno. Terminado o período de exposição, foi preparada solução em fase móvel para a análise.

9.2.2 Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida compatível com espectrometria de massas (LC-MS) para identificação dos produtos de degradação de orbifloxacino

O orbifloxacino foi sujeito à hidrólise ácida, básica e neutra, degradação oxidativa, fotólise ácida, básica e neutra, degradação fotolítica e térmica da SQR na forma sólida, além de estudos acelerados e de longa duração de estabilidade realizados na forma farmacêutica comprimido, como descrito no capítulo 8, para avaliar a possível produção dos respectivos produtos de degradação. Para identificar os prováveis produtos de degradação revelados pelo detector de massas, método por cromatografia líquida compatível com a espectrometria de massas foi desenvolvido.

Estudos iniciais foram realizados usando diferentes condições de gradiente, fases móveis e temperaturas (Tabela 9.1). Para o desenvolvimento do método, a solução de hidrólise básica de orbifloxacino foi utilizada por ser a que apresentou a

pior separação na primeira condição testada, além conter o maior número de produtos de degradação. A vazão foi mantida constante em 0,5 mL/min. A coluna usada foi a SymmetryShield Waters® RP18, 5 µm (250 mm x 4,6 mm). O comprimento de onda utilizado foi de 290 nm e o volume injetado foi de 20 µL. O principal objetivo durante o desenvolvimento do método foi obter picos com resolução maior que 1,5 entre os picos de interesse.

Tabela 9.1. Condições testadas para o desenvolvimento do método por LC-MS

Condição	Fase móvel	Gradiente (tempo/%B)	Temp. (°C)	Comentários
1	A: HAc 5% e MetOH, 80:20, v/v) B: ACN	0/5, 60/95, 65/5	40	Perdeu a maioria dos picos de interesse e apresentou baixa resolução
2	A: HAc 5% e MetOH, 80:20, v/v) B: ACN	0/5, 30/95, 35/5	40	Perdeu a maioria dos picos de interesse e apresentou baixa resolução
3	A: HAc 5% B: ACN	0/5, 30/50, 35/5	30	Baixa resolução
4	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 50/50, 55/5, 60/5	30	Baixa resolução para a maioria dos picos de interesse
5	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/50, 65/5	30	Boa separação foi encontrada, entretanto, tentativa foi feita para reduzir o tempo de corrida
6	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 50/60, 55/5	30	Apresentou fusão dos picos de interesse
7	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/60, 65/5	30	Apresentou fusão dos picos de interesse
8	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 30/90, 35/5	30	Perdeu os dois últimos picos (<i>m/z</i> 344 e 394)
9	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 1/5, 10/10, 15/20, 30/20, 50/50, 55/5, 60/5	30	Perdeu um pico de interesse
10	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 12/20, 23/25, 50/50, 55/5, 60/5	30	Péssima resolução no pico de massa 354

Tabela 9.1. cont. Condições testadas para desenvolvimento de método por LC-MS

Condição	Fase móvel	Gradiente (tempo/%B)	Temp. (°C)	Comentários
11	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 12/20, 20/20, 50/50, 55/5, 60/5	30	Péssima resolução do pico de massa 328
12	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/50, 65/	40	Baixa resolução no pico de massa 354 (resol. = 1,39)
13	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/50, 65/5	50	Baixa resolução no pico de massa 354 (resol. = 1,36)
14	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/50, 65/5	60	Baixa resolução nos picos de massas 328 (resol. = 0,84) e 354 (resol. = 0,89)
15	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/95, 65/5	40	Perdeu o pico de massa 354
16	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 40/95, 45/5	40	Picos com massa 344 e 394 se fundem
17	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 60/40, 65/5	40	Baixa resolução no pico de massa 328 (resol. = 0,31)
18	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 30/40, 35/5	40	Baixa resolução no pico de massa 354 (resol. = 1,12)
19	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 40/50, 45/5	40	Baixa resolução no pico de massa 328 (resol. = 1,15)
20	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 12/20, 23/25, 50/50, 55/5, 60/5	40	Perdeu o pico com massa 354
21	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 7/20, 23/25, 40/50, 45/5	40	Baixa resolução no pico de massa 328 (resol. = 0,93)
22	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 30/90, 35/5	40	Perdeu o pico de 394
23	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 7/20, 23/25, 40/50, 45/5	50	Baixa resolução no pico de massa 354
24	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 30/50, 35/5	40	Baixa resolução do pico de orbifloxacino (resol. = 1,48)

Tabela 9.1. cont. Condições testadas para desenvolvimento de método por LC-MS

Condição	Fase móvel	Gradiente (tempo/%B)	Temp. (°C)	Comentários
25	A: HAc 5% B: MetOH	0/5, 30/50, 35/5	50	Todos os picos obtiveram boa resolução

HAc: ácido acético; MetOH: metanol; resol.: resolução

Dois solventes orgânicos foram testados, metanol e acetonitrila. Quando acetonitrila foi utilizada, a maioria dos picos não puderam ser identificados, apresentando fusão e baixa resolução, por outro lado, metanol apresentou boa separação dos picos e foi, portanto, escolhido como fase orgânica para compor a fase móvel.

Como pode ser percebido na Tabela 9.1, a resolução dos principais produtos de degradação foi insatisfatória, quando a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C. O aumento da temperatura em 10 °C mostrou melhora da resolução dos picos, entretanto, alguns picos não foram identificados ou se fundiram. Utilizando a temperatura de 50 °C obteve-se a melhor resolução para todos os picos de interesse e tempo de corrida relativamente curto pôde ser utilizado, o que favorece a aplicabilidade do método.

A resposta avaliada para a escolha da melhor condição foi a resolução entre os picos de interesse e a detecção no espectro de massas.

A melhor condição encontrada para LC-MS foi a condição 25, sendo o solvente na bomba A ácido acético 5% e na bomba B, metanol 100%. A concentração do solvente orgânico foi iniciada com 5% (tempo 0 minuto) e foi aumentada linearmente até 30 minutos. O tempo de pós-corrída foi de 5 minutos, no qual a concentração do solvente B retornou a 5%. O detector foi mantido em 290 nm, uma vez que as soluções com os produtos de degradação mostraram boa resposta neste comprimento de onda. A vazão foi ajustada para 0,5 mL/min e foram injetados 20 µL das soluções.

O método desenvolvido foi adicionalmente validado segundo os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção recomendados pela ANVISA (BRASIL, 2003a), ICH (2005), INMETRO (2007) e USP (2011e).

9.3 Resultados e discussão

9.3.1 Validação do método por LC-MS

As condições cromatográficas e espectrométricas estabelecidas para a determinação de orbifloxacino e seus produtos de degradação por LC-MS estão apresentadas na Tabela 9.2.

Tabela 9.2. Parâmetros estabelecidos para a determinação de orbifloxacino e seus produtos de degradação pelo método por LC-MS

Fase móvel	Solvente A: ácido acético 5%, (v/v); Solvente B: metanol
Gradiente (tempo/%B)	0/5, 30/50, 35/5
Coluna	SymmetryShield Waters® RP18, 5 µm, 250 x 4,6 mm
Deteção	PDA, $\lambda = 290$ nm
Vazão	0,5 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	50 °C
Fonte de ionização	APCI
Modo de análise	Positivo
Analizador	Quadrupolo simples (MSq)
Detector	Multiplicador de elétrons
Gás de arraste	Nitrogênio
Vazão do gás	1,5 L/min
Temperatura de dessolvatação	400 °C
Voltagem do detector	1,5 kV
Corrente de interface	38 µA

O teste de adequação do sistema (*system suitability*) foi realizado para garantir que o sistema era adequado para a aplicação pretendida. A solução-padrão contendo 100,0 µg/mL foi injetada seis vezes. Os parâmetros avaliados foram área do pico de orbifloxacino, tempo de retenção, fator de capacidade, pratos, assimetria e resolução. Em todas as medições a área do pico variou menos que 2,0%, o tempo médio de retenção para orbifloxacino foi de 14,16 minutos, o fator de capacidade foi superior a 2, pratos foram maior que 2000 e a assimetria foi inferior a 2 para todos os picos. Em todos os casos, o pico do fármaco foi bem separado dos picos próximos (vizinhos) com resolução maior que 2.

Na Tabela 9.3 são apresentados os valores das áreas e seus respectivos desvios (DPR) obtidos pelas diferentes concentrações de orbifloxacino SQR.

Tabela 9.3. Valores das áreas referentes ao pico de orbifloxacino SQR para construção da curva analítica do método por LC-MS

Concentração (µg/mL)	Áreas *	Área média	DPR (%)
1,0	248522	251221	1,25
	254683		
	250460		
10,0	2626400	2621533	0,75
	2599820		
	2638379		
25,0	6318570	6269262	0,70
	6255709		
	6233508		
50,0	12578452	12402218	1,24
	12299849		
	12328353		
75,0	18556756	18585593	0,27
	18556756		
	18643266		
100,0	25440597	25988831	1,83
	26249236		
	26276660		

*Cada valor corresponde à média de três determinações.

A curva analítica de orbifloxacino SQR (Figura 9.1) foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 256079x - 119646$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9993.

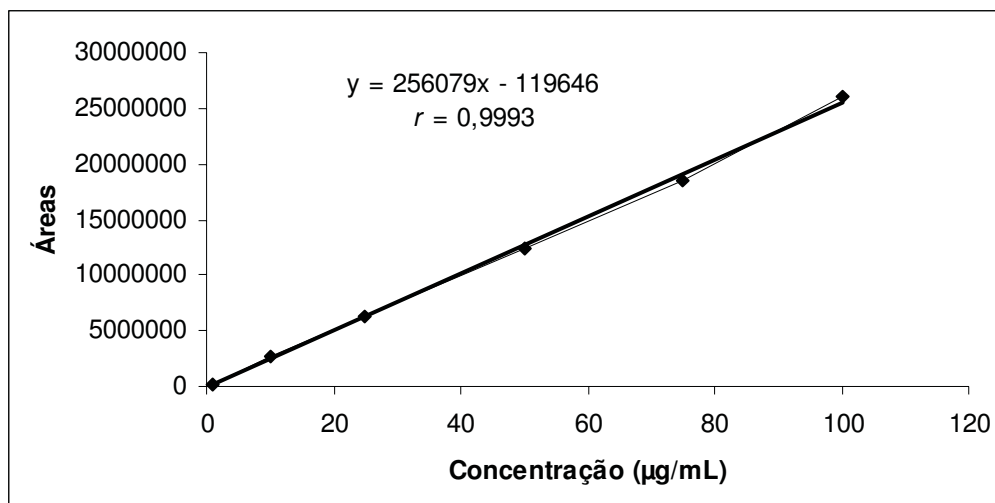


Figura 9.1. Curva analítica de orbifloxacino SQR obtida pelo método por LC-MS.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de orbifloxacino SQR é mostrada na Tabela 9.4.

Tabela 9.4. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de orbifloxacino SQR, utilizando o método por LC-MS

<i>Fontes de variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>F_{tab}</i>
Entre	5	1476854917767080	295370983553416	581,56*	3,11
Regressão	1	1473094573920060	1473094573920060	2900,41*	4,75
Desvio da linearidade	4	3760343847019	940085961755	1,85	4,79
Resíduo	12	507891673666	42324306139	-	-
Total	17	1477362809440740	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: soma dos quadrados médios

A precisão do método foi avaliada pela análise de orbifloxacino SQR na concentração de 100 µg/mL em sextuplicata em três dias diferentes. Os valores de desvio padrão relativo da precisão intradia e intermediária foram 0,48 e 0,43%, respectivamente.

Na Tabela 9.5 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método LC-MS. A recuperação foi realizada adicionando-se concentrações conhecidas de padrão ao *pool* das soluções degradadas de orbifloxacino. Os valores de recuperação foram calculados pela equação 9.1 (AOAC, 2002).

$$\%R = \left[\frac{(C_r - C_a)}{C_p} \right] \times 100 \quad \text{Equação 9.1}$$

em que:

C_r = concentração da solução amostra adicionada de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

C_a = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_p = concentração teórica da SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

Tabela 9.5. Valores do teste de recuperação de orbifloxacino pelo método por LC-MS

	ORBI SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	ORBI SQR encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R₁	25,0	24,82	99,30	
R₂	50,0	50,06	100,13	99,99
R₃	75,0	75,42	100,55	

A especificidade foi determinada através da degradação ácida, básica, neutra, oxidativa, fotolítica e térmica da solução de orbifloxacino. As Figuras 9.3, 9.7, 9.17, 9.21, 9.25, 9.35, 9.38, 9.41, 9.43, 9.45 e 9.47 na seção 9.3.3 (posterior) mostram os cromatogramas obtidos pelos estudos de degradação forçada, realizados conforme descrito na seção 9.2.1. Como podem ser observados, todos os picos foram bem resolvidos (resolução maior que 1,8) e apresentam pureza maior que 0,99, demonstrando a especificidade do método desenvolvido (Tabela 9.8).

Os limites de detecção e quantificação para este método foram calculados pela razão sinal-ruído (ICH, 2005). Os valores encontrados foram 0,7 e 5 ng/mL, respectivamente.

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 1,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Os valores para a inclinação e o intercepto da curva analítica foram 256079 e 119646, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9993. A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, no limite de confiança de 95% (Tabela 9.4).

Os valores de desvio padrão relativo dentro dos dias de análise tiveram média de 0,48 e entre os dias de 0,43% para o ensaio de precisão.

A exatidão do método, expressa pela percentagem de recuperação, é de 99,99% com variação de 0,64%.

O método proposto oferece alta sensibilidade e orbifloxacino e seus produtos de degradação podem ser detectados com precisão.

O principal objetivo do desenvolvimento deste método cromatográfico, além de quantificar orbifloxacino, foi separar os principais produtos de degradação gerados

durante o estudo de degradação forçada para sua detecção e análise pelo espectro de massas.

O método proposto permite a separação de todos os picos de interesse. Este método também permite realizar estudo de estabilidade para cinética de fotodegradação do fármaco.

9.3.2 Taxa de degradação de orbifloxacino

A influência do pH à alta temperatura foi verificada para o orbifloxacino. À temperatura de 80 °C, após 8 dias, a maior taxa de degradação foi encontrada em solução básica (~34% de hidrólise básica), seguida pela solução de orbifloxacino em meio ácido com aproximadamente 13% de degradação. A menor taxa de degradação sob aquecimento foi observada em solução neutra, na qual 7,6% de degradação foram encontradas (Tabela 9.6).

A degradação do fármaco também foi observada no estudo acelerado (40 °C ± 2 °C/75% ± 5% UR) e de longa duração (30 °C ± 2 °C/75% ± 5% UR) de estabilidade, sendo a taxa de degradação em 6 meses de 15,28% e 6,37%, respectivamente (Tabela 9.6).

Ainda, a estabilidade de orbifloxacino sob oxidação foi verificada. Para tanto, solução de peróxido de hidrogênio 3% foi utilizada. Em 24 horas de experimento, aproximadamente 17% do fármaco foi degradado.

Tabela 9.6. Percentuais obtidos nos estudos de degradação de orbifloxacino

<i>Condições</i>	<i>% degradação</i>
Hidrólise ácida (HCl 0,1 M, 80 °C, 8 dias)	12,85
Hidrólise básica (NaOH 0,1 M, 80 °C, 8 dias)	33,67
Hidrólise neutra (água, 80 °C, 8 dias)	7,58
Oxidação (H ₂ O ₂ 3%, temperatura ambiente, 24 h)	16,74
Fotólise ácida (HCl 0,1 M, exposição UV/VIS, 12 h)	17,62
Fotólise básica (NaOH 0,1 M, exposição UV/VIS, 5 h)	16,47
Fotólise neutra (Água, exposição UV/VIS, 1 h)	14,73
Degradação térmica (60 °C, 15 dias)	1,76
Fotólise seca (pó, UV/VIS, 8 dias)	1,82
Estudo acelerado de estabilidade (40 °C/75% UR, 6 meses)	15,28
Estudo de longa duração de estabilidade (30 °C/75% UR, 6 meses)	6,37

A taxa de degradação de orbifloxacino sob luz UV/VIS, em função do pH, também foi estudada e os resultados encontrados estão indicados na Tabela 9.7 e Figura 9.2.

Tabela 9.7. Dados do estudo de fotodegradação de orbifloxacino em condições ácida, básica e neutra

	<i>Fotólise ácida (%)*</i>	<i>Fotólise básica (%)*</i>	<i>Fotólise neutra (%)*</i>
0h	100,32	101,05	100,45
1h	101,15	104,12	85,72
2h	100,48	98,28	77,93
3h	100,89	96,36	70,75
4h	100,86	92,05	65,55
5h	97,86	84,58	61,27
6h	96,00	84,51	57,18
7h	95,53	84,15	52,83
8h	95,33	83,99	51,09
9h	95,04	81,25	47,57
10h	93,85	78,82	47,06
11h	93,51	76,69	44,88
12h	82,70	68,60	41,73
24h	82,70	52,33	30,63
72h	57,72	4,20	15,51

*% remanescente

A Figura 9.2 apresenta as curvas de decaimento da substância ativa orbifloxacino durante sua fotodegradação sob as condições ácida, básica e neutra.

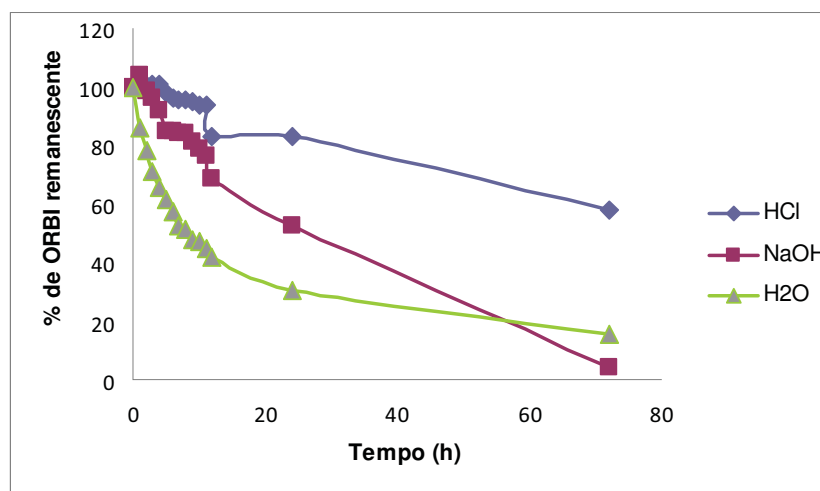


Figura 9.2. Taxa de fotodegradação de orbifloxacino em diferentes pHs.

De forma similar à cinética de fotodegradação de outras quinolonas, o orbifloxacino mostrou fotodegradação, sob radiação UV/VIS, dependente do pH. A fotodegradação mais rápida do fármaco ($t_{1/2} \sim 8$ h) foi encontrada na solução aquosa (pH 7). Em solução básica o $t_{1/2}$ foi de aproximadamente 24 horas. Após este tempo, a degradação de orbifloxacino neste meio foi a mais agressiva sendo quase 95% do fármaco degradado. A menor taxa de fotodegradação foi encontrada em solução ácida, na qual somente após 72 horas 40% de degradação na substância ativa foi observada (Figura 9.2). Todas as soluções apresentaram cinética de fotodegradação de primeira ordem. Estes dados estão de acordo com o estudo realizado por Morimura e colaboradores (1995b). De fato, estes mesmo autores afirmam que a forma *zwitteriônica* (neutra) é a forma mais fotorreativa e que a dissociação do fármaco, sendo catiônico em solução ácida e aniônico em solução básica, também afeta a taxa de fotodegradação (MORIMURA *et al.*, 1995b).

9.3.3 Identificação dos produtos de degradação gerados pela degradação de orbifloxacino

O estudo por LC-MS foi realizado para determinar os valores da razão massa/carga (m/z) dos maiores produtos de degradação de orbifloxacino formados sob hidrólises ácida, básica e neutra, oxidação, fotólises ácida, básica e neutra e condições de estudo acelerado e de longa duração de estabilidade, além do estudo térmico e fotolítico da SQR na forma sólida.

As soluções degradadas de orbifloxacino foram avaliadas por LC-MS com analisador quadrupolo simples e fonte iônica APCI, no modo positivo para a identificação dos principais produtos de degradação. Para análise por LC-MS, primeiramente as soluções degradadas de orbifloxacino foram consideradas no modo *scan* (TIC – *total ion current plot*) e os íons de m/z 50 a 650 foram registrados pelo período de tempo de 35 minutos. Os cromatogramas de massas foram comparados com os cromatogramas da LC e foram observados os tempos de retenção de cada produto de degradação de interesse.

Para cada solução foram realizadas novas leituras em triplicata utilizando detecção PDA e SIM (*Selected Ion Monitoring*) gerando picos mais bem resolvidos. Cada pico de interesse foi avaliado segundo os parâmetros de resolução, pratos, assimetria e fator de capacidade (Tabela 9.8). Todas as soluções analisadas estavam na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

O espectro de massas de orbifloxacino originado a partir da ionização química à pressão atmosférica no modo positivo exibiu pico do íon molecular em 396.

Tabela 9.8. Produtos de degradação de orbifloxacino isolados por LC-MS

	<i>TR</i>	<i>TRR</i>	<i>Ion (m/z)*</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>k'</i>
ORBI	14,21	1,00	396	2,32	41321	1,35	2,15
PD₁	11,69	0,82	352	17,72	13647	1,50	0,99
PD₂	10,29	0,72	328	15,67	18604	1,24	1,27
PD₃	12,64	0,89	354	2,10	14717	NC	1,79
PD₄	18,37	1,29	344	8,14	60577	1,06	3,05
PD₅	18,99	1,34	394	2,18	76279	1,19	3,19
PD₆	13,52	0,95	356	27,45	32914	NC	1,30
PD₇	12,94	0,91	368	1,81	2990	NC	1,52
PD₈	12,26	0,86	338	22,58	23955	1,28	1,09
PD₉	13,04	0,92	394	2,46	27323	NC	1,22
PD₁₀	15,71	1,11	412	1,96	50336	1,22	1,67
PD₁₁	32,73	2,30	390	9,57	118009	1,34	4,57

*[M]⁺ ou [M+H]⁺; PD: produto de degradação; TR: tempo de retenção; TRR: tempo de retenção relativo; R: resolução; N: pratos; T: assimetria; k': fator de capacidade; NC: não calculado.

As análises dos produtos de degradação gerados pelas hidrólises ácida, básica e neutra foram analisadas após o período de tempo de 8 dias. Os produtos gerados pela oxidação por peróxido de hidrogênio foram verificados após 24 horas. As análises dos fotoprodutos de degradação de orbifloxacino em soluções ácida, básica e neutra foram realizadas em soluções irradiadas após o período de 12, 5 e 1 horas, respectivamente (Tabela 9.6).

O tempo de análise foi definido de acordo com o trabalho de Alsante e colaboradores (2007) que preconiza de 5 a 20% de degradação na molécula para estudos de identificação.

Produtos de degradação que geraram picos com percentagem de área menor que 0,1% não foram considerados para o estudo.

9.3.3.1 Identificação dos produtos de degradação gerados pela hidrólise ácida

Sob condições ácidas um maior produto de degradação foi identificado - PD₁ (Tabela 9.8). Este produto apresentou tempo de retenção, em média, de 11,6 minutos, como pode ser visto na Figura 9.3.

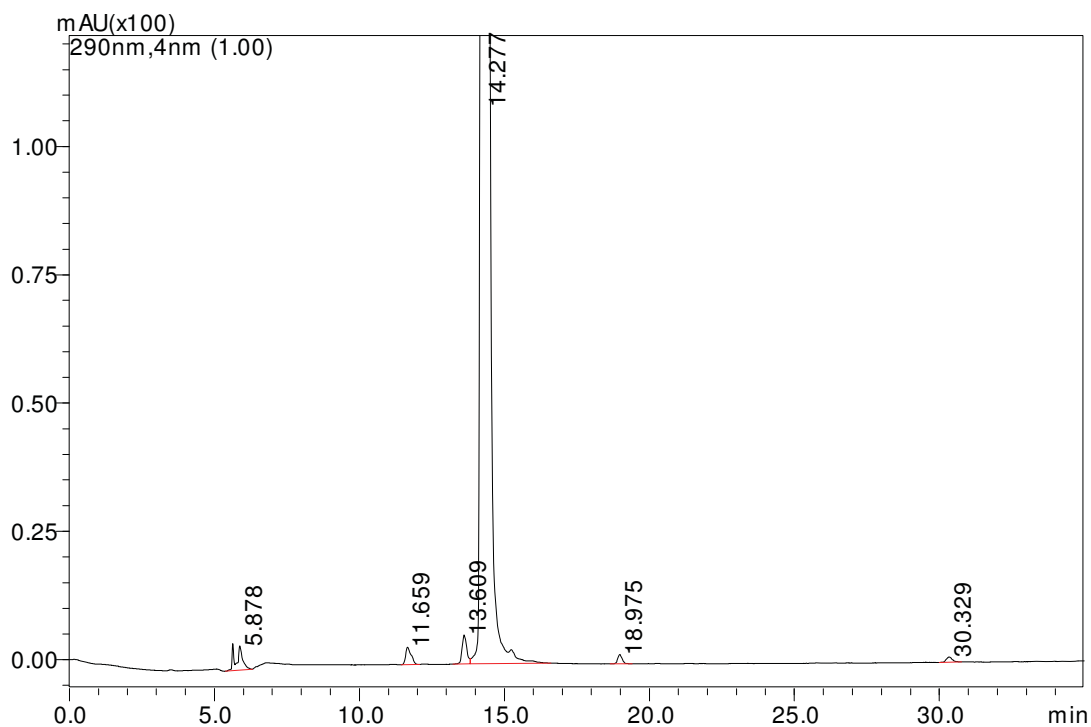


Figura 9.3. Produtos de degradação gerados na hidrólise ácida de orbifloxacin.

O produto de degradação gerado pela exposição de orbifloxacin em solução ácida por 8 dias a 80 °C apresentou m/z 352 (Figuras 9.4 e 9.5).

Os cromatogramas e espectro de massas observados para PD₁ são mostrados nas Figuras 9.4 e 9.5. Os parâmetros analisados estão compilados na Tabela 9.8.

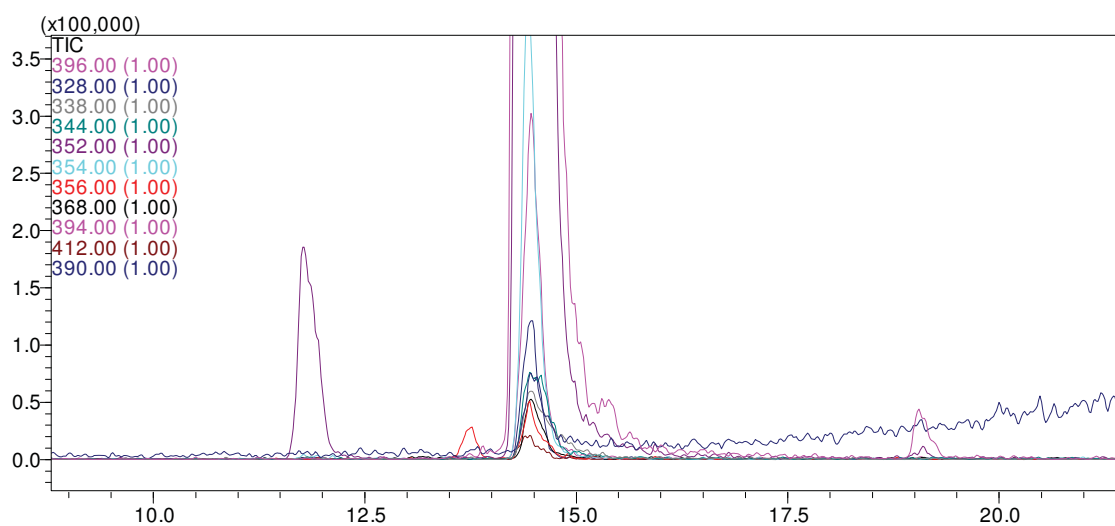


Figura 9.4. Cromatogramas de massas de PD₁ (modo SIM) gerados pela hidrólise ácida de orbifloxacin.

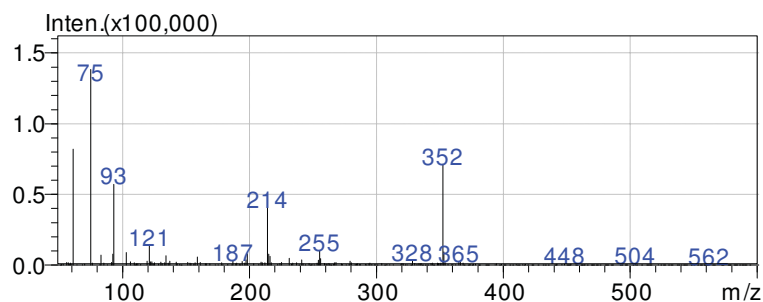


Figura 9.5. Espectro de massas de PD₁ isolado de orbifloxacin.

A perda de 44 unidades de massa indica a eliminação do grupo carboxílico. Este produto de degradação foi identificado como possivelmente sendo 1-ciclopropil-7-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)-5,6,8-trifluorquinolin-4(1*H*)-ona (Figura 9.6). De fato, esta reação foi anteriormente sugerida por Morimura e colaboradores (1995a) e este PD também está descrita nas Farmacopeias Americana e Britânica (BP, 2011b; USP, 2011f).

O mecanismo de descarboxilação sob condições ácidas foi considerado acontecer pela adição do próton ao carbono α e pela eliminação do grupo carboxílico (MORIMURA *et al.*, 1995a).

A estrutura sugerida é mostrada na Figura 9.6. Esta molécula apresenta fórmula molecular $C_{18}H_{20}F_3N_3O$ e massa média de 351,366 Da[†].

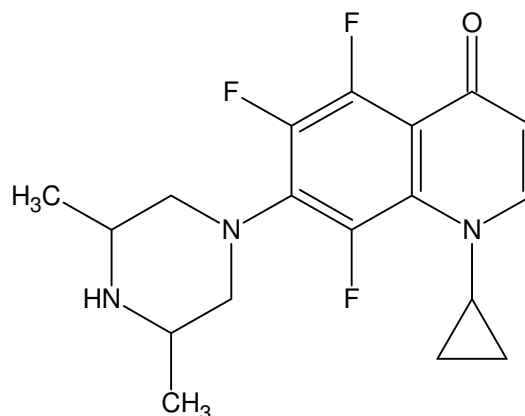


Figura 9.6. Estrutura química sugerida para o PD₁ de orbifloxacin.

O produto de degradação com m/z 356 (PD₆) também foi observado durante a hidrólise ácida de orbifloxacin, entretanto, o sinal foi considerado insignificante. Este PD parece estar presente na maioria das reações (hidrólise neutra, básica, estudos

[†]O nome químico, fórmula e massa das estruturas sugeridas foram obtidos pelo *software* ACD/Chemsketch. A massa indicada corresponde a massa média e não a massa monoisotópica (exata).

acelerado e de longa duração de estabilidade e estresse térmico do fármaco na forma sólida).

Este caminho de degradação foi amplamente relatado na literatura como sendo o caminho primário de fotodegradação de ciprofloxacino sob condições ácidas (BURHENNE *et al.*, 1997a, 1997b; MELLA *et al.*, 2001).

9.3.3.2 Identificação dos produtos de degradação gerados pela hidrólise básica

Quando o orbifloxacino foi exposto à alta temperatura em solução básica, no mínimo, sete produtos de degradação foram visíveis nos cromatogramas utilizando o detector PDA (Figura 9.7), entretanto somente quatro apresentaram boa intensidade no cromatograma de massas (Figura 9.8) para serem identificados. Estes produtos foram nominados como PD₂, PD₃, PD₄ e PD₅ e apresentaram massas de 328, 354, 344 e 394 Da, respectivamente (Tabela 9.8). Os produtos de degradação PD₁ e PD₆ também puderam ser observados como resultado desta reação, porém, com sinal baixo. O pico com tempo de retenção de 11,26 minutos não pôde ser identificado pelo espectrômetro de massas.

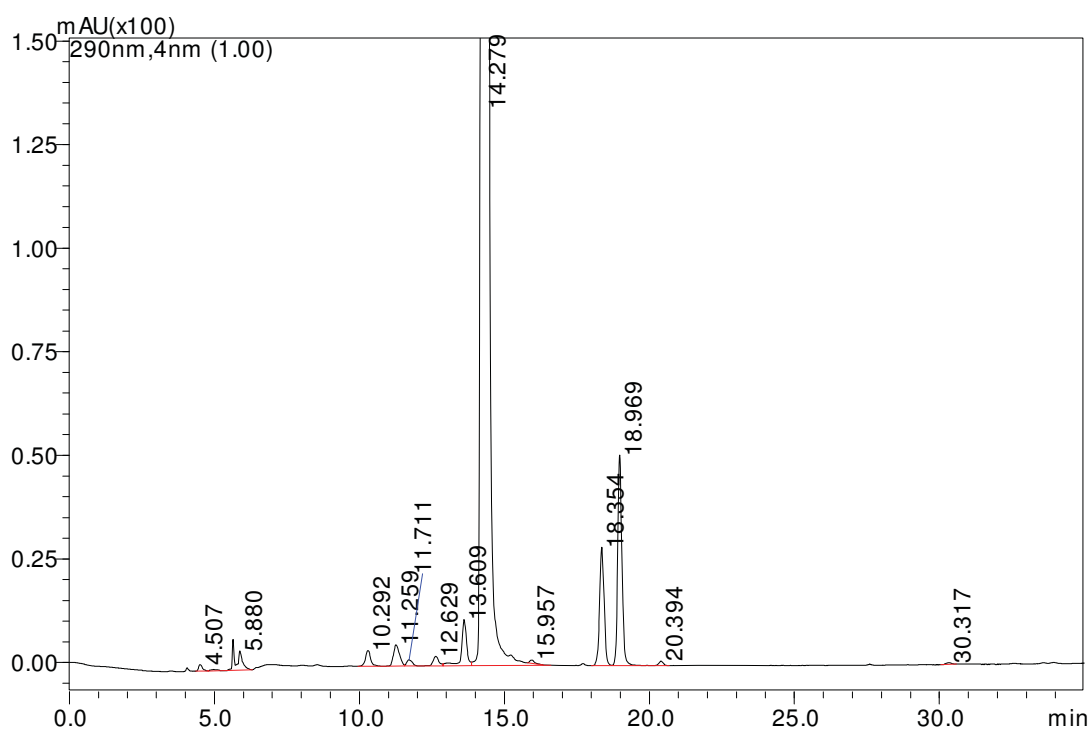


Figura 9.7. Produtos de degradação gerados na hidrólise básica de orbifloxacino.

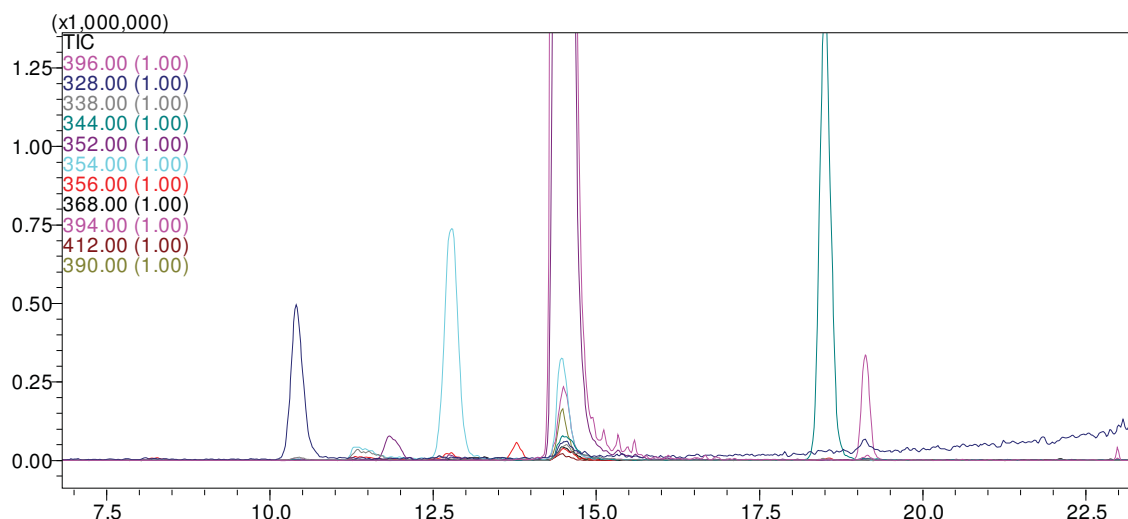


Figura 9.8. Cromatogramas de massas de PD₂, PD₃, PD₄ e PD₅ (modo SIM) gerados pela hidrólise básica de orbifloxacino.

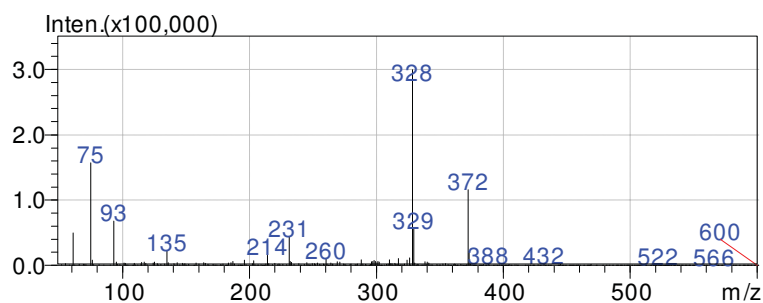


Figura 9.9. Espectro de massas de PD₂ isolado de orbifloxacino.

A estrutura sugerida do produto de degradação 2 está indicada na Figura 9.10. A estrutura foi nomeada como sendo 5,6,8-trifluór-7-[[*(1Z)*-2-(metilamino)prop-1-en-1-il]amino]-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico, com massa média de 327,258 Da e fórmula C₁₄H₁₂F₃N₃O₃.

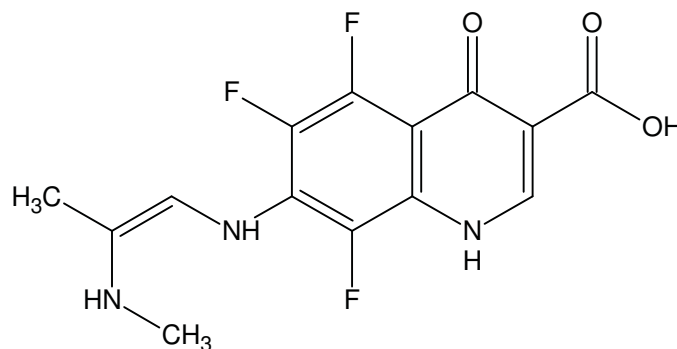


Figura 9.10. Estrutura química sugerida para o PD₂ de orbifloxacino.

Percebe-se que esta estrutura é originada a partir da abertura do anel 7-piperazínico com a permanência de um radical metila e a inserção de uma dupla ligação neste mesmo grupamento e pela eliminação do grupamento ciclopropil na posição 1 do anel quinolônico.

O produto de degradação PD₃ com tempo de retenção médio de 12,6 minutos, está representado pelo espectro de massas na Figura 9.11.

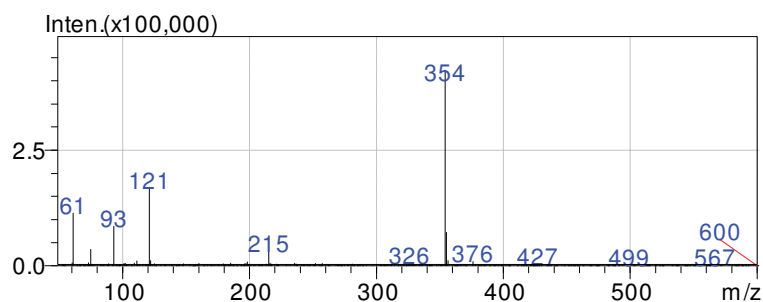


Figura 9.11. Espectro de massas de PD₃ isolado de orbifloxacino.

A estrutura química sugerida para o produto PD₃ está indicada na Figura 9.12. Como pode-se observar, esta estrutura é originada pela eliminação do grupo carboxílico na posição 3 e pela substituição da cetona em 4 por um radical hidroxila. Esta estrutura apresenta fórmula molecular C₁₈H₂₂F₃N₃O; massa de 353,382 Da e nome químico 1-ciclopropil-7-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)-5,6,8-trifluór-1,4-dihidroquinolin-4-ol.

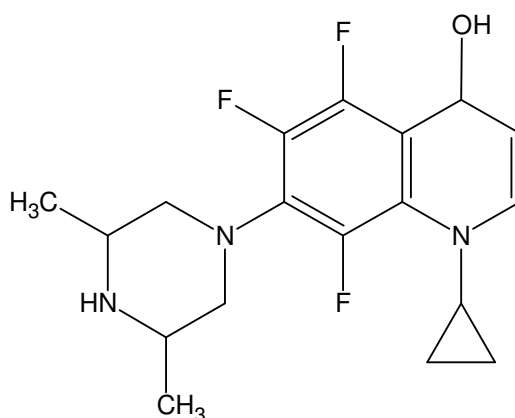


Figura 9.12. Estrutura química sugerida para o PD₃ de orbifloxacino.

O produto de degradação 4 foi eluído com tempo de retenção médio de 18,3 minutos. A Figura 9.13 apresenta o espectro de massas para esta impureza.

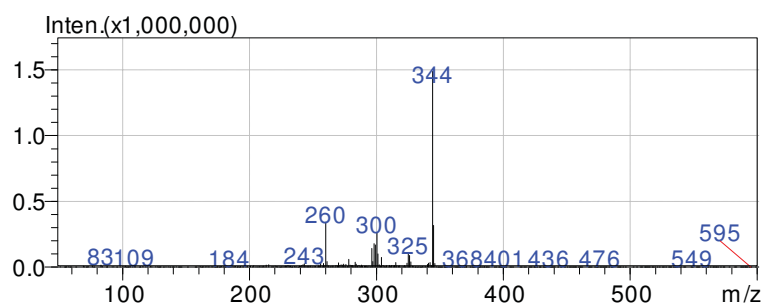


Figura 9.13. Espectro de massas de PD₄ isolado de orbifloxacin.

A estrutura química sugerida para o PD₄ está indicada na Figura 9.14.

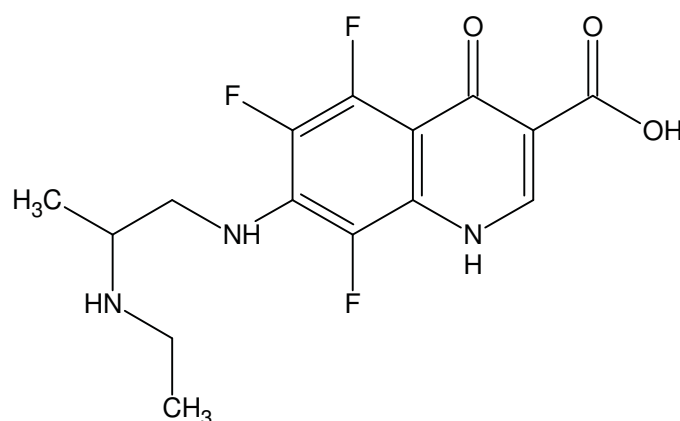


Figura 9.14. Estrutura química sugerida para o PD₄ de orbifloxacin.

A Figura 9.14 foi nomeada como 7-[[2-(etilamino)propil]amino]-5,6,8-triflúor-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico. Este PD apresenta fórmula molecular C₁₅H₁₆F₃N₃O₃ e massa média de 343,301 Da. Para resultar nesta estrutura, a molécula de orbifloxacin, provavelmente, sofreu abertura do anel piperazínico em 7, com permanência de um radical etila e perda do grupo ciclopropil em 1.

O espectro de massas do produto de degradação com massa 394 (DP₅), gerado durante a hidrólise básica de orbifloxacin é apresentado na Figura 9.15. Este produto foi eluído com tempo de retenção médio de 18,9 minutos.

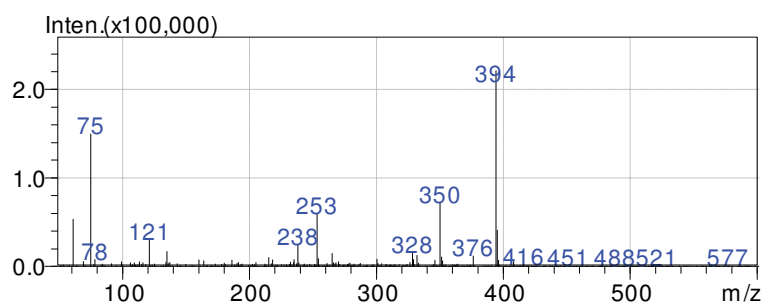


Figura 9.15. Espectro de massas de PD₅ isolado de orbifloxacin.

A estrutura química sugerida para o PD₅, com fórmula molecular C₁₉H₂₁F₂N₃O₄ e massa média de 393,385 Da é apresentada na Figura 9.16.

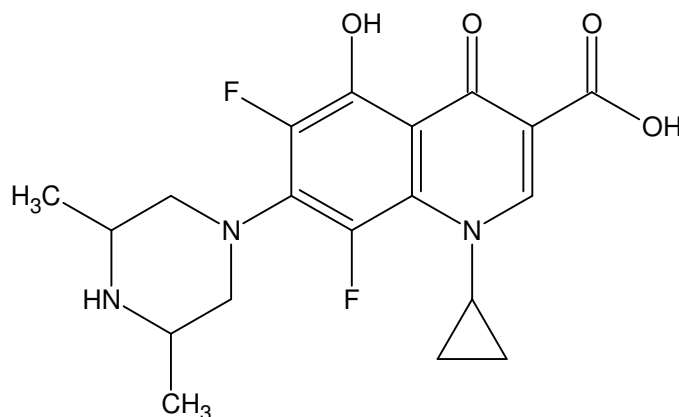


Figura 9.16. Estrutura química sugerida do PD₅ de orbifloxacino.

Na estrutura química de PD₅ ocorre a substituição do átomo de flúor na posição 5 por um radical hidroxila. A quebra da ligação C-F na posição 5 do anel quinolônico com adição do radical hidroxila também foi proposto por Morimura e colaboradores (1995a) em solução alcalina. Esta estrutura ainda foi proposta pela Farmacopeia Britânica (BP, 2011b) e Americana (USP, 2011f).

Como dito anteriormente o produto com tempo de retenção 11,26 minutos não pôde ser identificado. O espectro de massas deste PD não foi claro.

O produto de degradação com m/z 352 (tempo de retenção ~ 11,7 minutos) também aparece como produto de degradação da hidrólise básica de orbifloxacino, embora com uma intensidade muito baixa.

Novamente o sinal de 356 (PD₆) aparece em 13,6 minutos, mas em baixa intensidade.

9.3.3.3 Identificação dos produtos de degradação gerados pela hidrólise neutra

Em meio neutro sob aquecimento, a molécula de orbifloxacino gerou um maior produto de degradação (PD₆) (Figuras 9.17 e 9.18). Este mesmo produto também foi encontrado nas hidrólises ácida e básica, nos estudos acelerado e de longa duração de estabilidade, bem como no teste realizado com orbifloxacino SQR na forma sólida à temperatura de 60 °C por 15 dias. Possivelmente esta última reação ocorra devido à absorção da umidade do ambiente, resultando na hidrólise neutra.

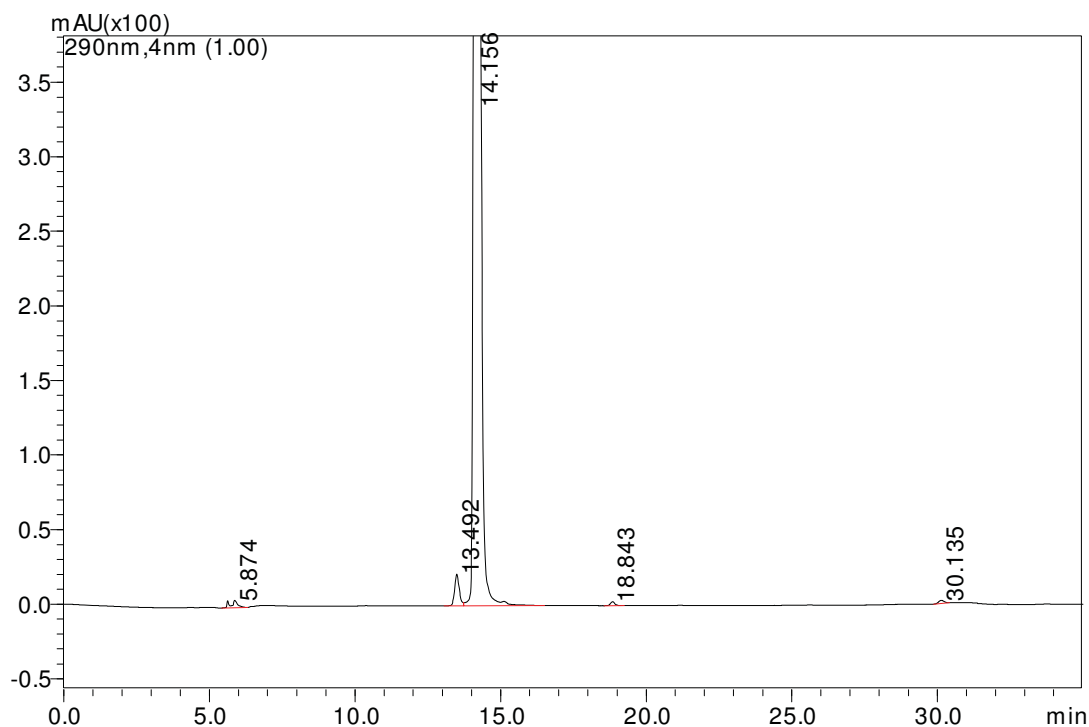


Figura 9.17. Produtos de degradação gerados na hidrólise neutra de orbifloxacin.

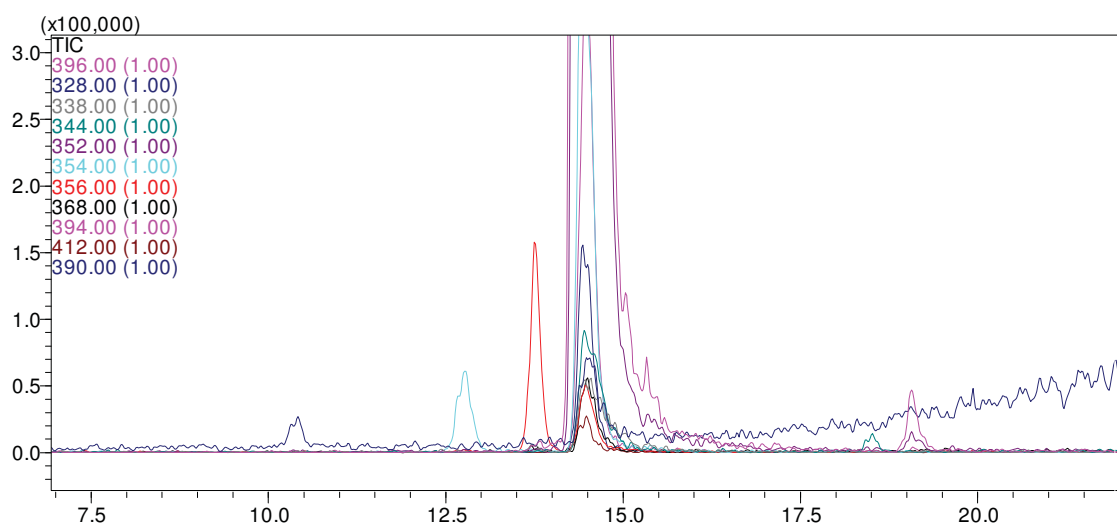


Figura 9.18. Cromatogramas de massas de PD₆ (modo SIM) gerados pela hidrólise neutra de orbifloxacin.

A Figura 9.19 mostra o espectro de massas obtido para o PD₆, com tempo de retenção médio de 13,4 minutos.

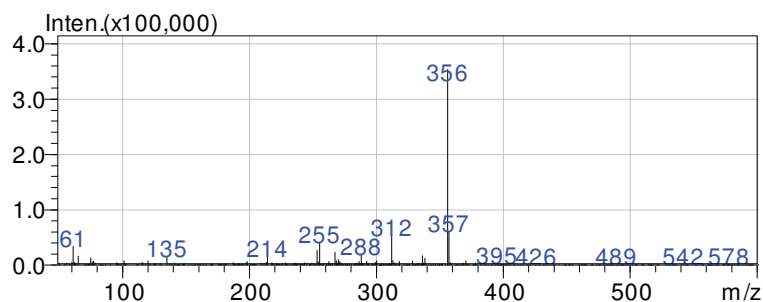


Figura 9.19. Espectro de massas de PD₆ isolado de orbifloxacin.

A Figura 9.20 apresenta as estruturas químicas sugeridas para o PD₆.

A estrutura codificada por “a”, 7-[(2-aminopropil)amino]-1-ciclopropil-5,6,8-trifluór-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico, apresenta fórmula molecular C₁₆H₁₆F₃N₃O₃ e massa média de 355,312 Da. Esta estrutura, possivelmente, foi gerada pela abertura do anel piperazínico na posição 7. A estrutura codificada como “b”, com nome 7-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)-5,6,8-trifluór-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico, e mesma fórmula e massa do composto “a”, provavelmente, resultou da perda do grupamento ciclopropil na posição 1 do anel quinolônico.

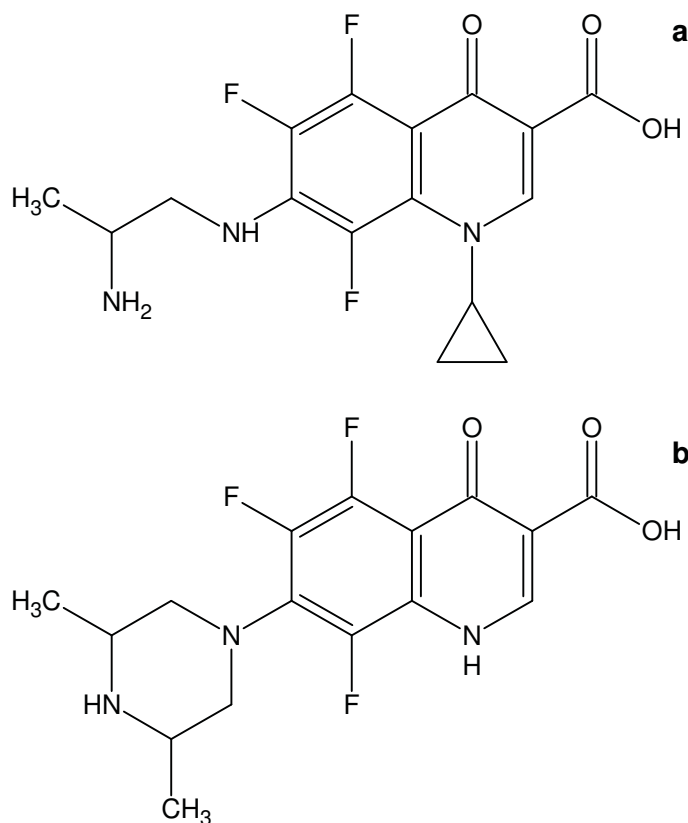


Figura 9.20. Estruturas químicas sugeridas para o PD₆ de orbifloxacin.

A massa do produto de degradação 6 (m/z 356) foi 40 unidades menor que a de orbifloxacino, o que é consistente com a perda do grupo ciclopropil ou abertura do anel piperazínico.

9.3.3.4 Identificação dos produtos de degradação gerados pela reação de oxidação

A oxidação da molécula de orbifloxacino gerou dois maiores produtos de degradação. O primeiro produto de degradação foi identificado como sendo 5,6,8-trifluór-7-[[[(1Z)-2-(metilamino)prop-1-en-1-il]amino]-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico (PD₂), com tempo de retenção, em média, de 10,2 minutos. A estrutura química sugerida para este produto foi anteriormente apresentada na Figura 9.10.

No tempo de retenção médio de 12,9 minutos um novo produto de degradação foi encontrado (PD₇) (Figuras 9.21 e 9.22). Este produto de degradação apresentou m/z 368 (Figura 9.23).

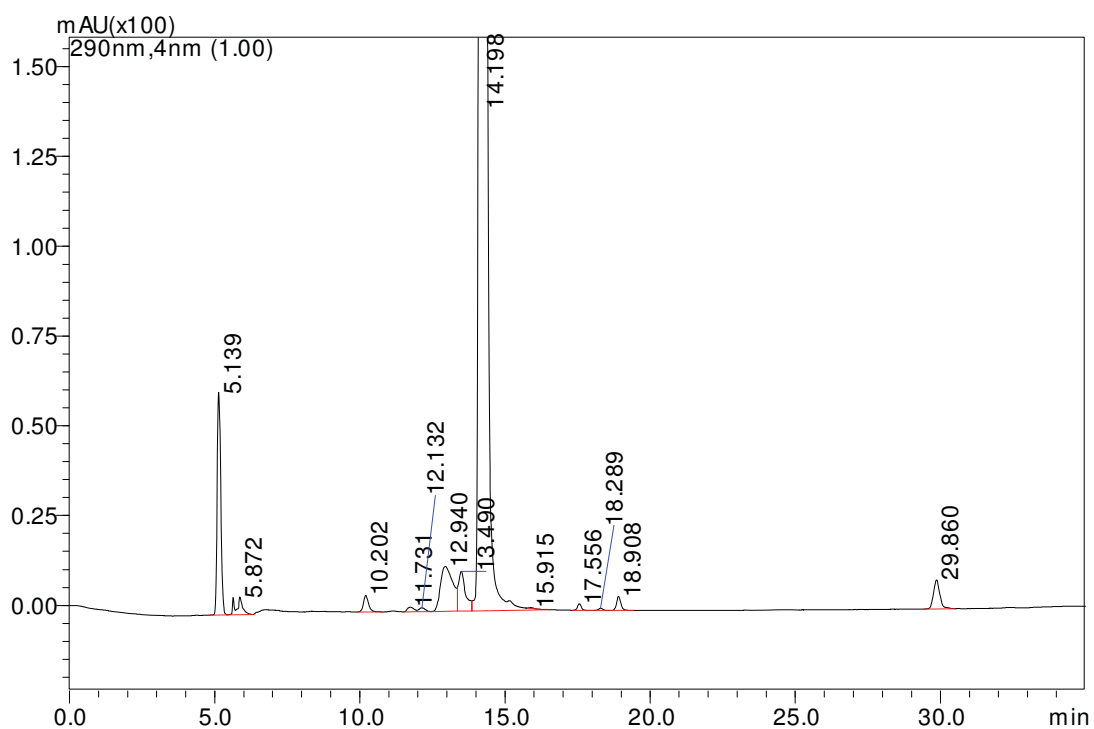


Figura 9.21. Produtos de degradação gerados pela oxidação de orbifloxacino utilizando peróxido de hidrogênio 3%.

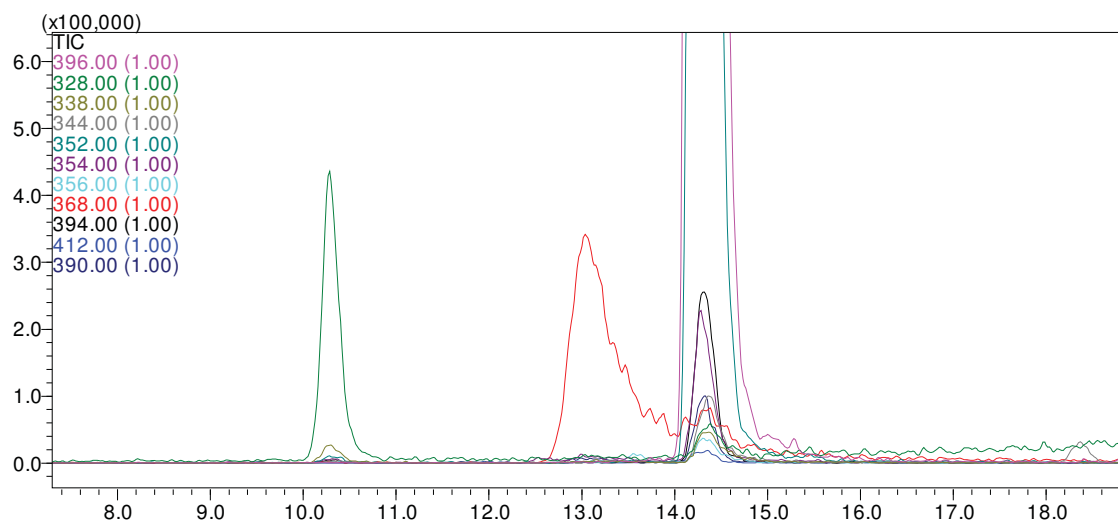


Figura 9.22. Cromatogramas de massas de PD₂ e PD₇ (modo SIM) gerados pela reação de oxidação de orbifloxacino.

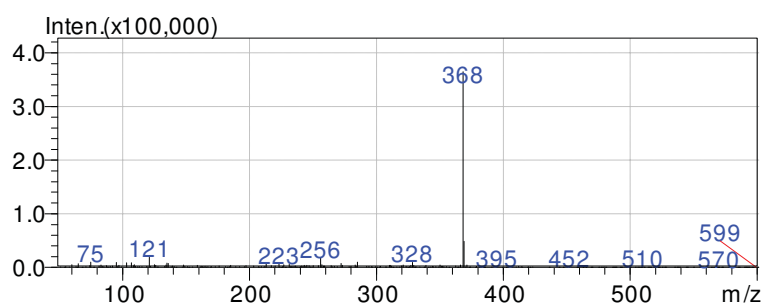


Figura 9.23. Espectro de massas de PD₇ isolado de orbifloxacino.

Sugere-se, para esta reação, que a molécula de orbifloxacino sofreu a perda dos dois radicais metila do anel piperazínico gerando a estrutura denominada 1-ciclopropil-5,6,8-triflúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico (Figura 9.24), com fórmula molecular C₁₇H₁₆F₃N₃O₃ e massa de 367,322 Da.

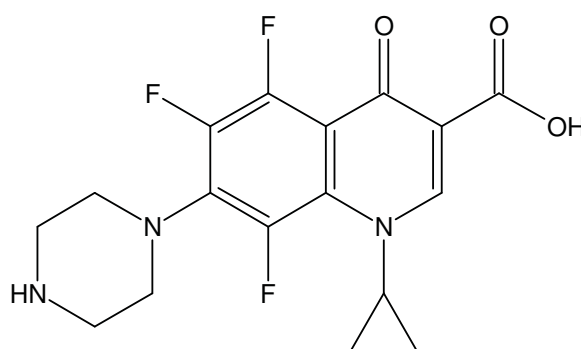


Figura 9.24. Estrutura química sugerida para o PD₇ de orbifloxacino.

9.3.3.5 Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise neutra

A estabilidade da molécula de orbifloxacino também foi avaliada sob luz UV e VIS. Nestas condições, a fotólise neutra gerou quatro maiores produtos de degradação (PD₈ - PD₁₁) (Figuras 9.25 e 9.26). Em apenas 1 hora de exposição da solução à luz UV/VIS 14,73% do fármaco foi degradado.

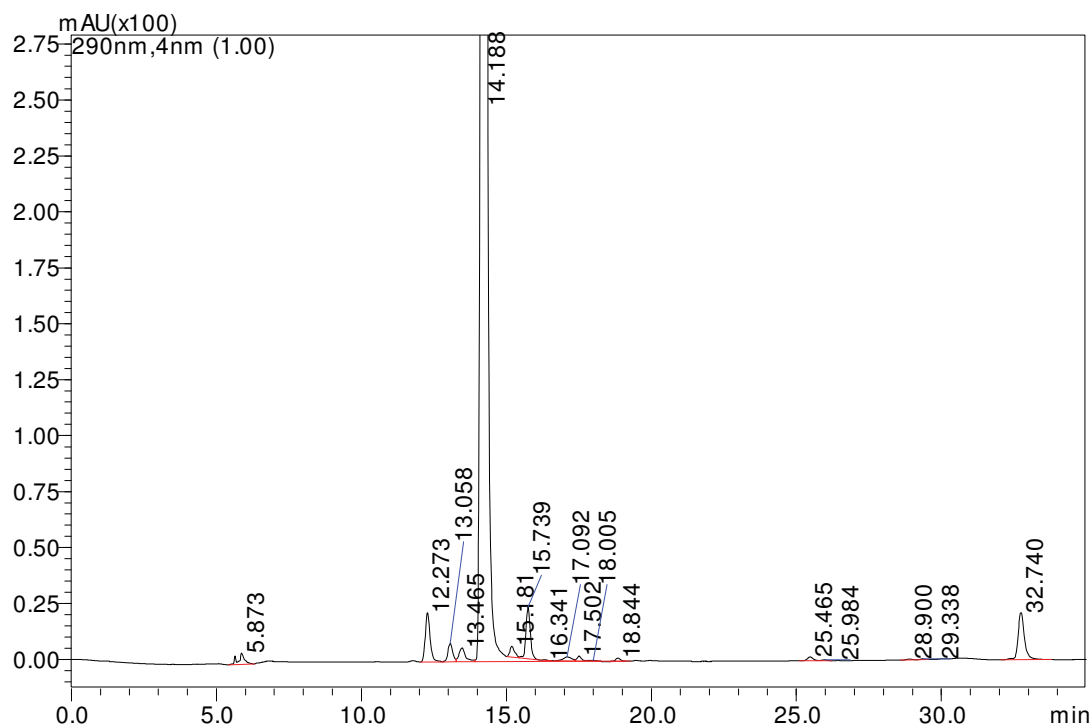


Figura 9.25. Cromatograma dos produtos de degradação gerados na fotólise neutra de orbifloxacino.

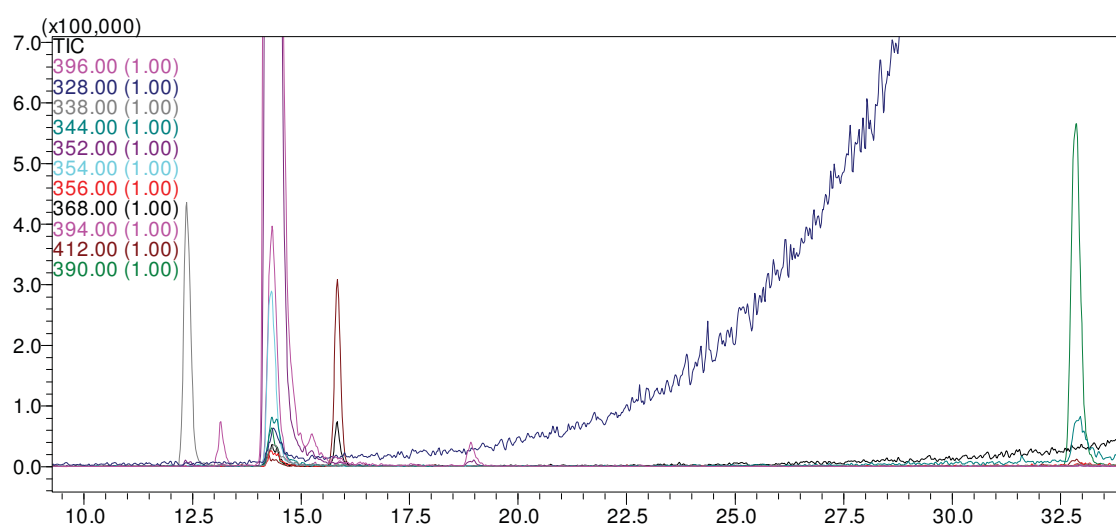


Figura 9.26. Cromatogramas de massas de PD₈, PD₉, PD₁₀ e PD₁₁ (modo SIM) gerados pela fotólise neutra de orbifloxacino.

O ponto isoelétrico da forma neutra é em pH 7,4. O orbifloxacino, similarmente ao ciprofloxacino (TORNIAINEN *et al.*, 1996), parece ser mais sensível à fotodegradação na forma *zwitteriônica*.

O primeiro produto de degradação gerado pela fotólise neutra de orbifloxacino foi eluído com tempo de retenção médio de 12,3 minutos. Este produto apresentou *m/z* 338 (PD₈) (Figura 9.27).

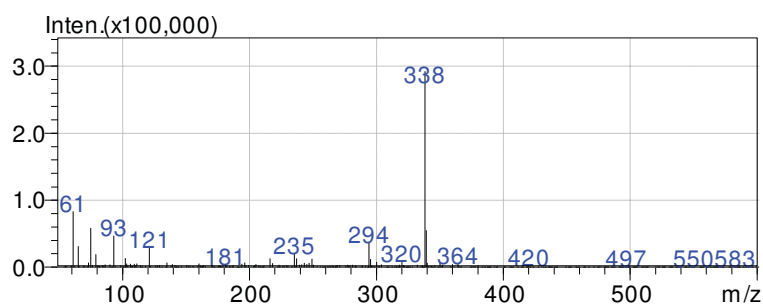


Figura 9.27. Espectro de massas de PD₈ isolado de orbifloxacino.

Duas estruturas foram propostas como sendo o PD₈ (Figuras 9.28a e 9.28b). A estrutura 9.28a, com fórmula molecular C₁₆H₁₇F₂N₃O₃ e massa média de 337,321, foi nomeada como sendo 7-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)-5,6-difluór-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico. A segunda estrutura proposta, b, com nome 7-[(2-aminopropil) amino]-1-ciclopropil-5,6-difluór-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico, apresenta a mesma fórmula e massa da estrutura “a”.

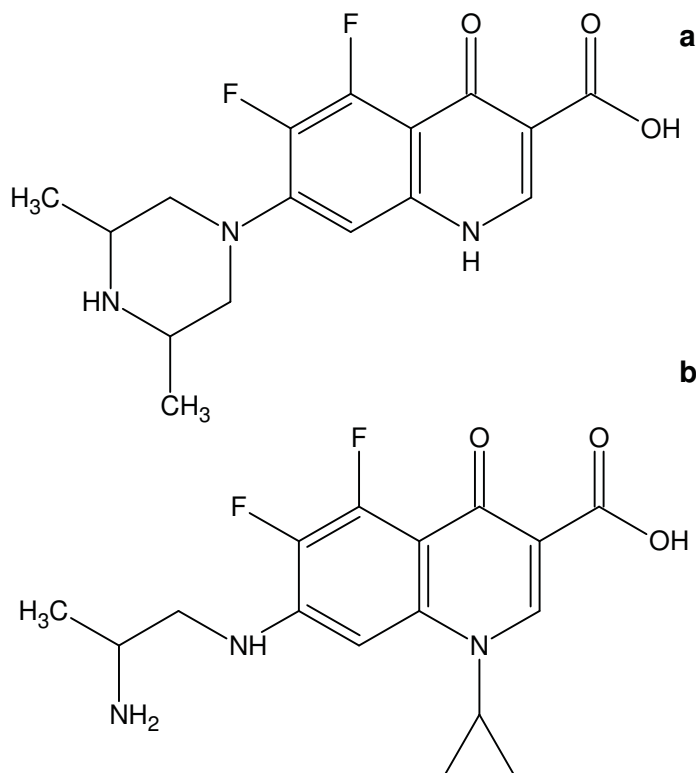


Figura 9.28. Estruturas químicas sugeridas para o PD₈ de orbifloxacino.

A formação do PD₈ também foi observada por Morimura e colaboradores (1997b). Similarmente ao nosso trabalho, estes autores encontraram este PD principalmente em solução neutra e ácida. Estudos por RMN deste produto demonstraram que o grupo ciclopropil e o flúor na posição 8 foram perdidos (Figura 9.28a). Entretanto, no mesmo trabalho, estes autores também identificaram outra molécula com razão massa/carga 338, contudo, pela análise por RMN foi confirmado que esta molécula apresenta o grupo ciclopropil intacto, porém o flúor da posição 8 foi substituído por hidrogênio e o grupamento piperazínico sofreu decomposição com abertura do anel (Figura 9.28b).

Segundo Morimura e colaboradores (1997b), sob irradiação, a solução de orbifloxacino parece sofrer dois tipos de reação, sendo estas dependentes do pH. Uma é a fotodecomposição do grupo dimetilpiperazínico na posição 7 com a clivagem da ligação C-F na posição 8 e outra é a eliminação do grupo ciclopropil da posição 1 com a clivagem da ligação C-F na posição 8. Estes autores sugerem que a eliminação do átomo de flúor da posição 8 ocorre nos primeiros estágios da reação fotoquímica de orbifloxacino.

O segundo produto de degradação gerado pela fotólise neutra apresentou m/z 394 (PD₉). Apesar deste produto apresentar a mesma razão massa/carga de PD₅ (Figura 9.16), ela possui tempo de retenção relativo diferente (Tabela 9.8).

O espectro de massas do PD₉ é apresentado na Figura 9.29.

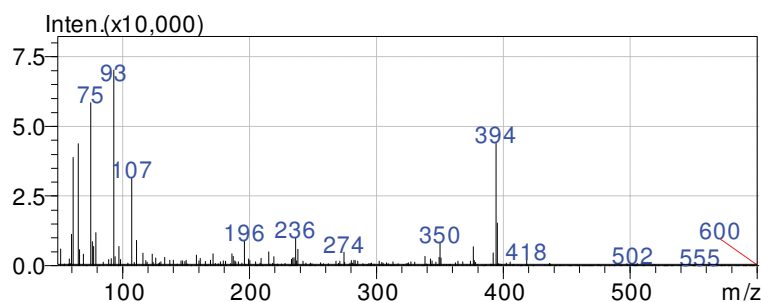


Figura 9.29. Espectro de massas de PD₉ isolado de orbifloxacino.

A Figura 9.30 representa a estrutura química sugerida para o PD₉. Indica-se que a reação acontecendo nesta situação seja a introdução de uma dupla ligação ao anel piperazínico na posição 7 da estrutura quinolônica.

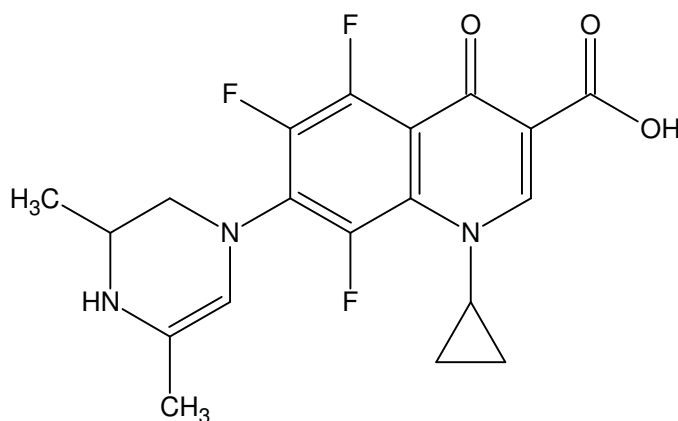


Figura 9.30. Estrutura química sugerida para o PD₉ de orbifloxacin.

A estrutura química do produto denominado PD₉, apresenta fórmula C₁₉H₁₈F₃N₃O₃ e massa média de 393,360 Da. O nome químico gerado foi ácido 1-ciclopropil-7-(3,5-dimetil-3,4-dihidropirazin-1(2*H*)-il)-5,6,8-trifluor-4-oxo-1,4-dihidroquinolona-3-carboxílico.

Segundo Albini e Monti (2003) a substituição do flúor por OH na posição 6 ocorre em soluções neutras irradiadas com luz UV. A substituição na posição 8 é menos provável pois, segundo estes autores não há formação de hidroxiquinolonas com halossustituídos em 8. Entretanto, o produto de degradação com massas com duas unidades menor que a estrutura intacta de orbifloxacin, sugere também a formação de ligação adicional (dupla). Esta última opção estrutural foi tomada como a ocorrendo neste caso, uma vez que, comparando o tempo de retenção e a estrutura química dos outros produtos formadas, o tempo de aproximadamente 13 minutos seria inadequado para a estrutura formada pela substituição de um átomo de flúor por uma hidroxila.

O produto de degradação PD₁₀ foi eluído com 15,7 minutos de tempo de retenção e apresentou *m/z* 412 (Figura 9.31). Este mesmo produto foi também encontrado durante o estudo de fotólise ácida de orbifloxacin.

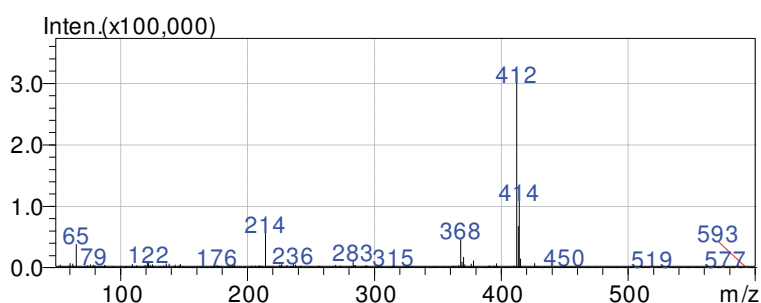


Figura 9.31. Espectro de massas de PD₁₀ isolado de orbifloxacin.

A estrutura química sugerida para o produto de degradação 10, gerado pela fotólise neutra, está apresentada na Figura 9.32. Esta estrutura pode ser explicada pela substituição do átomo de flúor, na posição 8, pelo átomo de cloro. De fato, no espectro de massas deste produto apresentado na Figura 9.31, pode-se observar o perfil isotópico característico de cloro.

Além desta constatação, Morimura e colaboradores (1997a) estudaram a fotoreação de orbifloxacin em solução aquosa na presença de íons cloreto e concluíram que o resultado desta reação sob luz UV-A foi a substituição do átomo de flúor na posição 8 da molécula deste fármaco por um átomo de cloro. Ainda, estudos anteriores realizados por este mesmo grupo de pesquisa indicam que orbifloxacin foi facilmente fotodecomposto em solução aquosa e a dissociação da ligação C-F na posição 8 foi uma importante reação de fotodegradação de orbifloxacin (MORIMURA et al., 1995a, 1997b).

A estrutura sugerida para o PD₁₀ apresenta fórmula C₁₉H₂₀ClF₂N₃O₃, massa média de 411,830 Da e foi nomeada como 8-cloro-1-ciclopropil-7-(3,5-dimetilpiperazin-1-il)-5,6-diflúor-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico.

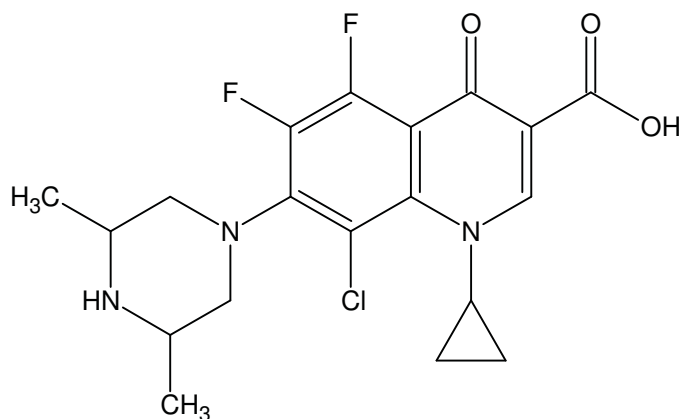


Figura 9.32. Estrutura química sugerida para o PD₁₀ de orbifloxacin.

O produto de degradação PD₁₁ demonstrou *m/z* 390 (Figura 9.33) e foi eluído com tempo de retenção de 32,7 minutos, sugerindo molécula menos polar.

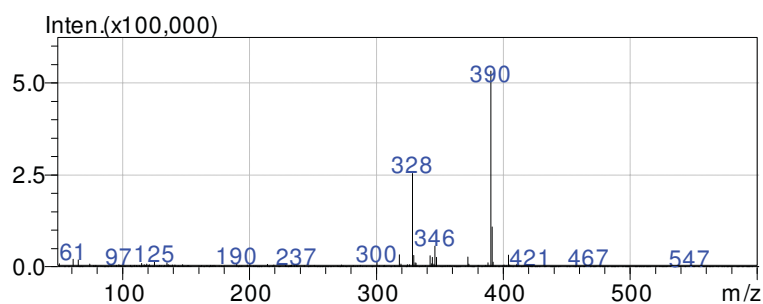


Figura 9.33. Espectro de massas de PD₁₁ isolado de orbifloxacin.

A estrutura sugerida para PD₁₁ é a apresentada na Figura 9.34.

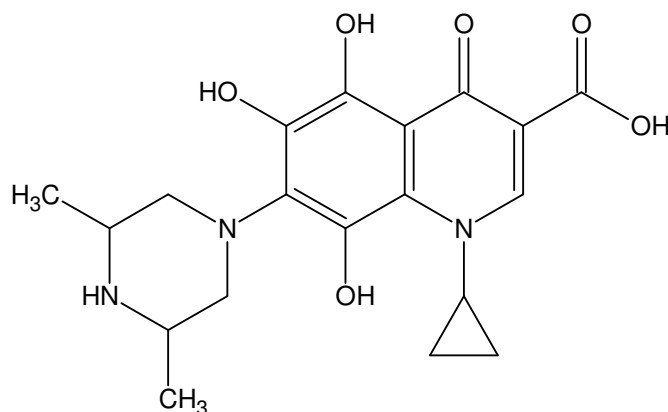


Figura 9.34. Estrutura química sugerida para o PD₁₁ de orbifloxacino.

A estrutura química sugerida para o PD₁₁ foi gerada pela substituição de todos os átomos de flúor, posições 5, 6 e 8 da molécula de orbifloxacino, por radicais hidroxila. E de fato, analisando o espectro de massas deste produto (Figura 9.33), se todos dos grupamentos OH e um grupo metila forem perdidos, molécula com massa média de 328 Da é encontrada.

9.3.3.6 Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise ácida

Na fotodegradação de orbifloxacino em condições ácidas o principal produto de degradação observado foi o PD₁₀ (Figura 9.32).

Da mesma forma que outras FQs, a máxima fotoestabilidade de orbifloxacino é encontrada em soluções com pH entre 3,0 e 4,0, onde o grupo carbonila não está ionizado e o nitrogênio básico está completamente protonado (TORNIAINEN *et al.*, 1996).

Os produtos de degradação PD₈ (m/z 338) e PD₆ (m/z 356) também foram observados nesta solução, embora com intensidade muito baixa.

Nas Figuras 9.35, 9.36 e 9.37 estão apresentados os cromatogramas e espectro de massas para a solução ácida fotodegradada de orbifloxacino.

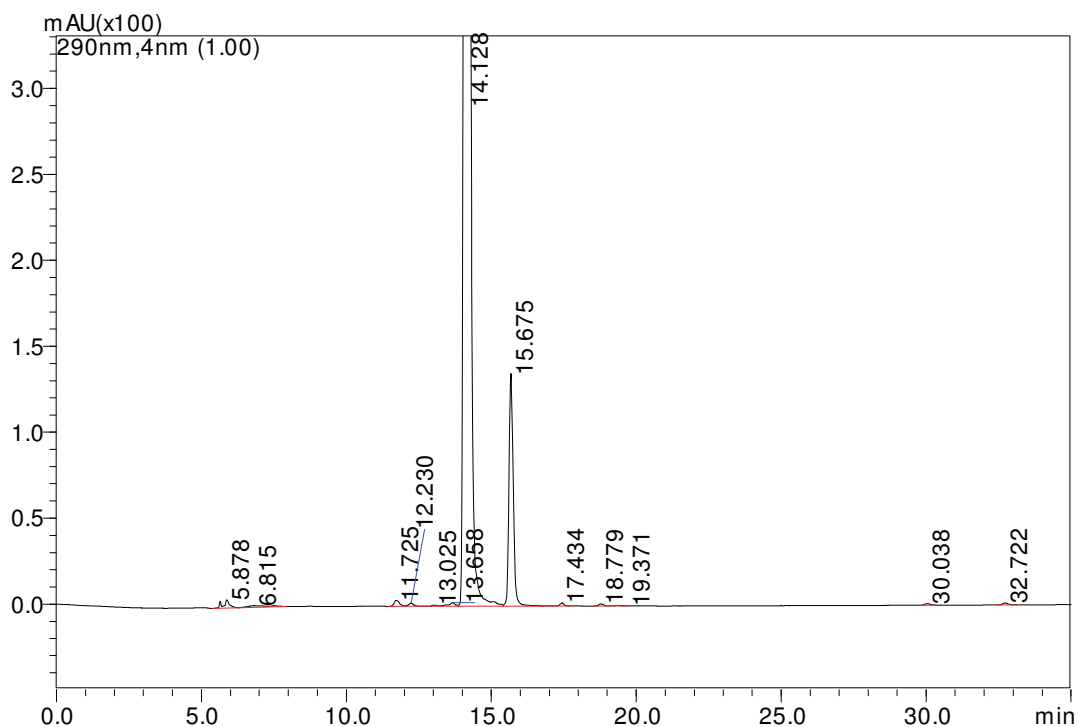


Figura 9.35. Cromatograma dos produtos de degradação gerados na fotólise ácida de orbifloxacin.

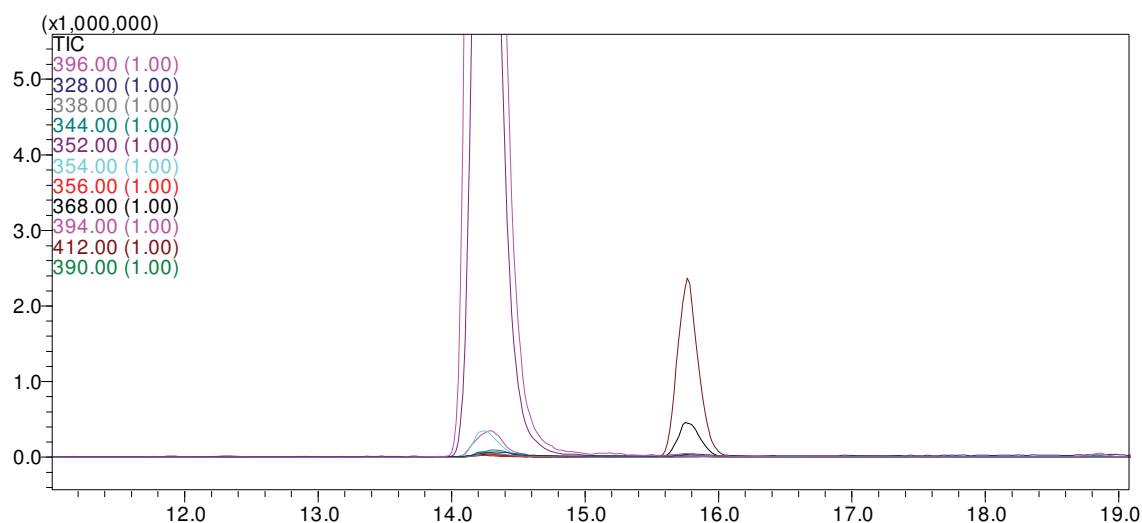


Figura 9.36. Cromatogramas de massas de PD₁₀ (modo SIM) gerados pela fotólise ácida de orbifloxacin.

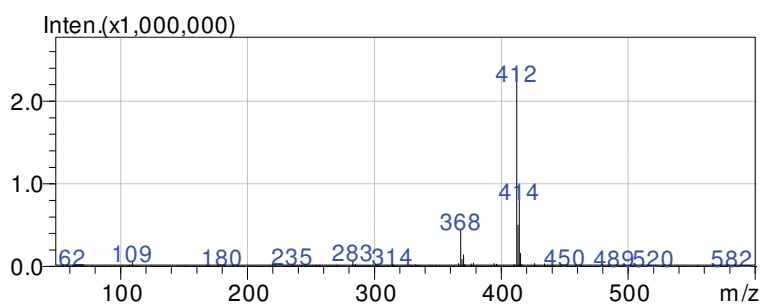


Figura 9.37. Espectro de massas de PD₁₀ isolado de orbifloxacin.

9.3.3.7 Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise básica

Pela exposição da molécula de orbifloxacino à luz UV/VIS em solução básica, um maior produto de degradação foi encontrado. Este PD apresentou tempo de retenção e massa similar ao PD₈ (m/z 338).

Nas Figuras 9.38, 9.39 e 9.40 estão apresentados os cromatogramas e espectro de massas para este produto de degradação.

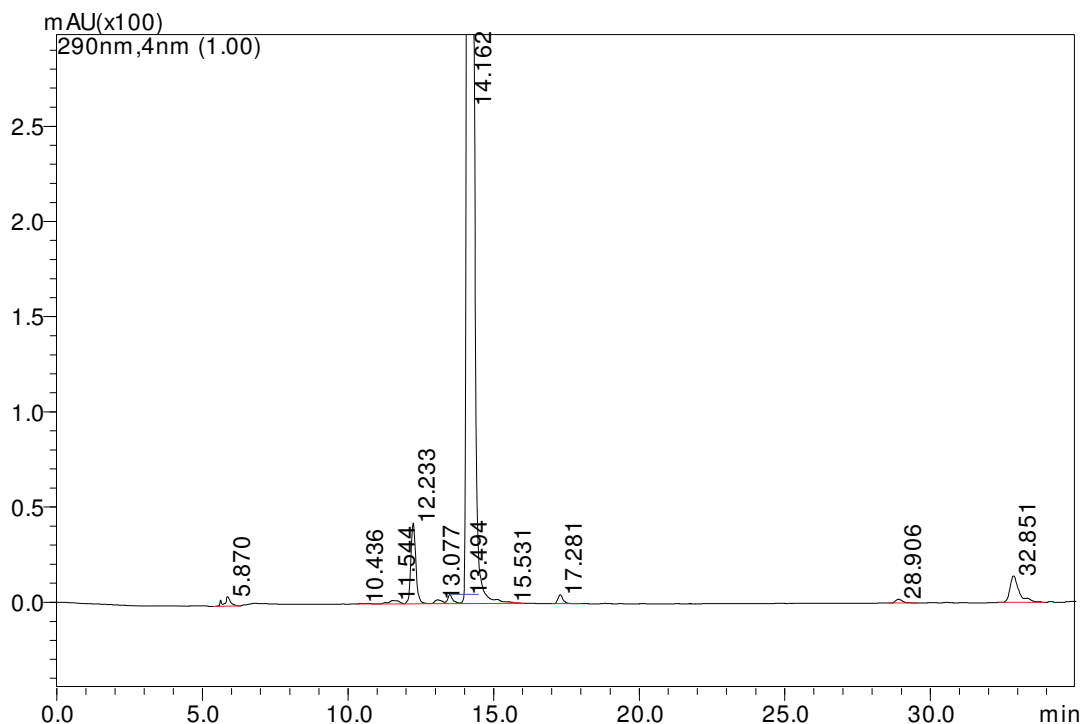


Figura 9.38. Produtos de degradação gerados na fotólise básica de orbifloxacino.

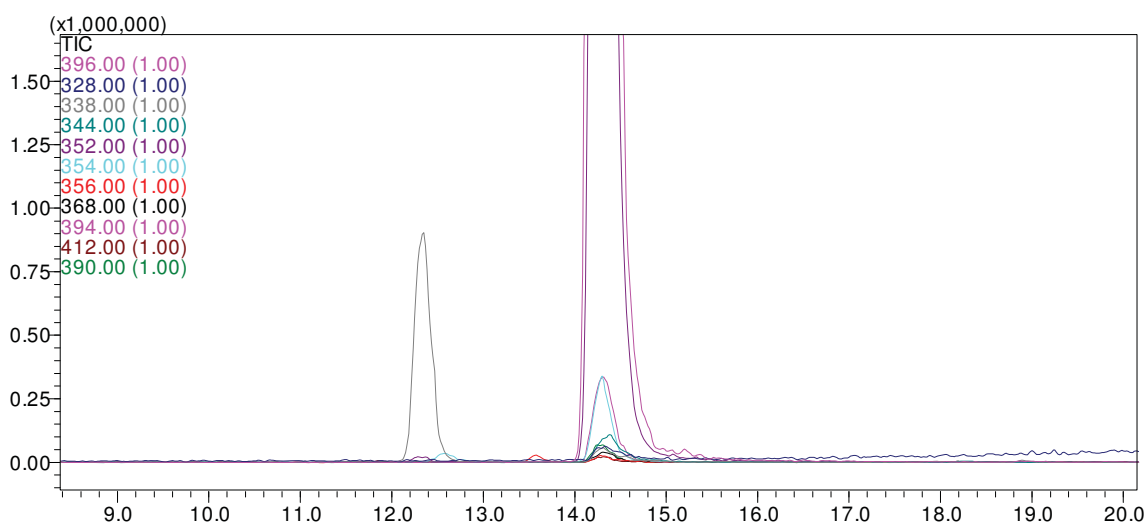


Figura 9.39. Cromatogramas de massas de PD₈ (modo SIM) gerados pela fotólise básica de orbifloxacino.

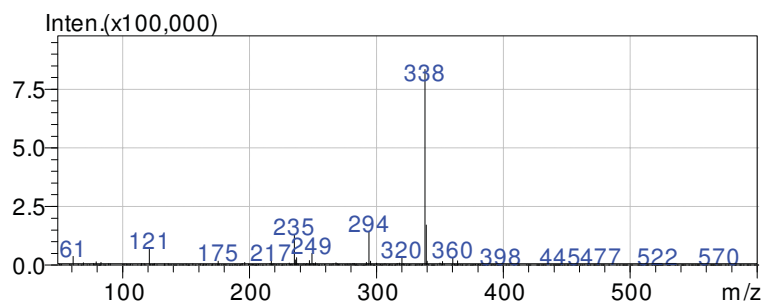


Figura 9.40. Espectro de massas de PD₈ isolado de orbifloxacin.

De forma diferente do trabalho apresentado por Morimura e colaboradores (1997b), o principal produto de degradação encontrado pela irradiação da solução básica de orbifloxacin foi o composto PD₈. Segundo o trabalho destes autores o principal produto encontrado foi o PD com m/z 336.

Este produto de degradação foi observado nas soluções básicas irradiadas, mas somente depois de 9 horas de degradação e apresentou sinal muito baixo, portanto, não foi considerado para análise.

9.3.3.8 Identificação dos produtos de degradação gerados no estudo acelerado de estabilidade

Como descrito anteriormente, o maior produto de degradação encontrado durante o estudo acelerado de estabilidade para orbifloxacin sob condições de temperatura de 40 °C e umidade relativa de 75%, pelo período de 6 meses, foi o PD₆ cuja estrutura química foi previamente sugerida (Figura 9.20).

Os cromatogramas característicos deste produto (PD₆), nestas condições de estudo de degradação, estão apresentados nas Figuras 9.41 e 9.42.

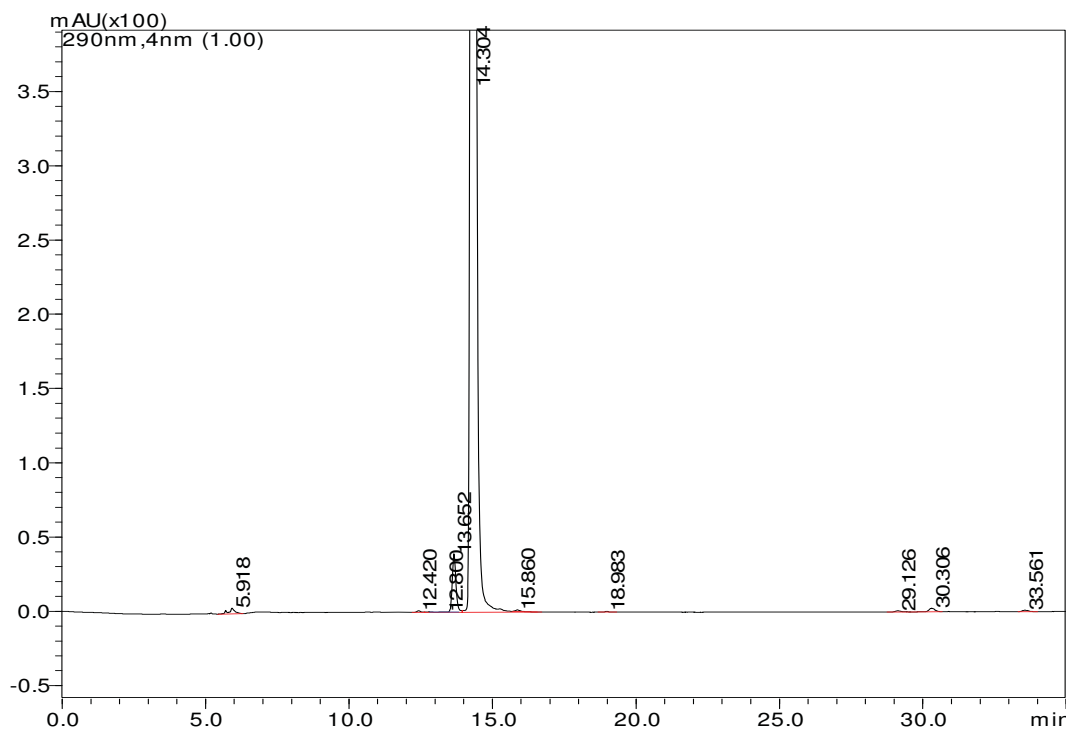


Figura 9.41. Produtos de degradação gerados durante estudo acelerado de estabilidade.

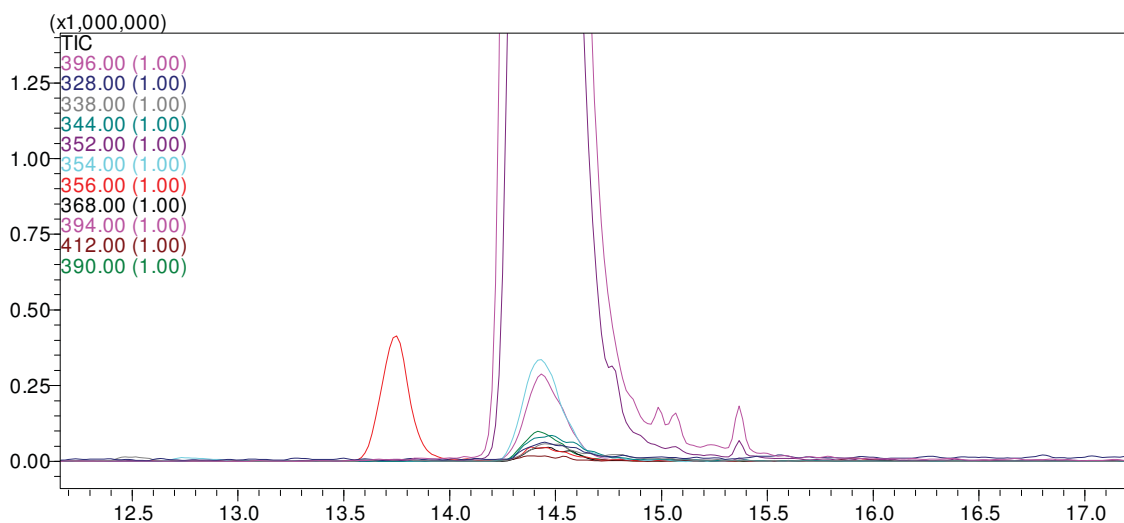


Figura 9.42. Cromatogramas de massas de PD₆ (modo SIM) gerados durante o estudo acelerado de estabilidade de orbifloxacin.

9.3.3.9 Identificação dos produtos de degradação gerados no estudo de longa duração de estabilidade

Novamente, no estudo de longa duração de estabilidade (30 °C/75% UR), em 6 meses, o principal produto de degradação encontrado foi o produto PD₆ (tempo de retenção 13,6 minutos), como pode ser verificado pelos cromatogramas das Figuras 9.43 e 9.44.

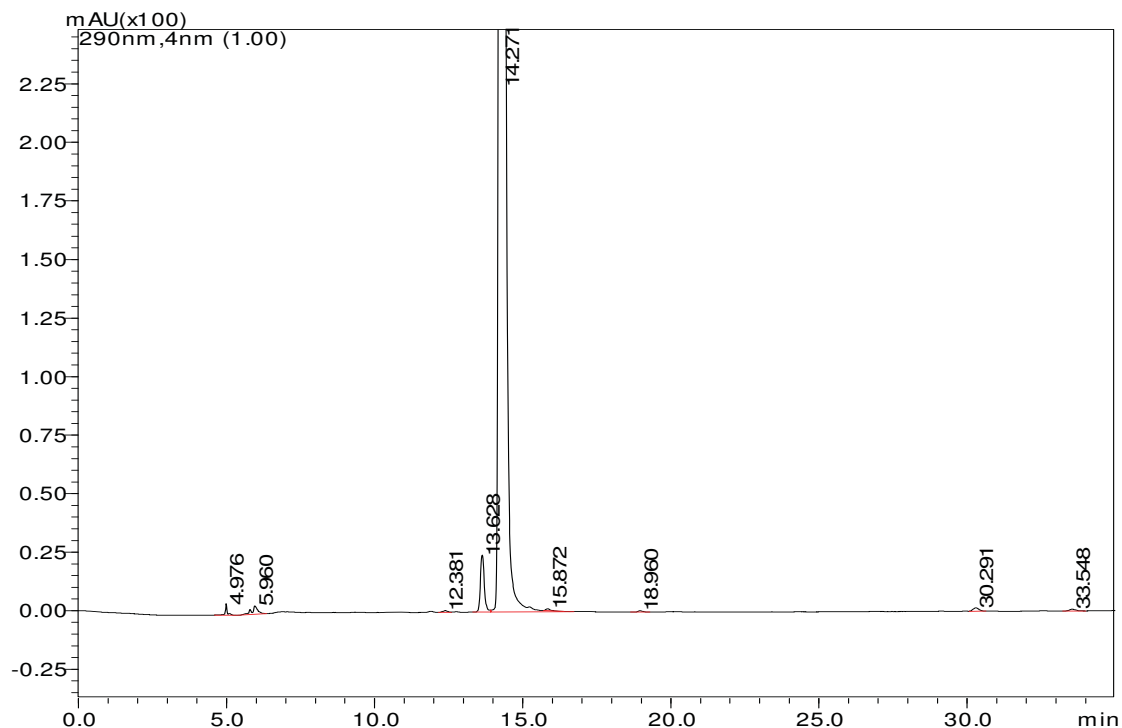


Figura 9.43. Produtos de degradação gerados durante estudo de longa duração de estabilidade.

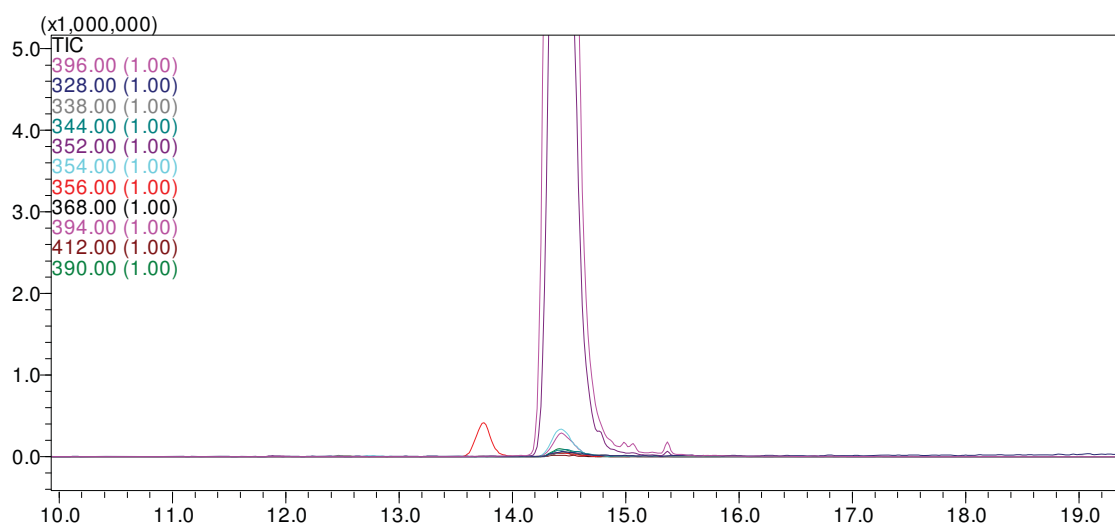


Figura 9.44. Cromatogramas de massas de PD₆ (modo SIM) gerados durante o estudo de longa duração de estabilidade de orbifloxacin.

9.3.3.10 Identificação dos produtos de degradação gerados pela degradação térmica

Quando a SQR na forma sólida foi exposta à temperatura de 60 °C por 15 dias, em forno, um produto de degradação foi identificado. Este produto apresentou tempo de retenção médio de 13,6 minutos. O mesmo PD foi anteriormente identificada na

hidrólise neutra, básica e estudos acelerados e de longa duração de estabilidade de orbifloxacino como sendo o PD₆ (m/z 356).

Há suspeitas de que a reação acontecendo neste caso também seja a hidrólise neutra da molécula de orbifloxacino, uma vez que a umidade no forno não foi controlada.

Nas Figuras 9.45 e 9.46 estão apresentados os cromatogramas típicos para este estudo.

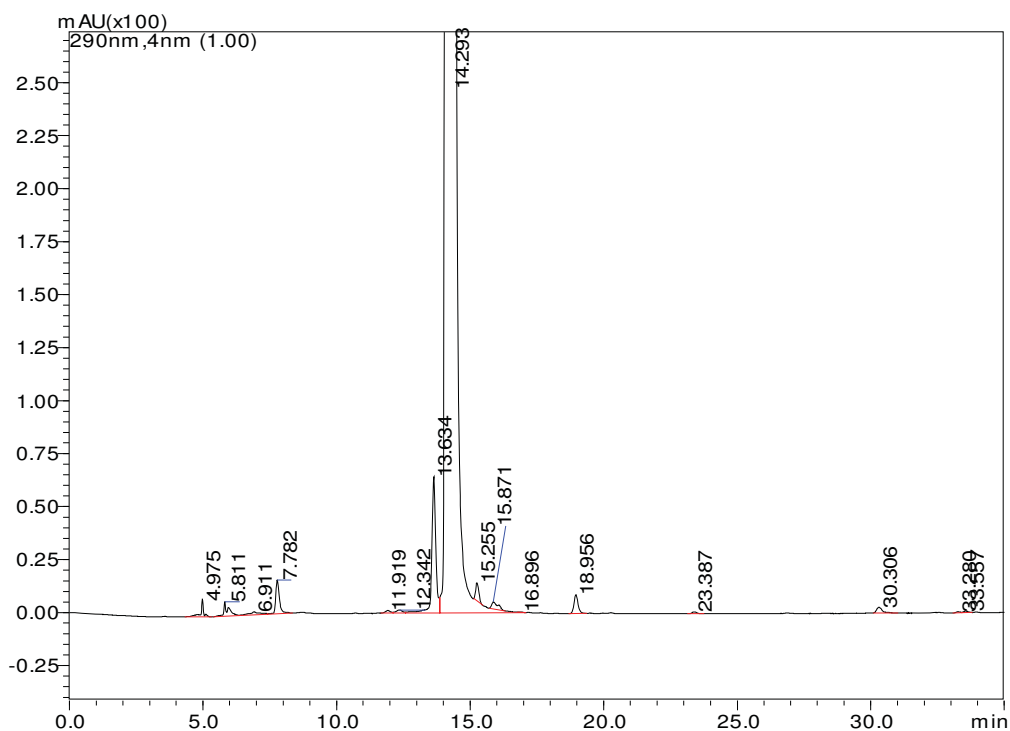


Figura 9.45. Produtos de degradação gerados durante estudo de degradação térmica de orbifloxacino SQR na forma sólida.

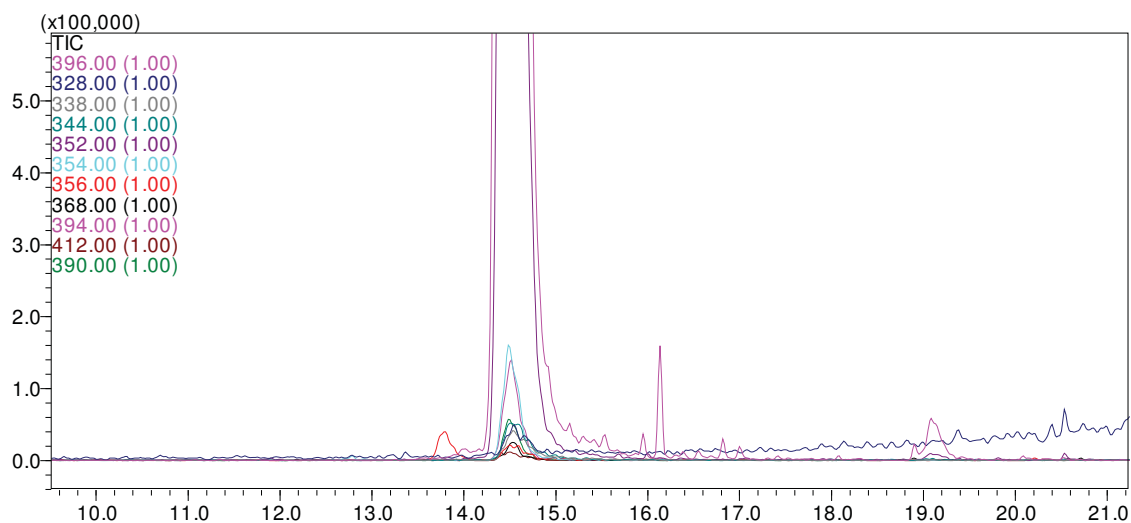


Figura 9.46. Cromatogramas de massas de PD₆ (modo SIM) gerados pelo estudo de degradação térmica de orbifloxacino SQR na forma sólida.

9.3.3.11 Identificação dos produtos de degradação gerados pela fotólise da SQR na forma sólida

Nenhum produto de degradação foi encontrado quando orbifloxacino SQR na forma sólida foi exposta à luz UV/VIS por 8 dias, como pode ser verificado nas Figuras 9.47 e 9.48.

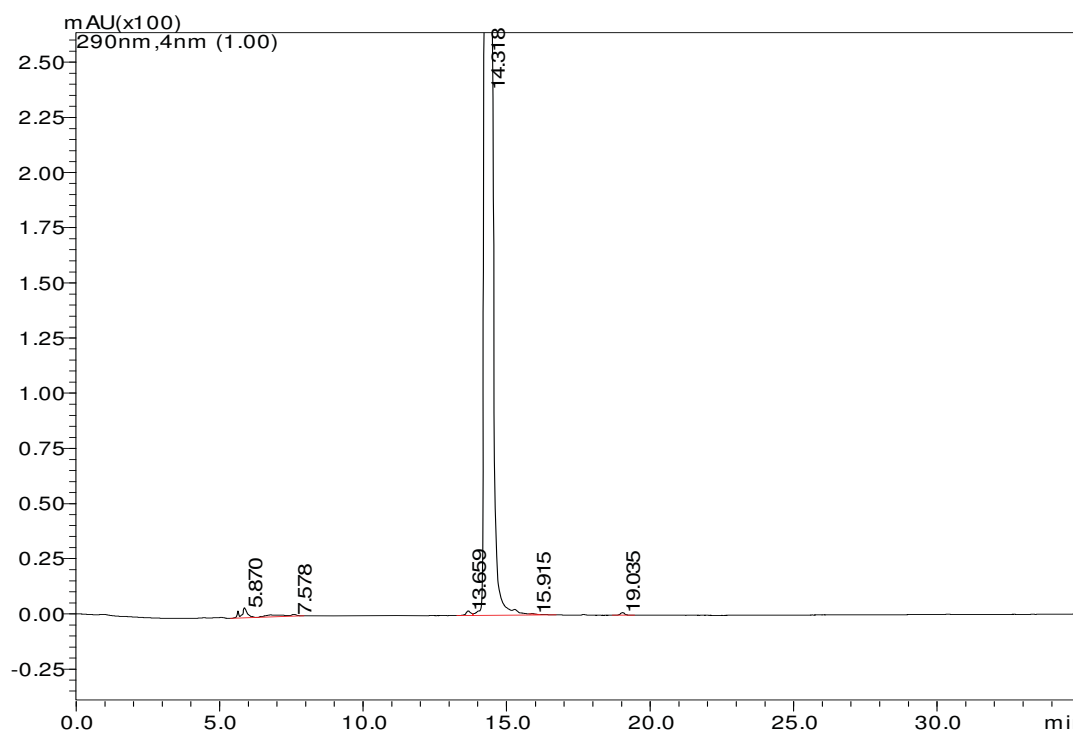


Figura 9.47. Cromatograma típico para orbifloxacino SQR na forma sólida irradiado por luz UV/VIS.

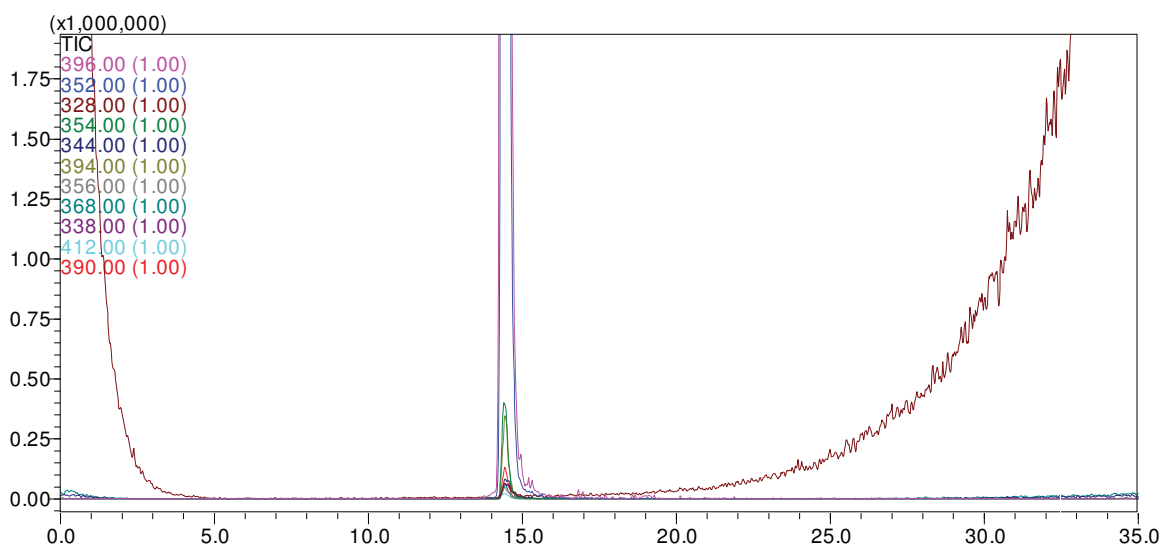


Figura 9.48. Cromatograma de massas típico (modo SIM) para orbifloxacino SQR na forma sólida irradiado por luz UV/VIS.

Na Figura 9.49 estão representadas as possíveis rotas de degradação de orbifloxacino sob as condições estudadas neste trabalho.

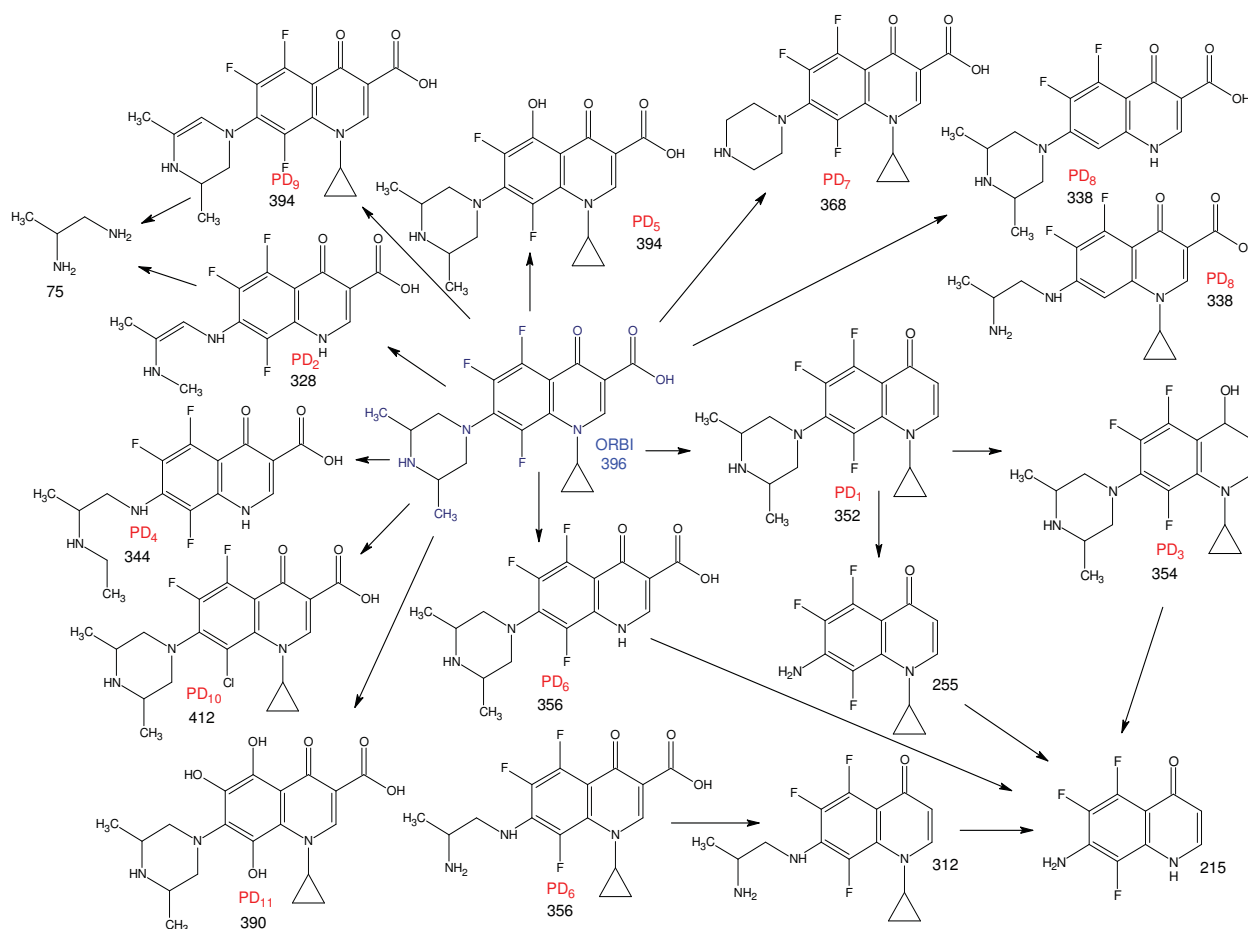


Figura 9.49. Rotas de fragmentação sugeridas para a molécula de orbifloxacino.

A caracterização estrutural[‡] dos PDs gerados pela degradação de orbifloxacino foi de interesse para o entendimento dos mecanismos de degradação e interpretação dos dados de estabilidade.

A maioria dos trabalhos existentes na literatura, relacionados à estabilidade das quinolonas, se refere a reações destas sob luz, quer seja ultravioleta ou visível.

A formação de oxigênio reativo (singleto, tripleto) dita a fotorreatividade das fluorquinolonas, sendo que a ocorrência de reações, após fotoexcitação, é devido a

[‡]Tentativa foi realizada no intuito de separar os produtos de degradação para posterior análise por outras técnicas de identificação. As alíquotas recolhidas 10 vezes por CLAE foram concentradas em Concentrador 5301 (EPENDORF), utilizando vácuo e rotação a 45 °C. As frações isoladas foram coletadas em CLAE analítico utilizando as condições mencionadas na seção 9.3.1. Foram efetuadas várias tentativas de analisar os produtos de degradação gerados utilizando RMN, entretanto, as quantidades coletadas não foram suficientes para detecção por esta técnica. Quantidades de 3 a 5 mg são necessários para tanto, e não dispúnhamos de equipamento e colunas para realizar a CLAE preparativa para obtermos tais quantidades, assim, os produtos de degradação não puderam ser adicionalmente caracterizados por esta e outras técnicas.

processos envolvendo os substituintes que atuam como sítios fotoquimicamente instáveis (por exemplo, a ligação carbono-flúor, o anel piperazínico, a ligação do grupo ciclopropila na posição 1 e a carboxila).

Para quinolonas contendo um átomo de flúor na posição 8, como é o caso de orbifloxacino, a desfluorinação tem demonstrado ser um significativo mecanismo de fotodegradação (CONDORELLI *et al.*, 1996; FASANI *et al.*, 1997; MARTÍNEZ *et al.*, 1997; MORIMURA *et al.*, 1997b; ENGLER *et al.*, 1998; FASANI *et al.*, 1998).

A abertura do anel piperazínico seguido pela clivagem foi observada para orbifloxacino.

Para a avaliação dos dados, os picos dos produtos de degradação de orbifloxacino foram analisados primeiramente pelo modo TIC (*Total Ion Chromatogram*), sendo todas as possíveis massas de produtos de degradação levadas em consideração e, em seguida, pela seleção dos fragmentos mais proeminentes. As estruturas sugeridas foram guiadas pela literatura disponível para outras quinolonas (ELROD *et al.*, 1990; FERGUSON e JOHNSON, 1990; NANGIA *et al.*, 1991; WAGAI e TAWARA, 1991; IWAMOTO *et al.*, 1992; MATSUMOTO *et al.*, 1992; WAGAI e TAWARA, 1992a, 1992b; HIDALGO *et al.*, 1993; MARUTANI *et al.*, 1993; YOSHIDA *et al.*, 1993; DOMAGALA, 1994; TIEFENBACHER *et al.*, 1994; VARGAS *et al.*, 1994; BALL e TILLOTSON, 1995; DEMACHI *et al.*, 1995; FERGUSON, 1995; LIETMAN, 1995; MORIMURA *et al.*, 1995a, 1995b; SANCHEZ *et al.*, 1995; TORNIAINEN e MAKI, 1995; BILSKI *et al.*, 1996; CONDORELLI *et al.*, 1996; TORNIAINEN *et al.*, 1996; YOSHIDA *et al.*, 1996; BURHENNE *et al.*, 1997a, 1997b; FASANI *et al.*, 1997; MARTÍNEZ *et al.*, 1997; MORIMURA *et al.*, 1997a, 1997b; ROSEN *et al.*, 1997a, 1997b; TORNIAINEN *et al.*, 1997a, 1997b; VOLMER *et al.*, 1997; UMEZAWA *et al.*, 1997; ARAKI e KITAOKA, 1998; ENGLER *et al.*, 1998; FASANI *et al.*, 1998; MARTÍNEZ *et al.*, 1998; MARUTANI *et al.*, 1998; SORTINO *et al.*, 1998; BURHENNE *et al.*, 1999; CONDORELLI *et al.*, 1999; FASANI *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c; VOUSDEN *et al.*, 1999; FASANI *et al.*, 2001; MELLA *et al.*, 2001; MONTI *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2001; ARAKI *et al.*, 2002; ALBINI e MONTI, 2003; FASANI *et al.*, 2004; HAYASHI *et al.*, 2004; ESPINOSA-MANSILLA *et al.*, 2005; ZOLTAN *et al.*, 2007; BUDAI *et al.*, 2008; LORENZO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Várias amostras-controle foram preparadas para comparação com as amostras estressadas. Primeiramente, as soluções das amostras estocadas sob condições normais foram analisadas ($t = 0$ h). Os cromatogramas das soluções do branco, consistindo dos agentes estressantes sem o fármaco, foram inspecionados com o

intuito de marcar os picos correspondentes aos agentes de estresse e para distingui-los dos potenciais produtos de degradação.

Extensiva degradação de orbifloxacino foi verificada em meio básico sob aquecimento, seguida pela hidrólise ácida e, em menor extensão, pela hidrólise neutra. Quando solução contendo orbifloxacino foi exposta à luz UV/VIS, a maior degradação foi percebida em solução neutra, seguida pela degradação em solução alcalina e obtendo-se a menor taxa de degradação fotolítica sob a condição ácida (Tabela 9.6).

A degradação oxidativa foi realizada utilizando-se peróxido de hidrogênio 3% por um período de 24 h. Nestas condições dois produtos de degradação majoritários foram identificados.

Orbifloxacino ainda apresentou degradação nos estudos acelerado e de longa duração de estabilidade. Este fármaco foi estável nas condições de fotólise e degradação térmica de orbifloxacino SQR na forma sólida, embora durante o estudo de degradação térmica um produto de degradação tenha sido identificado.

Nos últimos anos têm se tornado importante identificar as impurezas e produtos de degradação de fármacos e medicamentos do ponto de vista da predição de sua toxicidade. Somente Morimura e colaboradores, em 1995 e 1997, pesquisaram a degradação de orbifloxacino, entretanto, apenas sob condições fotolíticas. Assim, a maioria dos produtos de degradação deste fármaco ainda não era descrita.

O método por cromatografia líquida compatível com a espectrometria de massas foi desenvolvido e validado para identificar os produtos de degradação de orbifloxacino. As estruturas dos mais abundantes produtos de degradação foram sugeridas.

A elucidação das estruturas dos produtos de degradação pode ser útil no desenvolvimento de formulações para cumprir os requerimentos regulatórios dos limites de impurezas.

10 DISCUSSÃO GERAL

A qualidade dos produtos farmacêuticos tem sido uma preocupação no mundo inteiro. Sem a segurança de que os fármacos e medicamentos disponíveis apresentam padrões de qualidade, segurança e eficácia aceitáveis, qualquer serviço de saúde fica comprometido. Neste contexto, insere-se a necessidade de desenvolvimento e validação de métodos analíticos capazes de garantir a confiabilidade na qualidade de tais produtos.

Neste trabalho, o orbifloxacino foi o fármaco escolhido para os estudos químico-farmacêutico, de dissolução e de estabilidade. Objetivou-se realizar o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos com características de qualidade e custo diferentes para os laboratórios e indústrias farmacêuticas.

Os métodos para análise qualitativa de orbifloxacino propostos neste trabalho são métodos relativamente simples. Métodos gerais aplicados a medicamentos, tais como características organolépticas, peso médio, desintegração, resistência mecânica - dureza e friabilidade, faixa de fusão, determinação da umidade, análise térmica e cromatografia em camada delgada, foram utilizados para a caracterização da SQR e dos comprimidos de orbifloxacino. Para todos estes testes os resultados encontrados estão de acordo com o especificado pelo fabricante, literatura e/ou Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010).

As espectrofotometrias nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho permitiram detectar características de absorção específicas de orbifloxacino. Da mesma forma, os métodos por CCD, CLAE e análise térmica foram úteis na identificação deste fármaco na forma farmacêutica quando comparado com um padrão analítico.

Os métodos espectrofotométricos são largamente utilizados nas análises quantitativas de fármacos por apresentarem bom nível de exatidão e precisão. Muitos autores admitem que estes métodos, quando bem conduzidos, apresentam valores de exatidão e precisão compatíveis com os níveis de exigência adotados nos códigos oficiais. Em relação à sensibilidade, pode ser feita certa restrição devido à imensa diversificação das estruturas químicas encontradas entre os fármacos. Entretanto, o uso de equipamentos relativamente simples e a utilização de solventes mais acessíveis para a determinação das análises espectrofotométricas, junto à facilidade de execução, constituem vantagens complementares que justificam o largo emprego destas técnicas no controle de qualidade. O método por espectrofotometria na região do UV desenvolvido neste trabalho mostrou-se adequado para a quantificação de orbifloxacino em comprimidos.

Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma das mais importantes técnicas de separação, bem como uma das técnicas analíticas mais

utilizadas para fins qualitativos e quantitativos. Com a evolução dos detectores, o uso desta técnica, passou a ser ainda mais requisitada. Grande importância tem sido dada ao desenvolvimento de métodos cromatográficos que possam ser indicativos da estabilidade dos fármacos e medicamentos. O método por CLAE desenvolvido e validado neste trabalho pôde, de forma eficiente, separar os produtos de degradação do componente principal e, pelo uso do detector com arranjo de fotodiodos (PDA), foi possível determinar a pureza dos picos referentes ao orbifloxacino.

A análise quantitativa por CLAE demonstrou seletividade, linearidade, sensibilidade, robustez, precisão e exatidão para a determinação de orbifloxacino em comprimidos. Este método ainda mostrou ser indicativo de estabilidade, separando completamente o pico do fármaco dos produtos de degradação gerados nos estudos de degradação forçada.

Os ensaios microbiológicos, difusão em ágar e turbidimétrico, são métodos que não se restringem à quantificação de fármacos, mas que podem também ser empregados na observação de mudanças nas características de potência de orbifloxacino frente ao micro-organismo teste, como foi verificado nos estudos de estabilidade de orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido, neste trabalho.

O método turbidimétrico avalia a inibição do crescimento microbiano pela turbidez (absorvância) da suspensão dos micro-organismos, enquanto o método de difusão em ágar, relaciona o tamanho da zona de inibição com a dose da substância ensaiada. Em ambos os casos a resposta do micro-organismo é diretamente proporcional à concentração do ingrediente ativo. O método turbidimétrico apresenta algumas vantagens sobre o método de difusão em ágar, como por exemplo, menor tempo de execução, maior sensibilidade a baixas doses e manipulação mais fácil, além disto, a resposta obtida com este ensaio independe da difusão da substância ativa. Entretanto, o método de difusão também apresenta vantagens, como a conveniência nos testes de rotina de amostras de diversas fontes, insensibilidade aos solventes ou contaminantes orgânicos em amostras e facilidade de precisão e replicação.

Os métodos microbiológicos são os únicos capazes de determinar a potência de agentes antimicrobianos e, embora consumam maior tempo de análise, esta desvantagem foi praticamente eliminada com a validação do ensaio turbidimétrico.

Os ensaios microbiológicos, difusão em ágar e turbidimétrico desenvolvidos e validados, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1606 para orbifloxacino em comprimidos, mostraram-se lineares, precisos, exatos e específicos.

Com relação à exatidão dos quatro métodos propostos, os resultados foram satisfatórios, uma vez que o atributo correspondeu em todos os procedimentos. Os valores encontrados para a precisão dos métodos foram considerados adequados, pois todos apresentaram desvio padrão relativo menor que 5% para os métodos físico-químicos e menor que 15% para os bioensaios (BRASIL, 2003a). Com os dados das curvas analíticas, foi possível observar que todos os métodos apresentam coeficiente de correlação (r) maior que 0,99, significando assim, que os métodos podem ser considerados lineares. Em relação à seletividade, comprovou-se, em todos os métodos, que a resposta da substância ativa não foi alterada em nenhum momento pelos excipientes presentes na forma farmacêutica. No atributo da robustez, pôde-se verificar que, independente do método, não ocorreram grandes variações quando se alterou algum parâmetro analítico, exceto para o tempo de incubação do método turbidimétrico.

Desta maneira, nas condições do presente trabalho, pode-se inferir que os métodos microbiológicos, espectrofotométrico e cromatográfico para a quantificação de orbifloxacino em comprimidos forneceram resultados satisfatórios para todos os atributos da validação.

Os métodos propostos neste trabalho foram analisados comparativamente por análises estatísticas e foi encontrado que existe diferença estatisticamente significativa entre os mesmos para um nível de significância de 5%. Realizando-se o teste de Tukey para comparação das médias, obteve-se que somente os métodos microbiológicos, difusão em ágar e turbidimétrico, são diferentes a um nível de confiança também de 5%.

Outra etapa deste trabalho envolveu o estudo de dissolução de comprimidos de orbifloxacino. Os testes de dissolução têm se tornado parte importante no controle de qualidade de comprimidos e outras formas sólidas.

A condição que permitiu um perfil de dissolução satisfatório para os comprimidos de orbifloxacino foi obtida com o uso do aparato 2 (pás), velocidade de 50 rpm e 900 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. A quantificação das amostras obtidas no ensaio de dissolução foi feita utilizando os métodos por CLAE e espectrofotometria no UV previamente desenvolvidos e validados. Em função dos resultados obtidos sugere-se especificação de 85% de dissolução em até 30 minutos para os comprimidos de orbifloxacino.

A eficiência de dissolução ($ED\%$), realizada pelo estudo de dissolução das amostras degradadas nas condições de estudo acelerado e de longa duração de estabilidade, apresentou-se estatisticamente insignificante, apesar da diminuição do

teor do fármaco nos comprimidos ser verificada devido à degradação de orbifloxacino pela umidade e temperatura.

O estudo de estabilidade de orbifloxacino foi parte do objetivo deste trabalho. Foram realizados estudos de degradação forçada (testes de estresse), avaliando-se a suscetibilidade de orbifloxacino à hidrólise ácida, básica e neutra, à oxidação e fotólise em soluções aquosas ácida, básica e neutra, além da fotólise e degradação térmica da SQR na forma sólida. Estudos nas condições acelerada e de longa duração de estabilidade dos comprimidos triturados e íntegros de orbifloxacino também foram realizados.

O estudo de degradação forçada em meio ácido (HCl 0,1 M), básico (NaOH 0,1 M) e neutro degradou a molécula de orbifloxacino em 12,85; 33,67 e 7,58%, respectivamente, após 8 dias à temperatura de 80 °C.

O estudo de degradação forçada em meio oxidativo indicou que o fármaco sofre 16,74% de degradação, após 24 horas em contato com peróxido de hidrogênio 3%.

Na degradação forçada das soluções aquosas ácida, básica e neutra de orbifloxacino contra luz UV/VIS ficou evidenciado que o orbifloxacino é sensível à radiação nestas condições sendo a degradação do fármaco de 17,62; 16,47 e 14,73%, em 12, 5 e 1 hora, respectivamente.

Os estudos acelerado (40 °C/75% UR) e de longa duração (30 °C/75% UR) de estabilidade em câmara climática, por 6 meses, demonstraram que os comprimidos de orbifloxacino são sensíveis a temperatura e a umidade.

A SQR na forma sólida submetida à fotólise e degradação térmica foi praticamente estável, com taxa de degradação menor que 2% para ambos os casos.

A identificação dos produtos de degradação majoritários foi alcançada utilizando-se o método por LC-MS desenvolvido e validado neste trabalho. Este método demonstrou bons resultados, permitindo a determinação adequada dos principais produtos de degradação (PD₁ a PD₁₁).

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de análises qualitativas e quantitativas, bem como estudos de dissolução e de estabilidade para orbifloxacino SQR e comprimidos e espera contribuir com a comunidade científica através da publicação dos resultados obtidos na forma de artigos.

11 CONCLUSÃO

-
- A caracterização da SQR e dos comprimidos de orbifloxacino realizada pelo peso médio, tempo de desintegração, resistência mecânica (dureza e friabilidade) e umidade está de acordo com o especificado pelo fabricante, literatura e/ou Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010);
 - A determinação da faixa de fusão permitiu caracterizar orbifloxacino SQR;
 - Os métodos por CCD, espectrofotometria nas regiões do UV, VIS e IV, CLAE e análise térmica mostraram-se adequados para a identificação do fármaco na forma farmacêutica estudada;
 - A determinação de orbifloxacino em comprimidos pela espectrofotometria na região do UV a 290 nm, utilizando ácido clorídrico 0,5 M como solvente, atendeu a todos os parâmetros de validação;
 - A análise quantitativa pelo método indicativo de estabilidade por CLAE demonstrou alta seletividade, linearidade, sensibilidade, robustez, precisão e exatidão para a determinação de orbifloxacino em comprimidos, permitindo a separação do pico principal dos produtos de degradação formados;
 - Os métodos microbiológicos, tanto o ensaio por difusão em ágar quanto o teste turbidimétrico, foram desenvolvidos e validados utilizando o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1606 para a determinação de orbifloxacino em comprimidos. Ambos os métodos atenderam aos parâmetros de validação;
 - A comparação dos quatro métodos propostos para a determinação quantitativa de orbifloxacino na forma farmacêutica comprimido, utilizando os valores de doseamento, apresentou diferença estatisticamente significativa no nível de significância de 5% para os métodos microbiológicos, difusão em ágar e turbidimétrico;
 - O teste de dissolução utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e aparato 2 (pás) à 50 rpm, para comprimidos de orbifloxacino, forneceu resultados adequados e permitiram a obtenção dos perfis de dissolução. A avaliação da velocidade de liberação de orbifloxacino dos comprimidos pelo ensaio de dissolução demonstrou que estes apresentam cinética de primeira ordem;
 - A comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos degradados nos estudos acelerado e de longa duração de estabilidade, através da eficiência de dissolução percentual (*ED%*), demonstrou que não houve diferença entre os perfis de liberação dos comprimidos degradados nos tempos 0, 3 e 6 meses, apesar da verificação da diminuição do teor dos mesmos com o tempo;

-
- Estudo de estabilidade foi realizado para orbifloxacino, avaliando a suscetibilidade dessa molécula à hidrólise ácida, básica e neutra, degradação oxidativa, fotólise ácida, básica e neutra e degradação térmica e fotolítica da SQR na forma sólida, além dos estudos acelerado e de longa duração de estabilidade dos comprimidos triturados e íntegros deste fármaco. O orbifloxacino sofreu degradação em todas as condições testadas, exceto para a SQR na forma sólida;
 - O método por LC-MS foi desenvolvido e validado e permitiu a observação de pelo menos 11 produtos de degradação de orbifloxacino.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-ATY, A.M.; CHOI, J.-H.; KO, M.-W.; KHAY, S.; GOUDAH, A.; SHIN, H.-C.; KIM, J.-S.; CHANG, B.-J.; LEE, C.-H.; SHIM, J.-H. Approaches for application of sub and supercritical fluid extraction for quantification of orbifloxacin from plasma and milk: Application to disposition kinetics. **Anal. Chim. Acta**, v.631, p.108–115, 2009.

ABO-EL-SOUD, K.; GOUDAH, A. Influence of *Pasteurella multocida* infection on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in rabbits. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.33, p.63–68, 2009.

AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, p.3–11, 2007.

AHUJA, S.; ALSANTE, K. **Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals**. San Diego: Academic Press, 2003. p.1–25.

AITKEN, R.A. Carbenes and nitrenes. In: KNIPE, A.C.; WATTS, W.E. **Organic Reaction Mechanisms**. London: J. Wiley and Sons, 1993. p.207–227.

ALBARELLOS, G.A.; LANDONI, M.F. Current concepts on the use of antimicrobials in cats. **Vet. J.**, v.180, p.304–316, 2009.

ALBINI, A.; MONTI, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. **Chem. Soc. Rev.**, v.32, p.238–250, 2003.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, p.29–37, 2007.

ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; LOHR, L.L.; SHARP, T.R. Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. Part 1. **Am. Pharm. Rev.**, v.4, p.70–78, 2001.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.**, v.12, n.3, p.413–420, 1995.

ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M.; DIAZ, M.; MARTINEZ, M.; FREJO, M.; MARTINEZ, M.; TAFUR, M.; CASTELLANO, V. Pharmacokinetic characteristics and tissue residues for marbofloxacin and its metabolite N-desmethyl-marbofloxacin in broiler chickens. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, p.927–933, 2002.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L.V. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

AOAC Int., v.90, p.452-455, 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1, p.xx.

ARAKI, T.; KAWAI, Y.; OHTA, I.; KITAOKA, H. Photochemical behavior of sitafloxacin, fluoroquinolone antibiotic, in an aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v.50, n.2, p.229–234, 2002.

ARAKI, T.; KITAOKA, H. ESR Detection of free radical and active oxygen species generated during photolysis of fluoroquinolones. **Chem. Pharm. Bull.**, v.46, n.6, p.1021–1026, 1998.

ARATA, J.; HORIO, T.; SOEJIMA, R.; OHARA, K. Photosensitivity reactions caused by lomefloxacin hydrochloride: a multicenter survey. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.3141–3145, 1998.

ARGENTINE, M.D.; OWENS, P.K.; OLSEN, B.A. Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, p.12–28, 2007.

AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABRECQUE, O.; MESSIER, S. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **Can. Vet. J.**, v.47, p.774–778, 2006.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.28, p.1011–1040, 2002.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.46, (Suppl T1), p.17–24, 2000.

BALL, P.; TILLOTSON, G.S. Tolerability of fluoroquinolone antibiotics: past present and future. **Drug Saf.**, v.13, p.343–358, 1995.

BARI, S.B.; KADAM, B.R.; JAISWAL, Y.S.; SHIRKHEDKAR, A.A. Impurity profile: significance in active pharmaceutical ingredient. **Eurasian J. Anal. Chem.**, v.2, n.1, p.32–53, 2007.

BAVEJA, S.K.; RANGA, K.V.; BURI, P.K. Zero order release hydrophilic matrix tablets of β -adrenergic blockers. **Int. J. Pharm.**, v.39, p.39–45, 1987.

BERG, J.N.; WENDELL, D.E.; VOGELWEID, C.; FALES, W.H. Identification of the major coagulasepositive *Staphylococcus* sp. of dogs as *Staphylococcus intermedius*. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.1307–1309, 1984.

BERGOGNE–BEREZIN, E. Clinical role of protein binding of quinolones. **Clin. Pharmacokinet.**, v.41, p.741–750, 2002.

BILSKI, P.; MARTÍNEZ, L.J.; KOKER, E.B.; CHIGNELL, F. Photosensitization by norfloxacin is a function of pH. **Photochem. Photobiol.**, v.64, p.496–500, 1996.

BLONDEAU, J.M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. **Clin. Ther.**, v.21, p.3–40. 1999.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v.42, p.1-14, 2012.

BONILLA, F.L.G. **Validação de metodologia para análise de moxifloxacino em comprimidos**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

BOOTHE, D.M; BOECKH, A.; SIMPSON, R.B.; DUBOSE, K. Comparison of pharmacodynamic and pharmacokinetic indices of efficacy for 5 fluoroquinolones toward pathogens of dogs and cats. **J. Vet. Intern. Med.**, v.20, p.1297–1306, 2006.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 901, de 29 de maio de 2003c. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/recomenda_dissolucao2.pdf. Acesso em: 26 Jun 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 899, de 29 de maio de 2003a. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 26 Jun 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 de julho de 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf. Acesso em: 26 Jun 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**. Brasília, 03 de setembro de 2004. Disponível em: <http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informacoesdosetor/RE/Registro/2004/RE%20setembro%20310-04%20SIMILAR.pdf>. Acesso em: 26 Jun 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 897, de 29 de maio de 2003b. Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/897_03re.htm. Acesso em: 26 Jun 2012.

BRETNALL, E.; CLARKE, G.S. **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Separation Science and Technology Analysis**, Elsevier, v.10, p.429–457, 2011.

BRION, J.D.; LOPPINET, V.; PLAT, M. Quinolones. In: Association Française des enseignants de chimie thérapeutique. Triaité de chimie thérapeutique. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1992. v.2: Médicaments antibiotiques.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, v.1, 2011a.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, v.1, 2011b. p.88–90.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAH, P.A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharm. Technol.**, p.56–65, 2004.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Microchim. Acta**, v.128, p.93–106, 1998.

BRUNNER, E. Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. **Z. Phys. Chem.**, v.43, p.56–102, 1904.

BUDAI, M.; GROF, P.; ZIMMER, A.; PAPAI, K.; KLEBOVICH, I.; LUDANYI, K. UV light induced photodegradation of liposome encapsulated fluoroquinolones: An MS study. **J. Photochem. Photobiol. A Chem.**, v.198, p.268–273, 2008.

BURHENNE, J.; LUDWIG, M.; NIKOTOUDIS, M.; SPITELLER, M. Photolytic degradation of fluoroquinolone carboxylic acids in aqueous solution – Primary photoproducts and half-lives. **Environ. Sci. & Pollut. Res.**, v.4, p.10–15, 1997a.

BURHENNE, J.; LUDWIG, M.; SPITELLER, M. Photolytic degradation of fluoroquinolone carboxylic acids in aqueous solution – Isolation and structural elucidation of polar photometabolites. **Environ. Sci. & Pollut. Res.**, v.4, p.61–67, 1997b.

BURHENNE, J.; LUDWIG, M.; SPITELLER, M. Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS. **Chemosphere**, v.38, n.6, p.1279–1286, 1999.

BURLINSON, H. Testing of tablets: biopharmaceutical and other considerations. **Pharm. J.**, p.545–547, 1971.

CARRILLO, M. P. **Aplicación de fluoroquinolonas en Medicina Veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacocinéticos/farmacodinámicos**. Universidad de Murcia, 2008 (doctorado en farmacología).

CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. A validated stability–indicating LC method for orbifloxacin in the presence of degradation products. **Curr. Pharmaceut. Anal.**, v.7, n.3, p.176–181, 2011.

CAZEDEY, E.C.L.; PEREZ, D.P.; PEREZ, J.P.; SALGADO, H.R.N. LC Assay for Ciprofloxacin Hydrochloride Ophthalmic Solution. *Chromatographia*, v.69, p.241–244, 2009.

CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. **Pharmaceutics**, v.3, p.572–581, 2011.

CHO, H.J.; YI, H.; CHO, S.M.; LEE, D.G.; CHO, K.; ABD–EL–ATY, A.M.; SHIM, J.H.; LEE, S.H.; JEONG, J.Y.; SHIN, H.C. Single–step extraction followed by LC for determination of (fluoro)quinolone drug residues in muscle, eggs, and milk. **J. Sep. Sci.**, v.33, n.8, p.1034–1043, 2010.

CHO, S.; FOSSLER, C.P.; DIEZ–GONZALEZ, F.; WELLS, S.J.; HEDBERG, C.W.; KANEENE, J.B.; RUEGG, P.L.; WARNICK, L.D.; BENDER, J.B. Antimicrobial susceptibility of shiga toxin–producing *Escherichia coli* isolated from organic dairy farms, conventional dairy farms, and county fairs in Minnesota. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.4, n.2, p.178–186, 2007.

CHONAN, T.; FUJIMOTO, T.; INOUE, M.; TAZAWA, T.; OGAWA, H. Multiresidue determination of quinolones in animal and fishery products by HPLC. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v.49, n.3, p.244–248, 2008. (Artigo em japonês).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. Approved guideline M7–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standards.* CLSI Document M31–A3, vol. 28, n.8, Wayne, PA, 2008.

COELHO–BAPTISTA, B.; COSTA, M.; DUARTE CORREIA, J.; POMBA, C. *In vitro* activity of enrofloxacin, marbofloxacin, orbifloxacin and ciprofloxacin against clinical strains of *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs in Portugal. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.26, (Suppl. 1), p.155–156, 2003.

CONDORELLI, G.; DE GUIDI, G.; GIUFFRIDA, S.; MIANO, P.; VELARDITA, A.; SORTINO, S. Membrane damage photosensitized by enoxacin. **Photochem. Photobiol.**, v.63, p.75s, 1996.

CONDORELLI, G.; DE GUIDI, G.; GIULFRIDA, S.; SORTINO, S.; CHILLENI, R.; SCIUTO, S. Molecular mechanics of photosensitization induced by drugs XII. Photochemistry and photosensitization of rifloxacin: An unusual photo degradation path for the antibacterials containing a Fluoroquinolones– like chromophore. **Photochem. Photobiol.**, v.70, n.3, p.280–286, 1999.

CONNORS, R.D.; ELDER, E.J. Using a portfolio of particle growth technologies to enable delivery of drugs with poor water solubility. Solubilization solutions. **Drug Deliv. Technol.**, v.4, n.8, 2004.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Port. Farm.**, v. 59, n.4, p.181–190, 1999.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.13, p.123–133, 2001.

COX, H.U.; NEWMAN, S.S.; ROY, A.F.; HOSKINS, J.D. Species of *Staphylococcus* isolated from animal infections. **Cornell Vet.**, v.74, p.124–135, 1984.

COX, S.K. Allometric scaling of marbofloxacin, moxifloxacin, danofloxacin and difloxacin pharmacokinetics: a retrospective analysis. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.30, p.381–386, 2007.

CPMP. Note for guidance on stability testing of existing active substance and related finished Products. London: Committee for Proprietary Medicinal Products, EMEA, 1998.

CRAIG, W.A.; EBERT, S.C. Protein binding and its significance in antibacterial therapy. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.3, p.407–414, 1989.

DAVIS, J.L.; PAPICH, M.G.; WEINGARTEN, A. The pharmacokinetics of orbifloxacin in the horse following oral and intravenous administration. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.29, p.191–197, 2006.

DEMACHI, K.; MAEDA, H.; OJIMA, K.; KOKEI, T.; IMAIZUMI, H.; TAI, M.; NAKAJIMA, Y.; NARITA, H. Studies on structure of light degradation products of (–)-(S)-10-(1-aminocyclopropyl)-9-fluoro-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4] benzoxazine-6-carboxylic acid (T-3761) in aqueous solution and solid state. **Yakugaku Zasshi**, v.115, n.9, p.716–731, 1995.

DESAI, S.J.; SINGH, P.; SIMONELLI, A.P.; HIGUCHI, W.I. Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices III. Quantitative studies involving the polyethylene plastic matrix. **J. Pharm. Sci.**, v.55, p.1230–1234, 1966.

DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J. Health Econ.**, v.22, p.151–185, 2003

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. **Int. J. Pharm.**, v.321, p.1–11, 2006.

DOMAGALA, J.M. Structure–activity and structure–sideeffect relationships for the quinolone antibacterials. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.33, p.685–706, 1994.

DRESSMAN, J.B.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; REPPAS, C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, p.591–602, 2007.

DRUSANO, G.L. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. In: Proceedings of the 10th ISAP Symposium: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics (PK/PD): Towards Definitive Criteria. Milan, Italy, April 27–28, 2002.

DUAN, J.; YUAN, Z. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.1087–1089, 2001.

ELIAS, G.; LEE, J.-S.; HWANG, M.-H.; PARK, Y.-S.; CHO, K.-H.; KIM, Y.-H.; PARK, S.-C. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of orbifloxacin in Korean Hanwoo cattle. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.32, p.219–228, 2009.

ELROD, L.; LINTON, C.L.; SHELAT, B.P.; WONG, C.F. Determination of minor impurities in temafloxacin hydrochloride by high–performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.519, n.1, p.125–136, 1990.

ENGBERG, J.; AARESTRUP, F.M.; TAYLOR, D.E.; GERNER-SMIDT, P.; NACHAMKIN, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, p.24–34, 2001.

ENGLER, M.; RÜSING, G.; SÖRGEL, F.; HOLZGRABE, U. Defluorinated sparfloxacin as a new photoproduct identified by liquid chromatography coupled with UV detection and tandem mass spectrometry. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.5, p.1151–1159, 1998.

ESAKI, H.; ASAI, T.; KOJIMA, A.; ISHIHARA, K.; MORIOKA, A.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle on Japan from 2001 to 2002. **J. Vet. Med. Sci.**, v.67, n.1, p.75–77, 2005.

ESPINOSA-MANSILLA, A.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; GONZÁLEZ GÓMEZ, D.; SALINAS, F. HPLC determination of enoxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric (PIF) detection and multiemission scanning Application to urine and serum. **J. Chromatogr. B**, v.822, p.185–193, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 7th. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

EV, L.S. **Estudo da estabilidade do ofloxacino em forma farmacêutica solução injetável.** Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1997. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

FARINHA, A.; PAIS, J.P.; BICA, A. O ensaio de dissolução in vitro na avaliação da qualidade biofarmacêutica. **LEF – Boletim**, v.4, n.15, p.1-7, 1997.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FASANI, E.; ALBINI, A.; MELLA, M.; RAMPI, M.; BARBERIS NEGRA, F. Light and drugs: the photochemistry of fluoroquinolone antibiotics. **Int. J. Photoenergy**, v.1, p.1–5, 1999a.

FASANI, E.; BARBERIS NEGRA, F.F.; MELLA, M.; MONTI, S.; ALBINI, A. Photoinduced C–F bond cleavage in some fluorinated 7–amino–4–quinolone–3–carboxylic acids. **J. Org. Chem.**, v.64, p.5388–5395, 1999b.

FASANI, E.; MELLA, M.; ALBINI, A. Photochemistry of the phototoxic drug lomefloxacin: paths observed in the presence of amines or NaOH and from the methyl ester. **Eur. J. Org. Chem.**, v.24, p.5075–5082, 2004.

FASANI, E.; MELLA, M.; CACCIA, D.; TASSI, S.; FAGNONI, M.; ALBINI, A. The photochemistry of lomefloxacin. An aromatic carbene as the key intermediate in photodecomposition. **Chem. Commun.**, v.28, p.1329–1330, 1997.

FASANI, E.; MELLA, M.; MONTI, S.; ALBINI, A. Unexpected photoreactions of some 7-amino-6-fluoroquinolones in phosphate buffer. **Eur. J. Org. Chem.**, v.2, p.391–397, 2001.

FASANI, E.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. **Photochem. Photobiol.**, v.68, p.666–674, 1998.

FASANI, E.; RAMPI, M.; ALBINI, A. Photochemistry of some fluoroquinolones: effect of pH and chloride ion. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2**, p.1901–1907, 1999c.

FDA. Food and Drug Administration, 1997a. Guidance for Industry; Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070237.pdf>. Acesso em: 26 Jun 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 1997b. Guidance for Industry: SUPAC–MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070640.pdf>. Acesso em: 26 Jun 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 1998. “Draft Guidance for Industry, Stability Testing of Drug Substances and Drug Products” (FDA, Rockville, MD, June 1998), glossary.

FDA. Food and Drug Administration, 2000a. Guidance for Industry: Waiver of In–Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 26 Jun 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 2000b. Guidance For Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products— General Considerations. Disponível em: (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>). Acesso em: 26 Jun 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 2008. Guidance for Industry – Drug Stability Guidelines. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (CVM). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm051556.pdf>. Acesso em: 26 Jun 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 2011. Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf>. Acesso em: 09 Ago 2012.

FEDERAL REGISTER. Freedom of Information Summary: Orbax. NADA 141–081. Rockville, MD, FDA, April 22, 1997. Disponível em: <http://www.federalregister.gov/articles/1997/05/29/97-14107/oral-dosage-form-new-animal-drugs-orbifloxacin-tablet>. Acesso em: 26 Jun 2012.

Federal Register. Oral Dosage Form New Animal Drugs; Orbifloxacin Suspension. NADA 141–305. Rockville, MD, FDA, Aug 22, 2010. Disponível em: <http://www.federalregister.gov/articles/2010/05/12/2010-11245/oral-dosage-form-new-animal-drugs-orbifloxacin-suspension>. Acesso em: 26 Jun 2012.

FERGUSON, J. Fluoroquinolone photosensitization: a review of clinical and laboratory studies. **Photochem. Photobiol.**, v.62, p.954–958, 1995.

FERGUSON, J.; JOHNSON, B. E. Ciprofloxacin–induced photosensitivity: in vitro and in vivo studies. **Br. J. Dermatol.**, v.123, p.9–20, 1990.

FERRAZ, H.G. **Comprimido de ibuprofeno: formulação e avaliação do perfil de dissolução**. São Paulo, 1993. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

FORD, M.M.; DUBIELZIG, R.R.; GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P.; NARFSTRÖM, K.L. Ocular and systemic manifestations after oral administration of a high dose of enrofloxacin in cats. **Am. J. Vet. Res.**, v.68, p.190–202, 2007.

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

FUJII, T.; TAKATSU, S.; STEGEMANN, M.; OGATA, M.; KAMATA, S. Clinical efficacy and safety of an injectable formulation of cefovecin in the treatment of bacterial skin infections of dogs. **Jpn. J. Vet. Dermatol.**, v.13, n.2, p.81–88, 2007.

FUJITA, M.; TAMURA, W.; TOZAWA, T.; KOMETANI, T. Application of simultaneous determination method of residual veterinary drugs to processed foods. **Shokuhin Eiseiqaku Zasshi**, v.49, n.6, p.416–21, 2008. (Artigo em japonês).

GANIÈRE, J.-P.; MÉDAILLE, C.; ETORÉ, F. In vitro antimicrobial activity of orbifloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolates from canine skin and ear infections. **Res. Vet. Sci.**, v.77, p.67–71, 2004.

GARCÍA, M.A.; SOLANS, C.; ARAMAYONA, J.J.; RUEDA, S.; BREGANTE, M.A. Determination of orbifloxacin in rabbit plasma by high–performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. Sci.**, v.37, n.6, p.199–202, 1999.

- GEBRU, E.; DAMTE, D.; CHOI, M.J.; LEE, S.J.; KIM, Y.H.; PARK, S.C. Mutant prevention concentration and phenotypic and molecular basis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates and *in vitro*-selected mutants of *Escherichia coli* from dogs. **Vet. Microbiol.**, v.154, p.384–394, 2012.
- GEBRU, E.; LEE, J.-S.; CHANG, Z.-Q.; HWANG, M.-H.; CHENG, H.; PARK, S.-C. Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamic indices of orbifloxacin in beagle dogs after a single intravenous and intramuscular administration. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.7, p.3024–3029, 2009.
- GELATT, K.N.; VAN DER WOERDT, A.; KETRING, K.L.; ANDREW, S.E.; BROOKS, D.E.; BIROS, D.J.; DENIS, H.M.; CUTLER, T.J. Enrofloxacin associated retinal degeneration in cats. **Vet. Ophthalmol.**, v.4, p.99–106, 2001.
- GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica – parte II. **Cerâmica**, v.34, n.225, p.163-164, 1988.
- GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for determination of lomefloxacin in coated tablets. **J. AOAC Int.**, v.89, p.1077-1079, 2006.
- GONÇALVES, M.L.S.S. **Métodos instrumentais para análise de soluções: análise quantitativa**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.
- GOTTLIEB, S.; WIGNEY, D.I.; MARTIN, P.A.; NORRIS, J.M.; MALIK, R.; GOVENDIR, M. Susceptibility of canine and feline *Escherichia coli* and canine *Staphylococcus intermedius* isolates to fluoroquinolones. **Aust. Vet. J.**, v.86, n.4, p.147–152, 2008.
- GOUDAH, A.; ABO-EL-SOUD, K. Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous and intramuscular injections to dromedary lactating camels (*Camelus dromedaries*). **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.31, p.276–280, 2008.
- GOUDAH, A.; CHO, H.J.; SHIN, H.C.; SHIM, J.H.; REGMI, N.L.; SHIMODA, M.; ABD EL-ATY, A.M. Pharmacokinetics and milk distribution characteristics of orbifloxacin following intravenous and intramuscular injection in lactating ewes. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.32, n.4, p.338–344, 2009.
- GRAHN, B.H.; STOREY, E.S.; CULLEN, C.L. Diagnostic ophthalmology. **Can. Vet. J.**, v.43, p.137–138, 2002.
- HAINES, G.R.; BROWN, M.P.; GRONWALL, R.R.; MERRITT, K.A.; BALTZLEY, L.K. Pharmacokinetics of orbifloxacin and its concentration in body fluids and in endometrial tissues of mares. **Can. J. Vet. Res.**, v.65, p.181–187, 2001.

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L.; PAGE, R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. **Can. Vet. J.**, v.47, n.3, p.253–255, 2006.

HAYASHI, N.; NAKATA, Y.; YAZAKI, A. New findings on the structure phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.799–803, 2004.

HEINEN, E. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in cats after single oral administration. In: Proceedings of the eighth International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Israel, Abstract L11, 2000.

HEINEN, E. Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in dogs after single oral administration. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.25, p.1–5, 2002.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis, a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC Press, 2004. 260p.

HIDALGO, M.E.; PESSOA, C.; FERNANDEZ, E.; GRDENAS, A.M. Comparative determination of photodegradation kinetics of quinolones. **Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v.73, p.135–138, 1993.

HIGUCHI, W.I.; HIESTAND, E.N. Dissolution rates of finely divided drug powders. **J. Pharm. Sci.**, v.52, n.1, p.67–71, 1963.

HORIO, T.; MIYAUCHI, H.; ASADA, Y.; AOKI, Y.; HARADA, M. Phototoxicity and photoallergenicity of quinolones in guinea pigs. **J. Dermatol. Sci.**, v.7, p.130–135, 1994.

HUNG, S.-W.; SHIH, C.-W.; CHEN, B.-R.; TU, C.-Y.; LING, Y.-F.; TSOU, L.-T.; HO, S.-P.; WANG, W.-S. A new detection technique for fluoroquinolone-conjugated proteins by high performance liquid chromatography with UV/fluorescence detectors. **J. Food Drug Anal.**, v.15, n.1, p.71–74, 2007.

IBRAHEM, M.D; ATTA, A.H; SHALABY, M.A. Bioavailability of orbifloxacin in african sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*, and its efficacy in control of induced Edwardsiellosis. **J. Am. Sci.**, v.6, n.6, p.236–244, 2010.

IHRKE, P.J. Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the skin in small animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.185, p.1165–1168, 1984.

IHRKE, P.J.; PAPICH, M.G.; DEMANUELLE, T.C. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. **Vet. Dermatol.**, v.10, p.193–204, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Guidance for industry Q1A (R2) stability testing of new drug substances and products, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), 2006.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, 2005.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: Giz, 2004. 82p.

IONASHIRO, M; GIOLITO, I Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v.121, n.26, p. 17-24, 1980.

IWAMOTO, Y.; ITOYAMA, T.; YASUDA, K.; UZUHASHI, T.; TANIZAWA, I.; TAKINO, Y.; OKU, T.; HASHIZUME, H.; YANIHIGARA, Y. Photodynamic deoxyribonucleic acid (DNA) strand breaking activity of enoxacin and aflaqualone. **Chem. Pharm. Bull.**, v.40, p.1868–1870, 1992.

JASTI, B.R.; GHOSH, T.K. Theory and practice of contemporary pharmaceuticals. Chapter 8: **Chemical Kinetics and Stability**, 2005. p.217–256.

JOHNSTON, L.; MACKAY, L.; CROFT, M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high–performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection. **J. Chromatogr. A**, v.982, p.97–109, 2002.

KAJITA, H.; HATAKEYAMA, E. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in livestock products and fish by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v.49, n.6, p.381–389, 2008. (Artigo em japonês).

KANTIANI, K.; FARRÉ, M.; BARCELO, D. Rapid residue analysis of fluoroquinolones in raw bovine milk by online solid phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1218, p.9019–9027, 2011.

KAY-MUGFORD, P.A.; WEINGARTEN, A.J.; NGOH, M.; ZOLYNAS, R.; WHITE, A.; KATZ, T.; SIMMONS, R.; VARMA, K.J. Determination of plasma and skin concentrations of orbifloxacin in dogs with clinically normal skin and dogs with pyoderma. **Vet. Ther.**, v.3, n.4, p.402–408, 2002.

KHAN, K.A.; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.27, p.48–49, 1975.

KUMAZAWA, J.; YAGISAWA, M. The history of antibiotics: The Japanese story. **J. Infect. Chemother.**, v.8, p.125–133, 2002.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. Cap.26, v.2, p.1277–1255.

LEFEBVRE, H.; SCHNEIDER, M.; DUPOUY, V.; LAROUTE, V.; COSTES, G.; DELESALLE, L.; TOUTAIN, P. Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.21, p.453–461, 1998.

LEITE, E. G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos**. Porto Alegre, 2005. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

LENNERNAS, H.; ABRAHAMSSON, P. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extensions. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.57, p.273–285, 2005.

LI, Y.L.; HAO, X.L.; JI, B.Q.; XU, C.L.; CHEN, W.; SHEN, C.Y.; DING, T. Rapid determination of 19 quinolone residues in spiked fish and pig muscle by high-performance liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrometry. **Food Addit. Contam.**, v.26, n.3, p.306–313, 2009.

LIETMAN, P.S. Fluoroquinone toxicities. An update. **Drugs**, v.49, p.794–850, 1995.

LINDENBERG, M.; WIEGAND, C.; DRESSMAN, J. B. Comparison of the adsorption of several drugs to typical filter materials. **Dissol. Technol.**, p. 22–25, 2005.

LINDER, J.S.; HUANG, E.S.; STEINMAN, M.A.; GONZALES, R.; STAFFORD, R.S. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. **Am. J. Med.**, v.118, n.3, p.259–268, 2005.

LLINÀS, A.; GLEN, R.C.; GOODMAN, J.M. Solubility challenge: can you predict solubilities of 32 molecules using a database of 100 reliable measurements? **J. Chem. Inf. Model.**, v.48, p.1289–1303, 2008.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; MOLINA-DÍAZ, A.; RUIZ-MEDINA, A. Implementation of terbium-sensitized luminescence in sequential-injection analysis for automatic analysis of orbifloxacin. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.392, p.1397–1403, 2008.

LLOYD, D.H.; ALLAKER, R.P.; PATTINSON, I. Carriage of *Staphylococcus intermedius* on the ventral abdomen of clinically normal dogs and those with pyoderma. **Vet. Dermatol.**, v.2, p.161–164, 1991.

LORENZO, F.; NAVARATNAM, S.; EDGEM R.; ALLEN, N.S. Primary photophysical properties of moxifloxacin — A fluoroquinolone antibiotic. **Photochem. Photobiol.**, v.84, p.1118–1125, 2008.

MACKENZIE, R.C. Nomenclature in thermal analysis, part IV. **Thermochim. Acta**, v.28, n.1, p.1-6, 1979.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 26 out 2008.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

MARÍN, P.; ESCUDERO, E.; FERNÁNDEZ-VARÓN, E.; CÁRCELES, C.M. Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.4219–4225, 2007.

MARÍN, P.; FERNÁNDEZ-VARÓN, E.; ESCUDERO, E.; VANCRAEYNEST, D.; CÁRCELES, C.M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of orbifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.31, p.77–82, 2008.

MARKENS, U. Conducting stability studies – recent changes to climatic zone IV. **Pharma Times**, v.42, n.7, p.13–14, 2010.

MARONA, H.R.N. **Estudo químico-farmacêutico de esparfloxacino e caracterização bacteriana frente a quinolonas**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. (Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Desarrollo de análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino en polvo y en comprimidos de 200 mg. **Inf. Tecnol.**, v.9, p.251-254, 1998.

MARQUES, M.R.C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Rev. Anal.**, v.1, n.1, p.48-51, 2002.

MARTÍNEZ, L.J.; LI, G.; CHIGNELL, C.F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. **Photochem. Photobiol.**, v.65, n.3, p.599-602, 1997.

MARTÍNEZ, L.J.; SIK, R.H.; CHIGNELL, C.F. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. **Photochem. Photobiol.**, v.67, p.399-403, 1998.

MARTINEZ, M.; AUGSBURGER, L.; JOHNSTON, T.; JONES, W.W. Applying the Biopharmaceutics Classification System to veterinary pharmaceutical products Part I: Biopharmaceutics and formulation considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.54, p.805-824, 2002.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **Vet. J.**, v.172, p.10-28, 2006.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v.351, p.797-799, 1998.

MARUTANI K.; OTABE, Y.; NAGAMUTA, M.; MATSUBARA, S.; OTANI, H. Photoallergenicity of a fluoroquinolone antibacterial agent with a fluorine substituent at the 8-position in guinea pigs exposed to long-wavelength UV light. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.11, p.232-240, 1998.

MARUTANI, K.; MATSUMOTO, M.; OTABE, Y.; NAGAMUTA, M.; TANAKA, K.; MIYOSHI, A.; HASEGAWA, T.; NAGANO, H.; MATSUBARA, S.; KAMIDE, R.; YOKOTA, T.; MATSUMOTO, F.; UEDA, Y. Reduced phototoxicity of a fluoroquinolone antibacterial agent with a methoxy group at the 8 position in mice irradiated with long-wavelength UV-light. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.37, p.2217-2223, 1993.

MATSUMOTO, M.; KOJIMA, K.; NAGANO, H.; MATSUBARA, S.; YOKOTA, T. Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.36, p.1715–1719, 1992.

MATSUMOTO, S. Orbifloxacin, a fluoroquinolone derivative. **Jpn. S. Antimicrob. Anim.**, v.17, p.41–50, 1996. (Artigo em japonês).

MATSUMOTO, S.; KITADAI, N.; NAKATA, K.; KATAE, H. Combined *in vitro* effects of orbifloxacin and fosfomicin on *S. dublin* and *S. typhimurium* isolated from calves. **J. Jpn. Vet. Med. Assoc.**, v.53, p.1–6, 1999a. (Artigo em japonês).

MATSUMOTO, S.; NAKAI, M.; YOSHIDA, M.; KATAE, H. A study of metabolites isolated from urine samples of pigs and calves administered orbifloxacin. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.22, p.286–289, 1999b.

MATSUMOTO, S.; NAKAI, M.; YOSHIDA, M.; KATAE, H. Absorption, distribution and excretion of orbifloxacin in swine and calves. **J. Jpn. Vet. Med. Assoc.**, v.51, p.13–18, 1998a. (Artigo em japonês).

MATSUMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; KITADAI, N.; KATAE, H. A study of metabolites isolated from the urine samples of cats and dogs administered orbifloxacin. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, n.11, p.1259–1261, 1998b.

MATSUMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; YOSHIDA, M.; KOMATSU, T.; KITADAI, N.; HORII, Y.; KATAE, H. Absorption, distribution and excretion of orbifloxacin in dogs and cats. **J. Jpn. Vet. Med. Assoc.**, v.50, p.470–474, 1997. (Artigo em japonês).

MATTHEWS, B.R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. In: CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. (Eds.). **Drug stability: principles and practices**. 3.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2000. v.107, p.580.

MAZUEL, C. Norfloxacin. Analytical profiles of drugs substances. In: FLOREY, K. New York: Academic Press, 1991. v.20, p.552.

MCKAY, L.; ROSE, C.D.; MATOUSEK, J.L.; SCHMEITZEL, L.S.; GIBSON, N.M.; GASKIN, J.M. Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.43, p.307–312, 2007.

MELLA, M.; FASANI, E.; ALBINI, A. Photochemistry of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl) quinoline-3-carboxylic acid (ciprofloxacin) in aqueous solutions. **Helv. Chim. Acta**, v.84, p.2508–2519, 2001.

MONTI, S.; SORTINO, S.; FASANI, E.; ALBINI, A. Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: A study by nanosecond and picosecond spectroscopic techniques. **Chem. Eur. J.**, v.7, p.2185–2196, 2001.

MOORE, J.W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharm. Technol.**, v.20, n.6, p. 64–74, 1996.

MORENO, A.R., SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **J. AOAC Int.**, v.90, p.1379-1382, 2007.

MORIMURA, T.; KOHNO, K.; NOBUHARA, Y.; MATSUKURA, H. Photoreaction and active oxygen generation by photosensitization of a new antibacterial fluoroquinolone derivative, orbifloxacin, in the presence of chloride ion. **Chem. Pharm. Bull.**, v.45, n.11, p.1828–1832, 1997a.

MORIMURA, T.; KOHNO, T.; MATSUKURA, H.; NOBUHARA, Y. Photodegradation kinetics of the new antibacterial fluoroquinolone derivative, orbifloxacin, in aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v.43, n.6, p.1000–1004, 1995b.

MORIMURA, T.; NOBUHARA, Y.; MATSUKURA, H. Photodegradation products of a new antibacterial fluoroquinolone derivative, orbifloxacin, in aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v.45, n.2, p.373–377, 1997b.

MORIMURA, T.; OHNO, T.; MATSUKURA, H.; NOBUHARA, Y. Degradation kinetics of the new antibacterial fluoroquinolone derivative, orbifloxacin, in aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v.43, n.6, p.1052–1054, 1995a.

MORIOKA, A.; ASAI, T.; ISHIHARA, K.; KOJIMA, A.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T. *In vitro* activity of 24 antimicrobial agents against *Staphylococcus* and *Streptococcus* isolates from diseases animals in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v.67, n.2, p.207–210, 2005.

MULYE, N.V.; TURCO, S.J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dehydrate matrices. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.21, n.8, p.943–953, 1995.

NAKAMURA, S. Veterinary use of new quinolones in Japan. **Drugs**, v.49, (Suppl 2), p.152–158, 1995.

NANGIA, A.; LAM, F.; HUNG, C.T. A stability study of aqueous solution of norfloxacin. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.5, p.681–694, 1991.

NERNST, W. Theorie der reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen systemen. **Z. Phys. Chem.**, v.47, p.52–55, 1904.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NOYES, A.A.; WHITNEY, W.R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. **J. Am. Chem. Soc.**, v.19, p.930–934, 1897.

O'HARA, T.; DUNNE, A; BUTLER, J.; DENAVE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v.1, n.5, p.214–223, 1998.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14th. ed. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., 2006, p.1182.

OFOEFULE, S.I.; UDEOGARANYA, P.O; OKONTA, J.M. Prediction of *in vivo* bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). **Boll. Chim. Farm.**, v.140, n.3, p.187–191, 2001.

OLIVEIRA, H. S.; GONÇALO, M.; FIGUEIREDO, A.C. Photosensitivity to lomefloxacin. A clinical and photobiological study. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.16, p.116–120, 2000.

PAPICH, M. G.; RIVIERE, J.E. Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In: ADAMS, H.R. (Ed.). **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 8th ed. Iowa State University Press, Ames. p. 898–917, 2001.

PAVIA, D.L.; LANPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Infrared spectroscopy. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3.ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001. Cap. 2, p.13–84.

PIRRO, F.; EDINGLOH, M.; SCHMEER, N. Bactericidal and inhibitory activity of enrofloxacin and other fluoroquinolones in small animal pathogens. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.21, (Suppl. 12M), p.19–25, 1999.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Inf. J.**, v.30, p.1113–1120, 1996.

RANGA, K.V.; PADMALATHA, D.K.; BURI, P.K. Cellulose matrices for zero-order release of soluble drugs. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.14, p.2299–2320, 1988.

REGMI, N.L.; ABD EL-ATY, A.M.; KUBOTA, R.; SHAH, S.S.; SHIMODA, M. Lack of inhibitory effects of several fluoroquinolones on cytochrome P-450 3A activities at clinical dosage in dogs. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.30, p.37-42, 2007.

REGMI, N.L.; ABD EL-ATY, A.M.; KUBOTA, R.; TOMITA, A.; SHIMODA, M. Effect of ofloxacin on theophylline pharmacokinetics at clinical dosage in dogs. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.29, p.403-408, 2006.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed). **Martindale the extra pharmacopoeia**. 35.ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. p.278.

RHODES, C.T. Introductory overview. In: CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. (Eds.). **Drug stability: principles and practices**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2000. v.107, p.1-12.

RIDDLE, C.; LEMONS C. L.; PAPICH, M. G.; ALTIER, C. Evaluation of ciprofloxacin as a representative of veterinary fluoroquinolones in susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.1636-1637, 2000.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.

ROSEN, J.E.; CHEN, D.; PRAHALAD, A.K.; SPRATT, T.E.; SCHLUTER, G.; WILLIAMS, G.M. A fluoroquinolone antibiotic with a methoxy group at the 8 position yields reduced generation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine after ultraviolet-A irradiation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.145, p.381-387, 1997a.

ROSEN, J.E.; PRAHALAD, A.K.; SCHLUTER, G.; CHEN, D.; WILLIAMS, G.M. Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells. **Photochem. Photobiol.**, v.65, p.990-996, 1997b.

ROSSER, E.J. Causes of otitis externa. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.34, p.459-468, 2004.

ROY, J. Pharmaceutical Impurities – A Mini-Review. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.3, n.2, p.1-8, 2002.

RUBIN, J.; WALKER, R.D.; BLICKENSTAFF, K.; BODEIS-JONES, S.; ZHAO, S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. **Vet. Microbiol.**, v.131, p.164-172, 2008.

RUSSELL, J. **Química Geral**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1994. v.2, p.14.

SAITO, M.; KOZUTSUMI, D.; KAWASAKI, M.; KANBASHI, M.; NAKAMURA, R.; SATO, Y.; ENDO, M. Multiresidue method for pesticides and veterinary drugs in bovine milk using GC/MS and LC/MS/MS. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v.49, n.3, p.228–238, 2008. (Artigo em japonês).

SAKR, A.M.; KASSEN, A.A.; AZIZ, S.A.A.; SHALABY, A.H. Factors affecting physical standards of tablets. **Manuf. Chem. Aerosol News**, v.43, n.11, p.38–44, 1972.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v.40, p.443–446, 2006..

SANCHEZ, J. P.; GOGLIOTTI, R. D.; DOMAGALA, J. M.; GRACHECK, S. J.; HUBAND, M. D.; SESNIE, J. A.; COHEN, M. A.; SHAPIRO, M. A. The synthesis, structure–activity, and structure–side effect relationships of a series of 8–alkoxy– and 5–amino–8–alkoxyquinolone antibacterial agents. **J. Med. Chem.**, v.38, p.4478–4487, 1995.

SANTOKE, H.; SONG, W.; COOPER, W.J.; GREAVES, J.; MILLER, G.E. Free–radical–induced oxidative and reductive degradation of fluoroquinolone pharmaceuticals: Kinetic studies and degradation mechanism. **J. Phys. Chem. A**, v.113, p.7846–7851, 2009.

SÁRKÖZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Vet. Med.**, v.46, p.257–274, 2001.

SCHNEIDER, M.J.; DONOGHUE, D.J. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography–fluorescence–multiple mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.780, p.83–92, 2002.

SCHNEIDER, M.J.; DONOGHUE, D.J. Multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in eggs using liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v.483, p.39–49, 2003.

SCHNEIDER, M.J.; REYES–HERRERA, I.; DONOGHUE, D.J. Evaluation of serum as a potential matrix for multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in chicken using liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry. **J. AOAC Int.**, v.90, n.6, p.1716–1723, 2007.

SCHNEIDER, M.J.; VAZQUEZ–MORENO, L.; BERMUDEZ–ALMADA, M.C.; GUARDADO, R.B.; ORTEGA–NIEBLAS, M. Multiresidue determination of fluoroquinolones in shrimp by liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry. **J. AOAC Int.**, v.88, n.4, p.1160–1166, 2005.

SCHWARTZ, J.B.; SIMONELLI, A.P.; HIGUCHI, W.I. Drug release from wax matrices I: Analysis of data with first order kinetics and with diffusion controlled model. **J. Pharm. Sci.**, v.57, p.274–277, 1968.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Bacterial skin diseases. In:_____.
Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6.ed (MULLER, W. ed). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p.274–335.

SCOTT, D.W.; PETERS, J.; MILLER Jr., W.H. Efficacy of orbifloxacin tablets for the treatment of superficial and deep pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs. **Can. Vet. J.**, v.47, p.999–1002, 2006.

SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.43, n.1, p.79–88, 2007.

SHAN–YANG, L. Effect of excipients on tablet properties and dissolution behaviour of theophylline–tableted microcapsules under different compression forces. **J. Pharm. Sci.**, v.77, p.229–232, 1988.

SHIMODA, M.; ABD EL-ATY, A.M.; NAKAMURA, M.; KOKUE, E. Inhibitory effects of some fluoroquinolones on cytochrome P450 1A activities of canine hepatic microsomes. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.26, (Suppl. 1), p.111–112, 2003.

SHRYOCK, T.R. Letters to the Editor – NCCLS Quality Control Values for Veterinary–Use Fluoroquinolones. **J. Clin. Microbiol.**, p.1680–1681, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SINGH, P.; DESAI, S.J.; SIMONELLI, A.P.; HIGUCHI, W.I. Release rates of solid drug mixtures dispersed in inert matrices. I. Noninteracting drug mixtures. **J. Pharm. Sci.**, v.56, n.12, p.1542–1547, 1967.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R.P. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.69, p.148–173, 2012.

SKOUG, J.W.; HASLTEAD, G.W.; THEIS, D.L.; FREEMAN, J.E.; FAGAM, D.T.; ROHRS, B.R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol.**, v.1, p.34–43, 1997.

SMITH, A.; PENNEFATHER, P.M.; KAYE, S.B.; HART, C.A. Fluroquinolones: place in ocular therapy. **Indian Drugs**, v.61, n.6, p.747–761, 2001.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCK, J.I. **Practical HPLC method development**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. p.2–21.

SORTINO, S.; DE GUIDI, G.; GIUFFRIDA, S.; MONTI, S.; VELARDITA, A. pH Effects on the spectroscopic and photochemical behavior of enoxacin: a steady-state and time-resolved study. **Photochem. Photobiol.**, v.67, n.2, p.167–173, 1998.

STEGMAN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, D.; DE JONG, H.; LINDEN, H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.31, p.249–261, 2007.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. **Analytical method development and validation**. New York: Marccel Dekker, 1997. p.25–26.

TABASI, S.H.; FAHMY, R.; BENSLEY, D.; O'BRIEN, C.; HOAG, S.W. Quality by design, Part I: Application of NIR spectroscopy to monitor tablet manufacturing process. **J. Pharm. Sci.**, v.97, n.9, p.4040–4051, 2008a.

TABASI, S.H.; FAHMY, R.; BENSLEY, D.; O'BRIEN, C.; HOAG, S.W. Quality by design, Part II: Application of NIR spectroscopy to monitor the coating process for a pharmaceutical sustained release product. **J. Pharm. Sci.**, v.97, n.9, p.4052–4066, 2008b.

TABASI, S.H.; FAHMY, R.; BENSLEY, D.; O'BRIEN, C.; HOAG, S.W. Quality by design, Part III: Study of curing process of sustained release coated products using NIR spectroscopy. **J. Pharm. Sci.**, v.97, n.9, p.4067–4086, 2008c.

TAMURA, Y.; TAKAHASHI, H.; OOKUBO, T.; WATANABE, A. Bacterial spectrum detected in dogs with pyoderma. **J. Jpn. Vet. Assoc.**, v.46, p.54–56, 1993.

TANG, Y.Y.; LU, H.F.; LIN, H.Y.; SHIH, Y.C.; HWANG, D.F. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.881-882, p.12–19, 2012.

TIEFENBACHER, E. V.; HAEN, E.; PRZYBILLA, B.; KURZ, H. Photodegradation of some quinolones used as antimicrobials therapeutics. **J. Pharm. Sci.**, v.83, p.463–467, 1994.

TORNIAINEN, K.; ASKOLIN, C.P.; MATTINEN, J. Isolation and structure elucidation of an intermediate in the photodegradation of ciprofloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.16, n.3, p.439–445, 1997b.

TORNIAINEN, K.; MATTINEN, J.; ASKOLIN, C.P.; TAMMILEHTO, S. Structure elucidation of a photodegradation product of ciprofloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.15, p.887–894, 1997a.

TORNIAINEN, K.; TAMMILEHTO, S.; ULVI, V. The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. **Int. J. Pharm.**, v.132, p.53–61, 1996.

TORNIAINEN, T.; MAKI, E. Development of an isocratic high–performance liquid chromatographic method for monitoring of ciprofloxacin photodegradation. **J. Chromatogr. A**, v.697, p.397–405, 1995.

TOZO, G.C.G.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for cefoxitin sodium in dosage form. **J.**

UMEZAWA, N.; ARAKANE, K.; RYU, A.; MASHIKO, S.; HIROBE, M.; NAGANO, T. Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by antibacterial agents. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.342, p.275–281, 1997.

UNGELL, A.–L.; ABRAHAMSSON B. **Biopharmaceutical support in candidate drug selection in pharmaceutical preformulation and formulation**, GIBSON, M. (Ed.). Boca Raton: CRC Press LLC, 2000. p.97–153.

US PHARMACOPEIA. 34. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2011.

US PHARMACOPEIA 34–NF 29, Chapter <1092> The dissolution procedure: development and validation. 2011d.

US PHARMACOPEIA 34–NF 29, Chapter <1225> Validation of compendial procedures. 2011e.

US PHARMACOPEIA 34–NF 29, Chapter <701> Disintegration. 2011a.

US PHARMACOPEIA 34–NF 29, Chapter <711> Dissolution. 2011b.

US PHARMACOPEIA 34–NF 29, Chapter <724> Drug Release. 2011c.

US PHARMACOPEIA 34–NF 29, Orbifloxacin. 2011f, p.3732–3734.

VARGAS, F.; RIVAS, C.; CANUDAS, N. Photosensitized lipid peroxidation by cinoxacin and its photoproducts. Involvement of a derived peroxide in its phototoxicity. **Pharmazie**, v.49, p.742–745, 1994.

VASCONCELOS, T.G.; HENRIQUES, D.M.; KÖNIG, A.; MARTINS, A.F.; KÜMMERER, K. Photo–degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by–products. **Chemosphere**, v.76, p.487–493, 2009.

VOLMER, D.A.; MANSOORI, B.; LOCKE, S.J. Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v.69, n.20, p.4143-4155, 1997.

VOUSDEN, M.; FERGUSON, J.; RICHARDS, J.; BIRD, N.; ALLEN, A. Evaluation of phototoxic potential of gemifloxacin in healthy volunteers compared with ciprofloxacin. **Chemotherapy**, v.45, p.512-520, 1999.

WAGAI, N.; TAWARA, K. Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent-induced cutaneous phototoxicity in mice. **Arch. Toxicol.**, v.65, p.495-499, 1991.

WAGAI, N.; TAWARA, K. Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. **Arch. Toxicol.**, v.66, p.392-397, 1992a.

WAGAI, N.; TAWARA, K. Possible reasons for differences in phototoxic potential of 5 quinolone antibacterial agents: generation of toxic oxygen. **Free Radical Res. Commun.**, v.17, p.387-398, 1992b.

WALKER, R. D. The use of fluoroquinolones for companion animal therapy. **Aust. Vet. J.**, v.2, p.84-90, 2000.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.**, v.293, p.101-125, 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: a textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2.ed. London: Churchill Livingstone, 2005.

WHITTEM, T.; GAON, D. Principles of Antimicrobial Therapy. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.28, n.8, p.197-214, 1998.

WIEBE, V.; HAMILTON, P. Fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.221, p.1568-1571, 2002.

WILLARD, H; MERRITT Jr, L.; DEAN, J. **Análise instrumental**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979. 986p.

WINGER, B.E.; KEMP, C.A.J. Characterization of pharmaceutical compounds and related substances by using HPLC FTICR-MS and tandem mass spectrometry. **Am. Pharm. Rev.**, v.4, n.2, p.55-63, 2001.

World Health Organization (WHO). Technical Report Series, **Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products**. Annex 2, No. 953, 2009.

YAMADA, R.; KOZONO, M.; OHMORI, T.; MORIMATSU, F.; KITAYAMA, M. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with eletrospray ionization tandem spectrometry. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.70, n.1, p.54–65, 2006.

YOSHIDA, T.; YAMAMOTO, Y.; ORITA, H.; KAKIUCHI, M.; TAKAHASHI, Y.; ITAKURA, M.; KADO, N.; YASUDA, S.; KATO, H.; ITO, Y. Studies on quinolones antibacterials. V. Synthesis antibacterial activity of chiral 5-amino-7-(4-substituted-3-amino-1-pyrrolidiny)-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methyl-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids and derivatives. **Chem. Pharm. Bull.**, v.44, p.1376–1386, 1996.

YOSHIDA, Y.; SATO, E.; MOROI, R. Photodegradation products of levofloxacin in aqueous solution. **Arzneimittel Forschung Drug Res.**, v.43, p.601–606, 1993.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. **Stability of drugs and dosage forms**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002.

YU, H.; TAO, Y.; CHEN, D.; PAN, Y.; LIU, Z.; WANG, Y.; HUANG, L.; DAI, M.; PENG, D.; WANG, X.; YUAN, Z. Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. **J. Chromatogr. B**, v.885-886, p.150–159, 2012.

YURI, K.; HORII, Y.; KATAE, H.; OKUZUMI, K.; HASEGAWA, A. Fungi and bacteria isolated from skin lesions of dogs and their drug sensitivities. **Jpn. J. Vet. Dermatol.**, v.3, p.29–35, 1997.

ZHANEL, G.G.; NOREDDIN, A.M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.1, p.459-63, 2001.

ZOLTAN, T.; VARGAS, F.; IZZO, C. UV-Vis spectrophotometrical and analytical methodology for the determination of singlet oxygen in new antibacterials drugs. **Anal. Chem. Insights**, v.2, p.111–118, 2007.