

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

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE NORFLOXACINO
COMPRIMIDOS E ESTUDOS DE COMPLEXAÇÃO COM β -
CICLODEXTRINA E POLIMORFISMO

LUCAS CHIERENTIN

ARARAQUARA – SP

2013

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

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE NORFLOXACINO
COMPRIMIDOS E ESTUDOS DE COMPLEXAÇÃO COM β -
CICLODEXTRINA E POLIMORFISMO

LUCAS CHIERENTIN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

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

Chierentin, Lucas

C532a Análise químico-farmacêutica de norfloxacino comprimidos e estudos de complexação com β -ciclodextrina e polimorfismo / Lucas Chierentin. – Araraquara, 2013
252 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Fluoroquinolona. 2. Norfloxacino. 3. Controle de qualidade.
4. Métodos analíticos. 5. Espectrofotometria na região do visível.
6. Cromatografia líquida de alta eficiência. 7. Eletroforese capilar.
8. Doseamento microbiológico. 9. Complexos com β -ciclodextrina.
10. Polimorfismo. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

LUCAS CHIERENTIN

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE NORFLOXACINO
COMPRIMIDOS E ESTUDOS DE COMPLEXAÇÃO COM β -
CICLODEXTRINA E POLIMORFISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 26/02/2013

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara-SP

Prof.^a Dr.^a MARCELA LONGHI

Instituição: Universidad Nacional de Córdoba, UNC, Argentina

Prof. Dr. RUY CARLOS RUYER BECK

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ARARAQUARA – SP

2013

*Aos meus pais Sérgio e Marta
Meus irmãos Alexandre e Flávio*

Por todo amor, apoio e incentivo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar esta grande vitória.

À minha família, meus queridos pais Sérgio Chierentin e Marta Rocha Ferreira Chierentin, meus irmãos Alexandre Chierentin e Flávio Chierentin, meus tios Maria Aparecida Ferreira Brito, Olindo de Almeida Brito (*in memoriam*), Laura, Gilberto, Regina, Evaldo, meus primos Gustavo, Luisa, Augusto, Felipe, Leandro, Nicholas, Vinicius, Lenda, Lenira, Lorena e Laís, aos meus avôs Mercedes e Armando, sem eles nada seria possível. Agradeço o apoio incondicional, a confiança, a compreensão. Amo vocês...

À minha orientadora Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, por ter sido mais que uma orientadora e sim uma grande “mãe”, fornecendo conhecimento sólido, confiança, compreensão, incentivo e amizade.

Aos professores do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos-SP (UNIFEB) pela formação sólida e de qualidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela contribuição em minha formação científica.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade: Flávia Fiorentino, Edith Cazedey, Lucélia Magalhães, Rudy Bonfilio, Eliane Tótolli, Tahisa Pedroso, Andressa Leme, Camila Tavares, Ana Carolina Kogawa, Patrícia Aléssio, Flávia Carnavalli, Josilene Corrêa, Thales Oliveira, Lenita Tomita, Emiliane Rodrigues, Jan Frommelt, Lígia Beltrame, por todos vocês estarem sempre comigo, neste árduo processo de amadurecimento.

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

Aos colegas do Laboratório de Farmacotécnica, Hilris Rocha, Jéssica Bernegossi, Fabíola Prezotti, Liliane Pedreiro e Fernanda Kolenyak, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio e paciência na utilização do espectrofotômetro e pelas discussões oferecidas no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico, Eliete Von Zuben, Ana Cláudia, Kamila Rotolo, Nátaíia Ferri e Flávia Maccari, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio na utilização do espectrofotômetro.

Aos professores Irineu Moreira da Silva, Patrícia Rodella e Cátia Rezende pelos trabalhos científicos e por despertar em mim a paixão pela pesquisa.

À Profa. Dra. Marcela Longhi da Universidad Nacional de Córdoba – Argentina, pela grande colaboração nos estudos de complexação com β -CD e polimorfismo deste trabalho e também por toda amizade e dedicação compartilhados.

Aos amigos do Departamento de Farmacia da Universidad Nacional de Córdoba – Argentina, Claudia Garnero, Carolina Aloisio, Renée Onnainty, María Julia Mora, Alicia Delrivo, María Noel Urrutia, Jimena Vara e Ariana Zoppi pelas discussões em meu trabalho, todos os momentos felizes em Córdoba e claro aos mates de todos os dias.

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato do Laboratório de Química Analítica da Universidade de São Paulo (USP), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP, pela grande colaboração e disponibilização do laboratório para realização dos estudos de Eletroforese Capilar.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica da Universidade de São Paulo (USP), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Milena Tonon e em especial Thiago Barth, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio e paciência na utilização do equipamento de eletroforese capilar. E também as colegas, Valquíria Jabor e Luciana Angulo pela companhia no laboratório.

Ao Prof. Dr. Thomas Karnes do Laboratório de Bioanalítica da Virginia Commonwealth University (VCU), em Richmond-VA, EUA, pela colaboração nos estudos de Dissolução Intrínseca.

Aos colegas do Laboratório de Bionalítica da VCU nos EUA, Morse Faria e em especial Poonam Renish Delvadia, meus sinceros agradecimentos por todo apoio prestado aos estudos de dissolução intrínseca e valiosos momentos de discussão e aprendizagem.

Aos grandes amigos Carlos Da Silva e em especial Adriana Da Silva, por me apoiarem e me dar todo suporte em Richmond-VA, EUA.

Aos meus amigos Gabriel Spolzino, Daniel Nagata, Matheus Mazeli, Matheus Fernandes e especialmente Vitor de Matos Bueno que me ajudaram e auxiliaram nessa grande etapa da minha vida.

Ao meu grande amigo João Fernandes Neto pela correção ortográfica, ideias sugeridas desta dissertação e por toda sua amizade.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e à Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza pelas colaborações prestadas no exame geral de qualificação.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta jornada.

À Irani, Rita, Ana, Max e a todos os demais funcionários do serviço técnico da Biblioteca desta Faculdade pelo apoio.

A todas as funcionárias da secretaria de pós-graduação, por todo apoio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para minha formação e para que este trabalho se concretizasse.

Ao grupo União Química pela doação do norfloxacino substância química de referência e comprimidos.

Ao grupo Galena – Química Farmacêutica LTDA, pela doação do norfloxacino, matéria-prima.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (período: 03-07/2011) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- processo n° 2010/13335-2) (período: 08/2011-02/2013) pela concessão da bolsa de mestrado.

*O SEGREDO DE PROGREDIR É COMEÇAR.
O SEGREDO DE COMEÇAR É DIVIDIR AS TAREFAS ÁRDUAS
E COMPLICADAS EM TAREFAS PEQUENAS E FÁCEIS DE
EXECUTAR, E DEPOIS COMEÇAR PELA PRIMEIRA.*

MARK TWAIN

RESUMO

O norfloxacino é uma fluoroquinolona de segunda geração derivada do ácido nalidíxico. Como as demais fluoroquinolonas, o norfloxacino atua por inibição da DNA-girase bacteriana, complexo enzimático que participa do processo de replicação do DNA bacteriano e também inibe a topoisomerase tipo IV do DNA bacteriano. Esta fluoroquinolona é utilizada para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo *Enterobacteriaceae* e espécies *Pseudomonas*-resistentes e também alguns micro-organismos Gram-positivos. A literatura apresenta alguns métodos de análise para norfloxacino em fluidos biológicos, águas subterrâneas, alimentos e formas farmacêuticas. Com base nestas considerações, este trabalho objetiva desenvolver ensaios para análise qualitativa de norfloxacino utilizando espectrofotometria na região do visível, análise térmica, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar e outros métodos gerais para caracterização da SQR e comprimidos de norfloxacino. Métodos analíticos foram desenvolvidos e validados para a quantificação deste fármaco como: (1) espectrofotometria na região do visível, comprimento de onda de detecção 520 nm, com faixa linear de 95,0 a 120,0 µg/mL utilizando ácido clorânico 0,1% como reagente, com exatidão de 102,48%; (2) cromatografia líquida de alta eficiência, com comprimento de onda de detecção de 277 nm, fase móvel composta por solução aquosa de ácido acético 5% e metanol (80:20 v/v), obtendo-se tempo de retenção médio de 5,7 minutos e capacidade de separação de produtos de degradação. A faixa linear avaliada foi de 10,0 a 30,0 µg/mL, com exatidão de 103,96%; (3) Eletroforese Capilar, validado utilizando-se como eletrólito, tampão de tetraborato de sódio 30 mM a pH 9,0 e capilar de sílica fundida de 48,5 cm, sendo 40,0 cm efetivos, com 75 µm de diâmetro interno. A faixa linear avaliada foi de 5,0 a 30,0 µg/mL, com exatidão de 101,31%; (4) método microbiológico turbidimétrico, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, na faixa de concentração de 25, 50 e 100,0 µg/mL com exatidão de 100,74%. Todos os parâmetros de validação cumpriram as exigências dos principais guias e compêndios oficiais. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferenças estatísticas para um nível de significância de 5%. Para estudos de complexação do norfloxacino com β-ciclodextrina, através dos sistemas maceração, moagem conjunta e liofilização, a caracterização foi realizada por diagrama de solubilidade de fases, dissolução intrínseca, análise térmica, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X e análise

microbiológica dos sistemas obtidos. A melhor complexação foi obtida pelo sistema de liofilização e todos os complexos apresentaram atividade microbiana (MF = 97,18%; AM = 89,52%; LIOF = 96,57%) avaliada pelo método microbiológico turbidimétrico desenvolvido e validado. Finalmente, as três formas polimórficas descritas para norfloxacino foram recristalizadas e submetidas ao teste microbiológico turbidimétrico validado. Os resultados demonstram que o polimorfo na forma B (107,66%) apresentou maior atividade microbiana do que as formas A e C (91,5% e 57,87%) respectivamente.

Palavras-chave: fluoroquinolona, norfloxacino, controle de qualidade, métodos analíticos, espectrofotometria na região do visível, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, doseamento microbiológico, complexos com β -ciclodextrina, polimorfismo.

ABSTRACT

Norfloxacin is a second-generation fluoroquinolone derivate of nalidixic acid. Like other fluoroquinolones, norfloxacin acts by inhibiting DNA gyrase, the enzyme complex that participates in the process of bacterial DNA replication and also inhibit topoisomerase IV type of bacterial DNA. This fluoroquinolone is used in treatment of urinary tract infections caused by Gram-negative bacteria, including *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas*-resistant species and also by Gram-negative microorganisms. The literature describes some methods to analyses norfloxacin in biologic fluids, groundwater, foods and pharmaceutical forms. Based on these considerations, this work aims to develop assays for qualitative analysis of norfloxacin using visible spectrophotometry, thermal analysis, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and other general methods for the characterization of API and tablets of norfloxacin. Analytical methods were developed and validated for the quantification of this drug as: (1) visible spectrophotometry, detection wavelength 520 nm with a linear range from 95.0 to 120.0 $\mu\text{g/mL}$ using chloranilic acid 0.1% as a reagent, with an accuracy of 102.48%; (2) high performance liquid chromatography with detection wavelength of 277 nm, mobile phase composed of aqueous 5% acetic acid and methanol (80:20 v/v) obtaining an average retention time of 5.7 minutes and separation capability degradation products. The linear range was measured from 10.0 to 30.0 $\mu\text{g/mL}$, with accuracy (103.96%); (3) Capillary electrophoresis was validated using a solution of 30 mM sodium tetraborate buffer pH 9.0 as the electrolyte and a fused silica capillary of 48.5 cm, with 40.0 cm effective, and 75 μm of diameter. The linear range was evaluated from 5.0 to 30.0 $\mu\text{g/mL}$, with accuracy 101.31%; (4) microbiological turbidimetric method using micro-organism *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, with a linear range of 25, 50 and 100.0 $\mu\text{g/mL}$ with an accuracy of 100.74%. All validation parameters achieved the requirements of the major guidelines and official compendia. The developed methods were not statistically different for a significant level of 5%. For studies of norfloxacin complexation with β -cyclodextrin systems through maceration, grinding and lyophilization, the characterization was performed by phase solubility diagram, intrinsic dissolution, thermal analysis, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, X ray diffraction and microbiological analysis of the systems obtained. The best complexation by the system was freeze-drying and all complex showed microbial activity (MF = 97.18%, AM = 89.52%, LIOF = 96.57%) assessed by turbidimetric

microbiological method developed and validated. Finally, the three polymorphic forms described for norfloxacin were recrystallized and subjected to microbiological turbidimetric test validated. The results show that the polymorph in the form B (107.66%) has higher microbial activity of the forms A and C (91.5% and 57.87%) respectively.

Keywords: fluoroquinolone, norfloxacin, quality control, analytical methods, spectrophotometry in the visible region, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, microbiological assay, complexes with β -cyclodextrin, polymorphism.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química numerada do ácido nalidíxico.....	35
Figura 2	Estrutura química de uma fluorquinolona interagindo com o DNA.....	38
Figura 3	Estrutura química do norfloxacino (CAS: 70458-96-7).....	39
Figura 4	Diferentes protonações do norfloxacino dependentes do pH: a) neutro; b) cátion; c) zwitterion; d) ânion.....	42
Figura 5	Algoritmo de decisões relativo a polimorfismo constante do Guia Q6, parte I.....	64
Figura 6	Estrutura química de norfloxacino.....	67
Figura 7	Comprimido íntegro de norfloxacino.....	73
Figura 8	Variação de peso dos vinte comprimidos de norfloxacino.....	76
Figura 9	Curva de DSC e TG de norfloxacino SQR. Atmosfera de nitrogênio (vazão de 70 mL/min): programação de 0 a 300 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min.....	79
Figura 10	Curva de DSC e TG de norfloxacino comprimidos. Atmosfera de nitrogênio (vazão de 70 mL/min): programação de 0 a 300 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min.....	80
Figura 11	Espectro de absorção de infravermelho de norfloxacino SQR.....	83
Figura 12	Espectro de absorção de infravermelho de norfloxacino comprimidos.....	83
Figura 13	Sobreposição dos espectros na região do infravermelho de norfloxacino padrão, amostra e placebo.....	84
Figura 14	Complexo norfloxacino – ácido cloranílico.....	85
Figura 15	Espectro de absorção da solução de norfloxacino SQR com concentração de 120,0 µg/mL, na região do visível, utilizando ácido cloranílico como reagente.....	87
Figura 16	Cromatografia em camada delgada, sistema metanol:hidróxido de amônio (8:3, v/v), com as respectivas manchas de retenção norfloxacino SQR (P) e comprimidos (A): Rf=0,55.....	89
Figura 17	Cromatografia em camada delgada, sistema metanol:hidróxido de amônio (8:3, v/v), com as respectivas manchas de retenção P (NOR-SQR) e A (AMOSTRA): 0,55 e 0,56; 1 (NOR-SQR degradado) e 2 (amostra degradado): 0,74 e 0,74.....	90
Figura 18	Sobreposição de cromatogramas de norfloxacino SQR (P) e norfloxacino	

	comprimidos (A), nas mesmas concentrações (22,0 µg/mL), para identificação pelo método CLAE Fase móvel: solução de ácido acético 5 %: metanol (80:20, v/v). Fase estacionária: coluna Eclipse Plus C18 Agilant [®] Zorbax, (150 mm x 4,6 mm, 5 µm).....	92
Figura 19	Eletoferograma de padrão interno (PI) moxifloxacino e NOR-SQR (P).....	95
Figura 20	Curva das leituras de absorvância <i>versus</i> diferentes volumes de solução de ácido clorânico a 0,1%, com concentração constante de norfloxacino (120 µg/mL).....	106
Figura 21	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para a solução de norfloxacino-SQR.....	108
Figura 22	Curva analítica de norfloxacino SQR, obtida a 520 nm pelo método espectrofotométrico na região do visível.....	110
Figura 23	Gráfico de resíduos de norfloxacino SQR, obtida através da regressão linear.....	110
Figura 24	Espectro de absorção da solução placebo para verificação de ausência de reação entre os excipientes e ácido clorânico 0,1%.....	113
Figura 25	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 µg/mL, utilizando com fase móvel solução de ácido acético 5%:metanol (80:20).....	124
Figura 26	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 µg/mL, submetido à degradação em meio oxidativo (H ₂ O ₂ 3%). Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul).....	126
Figura 27	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 µg/mL, submetido à degradação em meio básico (NaOH 0,1 M). Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul).....	126
Figura 28	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 µg/mL, submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M). Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul).....	127
Figura 29	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 µg/mL, submetido à degradação em meio neutra. Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul).....	127
Figura 30	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 µg/mL, submetido à degradação fotolítica. Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul).....	128
Figura 31	Cromatograma da solução de norfloxacino SQR (cor preta), comprimidos (cor azul) e solução de placebo (cor verde) na concentração de 22,0 µg/mL obtidos pelo método cromatográfico.....	128
Figura 32	Curva analítica de norfloxacino SQR obtida pelo método cromatográfico,	

	utilizando como fase móvel solução de ácido acético 5% e metanol (80:20 v/v) a 277 nm.....	130
Figura 33	Eletroferograma de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, tempo de migração: padrão interno (PI) de 3,8 minutos e NOR-SQR 4,1 minutos.....	144
Figura 34	Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio oxidativo (H ₂ O ₂ 3%) durante 96 horas.....	146
Figura 35	Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio básico (NaOH 0,1 M) durante 96 horas.....	146
Figura 36	Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) durante 96 horas.....	146
Figura 37	Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio neutro, durante 96 horas.....	147
Figura 38	Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação fotolítica, durante 96 horas.....	147
Figura 39	Eletroferogramas de NOR-SQR com concentração de 20,0 µg/mL e solução de placebo. Tempo de migração: padrão interno (PI) de 3,8 minutos e NOR-SQR 4,1 minutos.....	147
Figura 40	Curva analítica de norfloxacino SQR obtida pelo método eletroforético, utilizando como eletrólito solução tampão tetraborato de sódio 30 mM pH 9,0 a 277 nm.....	149
Figura 41	Curvas analíticas de soluções de norfloxacino SQR e comprimidos, em concentrações de 25, 50 e 100,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico...	163
Figura 42	Estrutura química das principais ciclodextrinas: α-CD; β-CD; γ-CD.....	174
Figura 43	Modelo da estrutura química de ciclodextrina em forma de cone.....	175
Figura 44	Perfil plasmático teórico de uma formulação de um fármaco comparado a uma formulação de um complexo com ciclodextrina.....	178
Figura 45	Esquema das estequiometrias de inclusão ciclodextrina e hóspede. (A) 2:1, (B) 2:2, (C) 1:1, (D) 1:2.....	182
Figura 46	Tipos de diagrama de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármaco com ciclodextrina.....	186
Figura 47	Sistema de disco rotativo (<i>Wood's Apparatus</i>); aparato desmontado e demonstração do sistema no equipamento de dissolução, modelo USP (2012).	188

Figura 48	Sistema de disco fixo; aparato desmontado e sistema configurado no equipamento de dissolução.....	189
Figura 49	Isoterma de solubilidade do norfloxacino/ β -CD em água.....	196
Figura 50	Isoterma de norfloxacino/ β -CD em solução tampão fosfato pH 6,0.....	197
Figura 51	Isoterma de norfloxacino/ β -CD em solução tampão fosfato pH 8,0.....	198
Figura 52	Perfil da velocidade de dissolução do norfloxacino.....	200
Figura 53	Gráficos de calorimetria exploratória diferencial das amostras: β -CD (verde), NOR-MP (vermelho), AM (azul), MF (marrom) e LIOF (rosa).....	201
Figura 54	Gráficos de termogravimetria das amostras: β -CD (verde), NOR-MP (vermelho), AM (azul), MF (marrom) e LIOF (rosa).....	203
Figura 55	Espectro de absorção na região do infravermelho: NOR-MP (a); β -CD (b); LIOF (c); AM (d); MF (e).....	203
Figura 56	Difratograma de 1) Norfloxacino MP, 2) β -CD, 3) Amassado, 4) liofilizado e 5) mescla física.....	204
Figura 57	Fotomicrografia do norfloxacino-MP, aumento 500 vezes.....	205
Figura 58	Fotomicrografia da β -CD, aumento 500 vezes.....	205
Figura 59	Fotomicrografia do complexo obtido por amassado (AM), aumento 500 vezes.....	206
Figura 60	Fotomicrografia do complexo obtido por mescla física (MF), aumento de 500 vezes.....	206
Figura 61	Fotomicrografia do complexo obtido por liofilização (LIOF), aumento de 500 vezes.....	207
Figura 62	Representação gráfica da potência do NOR-MP x os complexos MF, AM e LIOF.....	208
Figura 63	Representação gráfica indicando a potência dos complexos MF, AM, LIOF antes e após 7 horas de degradação em luz UVC.....	208
Figura 64	Ilustração de célula unitária.....	211
Figura 65	Curvas de DSC de formas polimórficas de norfloxacino.....	217
Figura 66	Curvas de TG de formas polimórficas de norfloxacino.....	218
Figura 67	Espectros de infravermelho de formas polimórficas de norfloxacino.....	219
Figura 68	Espectros de RMN ^{13}C das formas polimórficas B e C.....	220

Figura 69	Difratograma do NOR-MP comparado aos difratogramas das formas polimórficas C, B e A.....	221
Figura 70	Fotomicrografia do polimorfo de norfloxacino (forma A) aumento de 1000x.....	222
Figura 71	Fotomicrografia do polimorfo de norfloxacino (forma B) aumento de 1000x.....	222
Figura 72	Fotomicrografia do polimorfo de norfloxacino (forma C) aumento de 1000x.....	223
Figura 73	Representação gráfica da potência do NOR-MP x polimorfos A, B e C.....	223

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das quinolonas utilizadas em medicina humana.....	36
Tabela 2	Categorias dos testes submetidos à validação.....	46
Tabela 3	Ensaio necessários para validação segundo categoria.....	46
Tabela 4	Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de norfloxacino.....	50
Tabela 5	Sistemas de eletroforese capilar referenciados na literatura para análise de norfloxacino.....	55
Tabela 6	Métodos descritos na literatura para análise de norfloxacino em produtos farmacêuticos e fluidos biológicos.....	59
Tabela 7	Variação de peso de comprimidos segundo a Farmacopeia Brasileira (2010).....	74
Tabela 8	Relação do peso individual dos comprimidos de norfloxacino, o peso médio e o respectivo desvio padrão relativo.....	75
Tabela 9	Valores da faixa de fusão obtidos para norfloxacino SQR e comprimidos.....	77
Tabela 10	Valores do teor de umidade da amostra de norfloxacino comprimidos.....	82
Tabela 11	Condições analíticas utilizadas no desenvolvimento do método por eletroforese capilar.....	94
Tabela 12	Formulação simulada para obtenção do placebo de norfloxacino comprimidos.....	98
Tabela 13	Valores obtidos para construção da curva de Ringbom para NOR-SQR.....	100
Tabela 14	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do visível.....	104
Tabela 15	Obtenção da curva de Ringbom para determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do visível para análise de norfloxacino a 520 nm.....	107
Tabela 16	Valores de absorvância determinados em 520 nm para a obtenção da curva analítica de norfloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico na região do visível.....	109
Tabela 17	Análise de variância de absorvância determinados da curva analítica de norfloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do visível.....	111
Tabela 18	Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método	

	espectrofotométrico para análise de norfloxacino comprimidos.....	112
Tabela 19	Determinação da exatidão do método analítico para análise de norfloxacino comprimidos por espectrofotometria na região do visível.....	112
Tabela 20	Avaliação da robustez do método analítico para análise de norfloxacino por espectrofotometria na região do visível.....	114
Tabela 21	Parâmetros estabelecidos para a determinação de norfloxacino em comprimidos pelo método CLAE.....	118
Tabela 22	Preparo de soluções para o teste de recuperação do método CLAE.....	122
Tabela 23	Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de norfloxacino.....	125
Tabela 24	Valores das áreas referentes ao pico de norfloxacino SQR para construção da curva analítica do método CLAE.....	129
Tabela 25	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de norfloxacino SQR, utilizado o método por CLAE.....	131
Tabela 26	Valores determinados para a precisão interdias e entre-analistas do método para norfloxacino comprimidos por CLAE.....	132
Tabela 27	Determinação da exatidão do método analítico para a análise de norfloxacino pelo método de CLAE.....	132
Tabela 28	Parâmetros da avaliação da robustez do método cromatográfico para análise de norfloxacino.....	134
Tabela 29	Preparo de soluções para o teste de recuperação método eletroforético.....	142
Tabela 30	Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema eletroforético desenvolvido para quantificação de norfloxacino.....	145
Tabela 31	Valores das áreas referentes ao pico de norfloxacino-SQR para construção da curva analítica do método eletroforético.....	148
Tabela 32	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de norfloxacino SQR, utilizado o método eletroforético.....	149
Tabela 33	Valores determinados para a precisão interdias e entre-analista do método para norfloxacino comprimidos pelo método eletroforético.....	150
Tabela 34	Determinação da exatidão do método analítico para análise de norfloxacino pelo método eletroforético.....	151
Tabela 35	Parâmetros de avaliação da robustez do método eletroforético para análise de norfloxacino.....	152
Tabela 36	Perdas percentuais encontradas para a solução de NOR-SQR na concentração	

	de 30 µg/mL, obtidas pelo método de EC indicativo de estabilidade.....	153
Tabela 37	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – turbidimétrico para determinação de norfloxacino em comprimidos.....	156
Tabela 38	Parâmetros estabelecidos para a determinação de norfloxacino em comprimidos pelo método turbidimétrico.....	157
Tabela 39	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método microbiológico turbidimétrico.....	161
Tabela 40	Leitura das absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade para avaliação de norfloxacino comprimidos, pelo método turbidimétrico.....	162
Tabela 41	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de norfloxacino SQR, utilizando o método turbidimétrico.....	164
Tabela 42	Valores determinados para a potência de norfloxacino em comprimidos na avaliação da precisão do método turbidimétrico.....	165
Tabela 43	Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico.....	165
Tabela 44	Valores do teste de especificidade do método turbidimétrico.....	166
Tabela 45	Resultados da avaliação da robustez do método analítico de norfloxacino por turbidimetria.....	167
Tabela 46	Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando CLAE, EC, espectrofotometria na região do visível e doseamento microbiológico pelo método turbidimétrico.....	169
Tabela 47	Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de norfloxacino comprimidos pelos métodos desenvolvidos.....	169
Tabela 48	Especialidades farmacêuticas contendo complexo de inclusão com ciclodextrinas.....	173
Tabela 49	Propriedades físico-químicas da α , β , γ ciclodextrina.....	176
Tabela 50	Força de ligação entre a molécula hóspede e a CD conforme o valor de K_C	187
Tabela 51	Esquema de preparação dos tubos de ensaio para o diagrama de solubilidade em água purificada, tampão pH 6,0 e pH 8,0.....	193
Tabela 52	Parâmetros de escolha para o teste de dissolução intrínseca.....	194
Tabela 53	Dados referentes à solubilidade do norfloxacino nos diferentes meios, o valor de constante de estabilidade ($K_C M^{-1}$), a eficiência de complexação (CE) e o	

	perfil de isoterma, 25 °C.....	199
Tabela 54	Resumo das três determinações de NOR-MP, através do método da VDI.....	199
Tabela 55	Resumo das três determinações da amostra de maceração e moagem conjunta, através do método da VDI.....	200
Tabela 56	Temperatura de perda de água dos gráficos de termogravimetria: β -CD, NOR-MP, AM, MF e LIOF.....	202
Tabela 57	Lista de medicamentos que apresentam polimorfismo registrados na ANVISA.....	214

LISTA DE ABREVIACOES

A	Amostra
ABS	Absorvância
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASC	rea Sob a Curva
BCS	<i>Biopharmaceutical Classification System</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CD	Ciclodextrina
CL	Quimioluminescência
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
CE	Eficiência de complexao
Comp.	Comprimido
C _{MAX}	Concentrao plasmática máxima
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
Da	Dalton
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difrao de raios X
EC	Eletroforese Capilar
F	Fármaco
FL	Espectro de fluorescência
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
FQs	Fluorquinolonas
FM	Fase Móvel
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IV	Infravermelho
K _C	Constante de associao

KBr	Brometo de potássio
K	Fator de capacidade
L	Ligante
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
LIOF	Liofilizado
MECK	Cromatografia Eletrocínética Micelar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mescla Física
MP	Matéria-prima
MOX-PI	Moxifloxacino Padrão Interno
NOR	Norfloxacino
NOR-MP	Norfloxacino Matéria-prima
NOR-SQR	Norfloxacino Substância Química de Referência
N	Número de pratos
P	Padrão
PL	Placebo
PI	Padrão Interno
pKa	Constante de associação
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SQR	Substância Química de Referência
S _{AC}	Solução de ácido cloranílico
S _{NOR}	Solução de norfloxacino
TF	Solução Tampão Fosfato
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta; detecção por UV
v/v	Volume por volume
VIS	Visível
α -CD	Ciclomalto-hexanose; alfa-ciclodextrina
β -CD	Ciclomalto-heptanose; beta-ciclodextrina
γ -CD	Ciclomalto-octanose; gama-ciclodextrina

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	23
1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1 Introdução e justificativa.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivos gerais.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	34
3.1 Introdução.....	35
3.2 Aplicações clínicas.....	40
3.3 Farmacodinâmica do norfloxacino.....	41
3.4 Farmacocinética do norfloxacino.....	42
3.5 Mecanismo de resistência.....	43
3.6 Métodos analíticos.....	44
3.7 Estudos de complexão.....	62
3.8 Estudos de polimorfismo.....	62
4 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS.....	66
4.1 Descrição geral do norfloxacino.....	67
4.2 Substância química de referência (SQR).....	68
4.3 Produto farmacêutico comprimido.....	68
4.4 Matéria prima.....	68
4.5 Padrão Interno.....	68
4.6 Micro-organismos.....	68
4.7 Equipamentos.....	68

4.8	Solventes e reagentes.....	70
5	ANÁLISE QUALITATIVA.....	71
5.1	Introdução.....	72
5.2	Características organolépticas de norfloxacino SQR.....	72
5.2.1	Método.....	72
5.2.2	Resultados e discussão.....	73
5.3	Características físicas do norfloxacino comprimidos.....	73
5.3.1	Método.....	73
5.3.2	Resultados e discussão.....	73
5.4	Determinação do peso médio dos comprimidos de norfloxacino.....	73
5.4.1	Método.....	74
5.4.2	Resultados e discussão.....	74
5.5	Determinação da faixa de fusão.....	76
5.5.1	Método.....	76
5.5.2	Resultados e discussão.....	77
5.6	Análise térmica de norfloxacino.....	77
5.6.1	Método.....	78
5.6.2	Resultados e discussão.....	79
5.7	Determinação de umidade.....	81
5.7.1	Método.....	81
5.7.2	Resultados e discussão.....	81
5.8	Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho.....	82
5.8.1	Método.....	82
5.8.2	Resultados e discussão.....	83
5.9	Espectrofotometria de absorção na região do visível.....	84
5.9.1	Método.....	86

5.9.2	Resultados e discussão.....	87
5.10	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	87
5.10.1	Método.....	88
5.10.2	Resultados e discussão.....	89
5.11	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	90
5.11.1	Método.....	91
5.11.2	Resultados e discussão.....	92
5.12	Eletroforese capilar (EC).....	93
5.12.1	Método.....	93
5.12.2	Resultados e discussão.....	94
6	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	96
6.1	Espectrofotometria de absorção na região de visível (VIS).....	97
6.1.1	Material.....	97
6.1.2	Método.....	99
6.1.3	Validação do método.....	101
6.1.4	Resultados.....	105
6.1.5	Discussão.....	114
6.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	115
6.2.1	Material.....	116
6.2.2	Método.....	118
6.2.3	Validação do método.....	119
6.2.4	Resultados.....	123
6.2.5	Discussão.....	134
6.3	Eletroforese Capilar (EC).....	136
6.3.1	Material.....	137
6.3.2	Método.....	139

6.3.3	Validação do método.....	139
6.3.4	Resultados.....	143
6.3.5	Discussão.....	152
6.4	Método microbiológico – Ensaio turbidimétrico.....	154
6.4.1	Material.....	155
6.4.2	Método.....	159
6.4.3	Validação.....	160
6.4.4	Resultados.....	162
6.4.5	Discussão.....	167
6.5	Análise comparativa dos métodos.....	168
7	ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO FÁRMACO NORFLOXACINO COM β-CICLODEXTRINA.....	171
7.1	Ciclodextrinas.....	172
7.2	Material.....	191
7.3	Métodos.....	193
7.4	Resultados.....	196
7.5	Discussão.....	209
8	ESTUDO DE POLIMORFISMO.....	210
8.1	Polimorfismo.....	211
8.2	Material.....	215
8.3	Método.....	215
8.4	Resultados.....	217
8.5	Discussão.....	224
9	DISCUSSÃO GERAL.....	225
10	CONCLUSÕES.....	228
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	231

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral e justificativa

Dentre as diferentes classes dos produtos farmacêuticos, os antimicrobianos estão entre os mais comumente prescritos. O uso indiscriminado de antimicrobianos, e, muitas vezes, incorreto desses agentes, pode levar conseqüentemente ao surgimento de patógenos resistentes. O sucesso da terapia antimicrobiana está relacionado à concentração do antimicrobiano no local da infecção, devendo ser suficiente para inibir o crescimento do micro-organismo responsável pela infecção (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Em 1960, surgiram as primeiras quinolonas, com a introdução do ácido nalidíxico na prática clínica. Em meados de 1980, com acréscimo de um átomo de flúor na posição C-6 do anel quinolônico e um grupo piperazila em posição C-7, surgiram as fluoroquinolonas, conferindo um amplo e potente espectro de atividade antibacteriana (APPELBAUM & HUNTER, 2000).

Em 31 de outubro de 1986, a *Food and Drug Administration* (FDA) sob registro *New Animal Drug Application* (NADA) 019384, aprovou o uso do norfloxacino nos Estados Unidos, que foi desenvolvido e patenteado em 1978 pelo Laboratório Merck Sharp & Dohme; foi a primeira fluoroquinolona que apresentou potente atividade antibacteriana, indicado para o tratamento do trato urinário (FDA, 2012c).

No Brasil, o norfloxacino foi liberado para comercialização, na forma farmacêutica de comprimidos, para o tratamento de humanos, em 30 de junho de 1983 para a dosagem de 400 mg, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2012).

Foram encontrados diversos trabalhos que avaliam as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, interações medicamentosas e efeitos adversos do norfloxacino, assim como, métodos analíticos para matrizes biológicas. Métodos de análise padronizados em compêndios oficiais como cromatografia líquida de alta eficiência (FB 4, 2001; BF, 2011; USP 35, 2012), titulação potenciométrica (FB 4, 2001; F. Portuguesa, 2005; BF, 2011; EP, 2011; USP 35, 2012), espectrofotométrico (FB 4, 2001; USP 35, 2012), microbiológico difusão em ágar (FB 4, 2001) e cromatografia em camada delgada (FB 4, 2001; F. Portuguesa, 2005; EP, 2011) estão descritos. Entretanto, o preparo de amostra e algumas técnicas como método microbiológico são de complexa execução, muitas vezes demandam um grande tempo

de análise e, portanto, faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de novas técnicas, com vantagens como: menor gasto de solvente, menor tempo de análise com menor geração de resíduos para o meio ambiente.

O presente trabalho contempla o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de norfloxacino como: (1) método cromatográfico, visando menor utilização de solventes orgânicos e ausência da utilização de solução tampão para uma melhor vida útil da coluna cromatográfica; (2) método eletroforético, uma vez que esta técnica é relativamente nova podendo utilizar quantidades mínimas de reagentes para a quantificação de fármacos, possui várias vantagens que podem ser diferenciais na escolha de um método analítico; (3) método espectrofotométrico na região do visível, objetivando método de baixo custo e de fácil execução; e (4) método microbiológico - turbidimétrico, visando rapidez para a determinação de potência do produto.

O norfloxacino é considerado pela *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) um fármaco de classe IV, sendo uma fluoroquinolona pouco solúvel em água. Em geral, presume-se que a formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas (CDs), leva ao aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução de princípios ativos lipofílicos, podendo refletir no aumento da biodisponibilidade e consequentemente atingindo mais rapidamente os micro-organismos, inibindo a DNA-girase e a topoisomerase II nas enzimas bacterianas (KAMAL DUA et al., 2007). Os sistemas de complexação foram desenvolvidos e caracterizados pelas técnicas de diagrama de solubilidade de fases, dissolução intrínseca, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios-X, espectrofotometria na região do infravermelho, e microscopia eletrônica de varredura.

Estudos recentes demonstram que o norfloxacino apresenta polimorfos que podem modificar o comportamento da molécula quando em meio biológico, inclusive podendo alterar sua biodisponibilidade (BARBAS et al., 2007). No intuito de pesquisar e avaliar o comportamento microbiológico das formas polimórficas do norfloxacino, foram realizados processos para obtenção da recristalização e então efetuada a caracterização por meio de técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios-X, espectrofotometria na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

- ✓ Desenvolver e validar novos métodos analíticos para o controle de qualidade de norfloxacino comprimidos;
- ✓ Realizar estudos de complexação do NOR-MP com β -ciclodextrina;
- ✓ Avaliar a influência do polimorfismo na atividade antimicrobiana.

2.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Realizar reação de identificação de norfloxacino baseado em suas características estruturais;
- ✓ Realizar análise térmica de norfloxacino SQR e forma farmacêutica comprimido;
- ✓ Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação de norfloxacino e seus produtos de degradação;
- ✓ Desenvolver método por espectrofotometria na região do visível (VIS), região do infravermelho (IV), eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação de norfloxacino SQR e forma farmacêutica comprimido;
- ✓ Desenvolver e validar método de análise para determinação quantitativa de norfloxacino na forma farmacêutica comprimido, por espectrofotometria na região do visível;
- ✓ Desenvolver e validar método microbiológico – turbidimétrico para doseamento de norfloxacino na forma farmacêutica comprimido;
- ✓ Desenvolver e validar método de análise para determinação quantitativa de norfloxacino na forma farmacêutica comprimido, por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar;
- ✓ Realizar estudos de complexação com β -ciclodextrina através do diagrama de solubilidade para obter a estequiometria do composto. Caracterizar suas diferentes formas de complexação, aplicar os sistemas de complexação no ensaio microbiológico;
- ✓ Obter diferentes polimorfos, caracterização e avaliação microbiológica dos polimorfos obtidos no ensaio microbiológico – turbidimétrico.

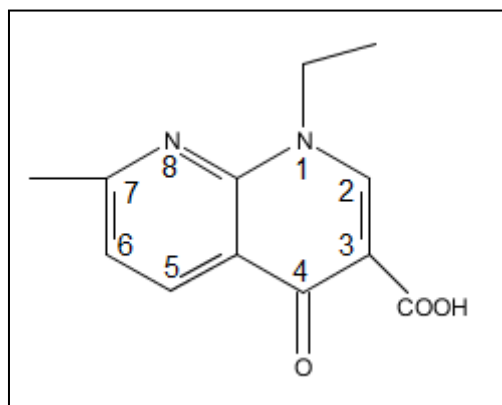
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Introdução

As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos relacionados de antimicrobianos derivados do ácido nalidíxico. A classe das quinolonas tem despertado interesse desde a sua descoberta em 1962, tendo sido patenteada por Leshner e colaboradores (APPELBAUM & HUNTER, 2000; ANDRIOLE, 2005). Quinolonas são incomuns entre os antimicrobianos na medida em que não foram isoladas de organismos vivos, mas sintetizadas quimicamente. A primeira quinolona, “ácido nalidíxico”, foi derivada da substância antimalárica cloroquina. Posteriormente, antimicrobianos foram obtidos pela introdução de um átomo de flúor em posição C-6 e um grupo piperazínico em posição C-7, conferindo amplo e potente espectro de ação contra os micro-organismos, obtendo-se, assim, o norfloxacin, patenteado em 1978 (SOUZA et al., 2004; BOLON, 2011).

Desde o descobrimento dos efeitos terapêuticos do ácido nalidíxico, modificações em seu núcleo foram efetuadas, a fim de melhorar sua potência, seu espectro de ação e reduzir as reações dos efeitos adversos. O núcleo inclui um grupo etil na posição N-1, um grupo carboxílico em C-3, um átomo de oxigênio em C-4 e um átomo de flúor em C-6. De todas as posições, a adição de um átomo de flúor na posição 6 foi uma mudança que ampliou substancialmente o espectro de ação das quinolonas (Figura 1) (WRIGHT et al., 2000). Esta modificação também aumentou a biodisponibilidade oral e a penetração nos tecidos das moléculas.

Figura 1. Estrutura química numerada do ácido nalidíxico



O tratamento de infecções sistêmicas com o ácido nalidíxico agindo contra muitas bactérias Gram-negativas, como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella* e *Proteus* (OWENS & AMBROSE, 2000). Porém, devido ao seu estreito espectro antibacteriano, baixa penetrabilidade tecidual, resistência bacteriana e frequentes efeitos adversos no sistema nervoso central, não foi um fármaco de escolha, mas contribuiu para as modificações estruturais que subsequentemente melhoraram as propriedades terapêuticas e reduziram efeitos adversos das quinolonas (O'DONNELL & GELONE, 2000).

As quinolonas de uso humano dividem-se em 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações (Tabela 1) (BALL, 2000; ANDRIOLE, 2005; SMITA et al., 2011; SOUZA et al., 2012).

Tabela 1. Classificação das quinolonas utilizadas em medicina humana

QUINOLONAS			
1 ^a Geração	FLUOROQUINOLONAS		
	2 ^a Geração	3 ^a Geração	4 ^a Geração
Cinoxacina			
Flumequina	Ciprofloxacino	Balofloxacino	Clinafloxacino
Ácido Nalidíxico	Enoxacino	Gatifloxacino	Garenoxacino
Ácido Oxolínico	Fleroxacino	Grepafloxacino	Gemifloxacino
Ácido Pipemídico	Lomefloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino
Rosoxacina	Nadifloxacino	Pazufloxacino	Prulifloxacino
Acrosoxacino	Ofloxacino	Esparfloxacino	Sitafloxacino
Droxacino	Norfloxacino	Temafloxacino	Trovafloxacino
Tioxacino	Pefloxacino	Tosufloxacino	Alatrofloxacino
Miloxacino	Rufloxacino		Ulifloxacino

Fonte: ANDRIOLE, 2005; SOUZA et al., 2012.

As fluoroquinolonas (FQs) são antimicrobianos sintéticos com atividade contra micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos. A maioria é administrada por via oral, sendo bem absorvidas, atingindo concentrações terapêuticas na maioria dos líquidos corporais e são parcialmente metabolizadas no fígado. A via renal é a principal via de eliminação, com aproximadamente 30% a 60% de uma dose oral excretada

inalterada pela urina. Os pacientes com insuficiência renal devem receber dosagens reduzidas (AMBROSE et al., 2001; GOODMAN & GILMAN, 2006).

As FQs têm demonstrado eficácia clínica no tratamento de infecções complicadas das vias urinárias, infecções respiratórias causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, otite externa invasiva causada por *P. aeruginosa*, em portadores de osteomielite bacilar Gram-negativa crônica, erradicação de *Streptococcus typhi*, gonorreia (para pacientes que não podem fazer o uso de penicilina, é administrado uma dose única de acrosoxacino de 1ª geração), prostatite bacteriana, cervicite (FLÓREZ et al., 1997; DUAN & YUAN, 2001; RANG et al., 2001; RUBIN et al., 2008), infecções do tecido liso, infecções respiratórias, meningite, sinusite, infecções de articulações ósseas, infecções recorrentes ou crônicas por *Pseudomonas* (VILCHEZ et al., 2001). Além disso, podem ser usadas para tuberculose resistente a múltiplos fármacos, infecções pelo complexo do *Mycobacterium avium* em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), tuberculose e febre em pacientes com câncer neutropênico (GOODMAN & GILMAN, 2006; DE-SOUZA, 2009; TAVARES, 2009).

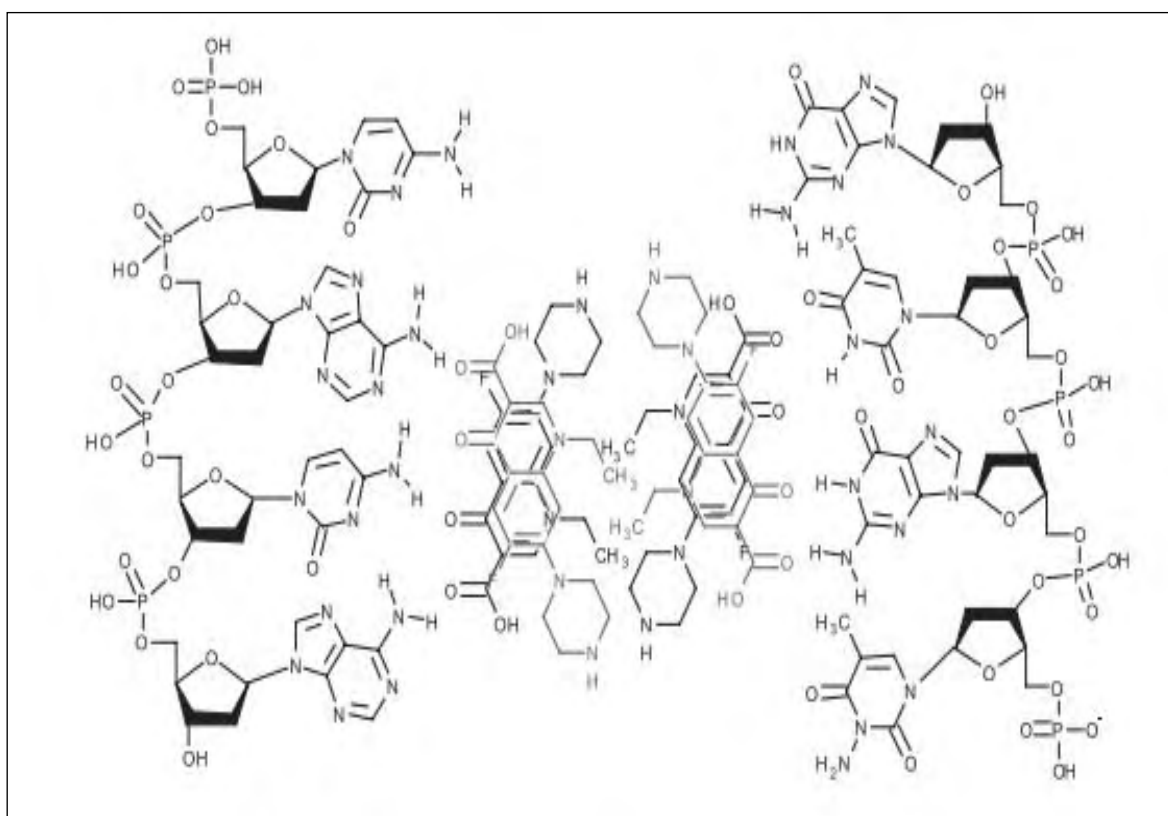
As FQs também são comumente usadas para o tratamento e prevenção de doenças veterinárias e na produção de alimentos para animais (BARBOSA et al., 1997; SIEFERT et al., 1999). O uso das quinolonas na medicina veterinária trouxe um problema mundial bastante sério, devido à resistência bacteriana aos antimicrobianos, que são os mesmos usados para a medicina humana. Existe o interesse científico quanto à administração de doses terapêuticas e subterapêuticas de antimicrobianos para os animais, principalmente devido ao surgimento e à difusão de vários agentes patogênicos resistentes aos antibióticos de bactérias zoonóticas. Esta questão vem sendo objeto de debates acalorados ao longo dos anos, no entanto, ainda não há consenso total sobre a importância do uso de antimicrobianos em animais, ou de resistência em bactérias isoladas de animais, no desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibióticos entre bactérias patogênicas humanas (DERMOTT et al., 2002; KOTRETSOU et al., 2004).

De uma maneira geral, o mecanismo de ação das FQs se dá pela inibição da DNA-girase (Gram-negativa) bacteriana (topoisomerase II) e topoisomerase II (Gram-

positiva), a enzima que produz superespiralamento negativo no ácido desoxirribonucleico (DNA). Esses fármacos são seletivos para a enzima bacteriana. A inibição se dá nas subunidades A da DNA-girase, enzima responsável pela replicação da dupla cadeia do DNA cromossômico (CHECCHET et al., 1998; RANG et al., 2007; ZHANG et al., 2007; KAMAT, 2005).

A Figura 2 ilustra a interação da molécula de uma quinolona com o DNA. As moléculas do fármaco se ligam ao DNA, induzidos pela DNA-girase, durante o passo de abertura e espiralamento, através das interações das pontes de hidrogênio com as bases do DNA, interações $\pi \rightarrow \pi$ entre anéis da quinolona e interações hidrofóbicas entre grupos etila de N1 (CECCHETTI et al., 1998; MITSCHER, 2005; LEYVA & LEYVA, 2008).

Figura 2. Estrutura química de uma fluorquinolona interagindo com o DNA

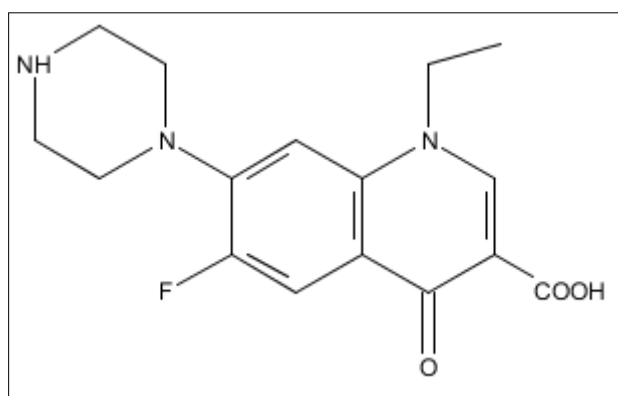


Fonte: LEYVA & LEYVA, 2008.

As FQs no organismo humano são fortemente afetadas por suas propriedades físico-químicas, em particular por suas propriedades de ionização em função do pH. A presença de centros carregados em muitos fármacos pode ser essencial para a sua atividade biológica e sua passagem através das membranas celulares. As FQs são moléculas anfotéricas, possuem grupos ionizáveis e exibem características zwitteriônicas (*zwitterions* – compostos químicos eletricamente neutros, mas que possuem cargas opostas em diferentes átomos não-adjacentes); essa característica representa um tipo particular de soluto com interações intra e intermoleculares que influenciam diretamente suas propriedades físico-químicas (PISTOS et al., 2005; MARTINEZ et al., 2006).

O norfloxacinó foi a primeira fluoroquinolona para o uso na medicina clínica, seguido logo depois pelo ciprofloxacino em meados dos anos 1980. O norfloxacinó, uma fluoroquinolona de segunda geração (Figura 3), com nome químico ácido 1- etil-6-flúor-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolino carboxílico, é uma fluoroquinolona zwitteriônica em pH fisiológico usada por vários anos em humanos e animais no tratamento de várias bactérias (VIJIAN, 2008). A forma farmacêutica em comprimido contendo norfloxacinó foi aprovada pelo FDA sob o registro NADA 019384 em 31 de outubro de 1986 e em 26 de abril de 2000 NADA 074690 (FDA, 2012c). No Brasil, o produto foi liberado para comercialização, na forma farmacêutica de comprimidos, para tratamento de humanos, em 30 de junho de 1983 para a dosagem de 400 mg, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012).

Figura 3. Estrutura química do norfloxacinó (CAS: 70458-96-7)



Este fármaco apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{18}FN_3O_3$, conforme CAS Register Number 70458-96-7 e peso molecular igual a 319,33 g/mol. O norfloxacino tem duas constantes de dissociação (pKa) $pK_{a1} = 6,34$ e $pK_{a2} = 8,75$ (BARBOSA et al., 1997; O'NEIL, 2006; ESPONDA et al., 2009). Os valores de pKa são referentes à dissociação dos grupos 3-quinolino carboxílico e 7-(1-piperazinil), respectivamente. O coeficiente de partição deste fármaco é 1,245 (MEDVEDOVICI et al., 2008). O norfloxacino entra em fusão na faixa de 220 a 221 °C (O'NEIL, 2006).

3.2 Aplicações clínicas

A infecção é um processo infeccioso que envolve micro-organismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários, onde ocorre a penetração do agente infeccioso no corpo do hospedeiro e então há proliferação dos micro-organismos com consequente sintomas devido a tal processo infeccioso. Um micro-organismo capaz de causar infecção é, com frequência, referido como patogênico. A patogenicidade no qual o micro-organismo pode causar dano a um hospedeiro infectado é conhecida como virulência (KONOMAN et al., 1989; GUIMARÃES et al., 2010).

O corpo humano é um verdadeiro nicho ambiental para as bactérias, capazes de fornecer calor, umidade e nutrientes, essenciais para o crescimento bacteriano. Assim, a obtenção de determinadas características genéticas pode tornar as bactérias capazes de penetrar no corpo do ser humano, ter acesso aos alimentos e também conseguir evadir-se do processo de eliminação pela resposta imunológica do hospedeiro. Dessa maneira, toda essa adaptação da bactéria pode resultar em danos e problemas à saúde do hospedeiro (MURRAY et al., 2002).

O norfloxacino é utilizado para o tratamento de doenças provocadas por micro-organismos Gram-negativos e patógenos atípicos, causando infecções gênitó-urinárias (cistite, pielite, cistopielite, pielonefrite, prostatite crônica, epididimite e as associadas com cirurgia urológica, bexiga neurogênica), gastroenterites agudas bacterianas causadas por micro-organismos sensíveis, cervicites gonocócicas causadas por cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtoras ou não de penicilinase, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus*

faecalis, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, para o tratamento de infecções oculares superficiais envolvendo a córnea ou a conjuntiva e contra febre tifoide (GRANGÉ et al., 1998; HENRY, 1999; RONER et al., 2004), e alguns organismos Gram-positivos (excluindo *Streptococcus pneumoniae*) (WAGENLEHNER et al., 2011).

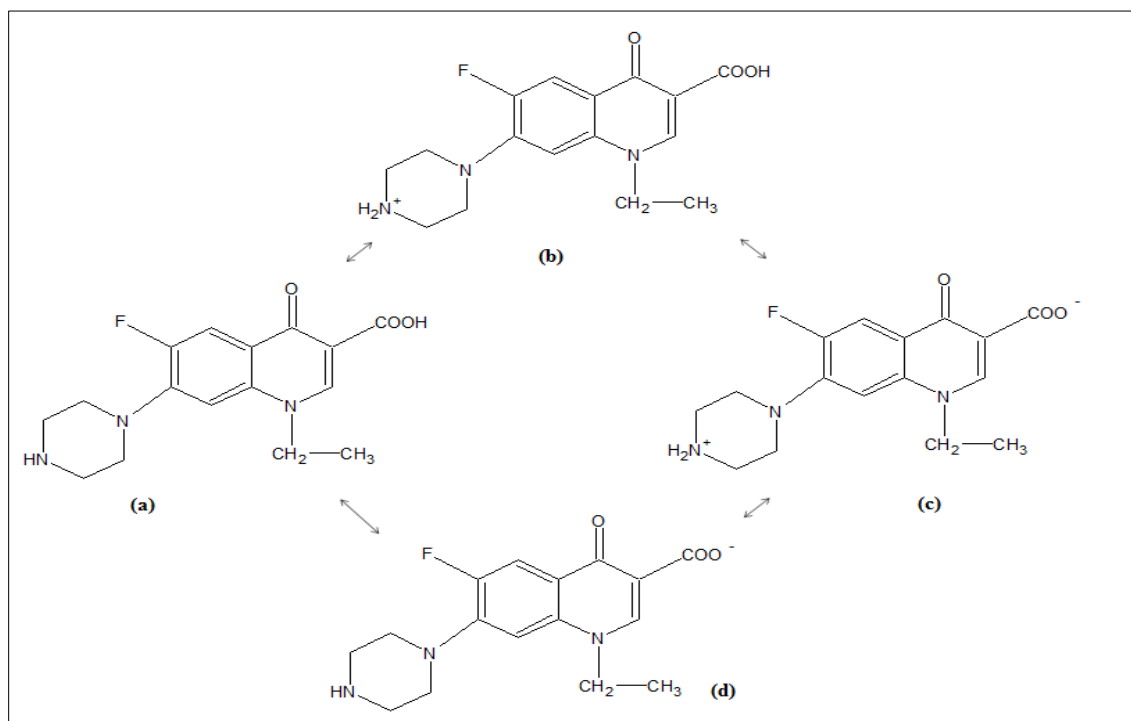
Em relação à estrutura-atividade, a adição de um átomo de flúor na posição 6 aumenta extraordinariamente a atividade antibacteriana das quinolonas contra *Staphylococcus*, e a adição de um grupo piperazinila na posição 7 do anel quinolônico aumenta a atividade contra bactérias Gram-negativas. Mantendo um átomo de flúor na posição 6 e um anel piperazinila na posição 7, a substituição de um grupo ciclopropílico na posição N-1 confere maior potência contra *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* (BLONDEAU, 2004; SILVA, 2009; BOLON, 2011).

O desenvolvimento do norfloxacinó foi um grande avanço à família das quinolonas, pois deu início à síntese de diversas quinolonas fluoradas como o ciprofloxacino, enoxacino, pefloxacino, entre outras. Isso garantiu o conhecimento da importância de determinadas posições na configuração estrutural das novas quinolonas fluoradas (BLONDEAU, 2004).

3.3 Farmacodinâmica do norfloxacinó

O norfloxacinó possui dois grupos funcionais receptores de prótons, correspondendo a dois equilíbrios químicos de ionização, em uma faixa de pH fisiologicamente relevante. O grupo carboxílico (C3) protona-se em meio levemente ácido, $pK_{a1} = 6,34$. Já o grupo associado ao N na posição quatro do anel piperazina (C7 anel quinolônico) protona-se em meio alcalino, $pK_{a2} = 8,75$ (MOUTON et al., 2005). Em pH neutro será predominante um “zwitterion” (com grupo carboxílico deprotonado e o N4 protonado). Em pH 10, mais de 90% estará na forma aniônica e em pH igual ou inferior a 4,5 estará na forma catiônica (Figura 4). O norfloxacinó exibe maior solubilidade aquosa em pH inferior a 4,5 ou superior a 8,0 (MUSA et al., 2009).

Figura 4. Diferentes protonações do norfloxacino dependentes do pH: a) neutro; b) cátion; c) zwitterion; d) ânion



Fonte: adaptado de MUSA e ERIKSSON (2009)

3.4 Farmacocinética do norfloxacino

Estudos farmacocinéticos mostram que após a administração por via oral o norfloxacino sofre menor absorção gastrointestinal e a presença de alimentos no estômago retarda a absorção desta quinolona. A absorção oral também é reduzida pela administração concomitante de antiácidos à base de hidróxido de alumínio ou magnésio (CHRISTIAN, 1996; DÍAZ, 1998a; ROCHA et al., 2011).

Após a administração oral, o norfloxacino apresenta meia-vida de 3,5-5 horas. Possui biodisponibilidade oral de 30 - 40%. Esta propriedade é favorável, porque o fármaco não sofre efeito pré-sistêmico de primeira passagem no fígado e a absorção ocorre principalmente no duodeno em uma pequena porção no jejuno (BARRÉ, 2001; VIJAN et al., 2008). A concentração sérica máxima é de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ quando a dose oral é de 400 mg. A concentração parênquimal renal e nas vias urinárias atinge elevada concentração, encontrando-se níveis nos rins entre 4 a 12 vezes maiores que os do sangue e nas vias urinárias, cerca de 100 a 300 vezes superiores aos do sangue. O

norfloxacino sofre metabolização parcial no fígado, em torno de 20% e possui como via primária a excreção renal, incluindo secreção tubular ou filtração glomerular. A porção não absorvida do fármaco é eliminada junto com as fezes, recuperando-se mais de 50% da dose administrada na matéria fecal. A área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo (ASC) é de 6,4 µg.h/mL (AL-RASHOOD et al., 2001; KATZUNG, 2005).

Outra importante vantagem dos fármacos derivados das quinolonas é que todos eles são encontrados nos fagócitos, possuem um grande volume de distribuição e baixa ligação às proteínas plasmáticas (HOOPER, 1998; LABRO, 1998; RANG et al., 2007).

3.5 *Mecanismo de resistência*

Finch (2009) relatou que os antimicrobianos são únicos entre os agentes terapêuticos muitas vezes usados de forma indiscriminada. Embora a sua utilização seja dirigida para o tratamento ou prevenção de doenças microbianas, sua eficácia é continuamente ameaçada pela resistência, sendo que essa resistência é facilmente transmitida entre os micro-organismos que, por sua vez, podem proliferar em ambientes mais amplos. As doenças infecciosas variam em gravidade de acordo com a idade e fatores de risco subjacentes, sendo que a escolha da terapia requer uma avaliação de riscos para garantir a prática segura e eficaz da prescrição.

A maneira pela qual as bactérias tornam-se resistentes a um agente antimicrobiano pode variar muito, tanto em classificação, quanto no real mecanismo de resistência da célula bacteriana. Mecanismos de resistência bacteriana incluem destruição da substância ativa, inativação e alteração do alvo enzima bacteriana. A resistência às quinolonas pode implicar na alteração da DNA-girase bacteriana, de proteínas da membrana externa como a topoisomerase IV e exportação do agente através do efluxo. No entanto, a resistência pode simplesmente representar um estado fisiológico alterado do micro-organismo (STRATTON, 1995; DRLICA et al., 1997).

A resistência gerada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos é um dos maiores desafios para a saúde pública global. Há uma diminuição da eficácia dos atuais agentes antimicrobianos e, como consequência, as infecções se tornam mais difíceis de tratar, mais economicamente dispendiosas e o controle de epidemias podem se tornar

mais difíceis. Isso tem contribuído para a alta morbidade e mortalidade por doenças infecciosas anteriormente tratáveis, tais como tuberculose, malária, doenças respiratórias agudas e diarreia (SHEARS, 2001; BYARUGABA, 2004).

3.6 Métodos analíticos

Na indústria farmacêutica, o controle de qualidade de medicamentos é responsável pela avaliação de inúmeras propriedades que conferem a qualidade das preparações farmacêuticas antes de serem distribuídas à população. Neste sentido, atua no desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para fármacos, no estudo de estabilidade de formulações, na análise de produtos de degradação e na padronização de procedimentos de produção (SYNDER et al., 1998).

O desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos para o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos deve ser realizado a partir de um bom planejamento. Os métodos devem permitir uma análise completa do produto, contemplando aspectos como a identificação e a determinação do teor de substância ativa, a identificação e determinação dos níveis de impureza e produtos de degradação, e a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (SWARTZ & KRULL, 1997).

Ha várias razões para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas (BRASIL, 2002; BRASIL, 2003a):

- Método não normalizado;
- Método desenvolvido no laboratório para atender uma aplicação específica;
- Ampliações – modificações dos métodos normalizados;
- Método normalizado usado fora do escopo indicado;
- No caso de métodos analíticos não descritos em farmacopeias ou formulários oficiais.

É de suma importância que os laboratórios demonstrem, através da validação, que os métodos de ensaio conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003).

Os medicamentos vêm sendo cada vez mais objeto de preocupação de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Por tais razões, é de enorme importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados (LA ROCA et al., 2007).

3.6.1 *Validação de métodos analíticos*

Para o controle de qualidade adequado de medicamentos é imprescindível o uso de métodos analíticos bastante sensíveis que permitam, desta forma, a determinação de quantidades mínimas de substância ativa e produtos de degradação. A escolha do método depende de vários fatores, tais como: pureza, qualidade do fármaco, quantidade da amostra, bem como a finalidade da análise, seja ela qualitativa ou quantitativa (BRASIL, 2004).

A fim de assegurar a credibilidade do método, deve-se validá-lo. A validação tem como objetivo demonstrar que procedimento analítico é adequado para a aplicação pretendida (ICH, 2005). É um processo pelo qual se estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfaçam às exigências para a sua aplicação (USP 33, 2010).

A validação deve ser considerada como parte de um conceito integrado que visa garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001; RIBANI et al., 2004).

Com a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003a (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos); a ANVISA passou a exigir para as preparações farmacêuticas a serem registradas no Brasil, estudos de validação de suas metodologias analíticas de controle de qualidade destes princípios ativos. As metodologias precisam ser avaliadas segundo critérios previamente definidos nos parâmetros de Linearidade, Seletividade, Intervalo, Limite de quantificação, Limite de detecção, Exatidão e Robustez de acordo com a finalidade da metodologia avaliada, de acordo com a Tabela 2 (BRASIL, 2003a).

Tabela 2. Categorias dos testes submetidos à validação

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de desempenho (ex: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003a.

Assim, de acordo com cada categoria são exigidos que se avaliem determinados parâmetros de maneira a comprovar a capacidade do método em fornecer resultados confiáveis, de acordo com a Tabela 3 (BRASIL, 2003a).

Tabela 3. Ensaio necessários para validação segundo categoria

PARAMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
Especificidade / Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão-Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão - Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; ** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão (Fonte: BRASIL, 2003a).

Os critérios adotados pela ANVISA seguem os parâmetros internacionais estabelecidos pela conferência internacional de harmonização (*INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION-ICH*).

Os parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método, de acordo com a Resolução nº899 (BRASIL, 2003a), ICH (2005) e USP 33 (2010) são:

- **Linearidade:** corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. Recomenda-se que sua determinação seja realizada, no mínimo, com cinco concentrações. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos. Além disso, deve-se apresentar as curvas obtidas, o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta;

- **Precisão:** representa o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. A precisão pode ser medida pela repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada por meio de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios. A precisão intermediária expressa a variação laboratorial, com o mesmo procedimento realizado em dias diferentes, equipamentos ou analistas diferentes. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR);

- **Exatidão:** representa o grau de proximidade entre os resultados individuais encontrados e um valor de aceito como referência. Pode ser determinada pelo teste de recuperação, em que quantidades conhecidas de substância química de referência são adicionadas à amostra, e então recuperadas. Neste caso, é expressa como percentagem de recuperação;

- **Especificidade e seletividade:** representa a capacidade de um método de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que

poderiam interferir com sua determinação, tais como excipientes, impurezas e produtos de degradação;

- **Robustez:** capacidade do método de não ser afetado por pequenas modificações nas condições analíticas;
- **Limite de Detecção:** representa a concentração mais baixa da substância em exame, sob as condições experimentais específicas;
- **Limite de Quantificação:** representa a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais específicas.

A validação de um método pode também ser entendida como um processo baseado na obtenção, documentação e análise de dados, os quais permitem tanto descrever o mesmo de forma detalhada, como identificar e controlar os fatores de variação (BREAUX et al., 2003).

O objetivo da validação é assegurar a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação do erro analítico, exigindo a adoção de procedimentos de validação que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação. O desenvolvimento de metodologias que permitem quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade destes produtos tanto no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional bem como em farmácias magistrais públicas e privadas (TRAISNEL et al., 1995).

Este trabalho objetiva o desenvolvimento e a validação de novos métodos analíticos de norfloxacino comprimidos.

3.6.2 *Revisão dos métodos analíticos para norfloxacino*

A química analítica enfrenta com bastante frequência o desafio proveniente das mais variadas áreas da ciência, sempre no sentido de contribuir com o estabelecimento de metodologias cada vez mais sensíveis, seletivas, confiáveis e de menor custo. O controle de qualidade de medicamentos reveste-se de grande importância, não apenas para assegurar os padrões de qualidade que garantam a eficácia e segurança dos medicamentos. Deste ponto de vista, a disponibilização de metodologias analíticas confiáveis e, se possível, rápidas e de baixo custo, mostram-se extremamente importantes.

O norfloxacino é um antimicrobiano de extrema importância, usado para administração em humanos e usado indiscriminadamente para tratamentos em animais. Na literatura destacam-se muitas metodologias analíticas para sua quantificação em produtos farmacêuticos, para material biológico e quantificação em órgãos e tecidos de animais; essas metodologias estão apresentadas na Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Urina, plasma e tecidos	CLAE	280	ACN: TF (20:80 v/v) pH 7,0	Vydac-hesperia (250x4,5 mm; 10 μ m)	1,0-500,0 μ g/mL	FORCHETTI et al., 1984
			ACN: Sol. tampão acetato (15:85 v/v) pH 4,8	Nucleosil C ₁₈ (100x5,0 mm; 3 μ m)	0,06-10 μ g/L	MONTAY et al., 1985
Soro	CLAE-FR	278	sol. aq. ác. fosfórico c/ tetrabutilamônio: MetOH (70:30 v/v) pH 2,2	Chromapak Nucleosil C ₁₈ (250x4,6 mm; 5 μ m)	0,3-1,5 μ g/mL	GROENEVELD & BROUWERS, 1986
			ACN: TF (15:85 v/v) pH 3,0	Waters Bondapak C ₅ (150x3,9 mm; 5 μ m)	0,125-20,0 μ g/mL	MORTON et al., 1986
Soro e urina	CLAE	278	ACN: sol. ác. fórmico c/ hidróxido de tetrabutilamônio (11:89 v/v) pH 3,0	Macherey-Nagel Nucleosil C ₁₈ (200x4,0 mm; 5 μ m)	10,0-100,0 μ g/mL	EHLE et al., 1987
		445				
Plasma e tecidos	CLAE-FR	300	ACN: MetOH: TF (19:3:78 v/v/v)	Partisil pxs C ₈ (250x34,6 mm; 10 μ m)	5,0-1500,0 ng/mL	LAGANÁ et al., 1987
		420				
Plasma e fluidos	CLAE	300	ACN: MetOH: TF (19:3:78 v/v/v)	Whatman Partisil pxs C ₈	50,0-500 ng/mL	LAGANÁ et al., 1988
		420				
Comprimidos	CLAE-FR	278	MetOH: água: dietilamina (50:50:0,4 v/v/v) pH 5,5	Hypersil ODS C ₁₈ (100x4,6 mm; 5 μ m)	1,0-45,0 μ g/mL	CUIPING et al., 1993
Plasma	CLAE-FR	280	MetOH: ác. trifluoroacético	Brockville Zorbax C ₈ (80x4,6 mm; 5 μ m)	0,025-5,0 μ g/mL	HUSSAIN et al., 1995
		418				

Tabela 4. Cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Soro	CLAE	279	ACN: TF (11:89 v/v) pH 2,5	Biosystems RP-18 (400x3,2 mm)	N/I	WALLIS et al., 1995
Plasma e urina	CLAE	$\lambda_{(exc)}=300$ $\lambda_{(em)}=450$	MetOH: sol. aq. perclórico e trietilamina (30:70 v/v)	Nucleosil C ₁₈ (800x4,0 mm; 3 μ m)	31,0-2507 ng/mL	MASCHER et al., 1998
Comprimido	CLAE-FR	278	ACN: TF (15:85 v/v) pH 3,0	Lichrosorb-RP8 (200x4,6 mm; 10 μ m)	10-20,0 μ g/mL	BORREGO et al., 1999
Resíduos de NOR em equipamento farmacêutico	CLAE	$\lambda_{(exc)}=277$ $\lambda_{(em)}=446$	ACN: TF (11:89 v/v) pH 3,3	Bondapak C ₁₈ (250x4,0 mm; 10 μ m)	10,0-90,0 ng/mL	SIMONOVSKA et al., 1999
Tecidos e ovo	CLAE	280	ACN: sol. aq. ác. ortofosfórico (15:85 v/v)	Hypersil (250x4,6 mm; 5 μ m)	4,0-100,0 ng/mL	GIGOSOS et al., 2000
Comprimido	CLAE	275	Ác. fosfórico 0,1%: ACN (85: 15 v/v) TF pH 4,0	C ₁₈ (300x3,9 mm)	N/I	FB 4, 2001
Alimentos	CLAE	$\lambda_{(exc)}=278$ $\lambda_{(em)}=446$	ACN: THF: TF (50:1:49 v/v/v) pH 2,6	Phenomenex Luna C ₅ (150x4,6 mm; 5 μ m)	0,5-10,0 μ g/mL	PECORELLI et al., 2003
Humor vítreo	CLAE	$\lambda_{(exc)}=290$ $\lambda_{(em)}=470$	ACN: sol. aq. ác. fórmico (15:85 v/v) pH 3,0	TSK-GEL ODS-80 TOSOH	0,025-1,25 μ g/mL	YAMADA et al., 2003
Impurezas sintéticas	CLAE-FR	260	Dihidrogênio de potássio: ACN (60:40 v/v) pH 3,0	Waters C ₁₈ (250x4,6 mm; 5 μ m)	N/I	RAO & NAGARAJU, 2004
Comprimido	CLAE	279	Água: ACN: trietilamina (80:19,7:0,3 v/v/v) pH 3,3	Lichrospher 100 RP-18 (125x4,0 mm; 5 μ m)	4,0-24,0 μ g/mL	KASSAB et al., 2005

Tabela 4. Cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de norfloxacin

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Urina e soro	CLAE	$\lambda_{\text{exe}}=277$	TF: THF (96:4 v/v)	Waters Nova Pak C ₁₈	6,0-14,0 ng/mL	MANSILLA et al., 2005
		$\lambda_{\text{em}}=444$	pH 3,0	(150x3,9 mm)		
Comprimido	CLAE-FR	275	ACN: sol. aq. acetato de TBAA,	Phenomenex C ₁₈	N/I	SHERVINGTON et al., 2005
			dodecil, sulfato de amônio e ác. cítrico (35:65 v/v)	(150x4,6 mm; 5 μ m)		
Urina e soro	CLAE	$\lambda_{\text{exe}}=277$	TF: THF (96:4 v/v)	Waters Nova pak C ₁₈	N/I	MANSILLA et al., 2006
		$\lambda_{\text{em}}=444$	pH 3,0	(150x3,9 mm)		
Urina e plasma	CLAE	$\lambda_{\text{exe}}=277$	TF: THF (92:8 v/v)	Novapak C ₁₈	N/I	MANSILLA et al., 2006
		$\lambda_{\text{em}}=490$	pH 3,0	(150x3,9 mm; 4 μ m)		
Águas subterrâneas	LC-MS	320,1 (m/z)	Sol. aq. amônio: ACN (85:15v/v) pH 3,0	Capcel Pak C ₈	7,0-29,0 pg/mL	MITANI et al., 2006
Solo	CLAE	280	Sol. aq. ác. fórmico: ACN	Waters Atlantis C ₁₈	0,15-5,0 μ g/g	TURRIEL et al., 2006
			(50:50v/v) pH 3,0	(150x3,0 mm; 3 μ m)		
Camarão	CLAE	278	ACN: MeOH: tampão acetato	Eclipse Zorbax C ₁₈	0,36-2,4 ng/mL	WAN et al., 2006
			(3:15:82 v/v/v) pH 3,65	(150x4,6 mm; 5 μ m)		
Plasma	CLAE	280	TF: ACN (88:12 v/v)	Phenomenex Gemini C ₁₈	25,0-3000	BEDOR et al., 2007
			pH 3,0	(150x4,6 mm; 5 μ m)	ng/mL	
Músculo de galinha e gema de ovo	CLAE	275	Sol. aq. c/ TFA 0,1%:ACN: MeOH	ODS-3	15,0-600 μ g/kg	CHRISTODOULOU et al., 2007
			(80:10:10 v/v/v)	(250x4,0 mm; 5 μ m)		

Tabela 4. Cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Efluente	LC-MS	320 (m/z)	ACN: MetOH:ác. fórmico:água (6:12:0,5:81,5 v/v/v/v)	Zorbax-sb C ₈ (150x2,1 mm; 3,5 μ m)	5,0-100,0 pg/ μ L	LEE et al., 2007
Leite	LC-MS	320 (m/z)	MetOH: ACN: água (35:35:30 v/v/v)	All-tech C ₁₈ (250x4,6 mm; 5 μ m)	0,3-15,0 ng/mL	BOGIALLI et al., 2008
Ração	CLAE	278 $\lambda_{(exc)}=278$ $\lambda_{(em)}=446$	ACN: sol. aq. de ác. fosfórico (20:80 v/v) pH 3,0	Phenomenex Gemini C ₁₈ (250x3,0 mm; 5 μ m)	0,04-0,8 mg/kg	GALARINI et al., 2009
Efluente	LC-MS	320 (m/z)	MetOH: sol. tampão amônio (20:80 v/v) pH 2,8	Phenomenex Synergi (250x4,6 mm; 4 μ m)	10,0-5000 ng/mL	LILLENBERG et al., 2009
Comprimidos	CLAE-FR	272	TF pH 3,0:ACN (84:16 v/v)	Luna C ₁₈ (150x4,6 mm)	0,05-5 μ g/mL	OLIVEIRA et al., 2009
Efluente tratado	LC-MS	N/I	Sol. aq. ác. fórmico 0,1%: MetOH (80:20 v/v)	Acquaty C ₁₈ (100x2,1 mm; 1,7 μ m)	5,0-53,0 ng/L	SHAO et al., 2009
Comprimido	CLAE	265	ACN: sol aq. Ác fosfórico pH 2,0 (5:95 v/v)	C ₁₈ (250x4,6 mm; 5 μ m)	N/I	BP, 2011
Água subterrânea	CLAE	270	ACN: TF (17:83 v/v) pH 3,0	Varian Pursuit (250x4,6 mm; 5 μ m)	0,25-0,5 μ g/mL	POLIWODA et al., 2010
Solo	CLAE	$\lambda_{(exc)}=280$ $\lambda_{(em)}=500$	TF: ACN	Ascentis Supelco (250x4,6 mm; 5 μ m)	2,0-50,0 μ g/mL	STURINI et al., 2010
Plasma	CLAE	280	MetOH: TF: ACN (30:30:40 v/v/v/v) pH 3,0	Agilant Shimpak ODS (250x4,6 mm; 5 μ m)	30,0-200,0 ng/mL	SHER, 2010

Tabela 4. Cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Comprimido	CLAE-FR	294	TF: ACN: MetOH (15:70:15 v/v/v) pH 2,5	Prontostil-AQ ODS (250x4,6 mm; 5 μ m)	4,0-20,0 μ g/mL	PATEL et al., 2011
Amostra biológica	CLAE	274	ACN: sol. aq. ác. fórmico (14:86 v/v) pH 2,6	Star RP C ₁₈ (750x4,0 mm; 3 μ m)	0,06-1000 μ g/L	PAYÁN et al., 2011
Comprimido	CLAE-FR	290	MetOH: TF (20:80 v/v) pH 3,0	Chromolith performance RP-18 (100x4,6 mm)	1,0-80,0 μ g/mL	SEBAYI et al., 2011
Efluente de indústria farmacêutica	CLAE	280	MetOH: água: TFA (70:30:0,05 v/v)	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (150x4,6 mm; 5 μ m)	0,01-2,0 μ g/mL	YAN et al., 2011
Ovo	LC-MS	320 (m/z)	ACN: sol. aq. ác. heptafluorobutírico	Phenomenex Luna C ₁₈ (150x2,0 mm; 3 μ m)	0-50,0 μ g/kg	GAJDA et al., 2012
Efluente	LC-MS	302,1 (m/z)	Sol. aq. ác. fórmico: ACN	Hypersil Gold C ₁₈ (200x2,1 mm; 12 μ m)	25,0-50,0 ng/L	KHAN et al., 2012
Fígado de galinha e águas subterrâneas	CLAE	280	ACN: sol. ác. fórmico pH 2,7	Waters Terra C ₁₈ (150x3,0 mm; 3,5 μ m)	30,0-500,0 kg/kg	MOEMA et al., 2012
Água subterrânea	CLAE	$\lambda_{\text{exc}}=278$ $\lambda_{\text{em}}=466$	ACN:TF (12:88 v/v)	Waters Aquasil- C ₁₈ (150x4,6 mm; 5 μ m)	5,0-150,0 ng/L	VÁZQUEZ et al., 2012
Comprimido	CLAE	275	ACN: ác. fosfórico (15:85 v/v)	Packing-LI	N/I	USP 35, 2012

N/I = não identificado; CLAE= Cromatografia líquida de alta eficiência; CLAE-FR= Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa; ACN=acetonitrila; MetOH= metanol; TBAA= tetrabutilamônio; TF= sol. tampão fosfato; THF= tetrahidrofurano.

Tabela 5. Sistemas de eletroforese capilar referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
MP	EC	214	Tampão borato de sódio (50 mM) pH 7,3	Sílica fundida (60cm x50 μ m)	N/I	SUN et al., 1997
MP	EC	280	Tampão fosfato (0,05 mM) pH 11,0	Sílica fundida (47cm x75 μ m)	N/I	BARBOSA et al., 1999
MP	CZE MEKC	280 $\lambda_{(exc)}= 325$ $\lambda_{(em)}= 420$	Tampão bicarbonato de sódio, Carbonato de sódio (0,1 M) pH 9,2	Sílica fundida (57cm x75 μ m)	0,5-10,0 mg/L	SCHMITH-KOPPLIN et al., 1999
Comprimido	EC	275	Tampão borato de sódio (65 mM), fosfato de sódio (35 mM), colato de sódio (60 mM): ACN (72:28 v/v) pH 7,3	Sílica fundida (67cm x50 μ m)	25-300 μ g/mL	SUN et al., 1999
Comprimido	EC	214	Tampão fosfato (125 mM) pH 7,0	Sílica fundida (47,5cm x75 μ m)	100-500 μ g/mL	FIERENS et al., 2000
Plasma	CZE MEKC	260	Tampão tetraborato de sódio (40 mM) e MetOH 10% pH 8,1	Sílica fundida (64,5cm x75 μ m)	0,8-45,0 mg/L	HERNÁNDEZ et al., 2000
Tecidos aves e suínos	EC	280	Tampão bicarbonato de sódio (30 mM), tetraborato de sódio (25 mM)	Sílica fundida (60cm x75 μ m)	0,01-1,0 μ g/mL	KOWALSKI et al., 2003
Comprimido	CZE	N/I	Tampão carbonato de amonio (120 mM), pH 9,12	Sílica fundida (34,2cm x50 μ m)	N/I	McCOURT et al., 2003

Tabela 5. Cont. Sistemas de eletroforese capilar referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Plasma	EC	$\lambda_{(exc)}=240$	Ác. fosfórico (50 mM): ACN	Sílica fundida	100-5000 $\mu\text{g/L}$	FERDIG et al., 2004
		$\lambda_{(em)}=400$	(60:40 v/v), pH 7,55	(70cm x75 μm)		
Comprimido	EC	214	Tampão fosfato (50 mM), pH 8,0	Sílica fundida (50,2cm x50 μm)	N/I	LIN et al., 2004
Urina	EC-CL	N/I	Tampão fosfato (15 mM), pH 8,2	Sílica fundida (40cm x75 μm)	0,05-10,0 $\mu\text{mol/L}$	DENG et al., 2006
Comprimido	EC	301	Tampão fosfato (32,5 mM), pH 2,5	Sílica fundida (31,2cm x50 μm)	10-50,0 mg/mL	ALNAJJAR et al., 2007a
Comprimido	EC	285	Tampão fosfato (10,0 mM), pH 2,5	Sílica fundida (31,2cm x50 μm)	1,0-50,0 mg/mL	ALNAJJAR et al., 2007b
Fígado de rato	EC	$\lambda_{(exc)}=325$	Tampão fosfato	Sílica fundida	0,01-100,0	CHENG et al., 2007
		$\lambda_{(em)}=435$	(50 mM), pH 4,6	(60cm x75 μm)	$\mu\text{g/mL}$	
Urina	EC	N/I	Tampão fosfato (20 mM), pH 8,2	Sílica fundida (55cm x50 μm)	2,0-200,0 $\mu\text{mol/L}$	LIU et al., 2008
Urina	EC	254	Tampão citrato (20 mM), ác. cítrico (4 mM), sulfato de sódio (10 mM), pH 6,1	Sílica fundida (47,5cm x75 μm)	0,057-0,084 $\mu\text{g/mL}$	YANG et al., 2008
Músculo de galinha	EC	N/I	Tampão TRIS (30 mM), ác. fosfórico (3 mM), pH 9,0	Sílica fundida (7,8cm x50 μm)	100-200,0 ng/mL	QIN et al., 2009

Tabela 5. Cont. Sistemas de eletroforese capilar referenciados na literatura para análise de norfloxacino

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Faixa	Referência
Leite	EC	220	Tampão tetraborato de sódio, pH 10,0	Sílica fundida (50cm x75 μ m)	0,15-4,0 μ g/mL	SOLANGI et al., 2009
Leite	CZE	254	Tampão tetraborato (12 mM), pH 9,0	Sílica fundida (65cm x50 μ m)	7,0-500,0 μ g/mL	WANG et al., 2009
Água	EC-CL	325	Tampão fosfato (125 mM) e MetOH 36%, pH 2,8	Sílica fundida (70cm x75 μ m)	0,3-1,9 ng/mL	AQUI et al., 2009

EC= Eletroforese Capilar; CZE= Eletroforese Capilar de Zona; MECK = Cromatografia Eletrocromatográfica Micelar; ACN=acetoneitrila; MetOH= metanol; CL = Quimioluminescência; N/I = Não Identificado.

Métodos espectrofotométricos na região do visível para determinação de quinolonas são baseados na reação dos fármacos com diferentes reagentes, originando compostos coloridos (MARONA & SCHAPOVAL, 2001). Alguns reagentes utilizados para a determinação de norfloxacinó através da “formação de complexo por pareamento iônico” (Tabela 6) estão descritos por Sastry e colaboradores (1995), Avadhanulu e colaboradores (1999), Gowda e Seetharamappa (2003), EL-Brashy e colaboradores (2004b; 2005a; 2005b), Salem e colaboradores (2005) Abdel-Hay e colaboradores (2008), Amin e colaboradores (2008) e Rufino e colaboradores (2011).

As reações através de “formação de complexo por transferência de cargas” (Tabela 6) estão descritas por Froehlich e colaboradores (1990b; 1990c), Lee e colaboradores (1994), El-Walily e colaboradores (1996), Amin (2000), Pojanagaroon e colaboradores (2002), Liming e colaboradores (2003), El-Brashy e colaboradores (2004a), Rahman e colaboradores (2004), Ragab e colaboradores (2004), Ming-Du e colaboradores (2005), Shaikh e colaboradores (2007), Darwish e colaboradores (2009), Naik e colaboradores (2009) e More e colaboradores (2009).

Métodos analíticos através da espectrofotometria de fluorescência foram encontrados para determinação de norfloxacinó e também estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Métodos descritos na literatura para análise de norfloxacino em produtos farmacêuticos e fluidos biológicos

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Solvente ou reagente	Faixa	Referência
Comprimido	VIS	410	Cloreto férrico	0,10 – 0,30 mg/mL	FROEHLICH et al., 1990b
Comprimido	VIS	410	Reativo de Marquis	1,0 – 2,0 mg/mL	FROEHLICH et al., 1990c
Comprimido	UV	277	HCl0,1 M	1,0 – 2,0 mg/mL	FROEHLICH et al., 1990d
MP	VIS	374	Ferro III	N/I	LEE et al., 1994
Comprimido	VIS	550	Ácido clorâmílico	0,25-5,75 mg/mL	AMIN et al., 1995
Comprimido	VIS	575	Violeta 3B	5,0 – 40,0 μ g/mL	SASTRY et al., 1995
		485	Tropaeolin		
Comprimido	UV	276	HCl0,1 M	1,0-10,0 μ g/mL	BORREGO et al., 1996
	FL	$\lambda_{(exo)}=330$			
		$\lambda_{(em)}=445$			
Comprimido	VIS	545	Eosina	3,0 – 10,0 μ g/mL	EL-WALILY et al., 1996
			Paládio II		
Comprimido	UV	280	HCl e NaOH 0,1 M	0,2 – 0,8 mg/mL	EL-KHATEEB et al., 1998
	VIS	358	Ferro (II)	0,16 – 0,64 mg/mL	
MP	UV	278	HCl0,1 M	N/I	DÍAZ et al., 1998b
	FL	$\lambda_{(exo)}=330$			
		$\lambda_{(em)}=445$			
Comprimido	VIS	524	Reineckato de amônio	N/I	AVADHANULU et al., 1999
Comprimido	VIS	330	Sudão III	0,4 – 12,0 μ g/mL	AMIN et al., 2000
Úrina e soro	FL	$\lambda_{(exo)}=272$	Tampão acetato pH 3,8	0,1-4,0 ng/mL	VÍLCHEZ et al., 2001
		$\lambda_{(em)}=446$			

Tabela 6. Cont. Métodos descritos na literatura para análise de norfloxacinó em produtos farmacéuticos e fluidos biológicos

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Solvente ou reagente	Faixa	Referência
Comprimido	UV	277	HCl 0,1 M	N/I	FB 4, 2001
Comprimido	VIS	435	Ferro III	0,2 – 1,4 $\mu\text{g/mL}$	POJANAGAROON et al., 2002
Comprimido	VIS	614	Azul brilhante G	0,4-8,0 $\mu\text{g/mL}$	GOWDA et al., 2003
Comprimido	FL	$\lambda_{\text{exc}}=334$ $\lambda_{\text{em}}=431$	Ácido clorânfilico	0,08 – 5,6 $\mu\text{g/mL}$	LIMING et al., 2003
Comprimido	VIS	603	Permanganato de potássio	2,0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$	RAHMAN et al., 2004
Comprimido	VIS	525	Reineckato de amônio	5,0 – 65,0 $\mu\text{g/mL}$	RAGAB et al., 2004
Comprimido	VIS	547	Eosina y	1,0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$	EL-BRASHY et al., 2004b
		545	Merbromina	0,8 – 16,0 $\mu\text{g/mL}$	
Comprimido	VIS	290	0,1 M H_2SO_4	0,3 - 1,4 $\mu\text{g/mL}$	SALEM et al., 2005
Comprimido	VIS	623	Tiocianato de cobalto	20,0 – 240,0 $\mu\text{g/mL}$	EL-BRASHY et al., 2005a
Comprimido	FL	$\lambda_{\text{exc}}=277$ $\lambda_{\text{em}}=453$	TCNQ	0,04 – 1,20 $\mu\text{g/mL}$	MING-DU et al., 2005
Comprimido	VIS	453	Tetraiodeto de bismuto III	8,0 – 80,0 $\mu\text{g/mL}$	EL-BRASHY et al., 2005b
Comprimido	VIS	322	Citrato de bismuto	N/I	SHAIKH et al., 2007
Comprimido	VIS	477	NBD-Cl	2,5 – 15,0 $\mu\text{g/mL}$	ABDEL-HEY et al., 2008
Comprimido	VIS	550	Sudão II	0,5 – 4,0 $\mu\text{g/mL}$	AMIN et al., 2008
		520	Vermelho congo	0,5 – 9,0 $\mu\text{g/mL}$	
		591	Violeta genciana	0,5 – 6,0 $\mu\text{g/mL}$	
Comprimido	VIS	625	N-vinilpiperazino	20,0 – 150,0 $\mu\text{g/mL}$	DARWISH et al., 2009

Tabela 6. Cont. Métodos descritos na literatura para análise de norfloxacin em produtos farmacêuticos e fluidos biológicos

AMOSTRA	MÉTODO	λ (nm)	Solvente ou reagente	Faixa	Referência
Comprimido	VIS	526	Permanganato de potássio	N/I	NAIK et al., 2009
Comprimido	FL	$\lambda_{(exc)}=278$ $\lambda_{(em)}=355$	PABA	0,5 – 8,0 $\mu\text{g/mL}$	MORE et al., 2009
Comprimido	FL	$\lambda_{(exc)}=277$ $\lambda_{(em)}=490$	HCl 0,1 M	29,5-800 ng/mL	ULU, 2009
MP	VIS	300	Ác. pícrico	N/I	MOAMEN et al., 2011
Comprimido	VIS	495	Ácido 3,5-dinitrobenzoico <i>p</i> -DAC	$2,75 \times 10^5 - 3,44 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$	RUFINO et al., 2011

VIS = espectrofotometria na região do visível; FL = espectrofotometria de fluorescência; UV = espectrofotometria na região do ultravioleta; N/I = não identificado;

NBC-Cl = 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole; TCNE = tetracianoetileno; *p*-DAC = *p*-(dimetilamino) cinnamaldeído; TCNQ = 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano;

PABA = ácido *p*-amino benzoico; MP = matéria prima.

3.7 *Estudos de complexação*

Com o intuito de aumentar a solubilidade do norfloxacino devido à sua classificação biofarmacêutica (classe IV), pode-se dispor de algumas estratégias, dentre elas a complexação com ciclodextrina.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que possuem a cavidade hidrofóbica e a superfície hidrofílica. Essas características permitem o aumento da solubilidade de moléculas lipofílicas como o norfloxacino, através da formação de complexos de inclusão. Posteriormente, esses complexos de inclusão são submetidos à caracterização, utilizando-se um conjunto de técnicas analíticas para explorar diferentes características do fármaco livre, da ciclodextrina em escolha, a β -ciclodextrina, (β -CD) e do complexo obtido. Neste estudo destacam-se as técnicas que serão aplicadas para a caracterização dos complexos: o diagrama de solubilidade de fases, dissolução intrínseca, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios-X, espectrofotometria na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura, além do estudo de atividade antimicrobiana com os complexos obtidos (GUYOT et al., 1995).

3.8 *Estudos de polimorfismo*

O polimorfismo é definido como a capacidade de uma substância existir em duas ou mais fases cristalinas que têm diferenças no arranjo e conformação das moléculas no cristal, o que repercute diretamente em suas propriedades físico-químicas. Essa mudança na estrutura cristalina pode ser alterada durante sua síntese através de etapas específicas como cristalização e precipitação ou durante os processos de fabricação da forma farmacêutica (GIRON, 1995).

Existem duas formas cristalinas que podem ser encontrados: solvatos e os polimorfos. Os solvatos, conhecidos também como pseudopolimorfos, são sólidos cristalinos que contêm moléculas de solventes dentro da estrutura cristalina. Se o solvente incorporado for água, o solvato é chamado de hidrato. Os polimorfos têm a mesma composição química, mas são diferentes na estrutura interna, e consequentemente, possuem propriedades físico-químicas diferentes. Partículas de

fármacos podem ocorrer na forma amorfa, além da forma cristalina identificável, podendo influenciar na estabilidade química e na atividade biológica (VIPAGUNTA et al., 2001).

Ao comparar as formas cristalinas e amorfas, espera-se que a amorfa seja menos estável quimicamente e mais solúvel que a forma cristalina. Isso ocorre devido aos cristais apresentarem menor energia livre, enquanto que na forma amorfa, a ausência de uma rede cristalina tridimensional proporciona maior mobilidade molecular. A energia cinética decorrente das diferentes formas de cristalização (amorfas, polimorfos ou solvatos) é responsável pelas diferenças na solubilidade e velocidade de dissolução (ANSEL et al., 2000).

Podem-se encontrar polimorfos na forma metaestável, que é uma forma menos estável. Seu uso na produção de medicamentos poderia resultar em uma velocidade de dissolução maior que a da forma cristalina mais estável, mas alguns problemas na formulação poderiam surgir, pois a forma mais metaestável pode ser convertida na mais estável. Se a alteração vier ocorrer antes de expirar o prazo de validade, isso poderia resultar em diferenças na biodisponibilidade do fármaco (ANSEL et al., 2000).

Estudos mostram que o norfloxacino apresenta duas formas polimórficas anidras (A e B), uma forma amorfa (C) (classificados como enantiotrópicos) e várias formas hidratadas (BARBAS et al., 2006). A forma A é compreendida como o princípio ativo apropriado para a produção de medicamentos por não apresentar molécula de água em sua estrutura (BARBAS et al., 2007).

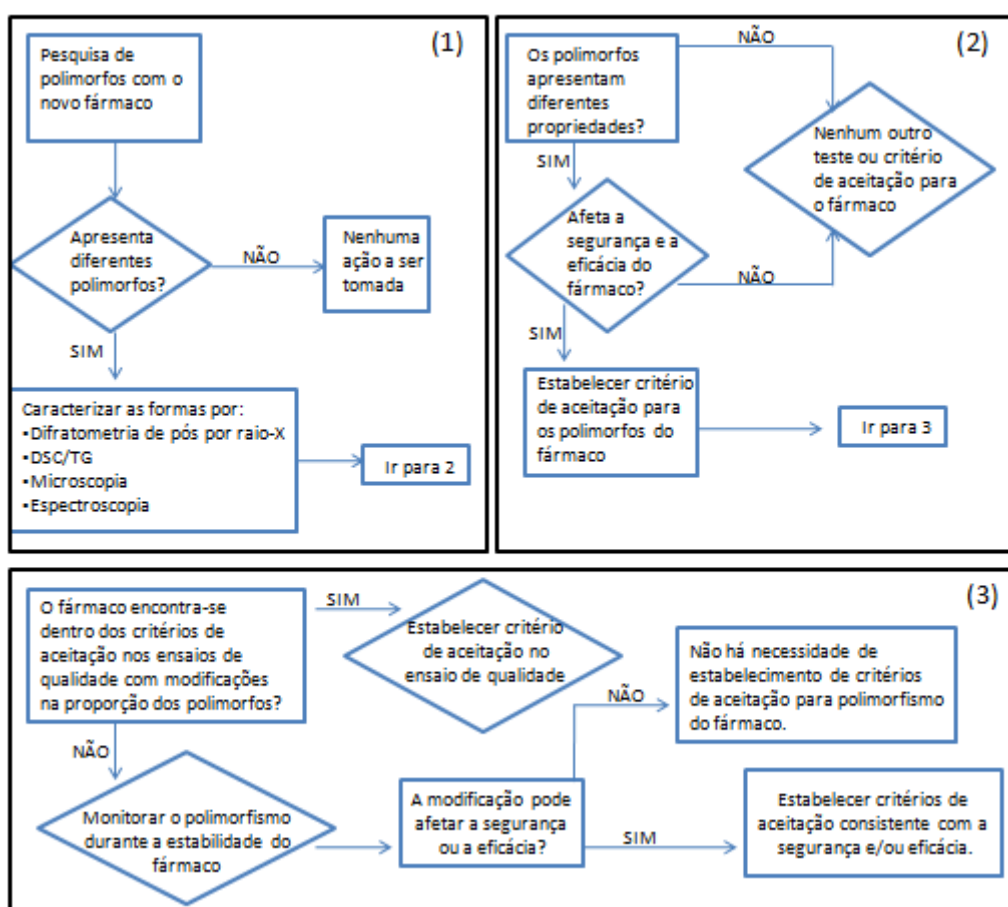
A comprovação e ocorrência de polimorfismo nos fármacos comercializados para produção de genéricos e similares no país poderá ser utilizada para dar suporte à ANVISA no sentido de tornar mais rigorosa a legislação para o registro destes produtos. Além disso, a definição de critérios claros para a análise de polimorfismo em matérias primas poderá auxiliar tanto a indústria farmacêutica, na montagem do *Relatório de Produção*, como o corpo técnico da ANVISA, responsável pela avaliação dos pedidos de registro destes medicamentos.

O guia ICH – Q6 trata de polimorfismo e define as especificações de novos fármacos e medicamentos. O guia Q6A, denominado *Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances*,

define polimorfismo como sendo a ocorrência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco. Nesta definição está incluída a solvatação ou hidratação de fármacos (pseudo-polimorfismo) e as formas amorfas.

O guia Q6A é acompanhado de um algoritmo de decisões, onde são indicados três procedimentos a serem tomados quando do surgimento de formas polimórficas em um fármaco. O algoritmo está representado na Figura 5.

Figura 5. Algoritmo de decisões relativo a polimorfismo constante do Guia Q6, parte I.



Fonte: adaptado de ICH, 1999

A avaliação do polimorfismo de um fármaco é, na maioria das vezes, um procedimento complexo, já que o processo de extração do fármaco pode alterar a forma do polimorfo. Além dos procedimentos de caracterização de um polimorfismo citados no Guia Q6A, pode ser realizado um ensaio de dissolução para um fármaco que se conheça a existência de formas polimórficas com solubilidades significativamente

diferentes, sendo bastante útil para a avaliação dessas formas, e conseqüentemente na segurança do produto (CAPUCHO, 2008).

No Brasil, no registro de medicamentos genéricos e medicamentos similares é preconizado que o solicitante do registro apresente documentação do fabricante do fármaco contendo informações sobre a existência de polimorfismo na matéria prima utilizada na produção dos medicamentos, a metodologia analítica adotada e resultados dos testes de determinação dos prováveis polimorfos do fármaco (CAPUCHO, 2008).

4. DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

4.1 Descrição geral do norfloxacin

Nome: Norfloxacin (NFLX); Norfloxacin (NOR)

Nomes químicos¹: 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinoline carboxylic acid (NFLX); ácido 1-etil-6-flúor-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolino carboxílico (NOR).

CAS²: 70458-96-7.

Fórmula molecular¹: C₁₆H₁₈FN₃O₃

Peso molecular¹: 319,33 g/mol

pKas¹: pKa₁/pKa₂: 6,34/8,75

Faixa de fusão¹: 220 a 221 °C

Composição percentual: C 60,18%; H 5,68%; F 5,95%; N 13,16%; O 15,03%.

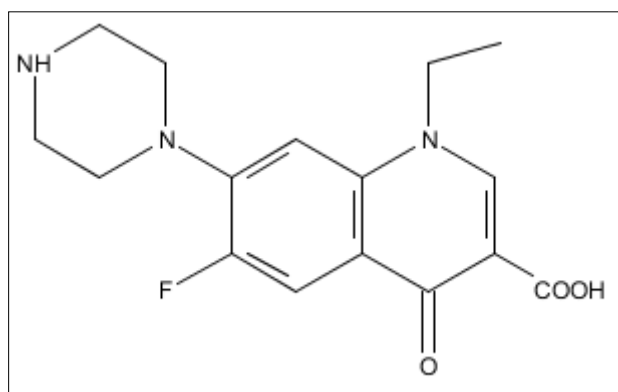
Nomes comerciais³: Norfloxacin (União Química, Sigma Pharma, Merck, Medley, Biosintética), Noroxin, Respexil, Floxacin (Merck), Flox (Hexal), Floxinol (Millet Roux), Fluxapril (Laboris), Norf (Sigma Pharma), Norflurin (Cellofarm), Norxacin (Globo), Uritrat (Libbs), Uroflox (Farmaion), Uroseptal (Bagó), Uroxazol (Bunker).

Categoria: Antimicrobiano

Descrição física: Pó cristalino amarelo claro e odor característico.

A estrutura química do norfloxacin está representada na Figura 6.

Figura 6. Estrutura química de norfloxacin



¹ Farmacopeia Brasileira (2010)

² Chemical Abstracts Service

³ Dicionário de Especialidades Farmacêuticas

4.2 Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi o norfloxacino, padrão secundário, teor declarado 100,00% (Lote: 1000003901; prazo de validade 14/10/2012), gentilmente doada pela União Química (Pouso Alegre-MG).

4.3 Produto farmacêutico comprimido

Foram analisados comprimidos contendo 400 mg de norfloxacino (teor rotulado), sob nome Norfloxacino (Lote: 1001549, prazo de validade março de 2012), medicamento gentilmente doado e produzido pela União Química (Pouso Alegre-MG).

4.4 Matéria prima

A matéria prima (MP) utilizada neste trabalho foi o norfloxacino, teor declarado 100,00% (Lote: 1003004203, prazo de validade 28/11/2012), gentilmente doada pela GALENA - Química Farmacêutica Ltda (Campinas-SP).

4.5 Padrão Interno (PI)

O padrão interno (PI) utilizado neste trabalho foi o cloridrato de moxifloxacino, teor declarado 100,00%. Gentilmente doado pela Alcon (São Paulo-SP).

4.6 Micro-organismos

- ❖ *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027
- ❖ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 IAL 636
- ❖ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150
- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 1851
- ❖ *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393

4.7 Equipamentos e outros aparatos

- ❖ Aparelho de ponto de fusão, Stuart Scientific Melting Point Apparatus SMP3;
- ❖ Aparato de Wood;
- ❖ Autoclave vertical, Phoenix[®];
- ❖ Analisador de umidade por infra-vermelho, modelo IV2000, Gehaka;
- ❖ Balança analítica Mettler[®], modelo H10;

- ❖ Banho de ultra-som, Unique[®];
- ❖ Coluna analítica Agilent[®] Zorbax Eclipse Plus C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm;
- ❖ Coluna analítica Luna C₁₈ Phenomenex[®], 150 x 4,6 mm, 5 µm;
- ❖ Cromatógrafo a líquido, Waters[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters 2487; e Waters[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária (Alliance 2695), desgaseificador online (DGU-14A, Shimadzu), injetor automático e detector DAD (DAD 996, WAT-OS-PDA);
- ❖ Cubetas de quartzo 10 mm de caminho óptico;
- ❖ Difratorômetro de raios-X, modelo D5000, Siemens;
- ❖ Dissolutor Vankel[®], modelo VK 6010;
- ❖ Equipamento de análise térmica, TA Instruments[®], modelo DSC-TA2920, TG-TA 2920;
- ❖ Equipamento de Eletroforese Capilar, modelo G 1600A, Agilent Technologies, Waldbrom, Alemanha.
- ❖ Espectrofotômetro UV/VIS, Shimadzu[®], modelo UVmini-1240;
- ❖ Espectrofotômetro Beckman modelo MA 420;
- ❖ Espectrofotômetro, FTIR, modelo Prestige 21, Shimadzu;
- ❖ Espectrômetro de massas do tipo *ion-trap* Bruker Avance II (Bremen, Alemanha);
- ❖ Estufa bacteriológica, Odontobrás[®], modelo ECB1.2;
- ❖ Estufa de esterilização, Nova Ética[®];
- ❖ Incubadora Shaker, Marconi[®], modelo MA420;
- ❖ Membranas de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro, Sartorius[®];
- ❖ Microscópio eletrônico, modelo JSM-7500F, JEOL.
- ❖ Micropipetas, Boeco[®];
- ❖ Peagômetro digital, Micronal[®], modelo B474;
- ❖ Placas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 X 20 cm), com espessura de 0,20 mm, Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄;
- ❖ Seringa, Hamilton[®];
- ❖ Revestidor por crepitação Bal-Tec, modelo SCD050.

4.8 Solventes e reagentes

- ❖ Acetato de etila (Merck-Alemanha);
- ❖ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker - EUA);
- ❖ Acetona (Merck-Alemanha);
- ❖ Ácido bórico (Merck – Alemanha);
- ❖ Ácido acético grau HPLC (J.T. Baker- EUA);
- ❖ Ácido acético (Merck-Alemanha);
- ❖ Ácido clorânico (Merck-Alemanha) ;
- ❖ Ácido clorídrico (Synth-Brasil);
- ❖ Ácido fosfórico (Synth – Brasil);
- ❖ Água ultrapura (Milli-Q);
- ❖ β -ciclodextrina (Roquete-Argentina)
- ❖ Borato de sódio (J.T. Baker - EUA);
- ❖ Butanol (Synth-Brasil);
- ❖ Cloreto de sódio (Vetec – Brasil);
- ❖ Clorofórmio (Merck-Alemanha);
- ❖ Cloridrato de Moxifloxacino (Sigma Pharma – Brasil);
- ❖ Diclorometano (Merck-Alemanha);
- ❖ Etanol (Synth-Brasil);
- ❖ Éter etílico (Merck-Alemanha);
- ❖ Fosfato de sódio monobásico (J.T. Baker – EUA);
- ❖ Fosfato de sódio dibásico (J.T. Baker - EUA);
- ❖ Hexano (Synth-Brasil);
- ❖ Hidróxido de amônio (Synth-Brasil);
- ❖ Hidróxido de sódio (Synth-Brasil; Spectrum, EUA);
- ❖ Isopropanol (Synth-Brasil);
- ❖ Meio de cultura: ágar Casoy (Acumedia - EUA);
- ❖ Meio de cultura: brain heart infusion BHI (Acumedia - EUA);
- ❖ Metanol (Merck-Alemanha);
- ❖ Metanol grau HPLC (J.T. Baker- EUA);
- ❖ Peróxido de hidrogênio (Synth-Brasil);
- ❖ Tris (J.T. Baker – EUA).

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1 Introdução

O controle de qualidade é uma etapa indispensável para as análises qualitativas e quantitativas de uma substância química de referência e/ou produto farmacêutico, sendo este um conjunto de medidas destinadas a garantir a qualquer momento, durante o processo de fabricação, a produção de lotes de medicamentos, tendo em vista o atendimento das normas sobre atividade, pureza, eficácia e inocuidade (ICH, 2005).

Para se ter certeza de que todos os lotes de um medicamento têm eficácia e inocuidade semelhantes, é essencial estabelecer especificações adequadas para esse medicamento e suas diversas formas farmacêuticas. Deste modo pode-se obter a qualidade necessária cumprindo as especificações existentes. Na realidade, uma vez estabelecidas a eficácia e inocuidade de um medicamento que já é comercializado, sua qualidade se avalia mediante testes de identidade e determinando sua atividade, sua pureza e algumas outras características (WHO, 2011).

Com o controle de qualidade visa-se fabricar produtos de determinada qualidade, de forma sistemática e uniforme. Por conseguinte, são considerados os fatores do controle de qualidade que determinam a aceitação ou rejeição, durante o processo de fabricação ou depois deste, dos componentes de um produto ou de suas diversas formas. Com relação a isso, os fatores mais importantes são as especificações de qualidade do produto e a vigilância da produção (WHO, 2011).

A análise qualitativa possui como finalidade a identificação de matéria prima ou de determinado componente de um produto. No entanto, a validade desses ensaios clássicos depende, basicamente, da sua especificidade ou seletividade, devendo ser confiável, de baixo custo e de fácil realização, sendo essas as vantagens dos métodos qualitativos realizados neste trabalho (PEIXOTO et al., 2005; MORENO & SALGADO, 2010).

5.2 Características organolépticas de norfloxacino SQR

5.2.1 Método

Analisou-se o norfloxacino SQR visualmente em relação ao aspecto, cor e odor.

5.2.2 Resultados e discussão

O norfloxacin SQR apresenta-se sob forma de pó cristalino, com odor característico e cor amarelo claro.

5.3 Características físicas do norfloxacin comprimidos

5.3.1 Método

Os comprimidos íntegros foram analisados, para descrição de suas características apresentadas, tais como aspecto, superfície, odor e cor.

5.3.2 Resultados e discussão

Os comprimidos de norfloxacin apresentam coloração branca, superfície polida de ambos os lados (opaca) (Figura 7).

Figura 7. Comprimido íntegro de norfloxacin



5.4 Determinação do peso médio dos comprimidos de norfloxacin

O teste se aplica a formas farmacêuticas sólidas, os comprimidos são pesados em balança analítica adequada.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010), admite-se não mais que duas unidades em desacordo com o estabelecido, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas. Na Tabela 7 são apresentados os limites de variações permitidos para formas farmacêuticas dos comprimidos em geral.

Tabela 7. Variação de peso de comprimidos segundo a Farmacopeia Brasileira (2010)

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

Para comprimidos contendo peso médio acima de 250 mg, a variação de peso permitida é $\pm 5,0\%$.

5.4.1 Método

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (2010). Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos em balança analítica, escolhidos aleatoriamente do mesmo lote.

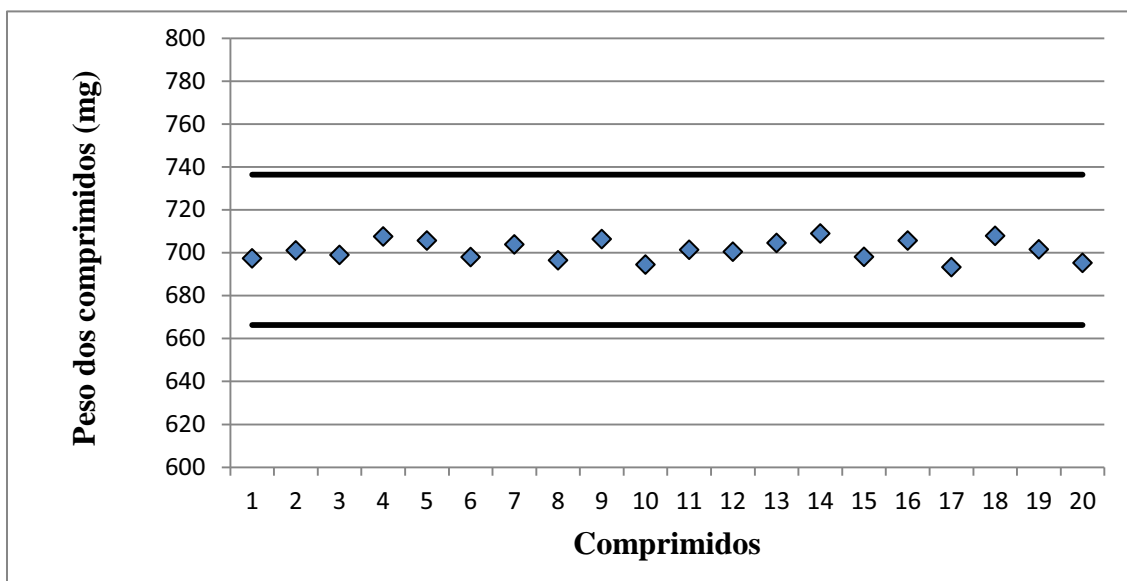
5.4.2 Resultados e discussão

A Tabela 8 relaciona o peso individual de vinte comprimidos com peso médio e o desvio padrão relativo.

Tabela 8. Relação do peso individual dos comprimidos de norfloxacino, o peso médio e o respectivo desvio padrão relativo

Comprimido	Peso individual (mg)	Peso médio (mg)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
1	697,4			
2	701,1			
3	699,0			
4	707,6			
5	705,7			
6	698,0			
7	703,9			
8	696,5			
9	706,4			
10	694,5	701,37	4,79	0,68
11	701,4			
12	700,5			
13	704,6			
14	709,0			
15	698,1			
16	705,7			
17	693,3			
18	707,9			
19	701,6			
20	695,3			

A Figura 8 ilustra a variação de peso dos vinte comprimidos de norfloxacino.

Figura 8. Variação de peso dos vinte comprimidos de norfloxacino

As variações de peso dos comprimidos de norfloxacino encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010), nenhum fora do peso máximo 736,43 mg e peso mínimo 666,30 mg. O desvio padrão relativo (DPR) apresentou valor de 0,68% encontrado dentro das especificações menor que 5%.

5.5 Determinação da faixa de fusão

A faixa de fusão é um ensaio realizado para a determinação de pureza de compostos, onde se observa a temperatura inicial de fusão, correspondente ao aparecimento das primeiras gotículas na parede do tubo capilar, e a temperatura correspondente à total fluidificação da amostra. A rapidez, simplicidade e o baixo custo do teste são algumas vantagens da aplicação da medida da faixa de fusão (NERY et al., 2008).

5.5.1 Método

A temperatura da faixa de fusão de NOR-SQR e norfloxacino comprimidos foram determinadas utilizando-se um aparelho de fusão e iniciou-se o aquecimento a temperatura de 10 °C/min. Uma pequena quantidade de NOR-SQR e/ou norfloxacino comprimidos foram dessecadas previamente durante 24 horas em estufa a 105 °C.

Foram introduzidas em capilares, quantidades suficientes para preencher aproximadamente 8,00 mm de altura, fechando-se uma de suas extremidades e inseridos na célula de aquecimento. Durante o aquecimento foi observada a faixa de fusão, onde a substância tornou-se totalmente líquida, foi definida como final da fusão ou o ponto de fusão (FB 5, 2010). Foram realizadas três determinações.

5.5.2 Resultados e discussão

A Tabela 9 mostra o valor da especificação e a faixa de fusão de NOR-SQR realizados três determinações.

Tabela 9. Valores da faixa de fusão obtidos para norfloxacin SQR e comprimidos

Substância	Especificação ¹	SQR	Comprimidos
Norfloxacin	220 – 221 °C	218,0 – 220,0 °C	218,0 – 220,0 °C
		218,0 – 220,0 °C	218,0 – 220,0 °C
		219,0 - 220,0 °C	218,0 - 220,0 °C
		Média: 218,33 – 220,00 °C	Média: 218,00 – 220,00 °C

¹Index Merck (O'NEIL, 2006)

A literatura descreve a faixa de fusão de norfloxacin entre 220,0 – 221,0 °C (O'NEIL, 2006). Os dados obtidos nestas análises tiveram como faixa de fusão média de 218,33 a 220,00 °C da NOR-SQR e 218,00 a 220,00 °C para norfloxacin comprimidos, estando de acordo com a especificação do Index Merck (2006). Esta é uma técnica físico-química de fácil execução e muito útil na identificação de fármacos, no entanto, para complementação da análise é necessário a execução de testes complementares.

5.6 Análise térmica de norfloxacin

A caracterização de fármacos e produtos farmacêuticos pelos métodos termoanalíticos vem sendo amplamente utilizada. Mesmo não constituindo técnicas oficiais, são muitos os trabalhos que se utilizam dessas metodologias como alternativas na caracterização e controle de qualidade de materiais farmacêuticos (BOND et al., 2002; SALGADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011).

A análise térmica abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (OLIVEIRA et al., 2011).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica termoanalítica na qual se mede a energia fornecida à amostra e a um material de referência termicamente inerte, ou mesmo um cadinho vazio, à medida que ambos vão sendo aquecidos ou resfriados em um calorímetro. Na DSC se mede a diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência. Usualmente, o material de referência adotado é a alumina. A curva resultante na DSC, denominada tecnicamente de curva DSC, é um gráfico que relaciona quantidade de calor ganhado ou perdido durante um intervalo de tempo (IONASHIRO, 2005).

A Termogravimetria (TG) é a técnica utilizada para medir as variações de massa de uma amostra durante o aquecimento, resfriamento ou quando mantida em temperatura específica. Os principais itens medidos nesta técnica são: evaporação, sublimação, decomposição, oxidação, redução, adsorção e dessorção de gás (IONASHIRO, 2005).

A análise térmica tem sido empregada historicamente nas áreas de pesquisa e desenvolvimento no campo farmacêutico, de alimentos, substâncias orgânicas e inorgânicas. Atualmente a análise térmica é utilizada em aplicações práticas, por exemplo, em controle de qualidade de produção, controle de processo e inspeção de materiais, de todas as áreas, fornecendo informações referentes à estabilidade térmica e à pureza da substância (OLIVEIRA et al., 2011).

5.6.1 Método

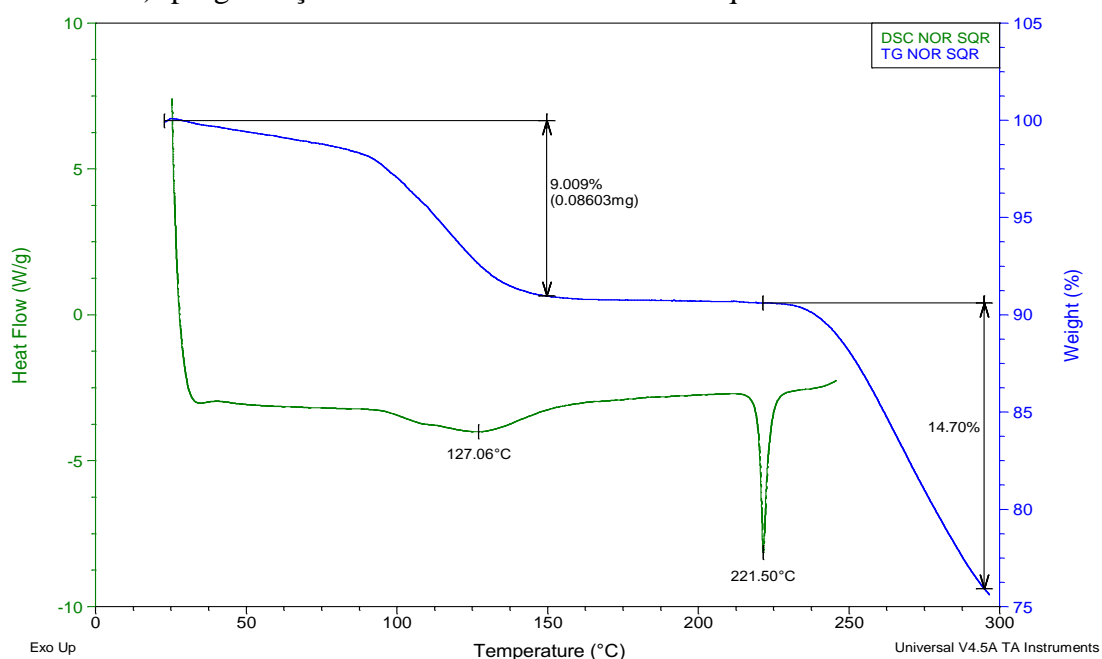
As curvas de DSC e TG de NOR-SQR e norfloxacino comprimidos foram obtidas com DSC/TA 2920. O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é basicamente constituído por uma microbalança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás. A massa da SQR para DSC foi de 0,810 mg e a massa para TG foi de 0,955 mg, para o produto farmacêutico a massa para o DSC foi de 0,820 mg e a massa para TG foi 1,347 mg colocadas em cápsulas de alumínio parcialmente fechadas, com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 25 °C até 350 °C,

atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 70 mL/min, suporte de Al₂O₃. Os dados obtidos foram analisados e processados através do *software* TA Instruments Universal Analysis 2000. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massas definidas.

5.6.2 Resultados e discussão

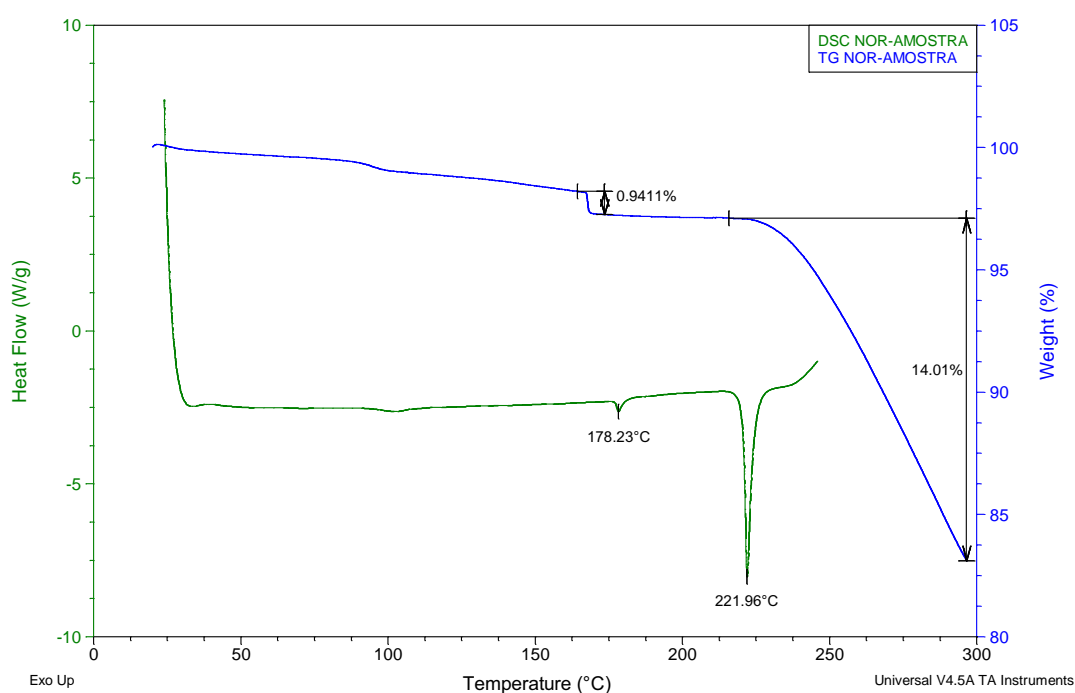
O NOR-SQR foi caracterizado termicamente através de DSC e TG. A curva DSC do NOR-SQR (Figura 9) demonstra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura de 100 °C a 150 °C, caracterizando o início da perda de água, o segundo evento endotérmico na faixa de fusão de temperatura de 220,0 °C a 230 °C característico da fusão da substância, evidenciando sua presença. O norfloxacino apresenta-se como pó cristalino branco a amarelo claro com faixa de fusão (decomposição) em 220 – 221 °C. A curva TG do NOR-SQR (Figura 9) apresenta dois eventos endotérmicos bem definidos. O primeiro evento ocorre entre 25,0 e 150,0 °C, evidenciando uma perda de água bem definida 9,00% e o segundo e último evento está relacionado à carbonização ocorrendo na faixa de 150,0 e 300 °C, todo o composto é carbonizado.

Figura 9. Curva de DSC e TG de norfloxacino SQR. Atmosfera de nitrogênio (vazão de 70 mL/min): programação de 0 a 300 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min



A amostra de norfloxacinó comprimidos foi caracterizada termicamente através de DSC e TG. A curva DSC do norfloxacinó comprimidos (Figura 10) demonstra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura de 175,0 °C a 180,0 °C, caracterizando o início da fusão de algum excipiente do comprimido, o segundo evento endotérmico na faixa de fusão de temperatura de 220,0 °C a 230,0 °C característico da fusão da substância norfloxacinó, evidenciando sua presença. A curva TG do norfloxacinó comprimidos (Figura 10) apresenta dois eventos endotérmicos bem definidos. O primeiro evento ocorre entre 25,0 e 160,0 °C sugerindo uma perda de água 0,94% e o segundo e último evento está relacionado à carbonização ocorrendo na faixa de 160,0 e 300 °C, onde todo o composto é carbonizado.

Figura 10. Curva de DSC e TG de norfloxacinó comprimidos. Atmosfera de nitrogênio (vazão de 70 mL/min): programação de 0 a 300 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min



Quando a faixa de fusão da substância em análise é muito grande, isso pode significar que a substância seria impura, o que, não é o caso da análise apresentada acima.

5.7 *Determinação de Umidade*

A umidade é um importante fator e está diretamente relacionada com o sucesso terapêutico do tratamento. Pesquisas mostram que o processo de fabricação e a maneira como os medicamentos são embalados e armazenados, assim como as condições de transporte, influenciam na umidade do produto farmacêutico e caso não sejam devidamente padronizados, estes fatores podem influenciar tanto na velocidade, quanto na quantidade de fármaco absorvido (BERGGEEN, 2004).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), 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.

5.7.1 *Método*

O equipamento para determinação de umidade por utilização de radiação infravermelho é composto por uma balança que possui acoplada uma fonte de radiação. Para a realização da análise, aproximadamente 1 g da amostra foi aplicada em um suporte (prato de alumínio) previamente tarado, e a massa inicial foi registrada. Em seguida iniciou-se o processo de radiação sobre a amostra durante 1 hora por 105 °C, e a massa final (peso constante) após o processo foi novamente registrada. As análises foram realizadas em triplicata (FB 5, 2010; BP, 2011).

5.7.2 *Resultados e discussão*

Na Farmacopeia Britânica (2011), a porcentagem de umidade para norfloxacino matéria-prima em 1 g deve ser menor que 1%, o valor de porcentagem de umidade para norfloxacino comprimido não existe na literatura. Os resultados do teor de umidade para norfloxacino comprimidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores do teor de umidade da amostra de norfloxacino comprimidos

Ensaio	Peso (g)	Umidade (%)
1	1,043	3,3
2	1,123	2,2
3	1,142	2,8
Média		2,7

O teor de umidade para norfloxacino comprimidos não está descrito na literatura, e de acordo com Prista e colaboradores (2002) o teor de umidade para comprimidos deve ser menor que 3%. O teor de umidade (2,7%) encontrado para norfloxacino comprimidos está dentro do limite.

5.8 *Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho*

No espectro eletromagnético, a região do infravermelho está localizada entre as regiões do visível e de micro-ondas 0,78 a 1000 μm , o que equivale aos números de onda de 12900 – 10 cm^{-1} . A faixa de maior uso está situada entre 4000 – 400 cm^{-1} , correspondente ao infravermelho médio (*MIR – medium infrared*). Apesar disso, é verificado um grande interesse nas regiões do infravermelho próximo (14290 – 4000 cm^{-1}) e do infravermelho distante (700 – 200 cm^{-1}) (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma das técnicas qualitativas mais utilizadas na identificação das funções químicas. Através dos diferentes modos vibracionais gerados por grupos funcionais ao absorverem radiação na região do infravermelho em comprimentos de onda característicos sendo possível determinar o grupo funcional existente na substância em análise (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

5.8.1 *Método*

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro IR, marca Shimadzu, pesando-se 1,0 mg de NOR-SQR e norfloxacino comprimidos sendo ambos dessecados previamente durante 30 minutos a 60,0 °C, utilizando-se dispersão de 150 mg de brometo de potássio (KBr) dessecado a 105 °C para confecção das pastilhas.

5.8.2 Resultados e discussão

Os espectros obtidos com NOR-SQR e norfloxacino comprimidos (Figuras 11 e 12) estão de acordo entre si, não mostrando presença de impurezas ou de degradação da amostra, já que os picos obtidos em ambas as substâncias são quase idênticas. A Figura 13 mostra os espectros sobrepostos (SILVERSTEIN et al., 2000; BP, 2011).

Figura 11. Espectro de absorção de infravermelho de norfloxacino SQR

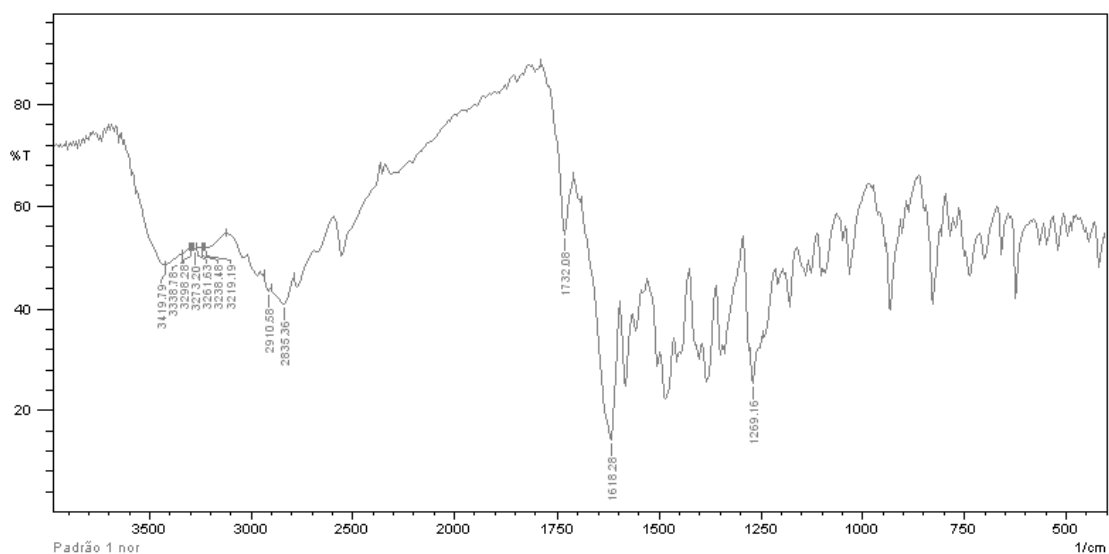


Figura 12. Espectro de absorção de infravermelho de norfloxacino comprimidos

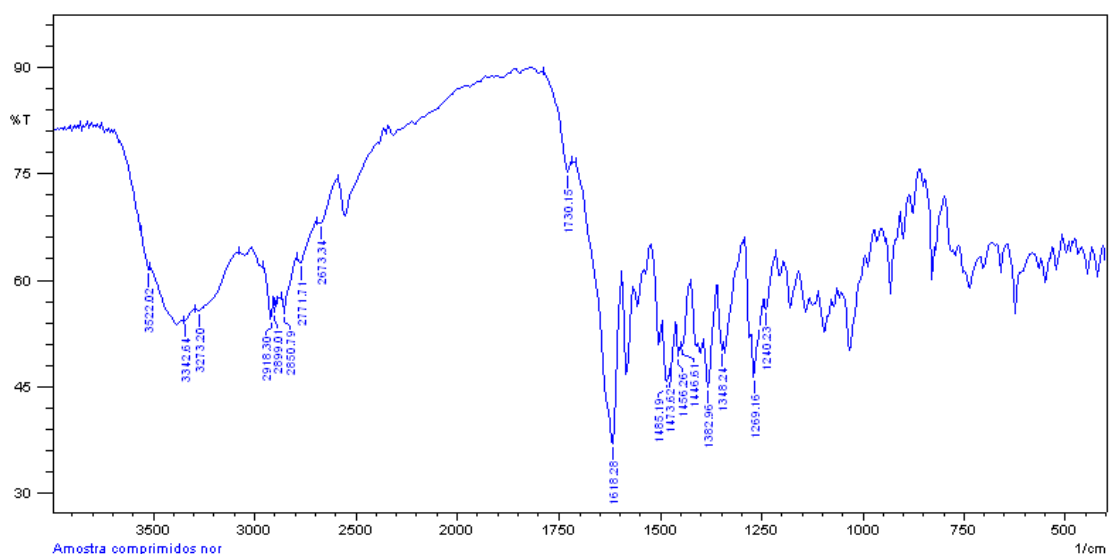
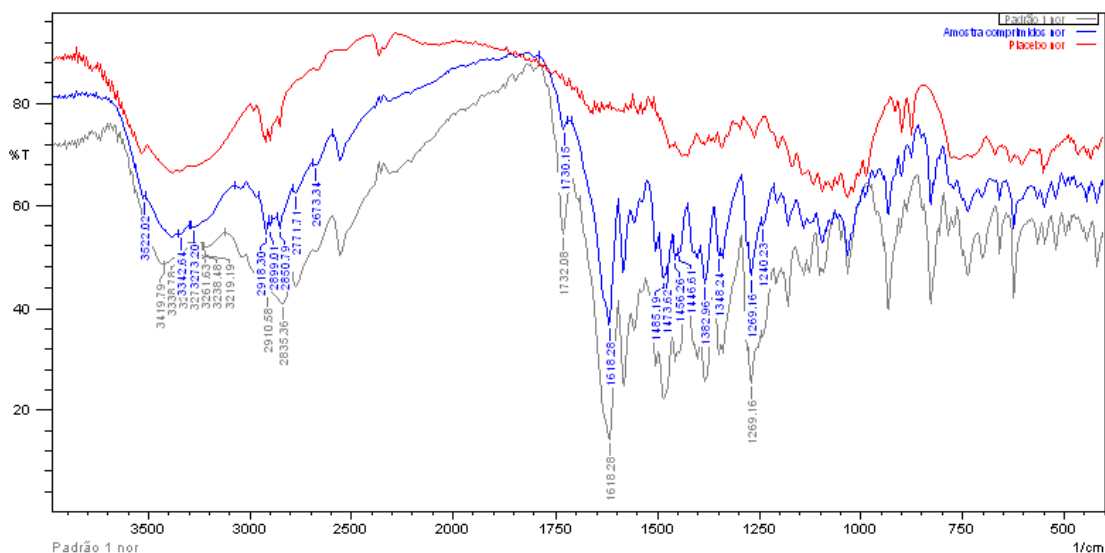


Figura 13. Sobreposição dos espectros na região do infravermelho de norfloxacinol padrão, amostra e placebo



O espectro de absorção na região de infravermelho apresentou bandas de absorção características de compostos de fluorquinolonas, tais como: a banda próximo a 3500 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração do grupo NH, a banda larga na região de 3368 a 3200 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações de deformação axial dos grupos OH, enquanto que em 2973 cm^{-1} aparecem as bandas de deformação da carboxila (COOH) ligada ao C3 que aparece na região entre 1747 e 1730 cm^{-1} e a banda da carbonila conjugada (CO, estrutura α,β -insaturada) em C4, que aparece entre 1653 e 1612 cm^{-1} . A banda em 1484 cm^{-1} pode ser atribuído ao anel quinolino e estiramento C-N e em 1250 cm^{-1} estiramento de C-F. O espectro do placebo não apresentou bandas características do padrão e amostra.

5.9 Espectrofotometria de absorção na região do visível

A espectrofotometria na região do visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas, podendo ser aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos. Tais métodos são amplamente utilizados em laboratórios de controle de qualidade, devido principalmente à sua facilidade de execução e ao seu baixo custo operacional (ASLAN et al., 2010).

Para que determinado fármaco possa ser analisado por essa técnica, o mesmo deve possuir grupamentos cromóforos e ter absorvidade adequada em dado solvente. Os métodos espectrofotométricos para fins qualitativos e quantitativos devem ser livres de interferência do solvente, de impurezas ou de excipientes.

A 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010) recomenda a espectrofotometria na região do visível tanto para substâncias naturalmente coradas como para aquelas que podem sofrer reação química, em que se forma estequiometricamente uma substância corada.

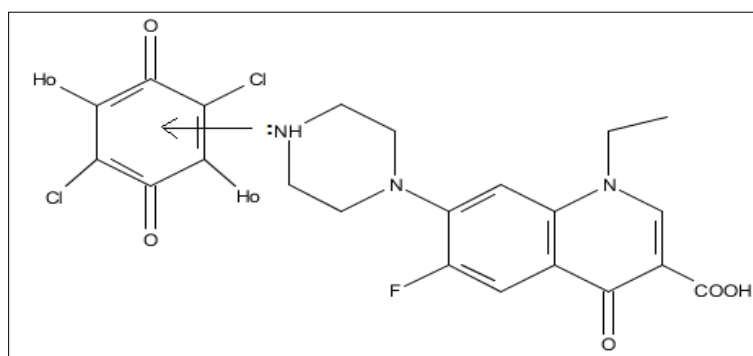
Reação com ácido cloranílico

As reações de transferência de carga vêm sendo empregadas há alguns anos para determinação espectrofotométrica de diferentes substâncias ativas presentes em medicamentos (ASLAN et al., 2010). Estes métodos exploram o caráter básico de alguns fármacos que, devido a esta característica, são excelentes doadores de elétrons.

A estrutura do ácido cloranílico (2,5-dicloro-3,6-diidróxi-1,4-benzoquinona) é composta por átomos doadores de elétrons π ligantes, que interagem com os elétrons n .

Apesar de sua simplicidade, a espectrofotometria na região do visível requer a escolha de reações adequadas, visto que a formação do produto colorido é uma etapa fundamental para o sucesso da metodologia. No caso do norfloxacin, o ácido cloranílico forma um complexo por transferência de cargas (Figura 14) de cor púrpura que pode ser medido espectrofotometricamente (LIMING et al., 2003).

Figura 14. Complexo norfloxacin – ácido cloranílico



O norfloxacin é um composto nitrogenado que age como n doador para o π acceptor ácido cloranílico.

Na reação entre o norfloxacino e o ácido cloranílico, a cor púrpura é alcançada imediatamente à intensidade máxima em temperatura ambiente e permanece estável por 30 minutos.

5.9.1 Método

5.9.1.1 Preparo da solução de norfloxacino SQR

Sistematicamente foram pesados 25 mg de norfloxacino SQR em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de metanol a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 50 mL. A solução foi mantida em equipamento de ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com metanol, para obtenção de solução de norfloxacino SQR de concentração final de 500 µg/mL. Posteriormente, esta solução foi mantida em banho-maria a 60 °C durante 3 minutos e filtrou-se a solução utilizando-se papel de filtro quantitativo.

5.9.1.2 Preparo do reagente ácido cloranílico 0,1%

Foram transferidos 50,0 mg de ácido cloranílico para balão volumétrico de 50,0 mL com auxílio de acetonitrila. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir a dissolução e completou-se com acetonitrila, obtendo-se o reagente com concentração final de 0,1%.

5.9.1.3 Procedimento do método

Em balão volumétrico âmbar de 5 mL adicionou-se uma alíquota de 1,2 mL da solução mãe de norfloxacino SQR (seção 5.9.1.1) em metanol com concentração de 500 µg/mL, em seguida 1,0 mL do reagente ácido cloranílico 0,1% foram adicionados e o volume do balão foi completado com acetonitrila para obtenção de solução com concentração final de 120,0 µg/mL. A leitura foi realizada no mesmo momento em espectrofotômetro contra branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

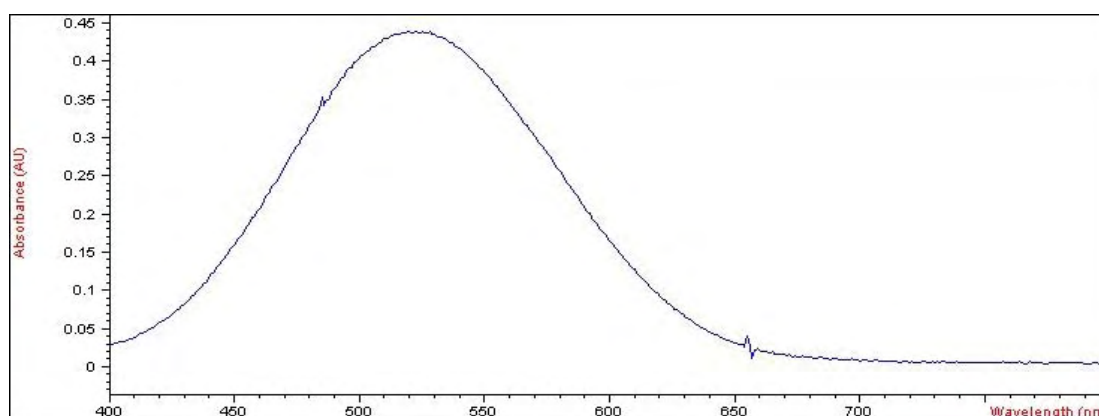
5.9.1.4 Teste para Cloreto

Em tubo de ensaio contendo solução apresentada na seção 5.9.1.3, foram adicionados gotas de nitrato de prata 0,1 N.

5.9.2 Resultados e discussão

A Figura 15 mostra a absorção obtida para a solução de norfloxacino SQR com concentração de 120,0 µg/mL, na região do visível, utilizando ácido cloranílico como reagente. O comprimento de onda máximo obtido que caracteriza este fármaco nesta reação foi 520 nm.

Figura 15. Espectro de absorção da solução de norfloxacino SQR com concentração de 120,0 µg/mL, na região do visível, utilizando ácido cloranílico como reagente



O teste para cloreto foi realizado para comprovar se a reação do norfloxacino com o ácido cloranílico é uma reação de transferência de cargas. Tal fato foi evidenciado após a adição de gotas de nitrato de prata 0,1 N na solução da seção 5.9.1.3, de coloração púrpura. Após a adição da solução de nitrato de prata 0,1 N, a coloração púrpura permaneceu constante, indicando então que a reação é de transferência de cargas, pois a mesma não ficou branca com precipitado.

5.10 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada

delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno de adsorção (FB 5, 2010).

5.10.1 Método

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), com espessura de 0,20 mm, adquiridas comercialmente e ativadas a 105 °C por uma hora.

Pesaram-se 10,0 mg de norfloxacino SQR que foram transferidos para balão volumétrico âmbar de 25,0 mL, completando-se o volume com metanol, para obtenção da solução com concentração final de 400,0 µg/mL. Parte desta solução foi exposta à luz UVC (254 nm, 200 W h m⁻²) direta para degradação. A partir do peso médio dos comprimidos de norfloxacino pesaram-se 17,53 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 25,0 mL com o auxílio de metanol. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução; esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, obtendo-se solução na concentração de 400,0 µg/mL. Foram testados os seguintes sistemas de fases móveis com soluções de norfloxacino SQR.

Sistema 1: ácido acético 5%: metanol: acetonitrila (10:5:5, v/v/v)

Sistema 2: ácido acético 5%: metanol: diclorometano: água (1:3:3:3, v/v/v/v)

Sistema 3: diclorometano: metanol: hidróxido de amônio (6:4:2, v/v/v)

Sistema 4: diclorometano: metanol: hidróxido de amônio: acetonitrila (4:4:2:1, v/v/v/v)

Sistema 5: diclorometano: metanol: hidróxido de amônio: acetonitrila (6:4:2:1, v/v/v/v)

Sistema 6: metanol: hidróxido de amônio (8:3, v/v)

Soluções de NOR-SQR e amostra foram degradadas em luz UVC (254 nm, 200 W h m⁻²) por 68 dias em placa de sílica gel e então analisadas pelo sistema 6.

Após a saturação da cuba com o sistema de fase móvel, preparou-se a placa colocando-se 25,0 µL das soluções de norfloxacino SQR, comprimidos e amostras degradadas para as placas procedendo-se a CCD.

Após a migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, até o solvente evaporar. As placas foram reveladas na câmara UV, para a comparação das manchas quanto a forma, posição e tamanho. Foi determinado o R_f do fármaco em cada análise.

5.10.2 Resultados e discussão

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

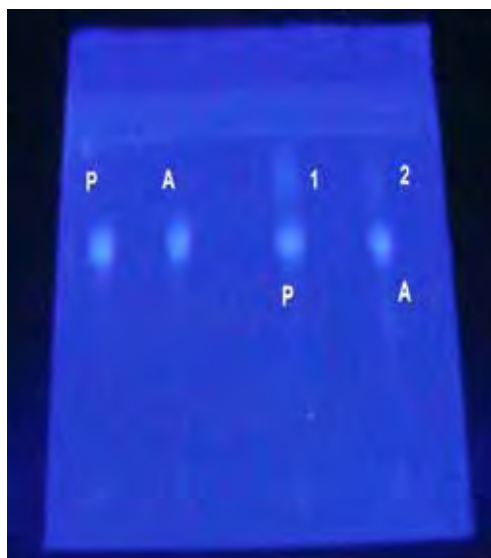
A Figura 16 mostra a placa cromatográfica com o melhor sistema de fase móvel composto por metanol: hidróxido de amônio (8:3, v/v), com Rf de 0,55 para NOR-SQR e comprimidos.

Figura 16. Cromatografia em camada delegada, sistema metanol:hidróxido de amônio (8:3, v/v), com as respectivas manchas de retenção norfloxacino SQR (P) e comprimidos (A): Rf = 0,55



A Figura 17 ilustra placa cromatográfica (sistema: metanol: hidróxido de amônio (8:3, v/v)) com os produtos de degradação e seus respectivos Rf_s: manchas de retenção P (NOR-SQR) e A (Amostra): 0,55 e 0,56; 1 (NOR-SQR degradado) e 2 (Amostra degradada): 0,74 e 0,74.

Figura 17. Cromatografia em camada delegada, sistema metanol:hidróxido de amônio (8:3, v/v), com as respectivas manchas de retenção P (NOR-SQR) e A (AMOSTRA): 0,55 e 0,56; 1 (NOR-SQR degradado) e 2 (amostra degradado): 0,74 e 0,74



A técnica de CCD foi empregada com o objetivo de identificar o NOR-SQR e comprimidos e também distinguir norfloxacino de seus produtos de degradação, utilizando um sistema de solvente simples. Devido à presença de ligações simples, ligações conjugadas e do flúor na molécula do norfloxacino pode ser revelado utilizando-se luz UVC. De acordo com a Figura 18 pode-se observar que foram separados os produtos de degradação comparando-se os R_f s apresentados anteriormente.

Na literatura é descrito uma metodologia complexa tanto para o preparo da amostra quanto para o sistema de solvente empregado (FB 5, 2010). Sendo assim a CCD apresenta-se como uma ferramenta de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. O método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação de produtos de degradação utilizando o sistema metanol:hidróxido de amônio (8:3, v/v).

5.11 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nas indústrias farmacêuticas, químicas, alimentícias, refinarias, petroquímicas, laboratórios de análises clínicas, ambiental, forense, entre outros, frequentemente é necessário separar, isolar, purificar, identificar e quantificar os componentes de misturas muitas vezes bastante complexas.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas analíticas mais empregadas pelas indústrias farmacêuticas para análise de teor e de impurezas orgânicas (BONFILIO et al., 2012). Em uma análise de fármacos faz-se necessária a comparação dos tempos de retenção da amostra e da respectiva SQR para confiabilidade dos resultados, obrigatoriamente se as substâncias são idênticas devem apresentar o mesmo tempo de retenção nas mesmas condições de análise.

5.11.1 Método

5.11.1.1 Preparo da solução de norfloxacinó SQR

Foram pesados 12,5 mg de norfloxacinó SQR e transferidos para balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com fase móvel (solução de ácido acético 5%: metanol (80:20 v/v)). Para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL e completou-se o volume até o menisco com água purificada para gerar soluções com a concentração final requerida.

5.11.1.2 Preparo da solução de norfloxacinó comprimidos

Partiu-se do peso médio de 20 comprimidos de norfloxacinó, pesou-se o equivalente a 21,91 mg do pó dos comprimidos em balança analítica, sendo transferidos com o auxílio de fase móvel (solução de ácido acético 5%: metanol (80:20)) a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25,00 mL. A solução foi mantida em equipamento de ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução do fármaco. Filtrou-se a solução com papel filtrante quantitativo. Finalmente, completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se uma solução de norfloxacinó comprimidos com concentração final de 500,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL para gerar soluções com a concentração final requerida e completada até o menisco com água purificada.

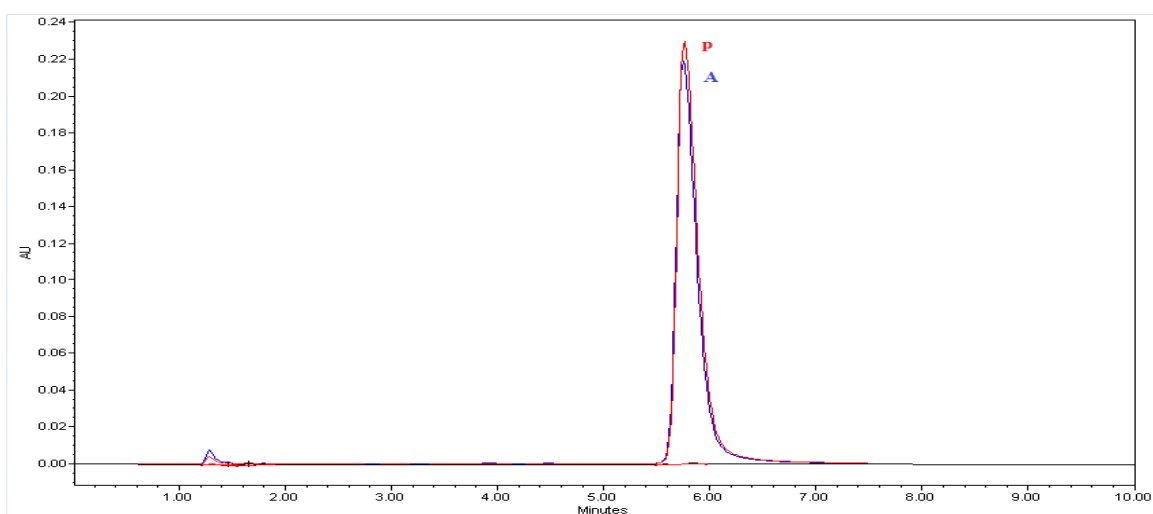
5.11.1.3 Procedimento do método

Prepararam-se soluções de norfloxacino SQR (seção 5.11.1.1) e norfloxacino comprimidos (seção 5.11.1.2) na concentração de 500 µg/mL; a partir destas soluções foram preparadas soluções na concentração de 22,0 µg/mL. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 277 nm, utilizando coluna Eclipse Plus C18 Agilent® Zorbax, (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e solução de ácido acético 5% v/v: metanol (80:20, v/v) como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min.

5.11.2 Resultados e discussão

O cromatograma típico obtido pelo método proposto, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente ao NOR-SRQ e comprimidos é mostrado na Figura 18. O tempo de retenção para ambas as amostras de 5,7 minutos permitiu rápida determinação do fármaco, possibilitando a sua aplicação em controle de qualidade.

Figura 18. Sobreposição de cromatogramas de norfloxacino SQR (P) e norfloxacino comprimidos (A), nas mesmas concentrações (22,0 µg/mL), para identificação pelo método CLAE Fase móvel: solução de ácido acético 5 %: metanol (80:20, v/v). Fase estacionária: coluna Eclipse Plus C18 Agilent® Zorbax, (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)



5.12 Eletroforese capilar (EC)

A eletroforese capilar é uma poderosa técnica de separação amplamente utilizada na investigação e desenvolvimento, controle de qualidade e estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos que, conforme aponta Ahuja (2008), inclui a simplicidade e análise rápida, possuindo ótimos mecanismos de seletividade e baixo custo. A implementação de eletroforese capilar pode contribuir muito para o desenvolvimento na validação de um novo desafio analítico não aplicável por outras técnicas.

Este procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica da Universidade de São Paulo (USP), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, supervisionado pela Professora Dr^a Pierina Sueli Bonato.

5.12.1 Método

5.12.1.1 Preparo da solução de norfloxacino SQR

Foram pesados 12,5 mg de norfloxacino SQR e transferidos para balão volumétrico âmbar de 25 mL, adicionou-se 5,0 mL de NaOH 0,1 M e levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos. Posteriormente, o volume foi completado com água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10,0 mL, completando-se até o menisco com água purificada para gerar soluções com a concentração final requerida.

5.12.1.2 Preparo da solução de moxifloxacino padrão interno

Foram pesados 12,5 mg de moxifloxacino Padrão Interno (MOX-PI) e transferidos para balão volumétrico âmbar de 25 mL, adicionou-se 5,0 mL de NaOH 0,1 M e levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos. Posteriormente, o volume foi completado com água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10,0 mL, completando-se até o menisco com água purificada para gerar soluções com a concentração final requerida.

5.12.1.3 Procedimento do método

Antes do uso, o capilar foi acondicionado da seguinte maneira: NaOH 0,1 M (10 min), água (10 min). Depois do uso o capilar foi lavado com NaOH 0,1 M (10 min) e água (10 min) e mantido com água.

As soluções de NOR-SQR (seção 5.12.1.1) e MOX-PI (seção 5.12.1.2) na concentração de 500 µg/mL foram diluídas com água para o preparo de soluções nas concentrações de 20,0 µg/mL.

As condições analíticas utilizadas no método estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Condições analíticas utilizadas no desenvolvimento do método por eletroforese capilar

Parâmetro	Descrição
Capilar	Sílica fundida, com 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 75 µm de diâmetro interno
Eletrólito	Tampão tetraborato de sódio 30 mM pH 9,0
Tensão aplicada	15 kV
Injeção hidrodinâmica	48 mBar/15 s
Detecção/comprimento de onda	DAD/277 nm
Pré-condicionamento (<i>Flush</i>)	2 min NaOH 0,1 M; 2 min H ₂ O; 2 min eletrólito
Temperatura	25 ± 1°C
Diluyente das amostras	Água purificada

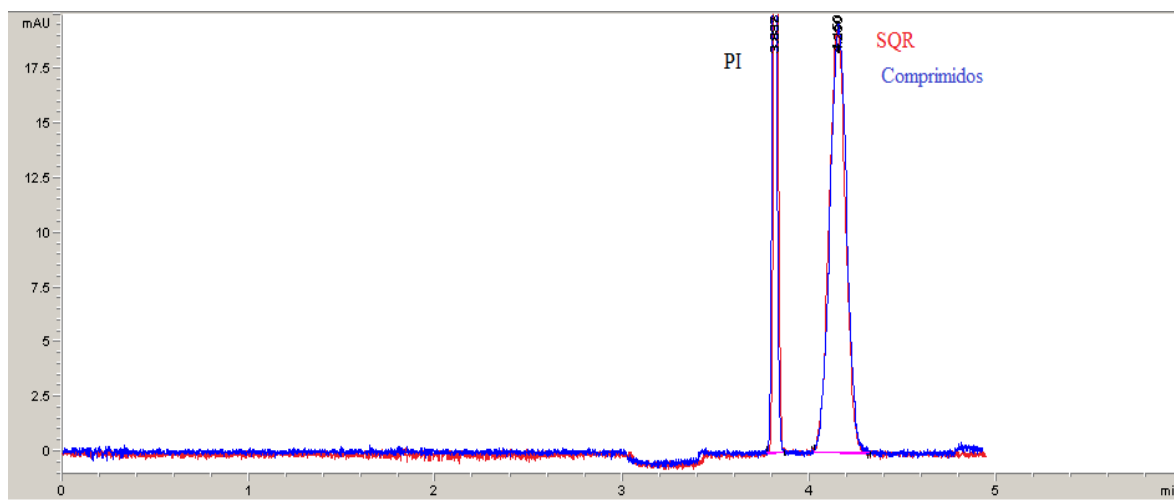
5.12.2 Resultados e discussão

O eletroferograma de MOX-PI e NOR-SQR com tempo de migração de 3,8 e 4,1 min respectivamente, na concentração de 20,0 µg/mL está representado na Figura 19. O PI foi utilizado para corrigir a variabilidade do volume de injeção e tempo de migração.

Para o desenvolvimento do método, foram testadas diferentes soluções tampão: tampão tetraborato de sódio (30, 50 e 75,0 mM pH 8,5), tampão tetraborato de sódio (30, 50 e 75,0 mM pH 9,0), tampão fosfato de sódio (50 mM pH 8,5), tampão fosfato de potássio monobásico (50 mM pH 8,5) e tampão tris (50 mM pH 8,5). Apenas o tampão

tetraborato de sódio 30 mM pH 9,0 forneceu resultados satisfatórios quanto à simetria do pico, tempo de migração e estabilidade da linha de base para o NOR-SQR e MOX-PI.

Figura 19. Eletroferograma de padrão interno (PI) moxifloxacino, NOR-SQR e comprimidos



A identificação do analito presente na amostra analisada foi através do tempo de migração relativa ao padrão interno, uma vez que este é um parâmetro de identificação mais robusto que a avaliação dos tempos de migração de cada substância isolada. A área foi calculada através da razão entre as áreas do MOX-PI e do NOR-SQR.

A eletroforese capilar é uma técnica interessante e uma alternativa na análise de produtos farmacêuticos devido a sua eficiência, flexibilidade, precisão e alta resolução. Além disso, utiliza volumes de amostra na ordem de nanolitros e baixo consumo de solventes (Ahuja, 2008).

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1 *Espectrofotometria de absorção na região do visível (VIS)*

A espectrofotometria é o método de análise óptico mais usado nas investigações biológicas e físico-químicas. O espectrofotômetro é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto e uma quantidade conhecida da mesma substância (ASLAN et al., 2010).

A absorção das radiações ultravioleta, visível e infravermelha dependem das estruturas das moléculas, e é característica para cada substância química. A espectrofotometria na região do visível possui como vantagens o baixo custo e a fácil execução, possibilitando a obtenção de alta sensibilidade e seletividade (ASLAN et al., 2010).

Vários reagentes foram testados para a determinação de norfloxacinolona e outras fluorquinolonas, porém a maioria de realização difícil e demorada devido a processo de extração do produto de reação. Neste contexto, o método proposto possui vantagens quanto ao equipamento, rapidez e facilidade de execução.

6.1.1 *Material*

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizou-se como solvente acetonitrila e como reagente ácido clorânico 0,1%. A substância química de referência e a forma farmacêutica utilizadas estão descritas nos itens 4.2 e 4.3.

6.1.1.1 *Preparo da solução de norfloxacinolona SQR*

Sistematicamente foram pesados 12,5 mg de norfloxacinolona SQR em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de metanol, a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. A solução foi mantida em equipamento de ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com metanol, para obtenção de solução de norfloxacinolona SQR de concentração final de 500 µg/mL. Posteriormente, esta solução foi mantida em banho-maria a 60 °C durante 3 minutos e filtrou-se a solução utilizando-se papel de filtro quantitativo.

6.1.1.2 Preparo da solução de norfloxacino comprimidos

No preparo da solução de norfloxacino comprimidos partiu-se do peso médio de 20 comprimidos de norfloxacino. Pesou-se o equivalente a 21,91 mg do fármaco em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de metanol a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. A solução foi mantida em equipamento de ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com metanol, obtendo-se solução de norfloxacino comprimidos de concentração final 500 µg/mL. Esta solução foi mantida em banho-maria a 60 °C durante 3 minutos e, posteriormente, foi filtrada em papel de filtro quantitativo.

6.1.1.3 Preparo do reagente ácido cloranílico 0,1%

Foram transferidos 50,0 mg de ácido cloranílico para balão volumétrico de 50,0 mL com auxílio de acetonitrila. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir a dissolução e completou-se com acetonitrila, obtendo-se o reagente com concentração final de 0,1%.

6.1.1.4 Preparo do placebo

Cada comprimido de norfloxacino contém além de substância ativa, os adjuvantes: lactose, talco, estearato de magnésio, celulose microcristalina, povidona e croscarmelose sódica. Através destes adjuvantes, preparou-se o placebo a partir da mistura homogênea dos componentes da formulação simulada (Tabela 12), na ausência do norfloxacino. As quantidades de adjuvantes presentes na formulação simulada foram definidas com base nas especificações percentuais descritas por Rowe e colaboradores (2009).

Tabela 12. Formulação simulada para obtenção do placebo de norfloxacino comprimidos

Componente	%
Lactose	42,37
Talco	6,77
Estearato de magnésio	3,38
Celulose microcristalina	25,42
Povidona	16,94
Croscarmelose sódica	5,08

Cerca de 21,91 mg do placebo foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de metanol. Deixou-se em ultra-som durante 30 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 1,2 mL para balão volumétrico de 5,0 mL, 1,0 mL do reagente ácido cloranílico 0,1% (seção 6.1.1.3) e completou-se o volume com acetonitrila.

6.1.2 Método

Em balão volumétrico âmbar de 5 mL adicionou-se alíquotas da solução mãe de norfloxacino SQR 500,0 µg/mL (seção 6.1.1.1) em metanol e 1,0 mL do reagente ácido cloranílico 0,1%, após completou-se o volume com acetonitrila. As leituras foram efetuadas imediatamente no comprimento de onda máximo, 520 nm, como descrito na seção 5.9.1.3, contra branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

6.1.2.1 Curva de Ringbom

A faixa de linearidade do método foi determinada pela curva de Ringbom. A partir da solução de trabalho de SQR preparada na seção 6.1.1.1, foram preparadas soluções com auxílio de micropipeta, em balões volumétricos âmbar de 5 mL, com concentrações de 10,0 a 190,0 µg/mL, como apresentado na Tabela 13.

Tabela 13. Valores obtidos para construção da curva de Ringbom para NOR-SQR

Pontos	Volume da concentração de NOR-SQR 500 µg/mL (mL)	Concentração (µg/mL)*
1	0,10	10
2	0,20	20
3	0,30	30
4	0,40	40
5	0,50	50
6	0,60	60
7	0,70	70
8	0,80	80
9	0,90	90
10	0,95	95
11	1,00	100
12	1,05	105
13	1,10	110
14	1,15	115
15	1,20	120
16	1,25	125
17	1,30	130
18	1,35	135
19	1,40	140
20	1,45	145
21	1,50	150
22	1,60	160
23	1,70	170
24	1,80	180
25	1,90	190

* diluída em balão volumétrico âmbar de 5 mL

6.1.2.2 Obtenção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica de norfloxacino SQR, utilizou-se o método descrito na seção 6.1.2 e alíquotas de 0,95; 1,00; 1,05; 1,10; 1,15 e 1,20 mL da solução descrita na seção 6.1.1.1, obtendo-se soluções com concentrações finais de 95, 100, 105, 110, 115 e 120,0 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 520 nm, utilizando como branco, solução preparada da mesma forma que as soluções de norfloxacino, porém sem adição do fármaco.

6.1.2.3 Cálculo do teor de norfloxacino comprimidos

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. As soluções foram preparadas em triplicata.

O cálculo da concentração de norfloxacino comprimidos foi realizado através das Equações 1 e 2.

$$C_A = A_A \times \frac{C_{SQR}}{A_{SQR}} \quad (1)$$

Em que:

C_A = concentração da amostra (µg/mL)

A_A = absorvância da amostra

C_{SQR} = concentração da substância química de referência

A_{SQR} = absorvância da substância química de referência

O valor percentual de norfloxacino nas amostras foi calculado pela Equação 2:

$$C_A \% = \frac{(C_A \times 100)}{C_T} \quad (2)$$

Em que:

$C_A\%$ = concentração percentual da amostra

C_A = concentração de norfloxacino encontrado na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_T = concentração teórica de norfloxacino na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

6.1.3 Validação

6.1.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi obtida através de três curvas analíticas em três dias diferentes. O gráfico de resíduos para a validade das pressuposições foi obtida através do cálculo dos resíduos para cada valor de y (VALDERRAMA et al., 2009). Através dos valores das concentrações *versus* média das absorvâncias utilizando a função *Regressão* no programa Excel[®], pode-se obter o gráfico de resíduos. Os resíduos representam a diferença entre o que foi realmente observado e o que foi previsto pelo modelo de regressão, isto é, e_i Equação 3:

$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i \quad (3)$$

Em que:

e_i = resíduo

Y_i = diferença entre resposta observada

\hat{y}_i = resposta estimada

Plota-se um gráfico no qual os resíduos são colocados no eixo vertical e os valores esperados de y , no horizontal (VALDERRAMA et al., 2009).

Cada curva foi construída conforme descrito na seção 6.1.2.2. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

6.1.3.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo percentual das amostras, submetida a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6.1.3.2.1 Repetibilidade

Seis soluções de norfloxacino SQR na concentração de 110,0 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

6.1.3.2.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária pela análise de soluções de norfloxacino comprimidos, na concentração de 110,0 µg/mL, executadas por diferentes analistas e em diferentes dias. As análises foram realizadas em três replicatas.

6.1.3.2.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras, na mesma concentração de 110,0 µg/mL, e analisaram-se três replicatas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

6.1.3.2.2.2 Entre-analistas

Duas amostras, na concentração de 110,0 µg/mL foram preparadas e analisadas em três replicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

6.1.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de padrão foi adicionado à amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 14, em triplicata.

Tabela 14. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do visível

	Norfloxacino amostra (500 µg/mL) (mL)	Norfloxacino SQR (500 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	0,70	-	70,0
R1	0,70	0,10	80,0
R2	0,70	0,30	100,0
R3	0,70	0,50	120,0
Padrão	-	0,70	70,0

*Balão volumétrico âmbar de 5 mL

A porcentagem de norfloxacino recuperada foi calculada conforme Equação 4:

$$\%R = \left[\frac{(C_R - C_A)}{C_P} \right] \times 100 \quad (4)$$

Em que:

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

C_A = concentração encontrada da amostra (µg/mL)

C_P = concentração teórica adicionada da solução da SQR (µg/mL)

6.1.3.4 Especificidade

A especificidade do método proposto foi avaliada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência (SQR) e presença (placebo) dos excipientes. Traçou-se o espectro de absorção da solução placebo descrito na seção 6.1.1.4, para verificação da ausência de absorção no comprimento de onda utilizado no método.

6.1.3.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A Equação 5 foi utilizada no cálculo.

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad (5)$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.3.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio do intercepto e na inclinação da curva analítica. O cálculo foi realizado segundo a Equação 6.

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC} \quad (6)$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.3.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados de teor de norfloxacino em comprimidos obtidos variando-se o comprimento de onda de absorção (522 e 518 nm) e o volume de solução de ácido cloranílico 0,1% (1,2 e 0,8 mL).

6.1.4 Resultados

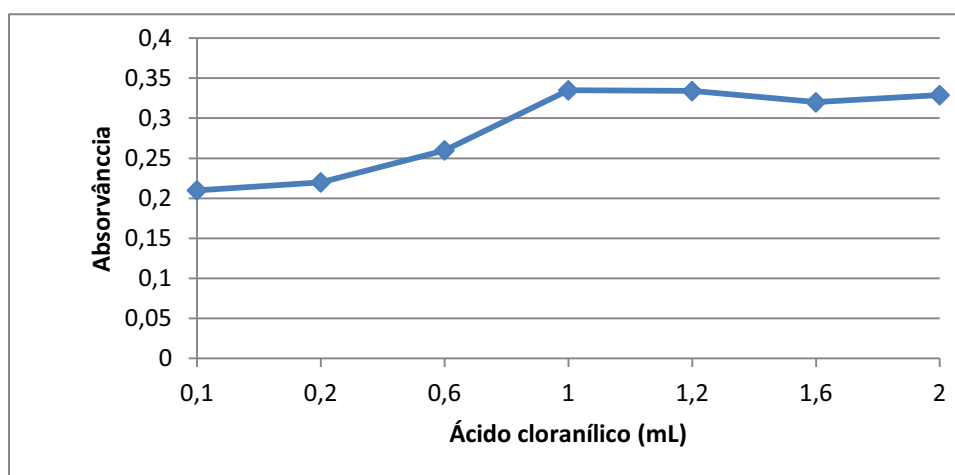
As características do espectro de absorção de norfloxacino SQR após a reação com ácido cloranílico 0,1% foram discutidas na seção 5.9.

A solução mãe de norfloxacino SQR e comprimidos foi aquecida em banho maria a 60 °C durante três minutos, para que o aquecimento provavelmente cause na

molécula a abertura do anel aromático na posição 4 como na Figura 14, fazendo com que reaja com a molécula de ácido cloranílico (MOSTAFA, 2002).

Para determinação das condições do método, avaliaram-se diferentes quantidades do reagente ácido cloranílico 0,1% com concentração molar de $7,8 \times 10^{-5}$. Fixou-se o volume da solução de norfloxacino ($120,0 \mu\text{g/mL}$) na concentração molar de $7,8 \times 10^{-5}$, variando-se o volume da solução de ácido cloranílico 0,1% de 0,1 a 2,0 mL, sendo analisadas contra um branco preparado para cada volume de solução de ácido cloranílico 0,1% para determinação da estequiometria da reação. Os resultados demonstraram (Figura 20) que para a maior concentração da curva analítica ($120 \mu\text{g/mL}$), o valor máximo de absorvância foi obtido com 1,0 mL da solução de ácido cloranílico 0,1%, acima deste volume as leituras permaneceram constantes ou diminuíram.

Figura 20. Curva das leituras de absorvância *versus* volumes de solução de ácido cloranílico a 0,1%, com concentração constante de norfloxacino ($120 \mu\text{g/mL}$)



A reação foi estável por 30 minutos, independente da presença de luz ou não, porém foram utilizados balões volumétricos âmbar devido à fotossensibilidade do norfloxacino descrito na literatura.

6.1.4.1 Curva de Ringbom

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do visível, para norfloxacino são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Obtenção da curva de Ringbom para determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do visível para análise de norfloxacino a 520 nm

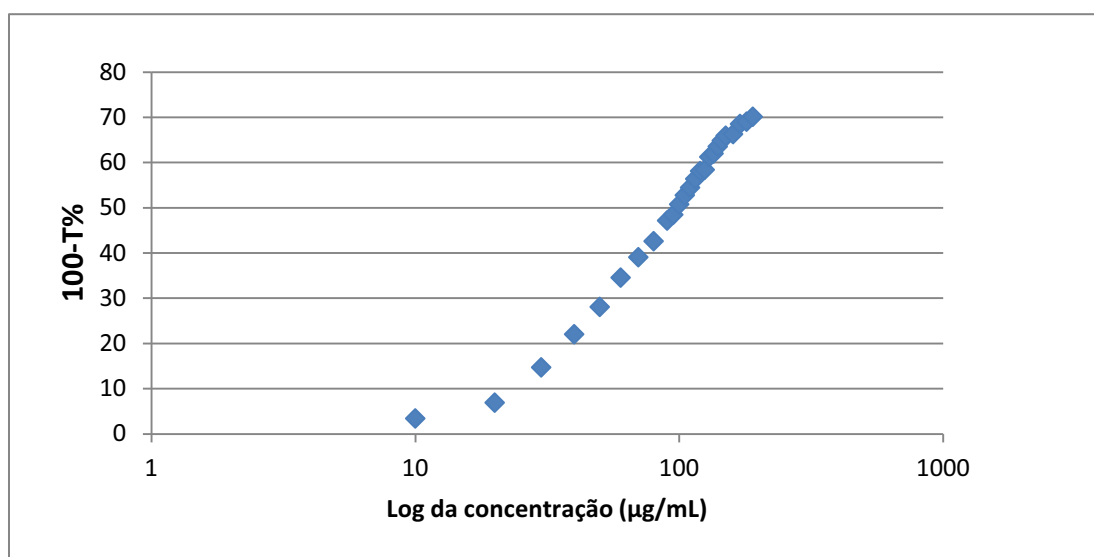
Pontos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	Absorvância	100-T%
1	10	0,015	3,3949
2	20	0,031	6,8892
3	30	0,069	14,6899
4	40	0,108	22,0169
5	50	0,143	28,0551
6	60	0,184	34,5363
7	70	0,215	39,0463
8	80	0,241	42,5883
9	90	0,276	47,1433
10	95	0,287	48,4534
11	100	0,307	50,7393
12	105	0,325	52,7501
13	110	0,341	54,4382
14	115	0,360	56,3584
15	120	0,377	58,0917
16	125	0,380	58,3801
17	130	0,411	61,2117
18	135	0,419	61,9723
19	140	0,438	63,5246
20	145	0,453	64,8196
21	150	0,467	65,9042
22	160	0,471	66,2635
23	170	0,501	68,5007
24	180	0,508	69,0115
25	190	0,524	70,0980

* Balão volumétrico âmbar de 5 mL

O espectro de absorção demonstrou pico máximo de absorção em 520 nm, utilizando solução orgânica de norfloxacino de 175,0 µg/mL. A curva de Ringbom determinou a faixa linear, e de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 95,0 a 120,0 µg/mL, mostrou-se linear.

A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de transmitância e de concentração em escala logarítmica (%) *versus* absorvância (100-T%) (Figura 21).

Figura 21. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para a solução de norfloxacino-SQR



6.1.4.2 Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de norfloxacino SQR, para a construção da curva analítica, são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de absorvância determinados em 520 nm para a obtenção da curva analítica de norfloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico na região do visível

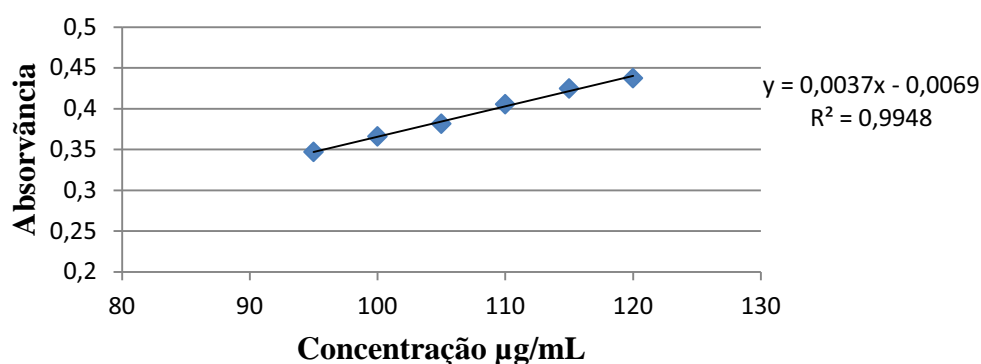
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância ^a	Absorvância média \pm DP ^b	DPR ^c (%)
95	0,3402	0,347 \pm 0,006	0,71
	0,3502		
	0,3501		
100	0,3629	0,366 \pm 0,007	1,20
	0,3734		
	0,3612		
105	0,3765	0,381 \pm 0,005	0,32
	0,3867		
	0,3807		
110	0,3989	0,405 \pm 0,008	0,75
	0,4144		
	0,4024		
115	0,4214	0,424 \pm 0,004	0,65
	0,4294		
	0,4276		
120	0,4343	0,437 \pm 0,007	1,22
	0,4449		
	0,4324		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR = Desvio Padrão Relativo

A representação gráfica da curva analítica e coeficiente de regressão de norfloxacino SQR (Figura 22) foram construídos com as médias dos valores de

absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante a avaliação da linearidade do método.

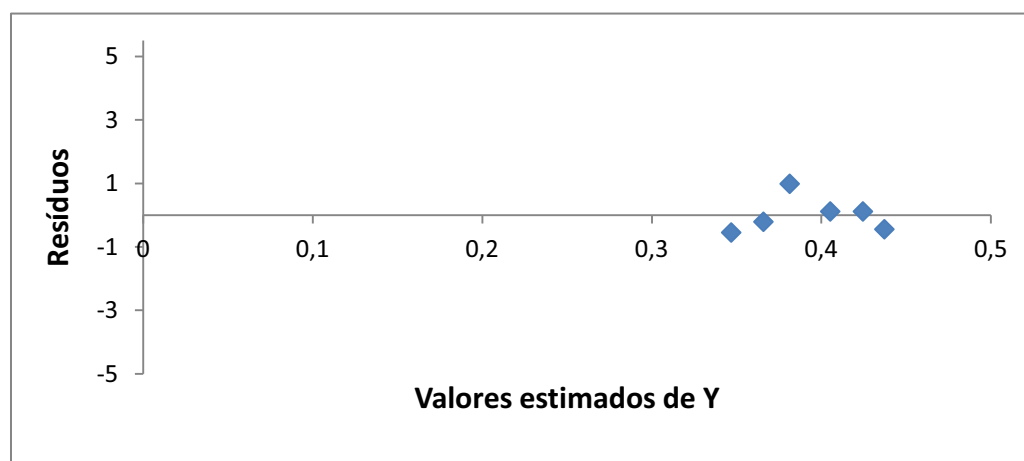
Figura 22. Curva analítica de norfloxacin SQR, obtida a 520 nm pelo método espectrofotométrico na região do visível



A equação da reta, determinada pelo método mínimos quadrados, é: $y = 0,0037x - 0,0069$, com um coeficiente de $r^2 = 0,9948$.

Qualitativamente, o gráfico dos resíduos (Figura 23) pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se a distribuição desses resíduos for aleatória (VALDERRAMA et al., 2009). Como pode-se observar, os pontos estão distribuídos de forma equilibrada acima e abaixo de uma linha imaginária paralela ao eixo x na altura do resíduo zero. A realização do gráfico de resíduos é uma confirmação adicional para concluir que os dados são realmente lineares.

Figura 23. Gráfico de resíduos de norfloxacin SQR, obtida através da regressão linear



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de norfloxacino é mostrada na Tabela 17.

Tabela 17. Análise de variância de absorvância determinados da curva analítica de norfloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do visível

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,01861	0,00372	96,20*	3,11
Regressão linear	1	0,01858	0,01858	480,20*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,19	3,26
Resíduo	12	0,0004643	0,00003868		
Total	17	0,01907			

*Significativo para $p < 0,05\%$

6.1.4.3 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação. Seis soluções de norfloxacino SQR preparadas na concentração de 110,0 $\mu\text{g/mL}$ foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, analista e laboratório forneceram DPR de 1,42% (Tabela 18).

A precisão intermediária foi avaliada através da precisão interdias e entre-analistas. Os valores de teor de norfloxacino comprimidos determinados durante a avaliação da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 18. Os DPR% dos parâmetros interdias e entre-analistas foram inferior a 0,05 e 0,18%, respectivamente.

Tabela 18. Determinação da precisão interdias, entre-analistas e intradia do método espectrofotométrico para análise de norfloxacino comprimidos

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (mg/comp)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (mg/comp)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
	1	410,60	102,65		A	408,68	102,17	0,18
1	2	410,84	102,71	0,05	B	409,72	102,43	
	3	411,00	102,75					
Intradia		408,16	102,04 ^c	1,42				

^a média de três determinações; ^b DPR% = desvio padrão relativo; ^c média de seis determinações

6.1.4.4 Exatidão

Na Tabela 19 são apresentados os valores de recuperação (R) obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico na região do visível.

Tabela 19. Determinação da exatidão do método analítico para análise de norfloxacino comprimidos por espectrofotometria na região do visível

	Norfloxacino SQR adicionado (µg/mL)	Norfloxacino SQR encontrado ^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
R 1	10,0	10,04	100,46		
R 2	30,0	30,84	102,80	101,38	1,23
R 3	50,0	50,43	100,87		

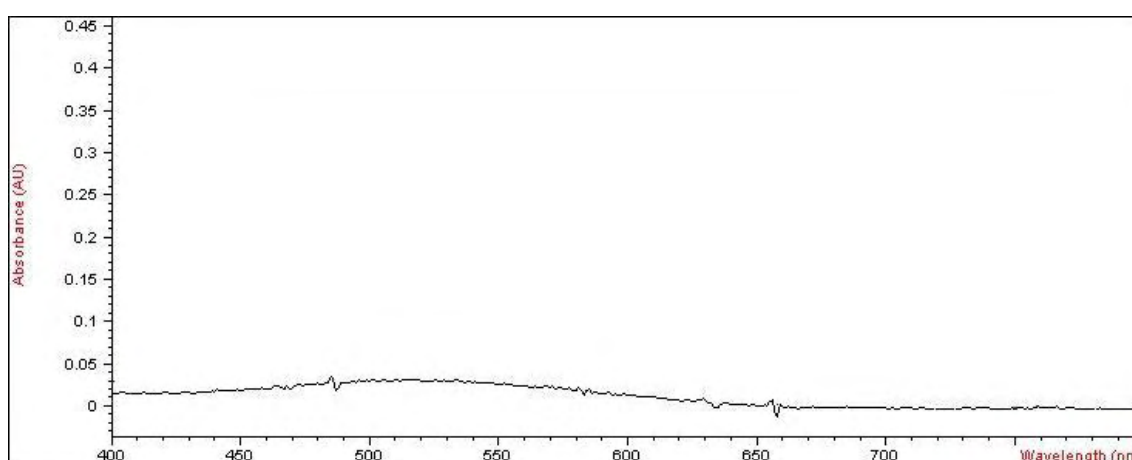
^a média de três determinações

^bDPR = desvio padrão relativo

6.1.4.5 Especificidade

Na avaliação da especificidade do método espectrofotométrico avaliou-se o espectro de absorção da solução de placebo preparado na seção 6.1.1.4, a qual não apresentou máximos na região de comprimento de onda utilizado no método (Figura 24).

Figura 24. Espectro de absorção da solução placebo para verificação de ausência de reação entre os excipientes e ácido cloranílico 0,1%



6.1.4.6 Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados para LD e LQ foram 22,05 µg/mL e 66,82 µg/mL, respectivamente.

6.1.4.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação dos comprimentos de onda e volume de solução de ácido cloranílico 0,1%. Na execução de análises do produto farmacêutico, os teores obtidos não apresentam diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,21%, comprovando a robustez do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme a Tabela 20.

Tabela 20. Avaliação da robustez do método analítico para análise de norfloxacino por espectrofotometria na região do visível

Variável	Faixa investigada	Norfloxacino ^a (mg/comprimido)	Norfloxacino ^a (%)	DPR ^b (%)
Comprimento de onda (nm)	522	412,48	103,12	0,21
	520	410,72	102,68	
	518	411,64	102,91	
Volume de solução de ácido cloranílico 0,1% (mL)	1,2	410,36	102,59	0,13
	1,0	411,28	102,82	
	0,8	410,38	102,58	

^a média de três determinações

^b DPR% = desvio padrão relativo

6.1.5 Discussão

A coloração violeta foi desenvolvida somente pela adição de norfloxacino em solução de ácido cloranílico 0,1%, podendo ser considerada a evidência da formação do complexo binário norfloxacino - ácido cloranílico.

O espectro de absorção mostrou pico de absorção máxima em 520 nm, utilizando solução de metanol a 110,0 µg/mL. Com o objetivo de determinar a linearidade, foi realizada a curva de Ringbom. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 95,0 a 120,0 µg/mL, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de determinação de 0,9948. A equação da reta foi $y = 0,0037x - 0,0069$. No gráfico de resíduos não foram observados valores discrepantes, onde a correlação alta (próxima de 1 ou -1) pode indicar forte dependência linear entre as variáveis. Neste caso, os pontos do gráfico de resíduos ficam dispostos em torno da reta (CARDOSO et al., 2010).

O desvio padrão relativo foi o parâmetro analisado para a determinação da precisão do método, a qual foi demonstrada através da repetibilidade e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). Os valores do desvio padrão relativo 0,05 e

0,18% para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, demonstram a precisão do método.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às soluções de norfloxacino comprimidos para quantificação da substância. Obtivemos neste teste de recuperação média de 101,38%.

Na avaliação da especificidade do método, estudou-se a possível reação entre os excipientes da formulação farmacêutica e o ácido cloranílico. De acordo com os espectros obtidos para norfloxacino SQR e para solução de placebo, constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência do excipiente no máximo de absorção de 520 nm.

Para avaliação da robustez do método proposto, modificações no comprimento de onda e volume de solução de ácido cloranílico 0,1% foram realizadas. Avaliaram-se os coeficientes de variação entre os teores de norfloxacino obtidos nas diferentes condições, obtendo-se resultados inferiores a, 0,21%, os quais demonstram a capacidade do método de se manter inalterado frente a pequenas modificações de alguns de seus parâmetros.

O método de quantificação por espectrofotometria na região do visível foi validado através de análise estatística e fatores como especificidade, precisão, exatidão e linearidade, apresentando bons resultados, podendo ser aplicado para determinação do conteúdo de norfloxacino em comprimidos.

6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies farmacêuticas e químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de massas (COLLINS et al., 2006).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária, denominada fase estacionária e a outra se move

através dela, denominada fase móvel, onde é percolada através dela em uma direção definida. Os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido, resultando em migrações diferentes destes componentes (POOPLE et al., 1991; COLLINS et al., 2006).

Embora seja descrito na literatura métodos cromatográficos, objetivou-se o uso de fase móvel sem tampão para maior durabilidade da coluna, menor tempo de análise e menor consumo de solvente. Assim como, facilidade no preparo das amostras.

6.2.1 *Material*

A substância química de referência e a forma farmacêutica comprimido utilizado neste trabalho estão descritas nas seções 4.2 e 4.3.

O sistema cromatográfico utilizado foi cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters® 2487. Foi utilizada coluna Eclipse Plus C18 Agilent® Zorbax, (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). As áreas dos picos foram integradas automaticamente usando o programa Empower 2.

6.2.1.1 *Preparo das fases móveis*

As fases móveis foram compostas de diferentes proporções das soluções (solução aquosas de ácido acético 1, 2 e 5%) e solventes (acetonitrila e metanol) e as misturas foram realizadas manualmente. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom durante 30 minutos para degaseificação antes do uso.

6.2.1.2 *Ensaio preliminares*

Diferentes parâmetros cromatográficos foram testados com o objetivo de encontrar condições favoráveis à quantificação do fármaco e adequada separação de seus produtos de degradação.

6.2.1.3 *Preparo da solução de norfloxacin SQR*

No preparo das soluções, 12,5 mg de norfloxacino SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com fase móvel (solução de ácido acético 5% v/v: metanol), levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com a mesma fase móvel para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL para gerar soluções com a concentração final requerida e completada até o menisco com água purificada. As soluções foram filtradas utilizando-se filtros de seringa de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

6.2.1.4 Preparo da solução de norfloxacino comprimidos

No preparo da solução de norfloxacino comprimidos partiu-se do peso médio de 20 comprimidos de norfloxacino. Pesou-se o equivalente a 21,91 mg da substância e transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com fase móvel (solução de ácido acético 5% v/v: metanol), levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total solubilização do fármaco e filtrada em papel de filtro quantitativo, gerando solução amostra de norfloxacino com concentração de 500,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL para gerar soluções com a concentração final requerida e completada até o menisco com água purificada. As soluções foram filtradas utilizando-se filtros de seringa de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

6.2.1.5 Preparo do placebo

Para o uso do placebo utilizou-se o mesmo placebo elaborado na seção 6.1.1.4.

Cerca de 21,91 mg do placebo foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de fase móvel (solução aquosa de ácido acético 5%: metanol). Deixou-se em ultra-som durante 30 minutos e completou-se o volume com a mesma fase móvel, filtrou-se com papel filtro quantitativo. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL e completada até o menisco com água purificada. As soluções foram filtradas utilizando-se filtros de seringa de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

6.2.2 Método

Ensaio preliminares foram efetuados utilizando os seguintes sistemas de fases móveis:

- 1- Solução aquosa de ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (70:15:15 v/v/v)
- 2- Solução aquosa de ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (60:20:20 v/v/v)
- 3- Solução aquosa de ácido acético 1%: metanol (70:30 v/v)
- 4- Solução aquosa de ácido acético 2,5%: metanol (70:30 v/v)
- 5- Solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (70:30 v/v)
- 6- Solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (80:20 v/v)

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação de norfloxacino comprimidos estão representadas na Tabela 21.

Tabela 21. Parâmetros estabelecidos para a determinação de norfloxacino em comprimidos pelo método CLAE

Fase móvel	Solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (80:20 v/v)
Coluna	Eclipse Plus C18 Agilent [®] Zorbax (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Deteção	277 nm
Vazão	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 ± 2 °C
Tempo de retenção	≈ 5,7 minutos

6.2.2.1 Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico “System Suitability”

Antes de realizar experimentos de validação, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é obtida através da conformidade do sistema, que pode ser definida por um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis.

Foram efetuadas seis injeções de norfloxacino SQR na concentração de 22,0 µg/mL, avaliando-se o desvio padrão relativo dos parâmetros de simetria do pico, número de pratos teóricos, tempo de retenção e área do pico da substância química de referência.

6.2.3 Validação

A validação do método foi elaborada de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (ICH, 2005; FB 5, 2010; USP 35, 2012). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

6.2.3.1 Especificidade

Determinada pelas degradações ácida, básica, oxidativa e fotolítica da solução de norfloxacino.

No intuito de determinar se o método analítico é indicativo de estabilidade, amostras de norfloxacino SQR foram submetidas em condições de estresse para conduzir o estudo de degradação forçada (ICH, 2005). Todas as amostras foram resfriadas, neutralizadas e diluídas para concentração de 22,0 µg/mL em balão volumétrico âmbar de 10,0 mL e filtradas antes da injeção.

- ❖ Degradação oxidativa: solubilizou-se com fase móvel (solução de ácido acético 5% v/v: metanol) 12,5 mg de norfloxacino SQR em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com a mesma solução de peróxido de hidrogênio para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Esta solução foi exposta a temperatura de 80 °C por 4 dias.
- ❖ Degradação ácida e alcalina: solubilizou-se com HCl 0,1 M 12,5 mg de norfloxacino SQR em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com solução HCl 0,1 M, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com a mesma solução de HCl para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Os

estudos na condição alcalina foram conduzidos de forma similar, com o fármaco na concentração de 500,0 µg/mL em NaOH 0,1 M. Estas soluções foram expostas a temperatura de 80 °C por 4 dias.

- ❖ Degradação neutra: solubilizou-se com fase móvel (solução de ácido acético 5% v/v: metanol) 12,5 mg de norfloxacin SQR em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com água, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com água para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Esta solução foi exposta a temperatura de 80 °C por 4 dias.
- ❖ Degradação fotolítica: solubilizou-se com fase móvel (solução de ácido acético 5% v/v: metanol) 12,5 mg de norfloxacin SQR em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com água, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com água para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Esta solução foi exposta à luz ultravioleta (200 W h m⁻²), por 4 dias.

Assim, a capacidade indicadora de estabilidade do método foi estabelecida através da resolução obtida entre o pico principal de norfloxacin e seus produtos de degradação.

Além disso, solução de placebo descrita na seção 6.2.1.5, foi analisada pelo método.

6.2.3.2 Linearidade

A partir da solução de norfloxacin SQR 500,0 µg/mL descrita na seção 6.2.1.3, transferiram-se alíquotas de 0,20; 0,28; 0,36; 0,44; 0,52 e 0,60 mL para balões volumétricos âmbar de 10 mL, completando-se o volume com água, obtendo-se concentrações de 10, 14, 18, 22, 26 e 30,0 µg/mL. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

6.2.3.3 *Precisão*

A precisão do método foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6.2.3.3.1 *Repetibilidade*

Foram realizadas seis determinações sucessivas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

6.2.3.3.2 *Precisão intermediária*

Avaliou-se a precisão intermediária através de análises executadas por diferentes analistas e em diferentes dias, usando os mesmos lotes de amostras e método. As análises foram realizadas em três replicatas.

6.2.3.3.2.1 *Interdias*

Analisaram-se três replicas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

6.2.3.3.2.2 *Entre-analistas*

Analisaram-se três replicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

A concentração de norfloxacino foi obtida através da Equação 7:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR} \quad (7)$$

Em que:

A_A = Área média absoluta das amostras

A_{SQR} = Área média absoluta da SQR

C_A = Concentração de norfloxacino na amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

O valor percentual de norfloxacino nas amostras foi calculado pela Equação 8:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T \quad (8)$$

Em que:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de norfloxacino encontrado na amostra

C_T = Concentração teórica de norfloxacino na amostra

6.2.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi estudada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 22, em triplicata.

Tabela 22. Preparo de soluções para o teste de recuperação do método CLAE

	NOR comprimidos (500 µg/mL) (mL)	NOR SQR (500 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	0,2	-	10,0
R1	0,2	0,152	17,6
R2	0,2	0,240	22,0
R3	0,2	0,328	26,4
Padrão	-	0,2	10,0

*balão volumétrico de 10 mL

A percentagem de norfloxacino recuperada foi calculada pela Equação 4, apresentada anteriormente na seção 6.1.3.3.

6.2.3.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A Equação 5 na seção 6.1.3.5 representa o cálculo.

6.2.3.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A Equação 6 na seção 6.1.3.6 representa o cálculo.

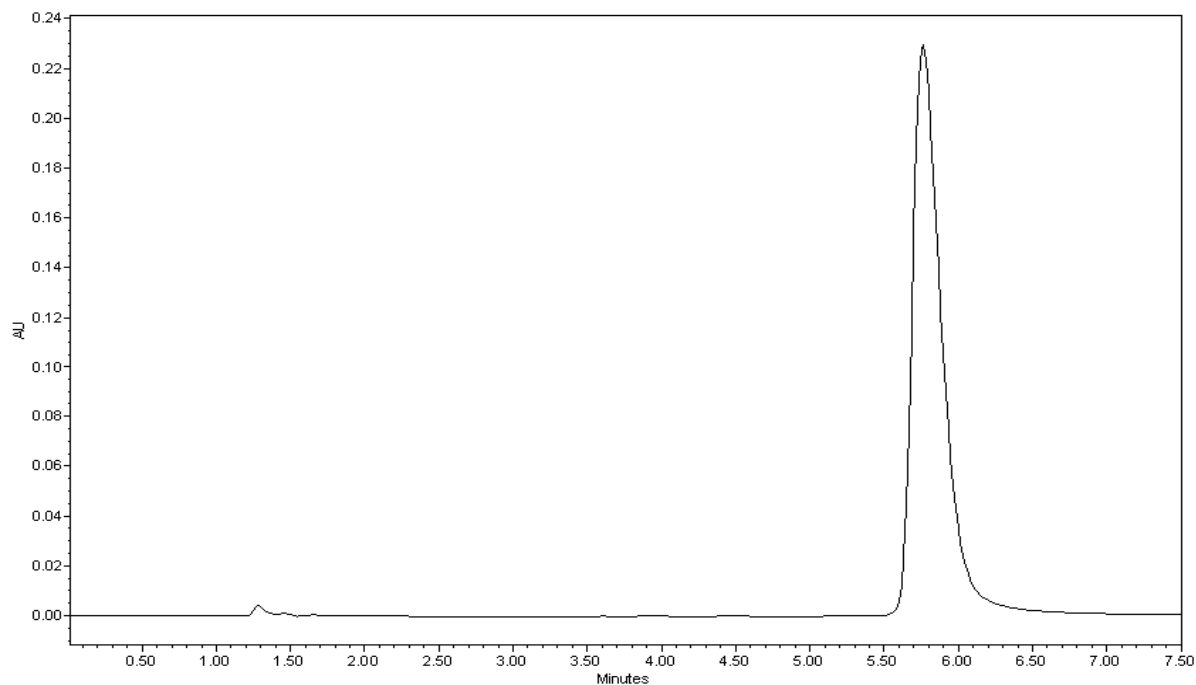
6.2.3.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela variação de alguns parâmetros analíticos como variação do comprimento de onda 275 para 277 e 279 nm, percentagem de metanol na fase móvel de 18% para 20% e 22%, variação do volume da vazão de 0,8 para 1,0 e 1,2 mL/min e tipo de coluna Phenomenex Luna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Foram analisadas 6 replicatas na concentração de 22,0 µg/mL de norfloxacino para cada variação. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao desvio padrão relativo dos valores das áreas.

6.2.4 Resultados

As condições cromatográficas estão apresentadas na seção 6.2.2 indicadas na Tabela 21. No cromatograma obtido utilizou-se fase móvel composta de solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (80:20 v/v) podendo ser identificado a formação de um pico quase totalmente simétrico e com tempo de retenção adequado ≈ 5,7 minutos (Figura 25).

Figura 25. Cromatograma da solução de norfloxacin SQR com concentração de 22,0 µg/mL, utilizando com fase móvel solução de ácido acético 5%:metanol (80:20).



6.2.4.1 Conformidade do sistema

Na Tabela 23 estão apresentados os resultados dos parâmetros avaliados de conformidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico, bem como os valores preconizados.

Tabela 23. Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para norfloxacino

Parâmetros avaliados					
Recomendação (FDA, 2012a)	TF ≤ 2	K > 2	N > 2000	-	-
	Assimetria	Fator de Capacidade	N° pratos	Tempo de retenção (min)	Área
	0,75	3,29	2200,19	5,58	2995654
	0,75	3,31	2223,92	5,61	2997951
	0,72	3,31	2223,92	5,61	3020060
	0,74	3,29	2223,92	5,61	2994350
	0,72	3,29	2200,19	5,58	3048035
	0,74	3,30	2208,09	5,59	3058041
Média	0,73	3,29	2213,37	5,59	3019015
DPR ^a (%)	1,85	0,29	0,59	0,26	0,93

TF = *tailing factor*; K = Fator de capacidade; N = n° de pratos; ^aDPR = desvio padrão relativo

O teste de conformidade do sistema é essencial para assegurar a qualidade no desempenho do sistema cromatográfico (FDA, 2012a).

6.2.4.2 Especificidade e estudos de degradação forçada

O estudo de degradação forçada foi realizado para a indicação de estabilidade do método analítico. As Figuras 26, 27, 28, 29 e 30 mostram os cromatogramas obtidos após as degradações oxidativa, básica, ácida, neutra e fotolítica, respectivamente, com os picos correspondentes aos produtos de degradação indicados em azul (PD1, PD2 e PD3) com uma seta em azul e o pico principal norfloxacino indicados em cor preta bem resolvidos.

Figura 26. Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$, submetido à degradação em meio oxidativo (H_2O_2 3%). Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul)

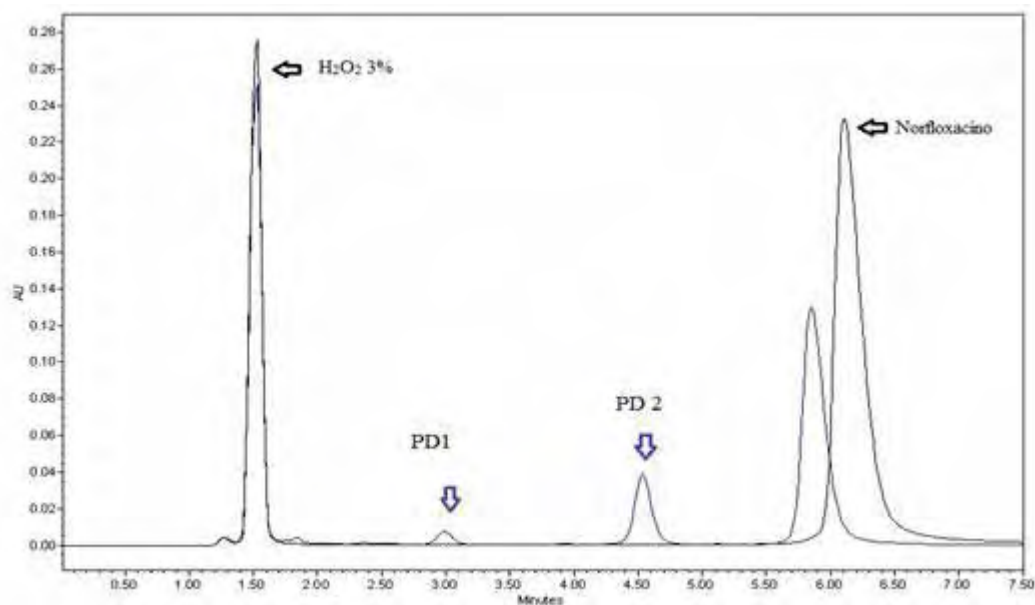


Figura 27. Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$, submetido à degradação em meio básico (NaOH 0,1 M). Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul)

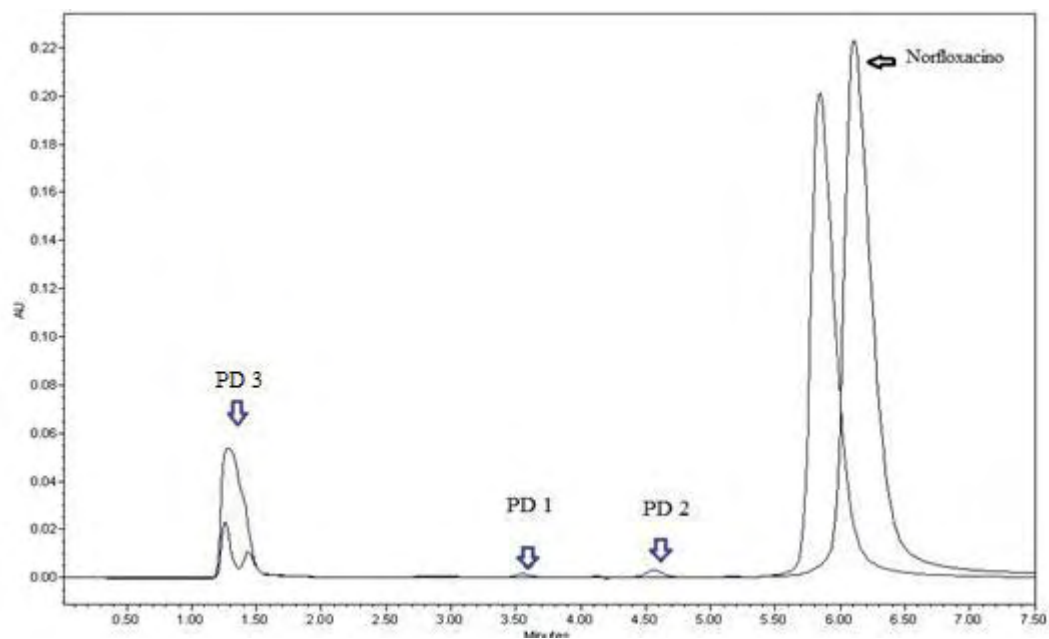


Figura 28. Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$, submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M). Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul)

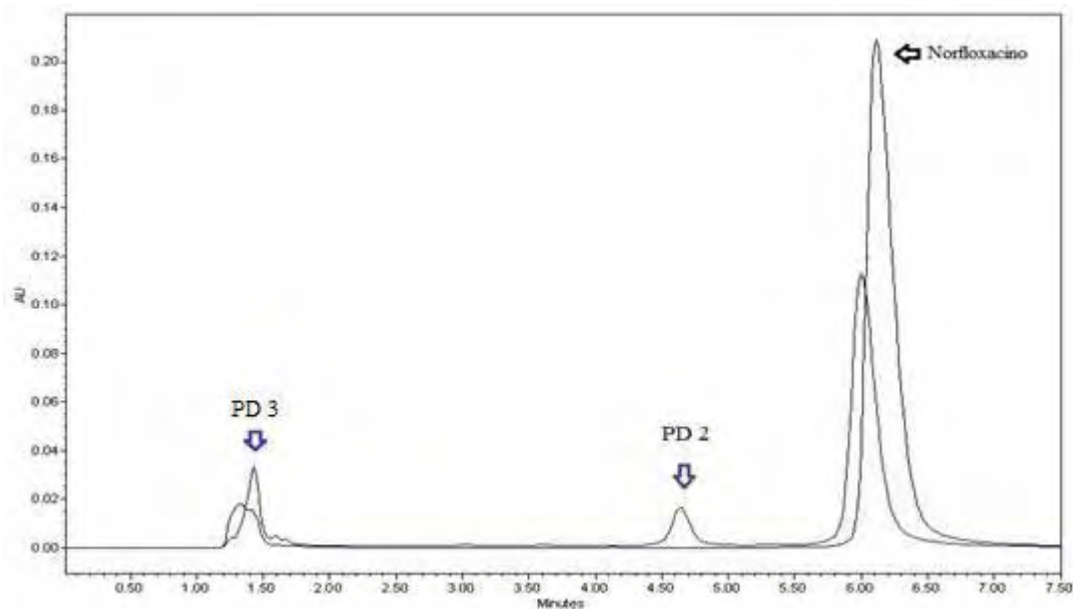


Figura 29. Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$, submetido à degradação em meio neutra. Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul)

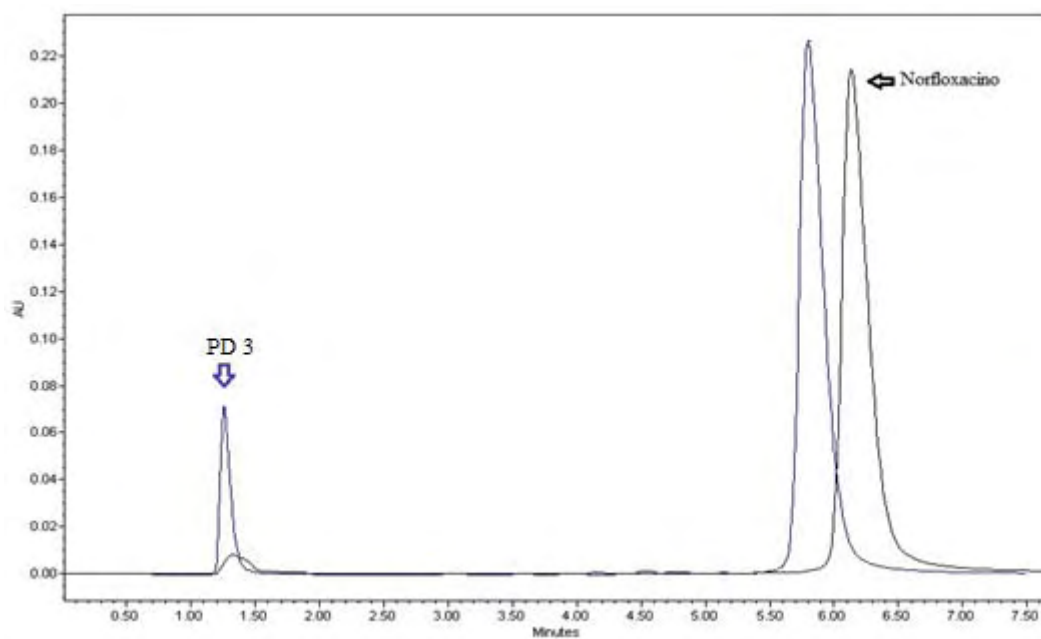
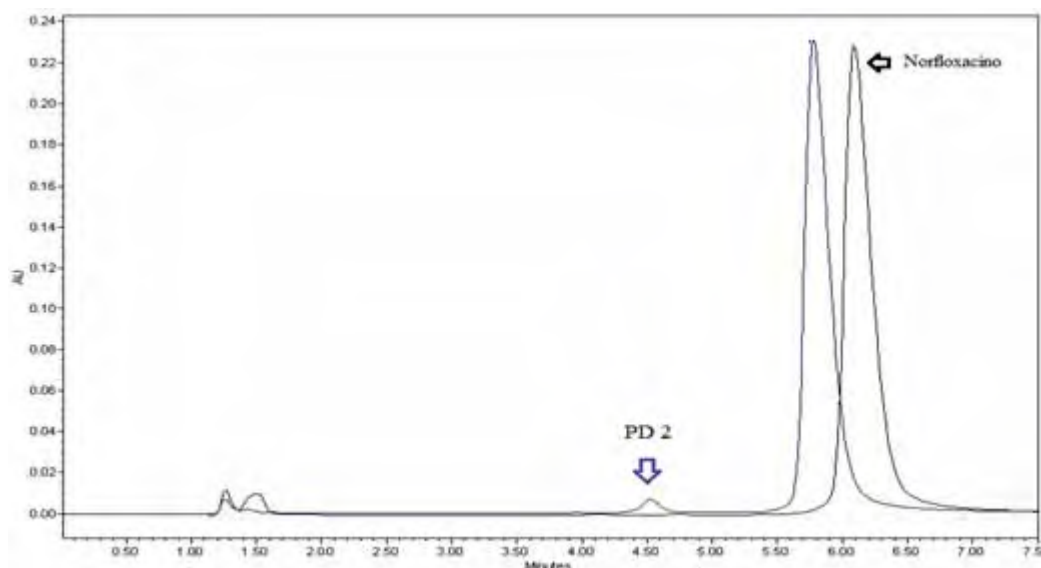
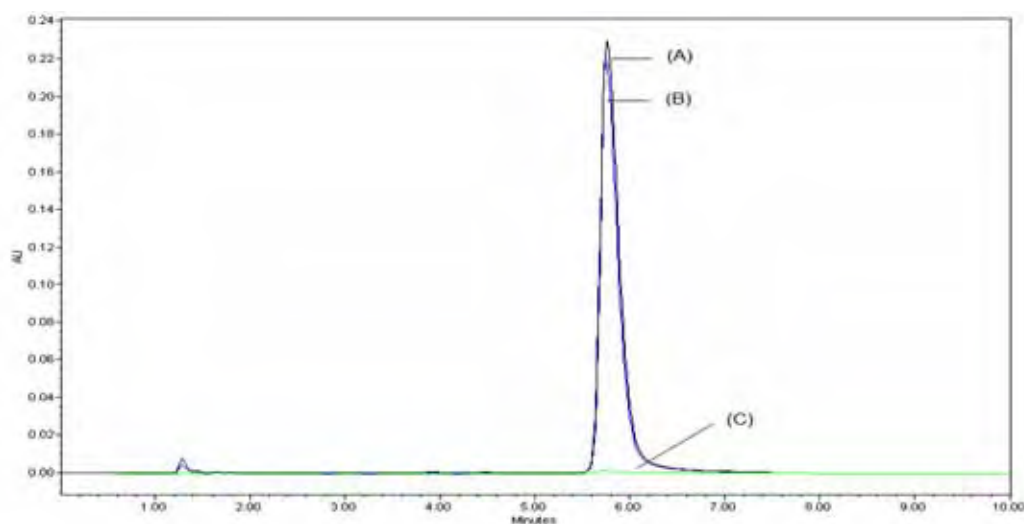


Figura 30. Cromatograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$, submetido à degradação fotolítica. Tempo zero (cor preta) e após 96 horas (cor azul)



A Figura 31 ilustra o cromatograma de norfloxacino SQR, comprimidos e a solução placebo sobreposta, provando através deste ensaio que o método desenvolvido é específico, não tendo interferência dos excipientes contidos na formulação do comprimido.

Figura 31. Cromatograma da solução de norfloxacino SQR (A), comprimidos (B) e solução de placebo (C) na concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$ obtidos pelo método cromatográfico



6.2.4.3 Linearidade

Na Tabela 24 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de norfloxacino SQR.

Tabela 24. Valores das áreas referentes ao pico de norfloxacino SQR para construção da curva analítica do método CLAE

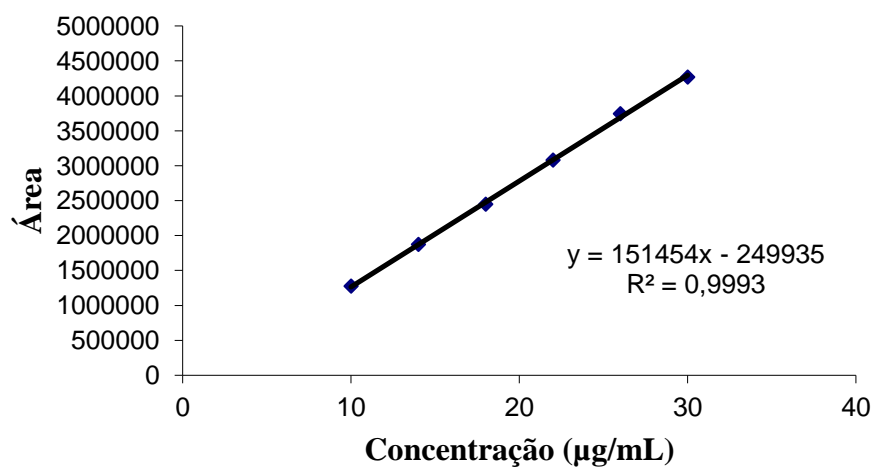
Concentração (µg/mL)	Áreas ^a (AU)	Área média ± DP ^b	DPR ^c (%)
10	1283012	1273625 ± 16461,54	1,29
	1283247		
	1254618		
14	1859686	1870679 ± 16869,88	0,90
	1862250		
	1890103		
18	2421663	2446084 ± 29954,99	1,22
	2437081		
	2479508		
22	3068257	3077560 ± 15983,25	0,52
	3068408		
	3096016		
26	3764332	3741272 ± 20963,86	0,56
	3723365		
	3736120		
30	4252785	4265698 ± 11472,76	0,27
	4274716		
	4269594		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR = desvio padrão relativo

A curva analítica de norfloxacin SQR (Figura 32) 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 $y = 151454x - 249935$, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9993.

Figura 32. Curva analítica de norfloxacin SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando como fase móvel solução de ácido acético 5% e metanol (80:20 v/v) a 277 nm



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de norfloxacin SQR é mostrada na Tabela 25.

Tabela 25. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de norfloxacino SQR, utilizado o método por CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	19282226651302,90	3856445330260,59	10150,99*	3,15
Regressão linear	1	19282226651302,90	19282226651302,90	50754,96*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,0000	3,26
Resíduo	12	4558898501,34	379908208,44		
Total	17	19286785549804,30			

*Significativo para $p < 0,05\%$

6.2.4.4 Precisão

Os teores de norfloxacino em comprimidos, determinados durante a análise da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 26.

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base nos desvios padrão relativos. Seis soluções de norfloxacino SQR preparadas na concentração de 22,0 $\mu\text{g/mL}$ foram submetidas a análises sucessivas e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, fornecendo DPR de 0,78%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises do padrão e da amostra em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais de teores médios de 102,84%, com DPR de 0,11%, respectivamente. Na precisão entre-analistas foram avaliadas por dois analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 103,51%, com DPR de 0,79%, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 26.

Tabela 26. Valores determinados para a precisão interdias e entre-analistas do método para norfloxacino comprimidos por CLAE

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (mg/comp.)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (mg/comp.)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
	1	414,4	103,60		A	414,56	103,64	0,79
1	2	409,64	102,41	0,11	B	413,48	103,37	
	3	410,0	102,50					
Intradia		414,48	102,04	0,78 ^c				

^a média de três determinações; ^b DPR% = desvio padrão relativo; ^c media de seis determinações

6.2.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade adicionada de padrão foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. Na Tabela 27 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método cromatográfico, em que a porcentagem média foi de 103,96%.

Tabela 27. Determinação da exatidão do método analítico para a análise de norfloxacino pelo método de CLAE

	NOR SQR adicionado (µg/mL)	NOR SQR encontrado ^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
R1	7,6	7,62	101,75		
R2	12,0	12,53	104,29	103,96	1,98
R3	16,4	17,58	105,85		

^a média de três determinações ^bDPR = desvio padrão relativo

6.2.4.6 Limites de detecção e de quantificação

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico foi 0,10 µg/mL e o LQ calculado foi 0,32 µg/mL.

6.2.4.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela variação de alguns parâmetros analíticos como: variação do comprimento de onda, porcentagem de metanol na fase móvel, variação do volume da vazão e tipo de coluna. Na execução de análises sob parâmetros alterados de modo isolado, os teores obtidos não apresentam diferença significativa e o desvio padrão relativo obtiveram média de 0,67 %, comprovando a robustez do método proposto, frente aos pequenos parâmetros avaliados de acordo com a Tabela 28.

Tabela 28. Parâmetros de avaliação da robustez do método cromatográfico para análise de norfloxacino

Variável	Faixa investigada	Norfloxacino ^a (mg/comp.)	Norfloxacino ^a (%)	DPR ^b (%)
Marca da coluna	Luna C ₁₈ Phenomenex® (150 x 4,6 mm, 5 µm)	423,80	105,95	0,71
	Eclipse Plus C18 Agilent® (150 x 4,6 mm, 5 µm)	419,52	104,88	
Vazão (mL/min)	0,8	418,12	104,53	0,19
	1,0	419,52	104,88	
	1,2	419,20	104,80	
Metanol (%)	18	419,60	104,90	0,98
	20	419,52	104,88	
	22	412,44	103,11	
Comprimento de onda (nm)	275	414,32	103,58	0,82
	277	419,52	104,88	
	279	413,00	103,25	

^a média de três determinações^bDPR = desvio padrão relativo

6.2.5 Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. A combinação desta técnica cromatográfica com detecção ultravioleta fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos farmacêuticos. Além disso, é aplicável para o monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos, como a possibilidade de identificação e quantificação dos produtos de degradação (WATSON, 2005).

A fim de estabelecer os parâmetros cromatográficos adequados para o estudo, diferentes composições de fase móvel foram testadas. Utilizou-se uma fase móvel livre de tampão, de simples preparação onde se obtiveram alta resolução dos picos cromatográficos.

Depois de estabelecidos os parâmetros de análise realizaram-se a conformidade do sistema (*system suitability*) visando verificar a validação do instrumento e da metodologia analítica simultaneamente para que o método apresente precisão e exatidão (LANÇAS, 2010).

As amostras foram preparadas em fase móvel com o objetivo de obtenção de um pico mais bem definido e diluindo-se em água até que o pH fique em torno de 4 para posterior injeção.

O tempo de retenção observado para norfloxacino foi aproximadamente 5,7 minutos, propiciando análise rápida e adequada para o controle de qualidade de rotina.

As propriedades indicadoras de estabilidade do método são avaliadas por estudos de degradação forçada, particularmente quando não há informações disponíveis sobre potenciais produtos de degradação. Todas as condições avaliadas nos estudos de degradação forçada resultaram na formação de produtos de degradação, com exceção da hidrólise neutra. Na degradação oxidativa, foram observados dois picos adicionais (PD1 e PD2) e um decréscimo significativo da área do pico de norfloxacino. Na degradação em meio ácido foi observado um pico adicional (PD2 e PD3) e decréscimo significativo na área do pico de norfloxacino. Na degradação em meio básico, foram observados dois pequenos picos adicionais (PD1, PD2 e PD3) e um leve decréscimo da área do pico do norfloxacino. Na degradação fotolítica observou-se um pico adicional (PD2) e um leve acréscimo no pico do fármaco e na degradação neutra observou-se um pico adicional (PD3), apenas o um acréscimo no pico do fármaco. Al-Deeb e colaboradores (1995) avaliaram a degradação do NOR através de estudos de foto-estabilidade. Borrego e colaboradores (1999) determinaram um produto de degradação que também foi identificado neste ensaio como PD2. No estudo citado os comprimidos de norfloxacino foram colocados em exposição à luz solar durante seis meses e em sua metodologia foi usado solução tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila como fase móvel. A avaliação da especificidade demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes na formulação e determinação de norfloxacino, pois não foi observado nenhum pico com o

tempo de retenção semelhante ao do norfloxacino. Assim sendo, o método cromatográfico demonstrou ser específico para a análise do fármaco em estudo.

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de uma curva analítica, na faixa de concentração de 10,0 a 30,0 µg/mL. Foram desenvolvidas três curvas analíticas. Observou-se haver correlação linear entre a concentração de norfloxacino SQR e as áreas absolutas obtidas. Os estudos de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação da reta $y = 151454x - 249935$. O método apresentou coeficiente de determinação de 0,9993, demonstrando elevada concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas obtidas. Os resultados da ANOVA demonstram haver regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade, o que confirma a linearidade do método.

Os dados para a repetibilidade e precisão intermediária apresentam DPR de 0,56% e 0,11% indicando a precisão do método proposto, sendo que a literatura preconiza DPR menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003).

Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 0,10 e 0,32 µg/mL, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade norfloxacino em produtos comerciais.

O teste de recuperação de norfloxacino SQR forneceu uma percentagem de recuperação média de 103,96%. Este valor mostra boa exatidão do método.

A robustez do método cromatográfico, avaliada através de pequenas modificações nas condições cromatográficas de modo isolado, indicou que o método é robusto em todas as alterações.

Considerando todos os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros analíticos, é possível afirmar que o método por CLAE foi validado de forma satisfatória para a quantificação de norfloxacino comprimidos.

6.3 *Eletroforese capilar (EC)*

Nos últimos anos, a eletroforese capilar (EC) tornou-se uma técnica popular devido à simplicidade, ao alto poder de separação, baixo tempo de análise e pequeno consumo de amostra e de solventes (TAVARES et al., 2003). O termo eletroforese

refere-se à migração de substâncias eletricamente carregadas, quando dissolvidas ou suspensas em um eletrólito através do qual passa uma corrente elétrica. A utilização de capilares como canais de ligação em eletroforese aumentaram o desempenho da separação eletroforética, comparável ao da CLAE (USP 33, 2010).

6.3.1 Material

A substância química de referência e a norfloxacino comprimidos utilizados neste trabalho estão descritas nas seções 4.2 e 4.3. O padrão interno utilizado foi o moxifloxacino.

O equipamento de eletroforese capilar utilizado foi o modelo Agilent^{®3D} CE (Agilent[®] Technologies, Waldbronn, Alemanha), acoplado com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor automático, com controle de temperatura e tensão.

As áreas dos picos foram integradas automaticamente usando o programa de *software ChemStation*.

6.3.1.1 Ensaios preliminares

Diferentes eletrólitos, valores de pH, temperaturas, voltagens, volumes de injeção e solventes da amostra foram testados para encontrar as condições favoráveis à quantificação do fármaco e adequada separação de seus produtos de degradação.

6.3.1.2 Preparo do eletrólito de fundo

Foram pesados 1,14 g de tampão tetraborato de sódio 30 mM, pH 9,0 e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com água purificada.

6.3.1.3 Preparo da solução de norfloxacino SQR

Sistematicamente foram pesados 12,5 mg de norfloxacino SQR em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de 5,0 mL de NaOH 0,1 M a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume

com água purificada, obtendo-se uma solução de norfloxacino SQR de concentração final de 500 µg/mL.

6.3.1.4 Preparo da solução de moxifloxacino padrão interno

Sistematicamente foram pesados 12,5 mg de moxifloxacino padrão interno (MOX - PI) em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de 5,0 mL de NaOH 0,1 M a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com água purificada, obtendo-se uma solução de MOX - PI de concentração final de 500 µg/mL.

6.3.1.5 Preparo da solução de norfloxacino comprimidos

No preparo de norfloxacino comprimidos partiu-se do peso médio de 20 comprimidos. Posteriormente, foram pesados 21,91 mg do fármaco em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de 5,0 mL de NaOH 0,1 M a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com água purificada, obtendo-se uma solução de norfloxacino comprimidos de concentração final 500 µg/mL. Posteriormente filtrou-se a solução em papel quantitativo.

6.3.1.6 Preparo do placebo

Para análise do placebo utilizou-se o mesmo placebo elaborado na seção 6.1.1.4. Cerca de 21,91 mg do placebo foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 0,5 mL de NaOH 0,1 M. Deixou-se em ultra-som durante 30 minutos e completou-se o volume com água purificada. Posteriormente, filtrou-se a solução em papel quantitativo.

6.3.2 Método

Para o acondicionamento inicial do capilar utilizou-se: NaOH 1 M durante 30 minutos, água purificada durante 30 minutos, NaOH 0,1 M durante 10 minutos e água purificada durante 10 minutos.

Antes do uso diário, o capilar foi acondicionado da seguinte maneira: NaOH 0,1 M durante 10 minutos e água purificada 10 minutos.

O pré-condicionamento do capilar (*Flush*) antes de cada determinação foi composto por: NaOH 0,1 M (2 min), água purificada (2 min) e eletrólito durante 2 minutos.

Depois de cada determinação o capilar foi lavado com: NaOH 0,1 M durante 10 minutos e água purificada durante 10 minutos. O capilar foi mantido com água, depois do trabalho diário.

As condições analíticas utilizadas no método estão descritas na Tabela 11 apresentado na seção 5.12.1.3.

A identificação de norfloxacinol comprimidos utilizando a técnica de EC foi realizada através da semelhança entre o tempo de migração observado na solução de NOR-SQR e norfloxacinol comprimidos.

6.3.3 Parâmetros de conformidade do sistema eletroforético “System Suitability”

Para verificar o desempenho do equipamento e antes de realizar os experimentos de validação analítica foram efetuadas seis injeções de NOR-SQR na concentração de 20 µg/mL, avaliando os parâmetros de conformidade do sistema para EC como: desvio padrão relativo dos parâmetros: *tailing* (T), fator de assimetria do pico (S), tempo de migração, número de pratos (N) e área do pico.

6.3.4 Validação

6.3.4.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade de um método analítico medir a resposta do analito na presença de suas impurezas (ICH, 2005). A capacidade indicadora de

estabilidade do método foi determinada pelas degradações neutra, ácida, básica, oxidativa e fotolítica da solução de norfloxacino.

Todas as amostras foram resfriadas, neutralizadas e diluídas para concentração de 20,0 µg/mL em balão volumétrico âmbar de 10,0 mL e filtradas antes da injeção.

- ❖ Degradação oxidativa: solubilizou-se 12,5 mg de norfloxacino SQR com 5,0 mL de NaOH 0,1 M em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3 %, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com a mesma solução de peróxido de hidrogênio para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Esta solução foi exposta a temperatura de 80 °C por 4 dias.
- ❖ Degradação ácida e alcalina: solubilizou-se com HCl 0,1 M 12,5 mg de norfloxacino SQR em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com solução HCl 0,1 M, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com a mesma solução de HCl para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Os estudos na condição alcalina foram conduzidos de forma similar, com o fármaco na concentração de 500,0 µg/mL em NaOH 0,1 M. Estas soluções foram expostas a temperatura de 80 °C por 4 dias.
- ❖ Degradação neutra e fotolítica: solubilizou-se 12,5 mg de norfloxacino SQR com 5,0 mL de NaOH 0,1 M em balão volumétrico âmbar de 25 mL, cujo volume foi completado com água, levou-se a solução ao ultra-som por 30 minutos e completou-se o volume com água para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Acondicionou-se a degradação neutra em temperatura de 80 °C por 4 dias e a degradação fotolítica foi exposta à luz ultravioleta (200 W h m⁻²), por 4 dias.

Além dos estudos de degradação forçada a especificidade do método foi avaliada também pela análise da solução de placebo descrita na seção 6.3.1.6.

6.3.4.2 Linearidade

A partir da solução de NOR-SQR 500,0 µg/mL descrita na seção 6.3.1.3, transferiram-se alíquotas de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 e 0,60 mL para balões volumétricos âmbar de 10 mL, completando-se o volume com água, obtendo-se concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30,0 µg/mL. A partir da solução de MOX-PI 500,0 µg/mL descrita na seção 6.3.1.4, preparou-se uma solução de 20,0 µg/mL em balão volumétrico âmbar de 10 mL, completando-se o volume com água. Em *vial* com capacidade de 500 µL foram adicionados 250 µL de NOR-SQR de cada concentração e 250 µL da solução de 20,0 µg/mL de MOX-PI. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

6.3.4.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6.3.4.3.1 Repetibilidade

Foram realizadas seis determinações sucessivas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

6.3.4.3.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária através de análises executadas por diferentes analistas e em diferentes dias, usando os mesmos lotes de amostras e método. As análises foram realizadas em três replicatas.

6.3.4.3.2.1 *Interdias*

Analisaram-se três replicas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

6.3.4.3.2.2 *Entre-analistas*

Analisaram-se três replicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

A concentração de norfloxacino foi obtida através da Equação 7 e o valor percentual de norfloxacino nas amostras foi calculado pela Equação 8 descrito anteriormente na seção 6.2.3.3.2.2.

6.3.4.4 *Exatidão*

A exatidão do método foi estudada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra. Todas as soluções finais foram adicionadas de PI. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 29, em triplicata.

Tabela 29. Preparo de soluções para o teste de recuperação método eletroforético

	NOR comprimidos (500 µg/mL) (mL)	NOR SQR (500 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	0,1	-	5,00
R1	0,1	0,22	16,0
R2	0,1	0,30	20,0
R3	0,1	0,38	24,0
Padrão	-	0,1	5,00

*balão volumétrico de 10 mL

A percentagem de norfloxacino recuperada foi calculada pela Equação 4, apresentada anteriormente na seção 6.1.3.3.

6.3.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi determinado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005). Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A Equação 5 na seção 6.1.3.5 representa o cálculo.

6.3.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005). Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A Equação 6 na seção 6.1.3.6 representa o cálculo.

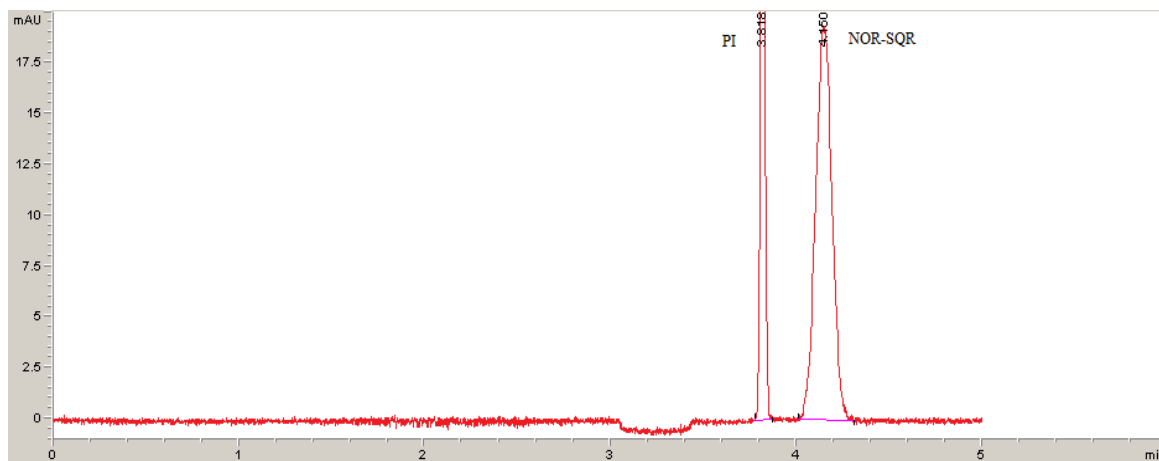
6.3.4.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela variação de pequenos parâmetros analíticos como: variação do comprimento de onda 277 para 275 e 279 nm, temperatura do capilar 25°C para 27°C e 23°C, voltagem (kV) 15 para 17 e 13, concentração da solução do tampão (mM) 30 para 32 e 28 e valor do pH do tampão 9,0 para 9,2 e 8,8. Foram analisadas seis replicatas na concentração de 20,0 µg/mL de norfloxacino para cada variação. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao desvio padrão relativo dos valores das áreas.

6.3.5 Resultados

As condições eletroforéticas estão apresentadas na seção 5.12.1.3 indicadas na Tabela 11. No eletroferograma típico obtido pelo método proposto, demonstrando a resolução e a assimetria do pico correspondente ao NOR-SQR, é apresentado na Figura 33. O tempo de migração observado em 4,1 minutos permitiu rápida determinação do fármaco, contribuindo com a sua determinação para o controle de qualidade.

Figura 33. Eletroferograma de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, tempo de migração: padrão interno (PI) de 3,8 minutos e NOR-SQR 4,1 minutos



6.3.5.1 Conformidade do sistema

Na Tabela 30 estão apresentados os resultados dos parâmetros avaliados de conformidade do sistema obtidos pelo método eletroforético, bem como os valores preconizados. Todos os valores encontrados foram calculados automaticamente pelo *software*.

Tabela 30. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema eletroforético desenvolvido para quantificação de norfloxacino

Parâmetros avaliados					
Recomendação (FDA, 1994; USP, 2008)	$S \leq 2$	$T \leq 1$	$N > 2000$	-	-
	Assimetria	USP <i>tailing</i>	Pratos teóricos	Tempo de migração (min)	Área absoluta
	1,00	1,09	10422	4,22	1,85
	1,00	1,07	10346	4,21	1,86
	0,99	1,09	10379	4,22	1,86
	1,01	1,08	10246	4,29	1,85
	1,00	1,09	10424	4,22	1,85
	1,02	1,06	10313	4,22	1,86
Média	1,00	1,08	10355	4,22	1,86
DPR ^a (%)	1,02	1,17	0,66	0,75	0,42

^a desvio padrão relativo; S = assimetria; T = *tailing factor*; N = n° pratos

O teste de conformidade do sistema é essencial para assegurar a qualidade no desempenho do sistema eletroforético (FDA, 1994; USP, 2008).

6.3.5.2 Especificidade e estudos de degradação forçada

As degradações forçadas foram realizadas para verificar as propriedades indicadoras de estabilidade do método analítico. As Figuras 34, 35, 36, 37 e 38 mostram os eletroferogramas obtidos após as degradações oxidativa, básica, ácida, neutra e fotolítica, respectivamente, com os picos correspondentes aos produtos de degradação (PD1 e PD2).

Os eletroferogramas obtidos através de análise da solução de NOR-SQR e da solução placebo podem ser visualizados na Figura 39.

Figura 34. Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio oxidativo (H₂O₂ 3%) durante 96 horas

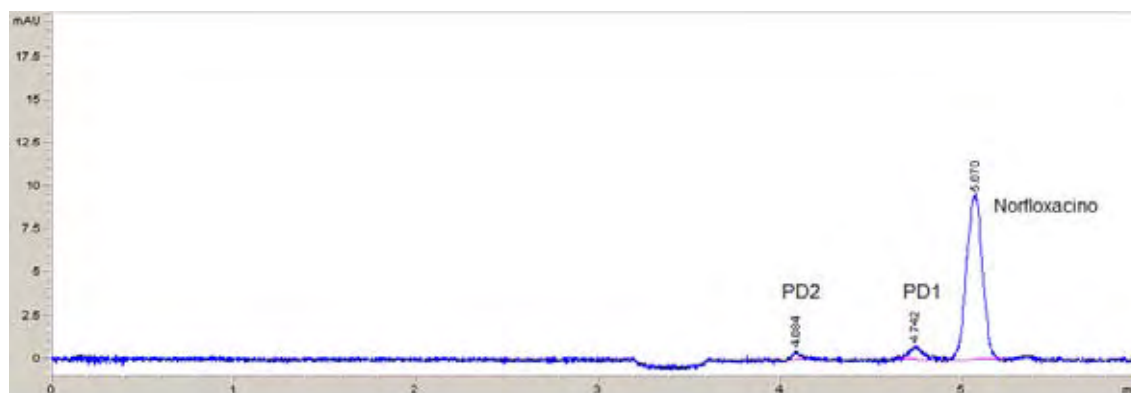


Figura 35. Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio básico (NaOH 0,1 M) durante 96 horas

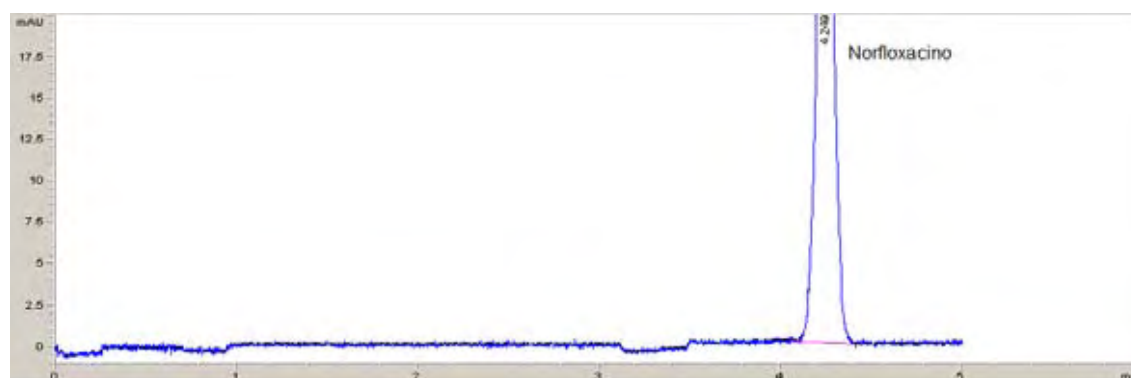


Figura 36. Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) durante 96 horas

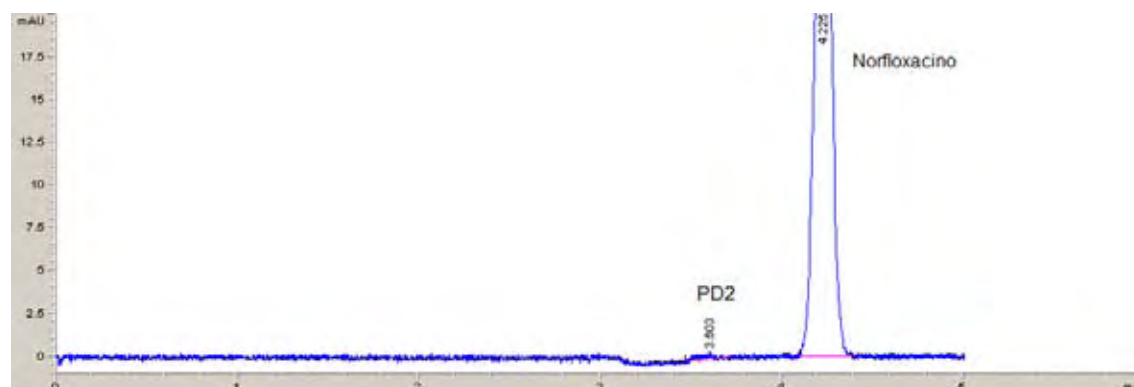


Figura 37. Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação em meio neutro, durante 96 horas

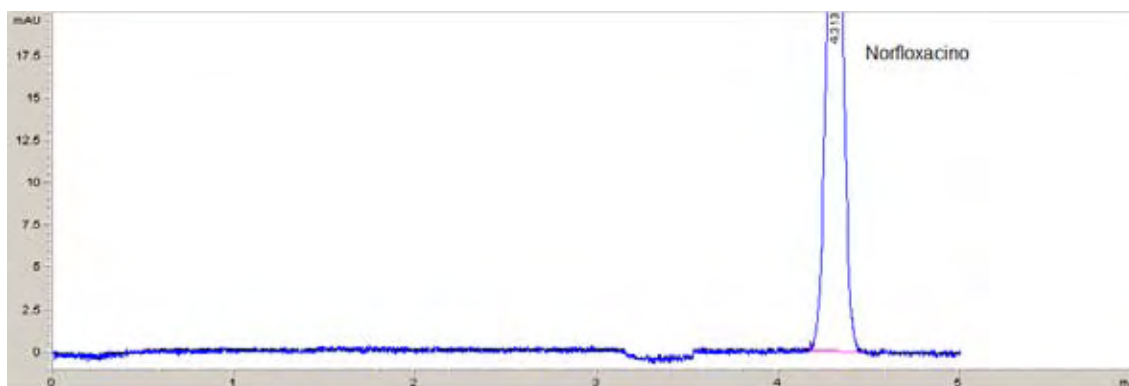


Figura 38. Eletroferograma da solução de norfloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, submetida à degradação fotolítica, durante 96 horas

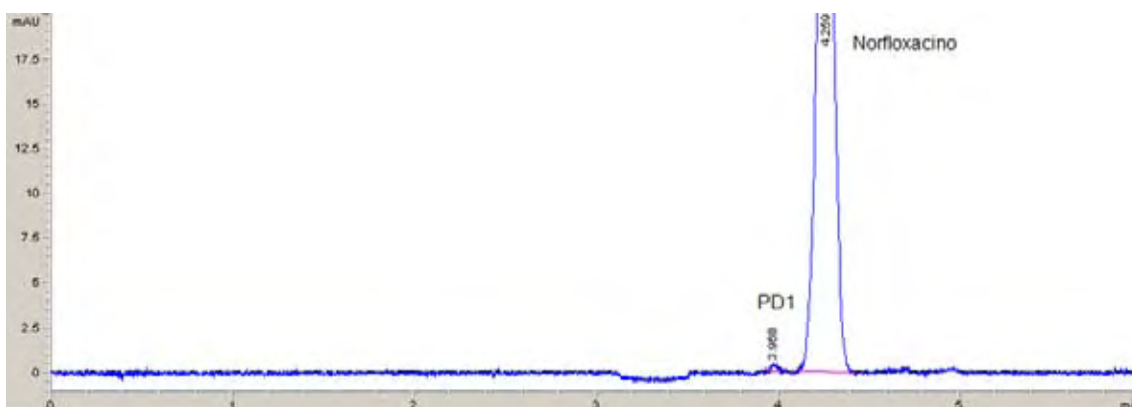
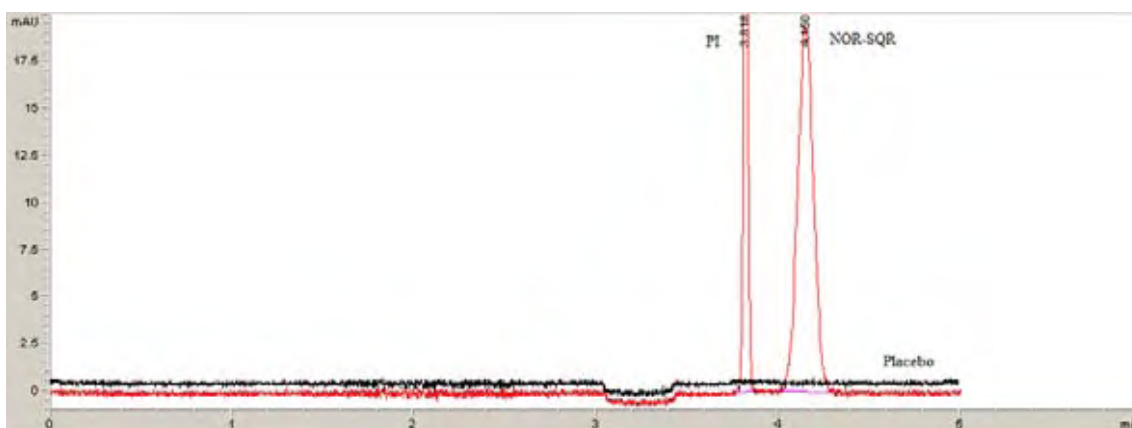


Figura 39. Eletroferogramas de NOR-SQR com concentração de 20,0 µg/mL e solução de placebo. Tempo de migração: padrão interno (PI) de 3,8 minutos e NOR-SQR 4,1 minutos



6.3.5.3 Linearidade

Na Tabela 31 estão apresentados os valores das áreas absolutas obtidas pelas diferentes concentrações de norfloxacino SQR.

Tabela 31. Valores das áreas referentes ao pico de norfloxacino-SQR para construção da curva analítica do método eletroforético

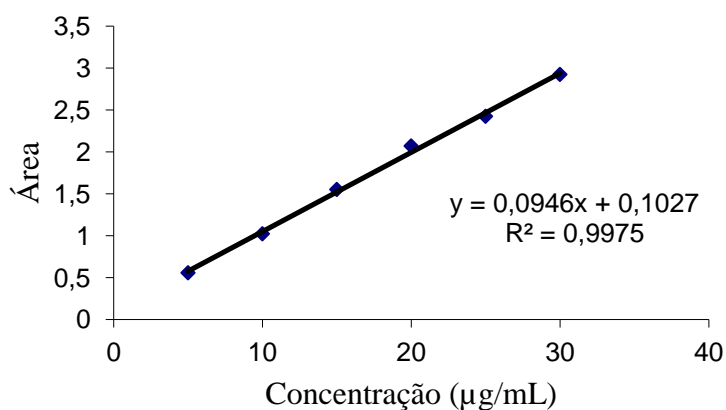
Concentração (µg/mL)	Áreas ^a absolutas	Área absoluta média ± DP ^b	DPR ^c (%)
5	0,5589	0,5570 ± 0,0038	0,69
	0,5528		
	0,5599		
10	1,0350	1,0220 ± 0,0115	1,13
	1,0180		
	1,0130		
15	1,5269	1,551 ± 0,0292	1,89
	1,5836		
	1,5427		
20	2,0238	2,070 ± 0,0164	1,94
	2,0878		
	2,0977		
25	2,4402	2,423 ± 0,0164	0,68
	2,4073		
	2,4223		
30	2,9710	2,923 ± 0,0420	1,44
	2,9010		
	2,8958		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR = desvio padrão relativo

A curva analítica de norfloxacino SQR (Figura 40) 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 $y = 0,0946x + 0,1027$, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9975.

Figura 40. Curva analítica de norfloxacin SQR obtida pelo método eletroforético, utilizando como eletrólito solução tampão tetraborato de sódio 30 mM pH 9,0 a 277 nm



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de norfloxacin SQR é mostrada na Tabela 32.

Tabela 32. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de norfloxacin SQR, utilizado o método eletroforético

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	11,76753	2,35351	3037,97*	3,11
Regressão linear	1	11,76750	11,76750	15189,81*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,00968	3,26
Resíduo	12	0,0092964	0,000775697		
Total	17	11,77682			

*Significativo para $p < 0,05\%$

6.3.5.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no desvio padrão relativo. Seis soluções de norfloxacino SQR preparadas na concentração de 20,0 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 0,46%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises do padrão e da amostra, em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais de teores médios de 102,06%, com DPR de 1,27%, respectivamente. Na precisão entre-analistas, foram avaliadas por dois analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 102,14%, com DPR de 0,63%, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 33.

Tabela 33. Valores determinados para a precisão interdias e entre-analista do método para norfloxacino comprimidos pelo método eletroforético

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (mg/comp.)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (mg/comp.)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
	1	402,28	100,57		A	406,28	101,57	0,63
1	2	410,88	102,72	1,27	B	410,88	102,72	
	3	411,60	102,90					
Intradia		407,64	101,91	0,46 ^c				

^a média de três determinações; ^b DPR% = desvio padrão relativo; ^c média de seis determinações

6.3.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade adicionada de padrão é adicionada à quantidade conhecida de amostra. Na Tabela 34 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método cromatográfico em que a porcentagem média foi de 101,31%.

Tabela 34. Determinação da exatidão do método analítico para análise de norfloxacino pelo método eletroforético

	NOR SQR adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	NOR SQR encontrado ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
R1	11,0	11,16	101,46		
R2	15,0	14,95	99,70	101,31	1,52
R3	19,0	19,78	102,77		

^a média de três determinações^bDPR = desvio padrão relativo

6.3.5.6 Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico foi 1,12 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ calculado para a menor quantidade detectada foi 3,41 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.5.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela variação de alguns parâmetros analíticos como variação do comprimento de onda, temperatura do capilar, voltagem (kV), concentração da solução do tampão (mM) e valor do pH do tampão. Na execução de análises sob parâmetros alterados de modo isolado, os teores obtidos não apresentam diferença significativa e os coeficientes de variação obtiveram média de 1,28%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos pequenos parâmetros avaliados de acordo com a Tabela 35.

Tabela 35. Parâmetros de avaliação da robustez do método eletroforético para análise de norfloxacino

Variável	Faixa Investigada	Norfloxacino ^a (mg/comp.)	Norfloxacino ^a (%)	DPR ^b (%)
Comprimento de onda (nm)	275	409,72	102,43	1,13
	277	407,72	101,93	
	279	413,08	103,27	
Temperatura do capilar (°C)	23	411,12	102,78	1,35
	25	403,84	100,96	
	27	411,60	102,09	
Voltagem (kV)	13	403,56	100,89	1,72
	15	406,72	101,68	
	17	406,48	101,62	
Concentração da solução do tampão (mM)	18	409,16	102,29	0,88
	20	409,84	102,46	
	22	407,80	101,95	
Valor do pH	8,8	405,44	101,36	1,03
	9,0	412,00	103,00	
	9,2	409,04	102,26	

^a média de três determinações

^bDPR = desvio padrão relativo

6.3.6 Discussão

A eletroforese capilar é um dos métodos de separação que tem sido empregada em diversas áreas da ciência, onde também passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. A combinação desta técnica cromatográfica com detecção ultravioleta fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos farmacêuticos (WATSON, 2005).

As condições eletroforéticas adequadas para o ensaio foram obtidas após diversos ensaios preliminares. A água ultrapura foi escolhida para o preparo das

diluições das amostras, apesar da solubilidade limitada do fármaco nesse solvente, e tampão tetraborato de sódio como eletrólito. O tempo de migração observado para NOR-SQR foi de 4,1 minutos, propiciando análise rápida, adequada para o controle de qualidade de rotina.

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de uma curva analítica, na faixa de concentração de 5,0 a 30,0 µg/mL. Foram desenvolvidas três curvas analíticas no mesmo dia. Observou-se haver correlação linear entre a concentração de NOR-SQR e as áreas absolutas obtidas. O estudo de regressão linear pelo método mínimos quadrados forneceu uma equação da reta $y = 0,0946x + 0,1027$. O coeficiente de determinação de 0,9975, demonstra elevada concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas obtidas. Os resultados da ANOVA mostraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade, o que confirma a linearidade do método.

A especificidade foi comprovada pela separação dos produtos de degradação (PD1 e PD2) submetidos à degradação oxidativa, ácida e fotolítica. A degradação oxidativa foi a mais agressiva com um pico extra em 4,74 minutos. As degradações expostas aos meios básico e neutro não apresentaram degradações. A Tabela 36 apresenta os valores, em percentagem, das perdas da área do pico do NOR-SQR e os tempos de migração dos picos extras das respectivas condições de degradações. A especificidade do método também foi avaliada através de uma solução de excipientes e demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes na formulação na determinação de norfloxacin, pois não foi observado nenhum pico com tempo de migração semelhante ao do fármaco.

Tabela 36. Perdas percentuais encontradas para a solução de NOR-SQR na concentração de 30 µg/mL, obtidas pelo método de EC indicativo de estabilidade

Degradação	Oxidativa	Ácida	Base	Neutra	Fotolítica
Perda (%)	1,20 e 3,77	1,59	1,93	0,80	0,93
Pico adicional (min)	4,08 e 4,74	3,6	NO	NO	3,9

NO: Não Observado

Comparando-se a especificidade do método CLAE com a EC, pode-se concluir que mesmo a técnica de EC usando um detector de DAD e em CLAE um detector UV-Vis, a sensibilidade para detecção dos produtos de degradações foi mais sensível pelo método CLAE.

Os dados para a repetibilidade e precisão intermediária apresentam DPR de 0,46% indicando ser menos que 2% de acordo com a literatura (ICH, 2005).

O teste de recuperação de NOR-SQR forneceu uma porcentagem de recuperação média de 101,31%. Este valor demonstra a boa exatidão do método proposto.

O método eletroforético apresentou boa sensibilidade para a quantificação de norfloxacino, uma vez que os valores calculados para o LD (2,93 µg/mL) e LQ (0,091 µg/mL) foram baixos.

A robustez do método eletroforético de modo isolado, indicou que o método é robusto em todas as alterações.

A EC é uma técnica de fácil implementação, com inúmeras vantagens como a alta eficiência nas separações, análises rápidas, simples instrumentação, reduzidos custos de operação, oferece uma variedade de modos de separação que podem ser efetuados em um mesmo capilar, possibilitando a análise de compostos oriundos de diversas matrizes e na maioria das vezes não necessita de grandes tratamentos da amostra. Além disso, normalmente não é necessário o uso de solventes orgânicos empregados como fase móvel, sendo uma grande vantagem para o meio ambiente.

6.4 Método microbiológico – Ensaio turbidimétrico

As farmacopeias, em geral, preconizam dois métodos para realização de doseamentos microbiológicos de antibióticos: o método turbidimétrico e o método de difusão em ágar (EP, 2010; FB 5, 2010; BP, 2011; USP 35, 2012).

No método de difusão em ágar, a substância em análise se difunde em um meio de cultura sólido inoculado com o micro-organismo teste (FB 4, 2001; FROEHLICH et al., 1990a). Após 24 horas observa-se em sua difusão, um halo de inibição de crescimento do micro-organismo, cujo diâmetro é uma função da concentração da amostra. A potência do antimicrobiano é obtida através da comparação com os dados do padrão (HEWITT, 2004).

No ensaio turbidimétrico, utiliza-se meio de cultura líquido, sendo inoculado com micro-organismo teste em diferentes tubos são adicionadas concentrações graduadas da amostra e do padrão. Após um determinado tempo a resposta do micro-organismo teste a ação do antimicrobiano é evidenciada pela alteração da turvação do meio de cultura líquido, sendo medida em espectrofotômetro. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa do fármaco presente no produto, comparadas ao padrão (HEWITT, 2004).

6.4.1 *Material*

O meio de cultura, água e ponteiros foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Para incubação dos micro-organismos utilizou-se aparelho incubador Shaker e estufa para cultura bacteriológica. Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro.

Foram empregados tubos de ensaio com 25,0 mm de diâmetro x 150,0 mm de altura devidamente tampados com algodão.

A substância química de referência e a forma farmacêutica utilizadas estão descritas nos itens 4.2 e 4.3.

6.4.1.1 *Ensaio preliminares*

Foram realizados estudos preliminares para a realização do ensaio microbiológico turbidimétrico para determinação de norfloxacino de acordo com a Tabela 37.

Tabela 37. Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – turbidimétrico para determinação de norfloxacino em comprimidos

Parâmetros	Descrição
Micro-organismos	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 IAL 636
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 1851
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Meios de cultura	Caldo BHI
	Caldo Casoy
	Caldo Mueller-Hinton
Soluções diluentes	Água
	Solução tampão pH 6,0
	Solução tampão pH 8,0
Concentrações do inóculo	4 %
	6 %
	10 %
Concentrações das soluções padrão e amostra	5,0; 10,0; 20,0 µg/mL
	25,0; 50,0; 100,0 µg/mL

A partir dos resultados obtidos com os testes preliminares, estabeleceram-se os parâmetros que apresentam o melhor desempenho na análise para a realização do doseamento microbiológico (Tabela 38).

Tabela 38. Parâmetros estabelecidos para a determinação de norfloxacino em comprimidos pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
Meio de cultura	Caldo BHI
Solução diluente	Água
Concentração do inóculo	6 %
Concentrações das soluções padrão e amostra	25,0; 50,0; 100,0 µg/mL
Tempo de incubação	4 horas
Temperatura de incubação	35 ±1 °C

6.4.1.2 Preparo da solução de norfloxacino SQR

Sistematicamente foram pesados 12,5 mg de norfloxacino SQR em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de 10 mL de NaOH 0,1 M a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com água purificada, obtendo-se uma solução de norfloxacino SQR de concentração final de 500 µg/mL.

A partir da solução acima, foram transferidas alíquotas de 500; 1000 e 2000 µL com auxílio de micro-pipetador automático para balão volumétrico âmbar de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações finais de 25, 50 e 100 µg/mL de norfloxacino SQR e o volume completado com água purificada e esterilizada.

6.4.1.3 Preparo da solução de norfloxacino comprimidos

No preparo de norfloxacino comprimidos partiu-se do peso médio de 20 comprimidos de norfloxacino. Posteriormente foram pesados 21,91 mg do fármaco em balança analítica, sendo transferidos com auxílio de 10 mL de NaOH 0,1 M a balão volumétrico âmbar de vidro devidamente calibrado com capacidade de 25 mL. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o

volume com água purificada, obtendo-se uma solução de norfloxacino comprimidos de concentração final 500 µg/mL. Posteriormente, filtrou-se a solução em papel quantitativo.

A partir da solução acima, foram transferidas alíquotas de 500; 1000 e 2000 µL com auxílio de micro-pipetador automático para balão volumétrico âmbar de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações finais de 25, 50 e 100 µg/mL de norfloxacino comprimidos e o volume completado com água purificada e esterilizada.

6.4.1.4 Manutenção das cepas e preparo do meio de cultura

Foram utilizados meio de cultura ágar casoy, para a manutenção dos micro-organismos teste.

Os meios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água destilada sob aquecimento, distribuídos nos tubos de ensaio (7 mL/tubo) e esterilizados em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

6.4.1.5 Preparo do inóculo

As culturas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (*American Type Culture Collection*) IAL 2150 (Instituto Adolfo Lutz) foram repicadas com alça de platina para o caldo BHI e mantidas, para seu desenvolvimento, em estufa microbiológica à temperatura de 35 °C ± 1 °C, durante 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo a 580 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de 25% ± 2%. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente.

6.4.1.6 Preparo do placebo

Para o uso do placebo utilizou-se o mesmo placebo elaborado na seção 6.1.1.4.

Cerca de 21,91 mg do placebo foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 10,0 mL de NaOH 0,1 M. Deixou-se em ultra-som durante 30 minutos e completou-se o volume com água purificada. Após filtração, transferiram-se 500, 1000 e 2000 µL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água.

6.4.2 Método

Primeiramente procedeu-se o preparo do inóculo como descrito na seção 6.4.1.5, em seguida, distribuiu-se em tubos idênticos contendo 10,0 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) estéril, 200 µL de cada uma das soluções do padrão e da amostra descritas nos itens 6.4.1.2 e 6.4.1.3, respectivamente. Adicionou-se em cada tubo, 600 µL 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 600 µL de inóculo, sem adição de norfloxacino) e um para controle negativo (contendo apenas o caldo BHI). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas 3 réplicas.

Incubou-se, em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de 35,0 °C ± 1,0 °C, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 500 µL 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 do branco contendo 10,0 mL de caldo BHI e 500 µL de formaldeído 12% (controle negativo).

6.4.2.1 Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida conforme descrito na seção 6.4.2. Analisou-se uma curva em cada dia, durante três dias consecutivos. Cada ponto de cada curva foi preparado em triplicata.

6.4.2.2 Cálculo da potência de norfloxacino comprimidos

A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (2004). A Equação 9 utiliza as médias das leituras de absorvâncias dos tubos obtidas com as três doses de norfloxacino SQR e comprimidos, nos 18 tubos analisados em cada ensaio.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100$$

$$M = \frac{F}{b} \quad b = \frac{E}{I}$$

(9)

Em que:

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

$F = 1/3 [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) - (\bar{P}1 + \bar{P}2 + \bar{P}3)]$

$I = \log$ aritmo da razão das doses

$E = 1/4 [(\bar{A}3 + \bar{P}3) - (\bar{A}1 + \bar{P}1)]$

6.4.3 Validação

6.4.3.1 Linearidade

A curva analítica final foi construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, cada uma composta por 18 tubos, conforme descrito na seção 6.4.2.1. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.4.3.2 Precisão

A precisão foi avaliada pela realização de ensaios de doseamento de norfloxacino comprimidos durante três dias seguidos (seção 6.4.2.2) (repetibilidade) e precisão intermediária. Os desvios padrão relativo dos dados foram calculados estatisticamente.

6.4.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação. Foram adicionados três níveis de concentrações, 80, 100 e 120,0 % de padrão as amostras. O estudo foi realizado em triplicata de acordo com a Tabela 39. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada caso.

Tabela 39. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método microbiológico turbidimétrico

	Norfloxacino amostra (500 µg/mL)	Norfloxacino SQR (500 µg/mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*	Concentração teórica (%)
Amostra	0,5	-	25,0	-
R1	0,5	0,3	40,0	80,0
R2	0,5	0,5	50,0	100,0
R3	0,5	0,7	60,0	120,0
Padrão	-	0,5	25,0	-

*balão volumétrico âmbar de 10 mL

6.4.3.3.1 Cálculo do teste de recuperação

A porcentagem de recuperação (R%) foi determinada de acordo com a Equação 10:

$$\text{Recuperação (\%)} = (PR/PT). 100 \quad (10)$$

Em que:

PR = potência encontrada nas amostras de recuperação

PT = Potência teórica

6.4.3.4 Especificidade

A especificidade do método proposto foi avaliada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência (SQR) e presença (placebo) dos excipientes. Prepararam-se os tubos de acordo com a seção 6.4.1.6 e fez-se a leituras dos tubos em espectrofotômetro a 530 nm.

6.4.3.5 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por meio de modificações nas condições estabelecidas, tais como: tempo de incubação (3h45min; 4h; 4h15min) e

comprimento de onda de leitura dos tubos (525, 530, 535 nm). Realizou-se a análise de potência das amostras de norfloxacino em condições normais e alteradas paralelamente, avaliando a interferência no resultado final.

6.4.4 Resultados

6.4.4.1 Linearidade

Os valores das absorvâncias dos tubos, obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de norfloxacino SQR e comprimidos encontram-se na Tabela 40.

Tabela 40. Leitura das absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade para avaliação de norfloxacino comprimidos, pelo método turbidimétrico

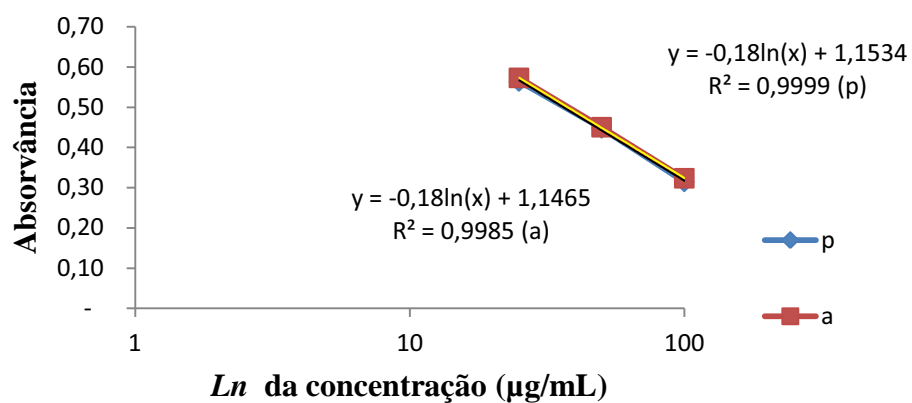
	Absorvâncias ^a					
	P1 (25 µg/mL)	P2 (50 µg/mL)	P3 (100 µg/mL)	A1 (25 µg/mL)	A2 (50 µg/mL)	A3 (100 µg/mL)
	0,575	0,453	0,311	0,582	0,461	0,323
	0,569	0,456	0,314	0,590	0,457	0,316
	0,548	0,434	0,318	0,547	0,433	0,331
ABS média	0,564	0,448	0,314	0,573	0,450	0,323
DPR%^b	2,51	2,67	1,12	3,99	3,36	2,32

^a média de três determinações

^b DPR% = desvio padrão relativo

As curvas analíticas de norfloxacino SQR e comprimidos (Figura 41) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,18\ln(x) + 1,153$, com um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9999, para o norfloxacino SQR e $y = -0,18\ln(x) + 1,146$, com r^2 de 0,9985, para o fármaco em comprimidos.

Figura 41. Curvas analíticas de soluções de norfloxacino SQR e comprimidos, em concentrações de 25, 50 e 100,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de norfloxacino é mostrada na Tabela 41.

Tabela 41. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de norfloxacino SQR, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Preparação	1	0,0002	0,0002	1,55	4,96
Regressão	1	0,1870	0,1870	1357,81*	4,96
Desvio de paralelismo	1	0,0000	0,0000	0,00	4,96
Quadrático	1	0,00001	0,0001	0,83	4,96
Diferença de quadrático	1	0,00000	0,0000	0,29	4,96
Entre doses	5	0,19	0,04	272,10*	3,33
Entre tubos	2	0,000	0,00	3,45	4,10
Dentro (erro)	10	0,00	0,00		
Total	17	0,19			

* Significativo para $p < 0,05$

6.4.4.2 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação de sete tubos com a dose intermediária de norfloxacino SQR. Os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram desvio padrão relativo de 1,33%. Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de uma amostra, em quatro dias consecutivos, obtendo-se valor experimental médio de potência de 102,05%, com DPR de 0,21%. Os resultados obtidos na avaliação da precisão interdias são mostrados na Tabela 42.

Tabela 42. Valores determinados para a potência de norfloxacino em comprimidos na avaliação da precisão do método turbidimétrico

Dia	Norfloxacino comprimido ^a		Potência média (%)	DPR ^b (%)
	mg/comprimido	%		
1	408,92	102,23		
2	408,48	102,12	102,05	0,21
3	407,24	101,81		
Intradia	408,80	102,20	-	1,33

^a média de três determinações^b DPR% = desvio padrão relativo

6.4.4.3 Exatidão

Determinou-se a exatidão do método através do teste de recuperação. Obteve-se valor médio de exatidão de 100,74%. Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 43.

Tabela 43. Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico

	NOR SQR adicionado (µg/mL)	NOR SQR encontrada ^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
R 1	15,0	15,65	103,03		
R 2	25,0	24,91	98,86	100,74	1,55
R 3	35,0	35,32	100,34		

^a média de três determinações^b DPR% = desvio padrão relativo

6.4.4.4 Especificidade

Na avaliação da especificidade do método microbiológico avaliou-se as absorvâncias dos tubos a 530 nm, verificando a ausência de atividade microbiana dos excipientes do placebo (PL) (Tabela 44).

Tabela 44. Valores do teste de especificidade do método turbidimétrico

Controle Positivo	Absorvâncias		
	PL ^a (25 µg/mL)	PL (50 µg/mL)	PL (100 µg/mL)
0,659	0,626	0,670	0,655
	0,662	0,650	0,640
	0,660	0,652	0,660
ABS média	0,649	0,657	0,651
DPR (%)^b	3,11	1,67	1,59

^a PL = Placebo; ^b DPR = desvio padrão relativo

6.4.4.5 Robustez

A robustez foi avaliada através de alterações no tempo de incubação e comprimento de onda de leitura dos tubos (Tabela 45). As alterações realizadas provocaram pequenas variações nos resultados de teores das amostras de norfloxacino comprimidos doseadas pelo método. Os desvios padrão relativos entre os teores foram de 4,45% e 2,27%, estando dentro da faixa que é de 5% comprovando a robustez do método proposto para os parâmetros avaliados (Tabela 6.3.7), porém o doseamento em relação ao tempo de incubação de 3h45min (93,12%) está fora da faixa indicado nas farmacopeias 95 a 105,0% (FB 5, 2010; BP, 2011), sendo assim não deverá ocorrer mudança no tempo de incubação durante o teste.

Tabela 45. Resultados da avaliação da robustez do método analítico para análise de norfloxacino por turbidimetria

Variável	Faixa investigada	Norfloxacino ^a (mg /comp.)	Norfloxacino ^a (%)	DPR ^b (%)
Tempo de incubação (°C)	3h45	372,48	93,12	4,5
	4h	392,12	98,03	
	4h15	407,57	101,89	
Comprimento de onda (nm)	525	397,12	99,28	2,27
	530	380,08	95,08	
	535	384,12	96,03	

^a média de três determinações

^b DPR% = desvio padrão relativo

6.4.5 Discussão

O método de turbidimetria apresenta a vantagem de ser mais sensível, utilizando-se meio fluido onde a solução em análise se difundirá completamente e também por possuir menor tempo de análise do que o por difusão em ágar, já que responde às concentrações menores de antimicrobiano. Por outro lado, tem desvantagens como: soluções coloridas e turvas podem interferir na determinação da resposta; há necessidade das soluções padrão e amostra estarem estéreis; há interferência causada pela presença de substâncias inibidoras e ativadoras de crescimento microbiano, como por exemplo, solventes orgânicos utilizados em processos extrativos e substâncias presentes na amostra (RIPPERE, 1979).

O teste microbiológico permite determinar a potência de um antimicrobiano, através da turbidez (absorvância), causada pelo crescimento do micro-organismo.

No desenvolvimento deste método foram escolhidas as concentrações de 25, 50 e 100,0 µg/mL, uma vez que apresentam a melhor resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A utilização do micro-

organismo *S. epidermidis* baseia-se na sua sensibilidade frente ao norfloxacino e na facilidade de crescimento e manutenção deste micro-organismo.

Na validação do método microbiológico turbidimétrico, a linearidade do método foi comprovada pelos coeficientes de determinação de 0,999 e 0,998 para norfloxacino SQR e comprimidos, respectivamente, os quais foram bastante próximos da unidade. A análise de variância demonstrou significativa regressão e ausência de desvios de linearidade e paralelismo nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. O teste de especificidade evidenciou que os excipientes utilizados não influenciam no teste. A precisão do método foi avaliada através dos desvios padrão relativos dos teores de norfloxacino comprimidos obtidos em três diferentes dias. Com resultado médio de teor de 102,05% e desvio padrão relativo 0,21%, a precisão do método foi comprovada, estando de acordo com as monografias para antimicrobianos em compêndios oficiais que é de 95,0 a 105,0% (FB 5, 2010; BP, 2011).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada médias de 100,74% para o ensaio turbidimétrico.

As pequenas alterações efetuadas nos parâmetros do método durante a avaliação da robustez não causaram efeitos significativos na análise. Entretanto, os parâmetros estabelecidos devem ser respeitados. A validação do método foi satisfatória atenderam às especificações nacionais e internacionais para adequada quantificação de norfloxacino comprimidos.

6.5 Análise comparativa dos métodos

Para a comparação dos métodos estudados foi aplicado a análise estatística de variância (ANOVA). Os ensaios de comparação devem prover de dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP 35, 2012). Os resultados obtidos na determinação quantitativa de norfloxacino, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 46.

Tabela 46. Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos quatros métodos validados usando CLAE, EC, espectrofotometria na região do visível e doseamento microbiológico pelo método turbidimétrico

Parâmetro	Métodos			
	CLAE	EC	Visível	Turbidimétrico
Teor (%)	102,41	100,57	102,65	102,23
	103,6	102,72	102,71	102,12
	102,5	102,90	102,75	102,81
Teor médio (%)	102,83	102,06	102,70	102,05
DPR (%) ^a	0,04	1,29	0,64	0,21

^a DPR(%) = desvio padrão relativo

A Tabela 47 mostra o resultado de ANOVA calculado, utilizando os valores experimentais do teor de norfloxacino comprimidos, a partir dos métodos validados.

Tabela 47. Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de norfloxacino comprimidos pelos métodos desenvolvidos

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamentos	3	1,54	0,51	0,95	4,06
Resíduo	8	4,33	0,54		
Total	11	5,88			

significativo para $p < 5\%$

Os resultados obtidos através da ANOVA demonstram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para um nível de significância de 5%. Desta

forma, os métodos validados são equivalentes, ou seja, o resultado comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa do fármaco na forma farmacêutica.

A média dos valores experimentais obtidos pelos métodos CLAE, EC, espectrofotometria na região do visível e método microbiológico encontram-se dentro do intervalo permitido para a maioria dos antimicrobianos que é de 90 a 110% (F. Bras. IV, 1998; FB 5, 2010; BP, 2011; USP 35, 2012).

Os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamentos oficiais, nacionais e internacionais. Apesar de demonstrarem intercambialidade, cada método possui características próprias, tais como tempo, custo da análise, geração de resíduos, manuseio e equipamento sofisticado ou não. Entretanto alguns métodos são mais específicos e adequados para a análise de rotina em laboratórios.

O método espectrofotométrico na região do visível é simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas faz-se necessário a utilização de solventes orgânicos como metanol e acetonitrila e não são específicos e seletivos para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação.

O método microbiológico, turbidimétrico, fornece informação sobre a potência da substância em análise, devendo ser aplicado em paralelo com métodos físico-químico, a fim assegurar a eficácia terapêutica dos antimicrobianos. Para a execução do método é necessário um ambiente estéril para a realização dos ensaios. Este método apresenta duas vantagens como menor tempo de análise e também melhor difusão da amostra no meio de cultura em caldo, quando comparado ao teste de difusão em ágar.

Os métodos cromatográficos CLAE e EC, são os mais adequados para a identificação dos produtos de degradação formados. No entanto o método de CLAE apresentou mais sensibilidade para a detecção desses produtos comparado ao método de EC neste estudo. A EC possui vantagem quanto ao não uso de solvente orgânico quando comparado a CLAE que possui maior custo, devido ao uso de solvente orgânico e em ambas as metodologias apresentam um tempo de análise considerável para ser aplicado a rotina em laboratório de controle de qualidade.

*7. ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DO
COMPLEXO DE INCLUSÃO DO
FÁRMACO NORFLOXACINO COM β -
CICLODEXTRINA*

7.1 Ciclodextrinas

7.1.1 Histórico

As ciclodextrinas (CDs) são consideradas como um grupo de excipientes e são conhecidas há mais de 100 anos. Elas foram descobertas por Villiers em 1891 e isoladas por Schardinger em 1903, que obteve produtos de degradação do amido pela ação das amilases produzidas pelo *Bacillus macerans*. Freudenberg e colaboradores em 1938 relataram que as ligações entre as unidades de glicose eram do tipo α (1,4), como na amilase. Dez anos mais tarde, verificaram que as CDs apresentavam a capacidade de formar complexos de inclusão. Posteriormente, a diferenciação dos diversos tipos de CDs α , β e γ teve início na determinação de suas massas moleculares (FRENCH et al., 1957; STEJTLEI, 1998; MELO et al., 2007).

Freudenberg e Cramer (1953; citado por FRENCH et al., 1957) obtiveram a primeira patente abordando os aspectos mais importantes da aplicação de CD nas formulações de medicamentos, envolvendo a obtenção de complexo de inclusão. Com o avanço tecnológico nesta área nos últimos anos (LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007), evidenciou-se um aumento na produção de CDs, com menor custo e, por consequência, maiores investimentos nas investigações relacionadas com a preparação de seus derivados e suas aplicações. A Tabela 48 adaptada de Brewster e Loftsson (2007) mostra alguns exemplos de indústrias farmacêuticas que utilizam CDs em suas formulações farmacêuticas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996).

Este estudo foi realizado no Departamento de Farmácia da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Córdoba (UNC – Argentina), sob a supervisão da Profa. Dr^a Marcela Longhi, em 2011.

Tabela 48. Especialidades farmacêuticas contendo complexo de inclusão com ciclodextrinas

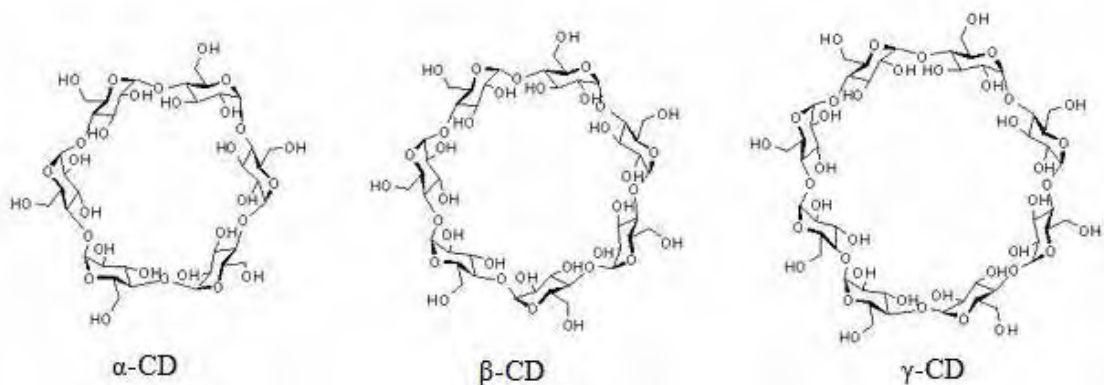
Complexo fármaco/CD	Nome comercial	Forma farmacêutica	Laboratório/País
Aprostadi/αCD	Rigidur®	Solução I.V.	Ferring, Dinamarca
Ácido tiaprofênico/βCD	Surgamyl®	Comprimido	Roussel-maestrelli, Itália
Alprostadi/αCD	Caverject Dual®	Solução I.V.	Pfsier, Europa
Benexate/ βCD	Ulgut®	Cápsula	Teikoky, Japão
Cefalosporina/βCD	Meiact®	Comprimido	Meiji, Seika, Japão
Cefotrima-hexetil/βCD	Pansporin T®	Comprimido	Takeda, Japão
Cetirizina/βCD	Cetirizin®	Comprimido	LosanPharma, Alemanha
Cloranfenicol/RMβCD	Clorocil®	Solução oftálmica	Oftalder, Portugal
Cloro-diazepóxido/βCD	Trasillium®	Comprimido	Gador, Argentina
Dexametasona/βCD	Glymesason®	Pomada	Fulinaga, Japão
Diclofenaco/ HPγCD	Voltaren Ophatamic®	Solução oftálmica	Ciba Vision, Suíça
Difenidramina/βCD	Stada-Travel®	Comprimido	Stada, Alemanha
Hidrocortisona/HPβCD	Dexocort®	Creme	Delta, Islândia
Indometacina/HPβCD	Indocollyre®	Solução oftálmica	Chauvin, França
Itraconazol/βHPβCD	Sporanox®	Capsula	Janssen, Bélgica
Meloxicam/ βCD	Mobitil®	Comprimido, supositório	Union Medical Pharmaceuticals, Egito
Mitomicina/HPβCD	MitoExtra®	Solução I.V.	Novartis, Suíça
Nicotina/βCD	Nicorette®	Comprimido sublingual	Pharmacia&Upjohn, Suécia
Nimesulida/βCD	Mesulid Fast®	Supositório, granulado,	Italfarmaco, Boehringer
	Aulin Beta®	comprimido	Mannheim, Itália
Nitroglicerina/βCD	Nitropen®	Comprimido sublingual	Nihon kayaku, Japão
Óleo gárico/βCD	Xund®, Tegra®	Drágea	Biphax, Hermes, Alemanha
Omeprazol/ βCD	Omebeta®	Comprimido	Betafarm, Europa
OP-1206/γCD	Opalmon®	Comprimido	Schwartz, Alemanha
PG ₂ /βCD	Prostamon E®	Comprimido sublingual	Ono, Japão
PGE ₁ /αCD	Prostavastin®	Solução I.V.	Ono, Japão
Piroxicam/βCD	Brexin®, Flogene®	Comprimido, granulado,	Chiesi, Itália; Ache, Brasil
	Cicladon®	supositório	
Voriconazol/SBEβCD	VFend®	Solução I.V.	Pfizer, USA
Ziprasidone/SBEβCD	Geodon®	Solução I.M.	Pfizer, USA

Fonte: adaptado de BREWSTER & LOFTSSON, 2007

7.1.2 Características físico-químicas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, cuja estrutura é formada geralmente por seis (ciclomalto-hexanose, alfa ciclodextrina ou α -CD), sete (ciclomalto-heptanose, beta ciclodextrina ou β -CD) ou oito (ciclomalto-octanose, gama ciclodextrina ou γ -CD) unidades de D(+)-glicopironase, unidas pelas ligações α (1,4), dispostas de maneira que a molécula assuma forma de um cilindro oco com extremidades abertas (Figura 42). Destes três derivados, a mais vantajosa para utilização farmacêutica como agente complexante é a β -CD, devido, entre outras propriedades ao tamanho da sua cavidade, disponibilidade e baixo custo (STEJTLI, 1998; ARAÚJO et al., 2003; VENTURINI et al., 2008; GARNERO et al., 2010).

Figura 42. Estrutura química das principais ciclodextrinas: α -CD; β -CD; γ -CD



Fonte: adaptado de VENTURINI et al., 2008

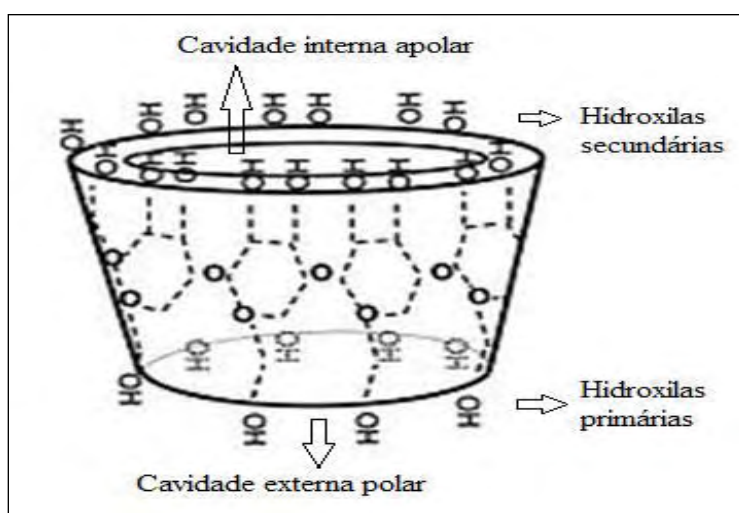
A obtenção das CDs se dá através da degradação do amido pela enzima ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) [1,4-alfa-glucano 4-alfa-D-(1,4-alfa-D-glucano)-transferase], obtida do *B. macerans*, apresentando a propriedade de transformar a cadeia linear de amido em moléculas cíclicas (CARDELLO et al., 1996).

A β -ciclodextrina, também conhecida como β -dextrina de Schardinger, ciclomalto-heptose, cicloheptaglucano, cicloheptaamilose, β -CD, BCD e C7A, apresenta uma cavidade interna com diâmetro de aproximadamente 6 a 6,4 Å, adequada à inclusão de inúmeros fármacos (LINDNER et al., 1981; RIBEIRO, 2003).

A cavidade das CDs possui dimensões médias de (1,5 x 0,7 x 0,8 nm) e caráter hidrofóbico, enquanto a superfície tem caráter hidrofílico, devido à presença de grupos

OH (Figura 43). Esta estrutura permite a formação de complexos de inclusão estáveis, com grandes diversidades de substâncias orgânicas, sais e halogênios, além de formar complexos com substâncias de massa molecular típica de 80 a 250 Daltons. Sua cavidade interna é apolar e a cavidade externa é polar. Essa propriedade permite que a solubilidade de moléculas hospedeiras hidrofóbicas seja aumentada através da formação de complexos de inclusão (ARAÚJO et al., 2003).

Figura 43. Modelo da estrutura química de ciclodextrina em forma de cone



Fonte: adaptado de PANDYA et al., 2008

A Tabela 49 mostra as propriedades físico-químicas particulares das CDs sugerida por VEIGA e colaboradores (2006).

Tabela 49. Propriedades físico-químicas da α , β e γ ciclodextrinas

	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/100mL a 25 °C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,9 – 8,3
Altura da estrutura (Å)	7,9 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1
Volume aproximado (Å) ³	174	262	427
pKa (25 °C)	12,333	12,202	12,081

Fonte: VEIGA, et al., 2006.

7.1.3 Biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis

De acordo com o *Biopharmaceutics Classification System* (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

Nesta classe pertencem os fármacos que possuem alta solubilidade e alta permeabilidade, considerando que para fármacos de liberação imediata, a taxa de absorção será controlada pelo esvaziamento do suco gástrico e não será esperada nenhuma correlação com a taxa de dissolução. Então, 100% de absorção pode ser esperada se pelo menos 85% do produto se dissolve em 30 minutos possa assegurar a bioequivalência para as formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (AMIDON et al., 1995).

Classe II: baixa solubilidade/alta permeabilidade

Os fármacos de Classe II necessitam que os perfis de dissolução sejam mais definidos e reprodutíveis. Devem ser consideradas, também, as condições do meio de dissolução que refletem a situação *in vivo*, e a taxa de dissolução *in vitro* pode ser observada (AMIDON et al., 1995).

Classe III: alta solubilidade/baixa permeabilidade

Nesta classe de fármacos a permeabilidade é o fator que controla a absorção, porém a dissolução irá ocorrer muito rapidamente. Nesses casos, o perfil de dissolução será bem definido (AMIDON et al., 1995).

Classe IV: baixa solubilidade/baixa permeabilidade

Fármacos que apresentam baixíssima biodisponibilidade oral. O número de substâncias que são classificadas nesta classe irá depender dos limites utilizados na classificação de solubilidade e permeabilidade (AMIDON et al., 1995).

As CDs têm apresentado um papel importante na avaliação de fármacos pouco solúveis por aumentar a solubilidade aparente e/ou dissolução, devido à sua propriedade de formar complexos de inclusão ou dispersão sólida, atuando como carreadores hidrofílicos de fármacos com características inadequadas para complexação, ou ainda, como promotores da dissolução de comprimidos contendo doses elevadas de fármacos, nos quais o emprego de complexos fármaco:ciclodextrina é difícil (VEIGA et al., 2006).

Várias técnicas têm sido empregadas para compensar a insolubilidade e, conseqüentemente, a baixa eficiência de dissolução, incluindo o emprego de sólidos amorfos nas formulações, tais como microemulsões, nanopartículas, formações de sais, complexos hidrossolúveis e formação de dispersões sólidas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996).

O norfloxacinó é considerado pelo BCS um fármaco de classe IV, uma fluorquinolona pouco solúvel em água. A taxa de dissolução é o fator limitante da taxa de absorção *in vivo* desse fármaco. Assim, um aumento na taxa de dissolução é importante para atingir adequados níveis do fármaco no sangue. Varshney e colaboradores (2012) destacam testes que já foram realizados para melhorar a biodisponibilidade e o aumento da solubilidade do norfloxacinó, incluindo diferentes métodos de complexação, no entanto, nenhum método de complexação foi testado para avaliar se o fármaco complexado continuaria com sua atividade antimicrobiana.

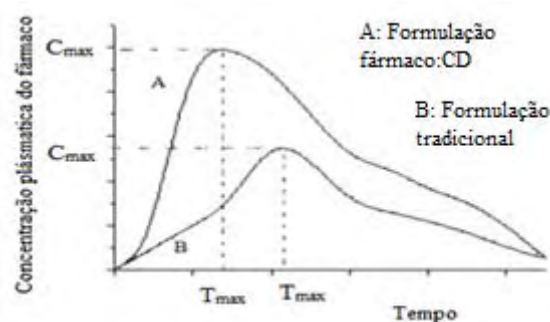
7.1.4 Farmacocinética

7.1.4.1 Absorção e metabolismo

As CDs são resistentes às enzimas humanas que normalmente hidrolisam o amido, como a β -amilase, uma vez que sua forma cíclica deixa indisponíveis os grupos terminais que seriam suscetíveis à hidrólise enzimática pancreática e salivar. Apenas pequena quantidade de CDs é absorvida através da mucosa gastrointestinal. A dissociação do complexo formado entre a molécula hóspede e a CD ocorre no suco digestivo. A molécula liberada é então absorvida, enquanto a CD é biotransformada no cólon em glicose, maltodextrinas acíclicas e maltose, que são metabolizadas, absorvidas da mesma forma que o amido e excretadas como H_2O e CO_2 . Na administração oral de complexos fármacos:CDs, a diluição provocada pelos fluidos gastrintestinais, promove a dissociação do complexo, com o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico, extremamente rápido. As CDs funcionam como transportadoras, carregando as moléculas hidrofóbicas de fármaco em solução até as membranas celulares lipofílicas para sua absorção, e permanecendo nos fluidos aquosos. O elevado tamanho das CDs e de seus complexos de inclusão, e sua superfície fortemente hidrofílica tornam a absorção desta molécula praticamente insignificante (DRUNKLER et al., 1999; RAMA et al., 2005; SÁ BARRETO et al., 2008).

A biodisponibilidade por via oral, especialmente pelos fármacos pouco solúveis em água, é bastante significativa (Figura 44). Segundo estudos *in vivo*, 35 fármacos administrados na forma de complexo tiveram um acréscimo nos valores da área sob a curva (ASC) de mais de 80%, comparados com as formulações tradicionais, apresentando uma concentração plasmática máxima (C_{max}) 70% maior (SÁ BARRETO et al., 2008).

Figura 44. Perfil plasmático teórico de uma formulação de um fármaco comparado a uma formulação de um complexo com ciclodextrina



Fonte: adaptado de SÁ BARRETO et al., 2008

Fármacos que possuem formulação tradicional, porém com alguns problemas de biodisponibilidade, podem ser melhorados através de uma nova formulação com ciclodextrina.

7.1.4.2 Toxicidade

Em 1957, as ciclodextrinas foram descritas como sendo compostos de alta toxicidade, no entanto, ao longo dos anos através de estudos detalhados de metabolismo e toxicidade da β -CD em ratos e cães por Bellinger e colaboradores (1995) relataram que durante 52 semanas, a administração de doses conhecidas de β -CD indicaram efeito não tóxico de 12.500 ppm em ratos (equivalente a 654,0 ou 864,0 mg/kg/dia para machos e fêmeas, respectivamente) e 50.000 ppm em cães (equivalente a 1831,0 ou 1967,0 mg/kg/dia para machos e fêmeas, respectivamente), constatando uma posição mais receptiva por parte das autoridades regulatórias fiscais com relação a este tipo de composto (SZEJTLI, 1984; BELLINGER et al., 1995; LOFTSSON & BREWSTER, 1996; IRIE & UEKAMA, 1997). A toxicidade da β -CD em roedores foi estudada por Barrow e colaboradores em 1995.

A toxicidade das substâncias está diretamente ligada com sua capacidade de ser absorvida pelo organismo, de interagir com os sistemas enzimáticos, provocando alterações metabólicas ou também, com a capacidade de se depositarem em certos órgãos e tecidos. Quanto à toxicidade, para a α -CD e γ -CD não existem restrições de uso, já para a β -CD existe a restrição por via parenteral (SÁ BARRETO et al., 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC 2 de 15 de janeiro de 2007 aprova o uso de CDs como aditivos para aromatizantes, porém não especifica a quantidade de uso (BRASIL, 2007; ROWE et al., 2009).

7.1.4.3 Aplicações das ciclodextrinas

Devido à estrutura, as CDs apresentam a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade muito grande de substratos, nas mais variadas áreas da indústria como: farmacêutica, alimentícia, cosmética, química analítica, biotecnológica, ambiental e na agricultura (GUYOT et al., 1995).

Na indústria farmacêutica, as CDs são amplamente utilizadas. Na literatura estão apresentados uma variedade de fármacos complexados como clotrimazol (BILENSOY et al., 2006), dorzolamida (SIGURDSSON et al., 2005), azitromicina (PASQUINI et al., 2008) e β -lapachona (NASONGKALA et al., 2003). Varshney e colaboradores (2012) fizeram uma revisão a respeito da solubilidade do norfloxacino, uma vez que é considerado um fármaco de classe IV; neste trabalho encontram-se diferentes métodos utilizados para seu aumento da solubilidade, incluindo dispersões sólidas de complexação (em presença de solubilizantes ácidos, EDTA com caproato de sódio e interação com íons metálicos).

Na área alimentar são utilizadas para encapsular óleos essenciais, vitaminas, entre outros compostos, prevenindo, deste modo, sua fácil oxidação, perda de volatilidade e alteração das características físicas, químicas e organolépticas dos produtos alimentares (GUYOT et al., 1995).

7.1.4.3.1 *Aumento da estabilidade de moléculas hóspedes*

Os princípios ativos presentes em solução aquosa estão sujeitos a reações de degradação, os quais são levados à diminuição de atividade terapêutica ou até mesmo à formação de produtos de degradação indesejáveis e prejudiciais à saúde. Junto ao complexo de inclusão, poderão estar protegidos das situações de degradação. Os fármacos devem permanecer suficientemente estáveis, não somente durante a estocagem, mas também nos fluidos biológicos, já que nas reações que resultam em produtos farmacologicamente inativos ou menos ativos, terão sua efetividade terapêutica reduzida (FRÖMMING et al., 1994).

A decomposição fotolítica é decorrente da absorção de luz ou energia radiante pela molécula do fármaco fotossensível. Parece claro que esse tipo de alteração depende da facilidade com que a luz se propaga no meio no qual está contido o fármaco. Formas farmacêuticas tais como, xaropes, soluções e elixires são mais suscetíveis às alterações que as emulsões, suspensões, comprimidos e pós (UEKAMA et al., 1997; FRÖMMING et al., 1994).

Entre outros fatores preocupantes na estabilidade de formulações, destacam-se processo de oxidação de uma substância cristalina e influência da temperatura

diretamente na estabilidade física de muitas formas farmacêuticas (GAL FÜZY et al., 1984).

7.1.4.3.2 *Aumento da solubilidade de fármacos*

Fármacos pouco solúveis apresentam problemas de biodisponibilidade e têm demonstrado serem imprevisíveis e mais lentamente absorvidos se comparados com fármacos de maior solubilidade em água (VEIGA et al., 2006). A solubilidade aquosa é fator determinante para que novas substâncias químicas tenham sucesso como novos fármacos (FRÖMMING et al., 1994).

Em geral, presume-se que a formação de complexos de inclusão em CDs, leva ao aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução de princípios ativos lipofílicos, o que pode refletir em um aumento de sua biodisponibilidade ou em diminuição de seus efeitos (OTERO et al., 1991).

Normalmente, a solubilidade de um fármaco aumenta com a quantidade de CD adicionada. O aumento da solubilidade parece estar relacionado com a solubilidade intrínseca do hóspede, bem como com a capacidade de inclusão da molécula hospedeira em água, onde estes fatores estarão refletindo na magnitude da constante de estabilidade do complexo (AHN et al., 1997).

7.1.5 *Fatores limitantes da aplicação das ciclodextrinas*

Os principais fatores que afetam a extensão e o grau de complexação incluem o tamanho e a geometria da molécula-hóspede, a energia conformacional, alterações da tensão superficial, a força das interações de van der Waals e de outras forças eletrostáticas (CHALLA et al., 2005).

A solubilidade relativa do complexo contribuem para definir o equilíbrio final. A temperatura, o pH e outras moléculas hóspedes competidoras podem, também, afetar o equilíbrio. De forma geral, a complexação ocorre de forma mais favorável quando a molécula hóspede possui massa molecular entre 100 e 400 Daltons (Da), solubilidade em água inferior a 10 mg/mL e ponto de fusão a 250 °C (CHALLA et al., 2005; RAMA et al., 2005).

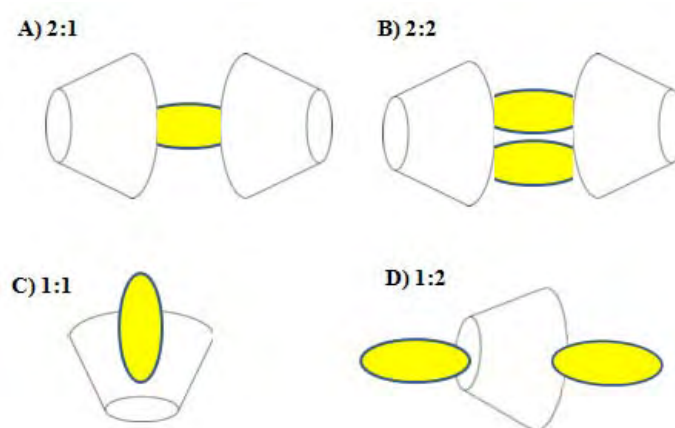
Fatores como o tipo de CD podem influenciar a formação, bem como o desempenho do complexo fármaco:CD. O modo de preparação, coevaporação, malaxagem, dispersão sólida, co-precipitação, *spray-drying* ou liofilização podem afetar a complexação fármaco:CD. A efetividade do método depende da natureza do fármaco em estudo e a CD empregada (CHALLA et al., 2005; RAMA et al., 2005).

7.1.6 Formação de complexo de inclusão

As ciclodextrinas apresentam capacidades próprias para formar complexos de inclusão não covalentes com moléculas específicas, capacidades estas que dependem do ajuste adequado da molécula hóspede na cavidade hidrófoba da CD. Os complexos de inclusão formados entre as CDs e fármacos, são do tipo *host-guest*, onde *host* vem do inglês hospedeiro e *guest* de hóspede ou também pode ser chamado de substrato (GUYOT et al., 1995).

O complexo pode se formar através de quatro tipos de estequiometria ciclodextrina:hóspede: 2:1, 2:2, 1:1 e 1:2 (Figura 45), os quais dependem do tamanho e das características químicas e estruturais do hóspede (SONG et al., 2009).

Figura 45. Esquema das estequiometrias de inclusão ciclodextrina e hóspede. (A) 2:1, (B) 2:2, (C) 1:1, (D) 1:2



Fonte: criação do autor.

Dentre estes quatro exemplos de estequiometria de inclusão entre ciclodextrina e hóspede, a mais comum é a 1:1. A constante de equilíbrio é mensurável e determinada

normalmente por técnicas como espectrofotometria na região do ultravioleta e fluorescência. Os métodos mais difundidos levam os nomes de seus autores e são amplamente utilizados no meio científico (BENESI & HILDEBRANDT, 1949; HIGUCHI & CONNORS, 1965).

Na literatura são descritos diversos métodos de preparação dos complexos de inclusão, entre os quais se podem destacar (SHIMPI et al., 2005):

- a) Complexos em solução: Um método muito utilizado através da dissolução de ambos, hóspede e CD em um mesmo solvente, a temperatura ambiente ou através do aquecimento, com agitação durante um tempo suficiente para garantia do estado de equilíbrio de 24 a 48 horas. Para obtenção do complexo, se faz então a remoção do solvente mediante liofilização, evaporação, refrigeração ou *spray drying*. A presença de água é absolutamente necessária, pura ou em um sistema de solvente orgânico, onde este será utilizado para a solubilização da molécula hóspede. São usados como co-solventes: etanol, metanol, isopropanol ou em certos casos, a acetona.
- b) Maceração (*kneading*): consiste em misturar quantidades estequiométricas do hóspede e CD, com adição de uma pequena quantidade de água ou solvente orgânico. A mistura é então macerada até que se evapore a fase líquida, formando-se uma pasta que irá ser submetida à secagem até a eliminação total do solvente.
- c) Moagem conjunta (*grinding*): mistura-se a CD e o hóspede no estado sólido que são triturados vigorosamente por um determinado tempo, sem uso de solvente.
- d) Liofilização: consiste no método em solução, onde se submete ao processo de liofilização a solução na qual o hóspede e CD se encontram em concentrações estequiométricas. Pode-se empregar algum solvente com a finalidade de obter ambas as substâncias totalmente dissolvidas. As condições nas quais se procede a liofilização vão influenciar de forma determinante nas características do produto final. A velocidade de congelamento prévia à liofilização, condiciona a estrutura do complexo. Um rápido congelamento na presença de nitrogênio líquido, geralmente favorece

a formação de produtos amorfos, enquanto que um congelamento mais lento leva a produtos cristalinos.

- e) Coprecipitação: consiste na adição de um excesso de substância ativa a uma solução saturada de CD. Em alguns casos, este simples procedimento pode levar à formação do complexo de inclusão, porém, frequentemente, pode-se necessitar de aparatos como: agitação, ultra-som ou aquecimento da solução para precipitação do produto final.

7.1.7 Propriedades do complexo de inclusão

A formação de complexos de inclusão provoca mudanças significativas nas características do fármaco, ou seja, as propriedades físicas e químicas que o fármaco apresenta neste microambiente, de polaridade reduzida e geometria restrita, são diferentes daquelas apresentadas em fase aquosa. Além disso, a molécula anteriormente hidrofóbica, sob complexação, torna-se hidrofílica (DEL-VALLE, 2004).

7.1.8 Caracterização e identificação dos complexos de inclusão

Não é garantido que um pó obtido na mistura de um fármaco e a CD em suspensão, solução ou como pasta, seja um verdadeiro complexo de inclusão. Muitos compostos não podem ser complexados, outros formam complexos de inclusão em solução, mas não no estado sólido. O produto sólido final pode ser uma mistura de hóspede e hospedeiro, hóspede não complexado e CD hidratada (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

7.1.8.1 Constantes de estabilidade dos complexos

O diagrama de solubilidade de fases, desenvolvido por Higuchi e Connors (1965), é utilizado para a verificação de formação de complexos de inclusão. O diagrama consiste em um gráfico, no qual é representada a solubilidade do hóspede em função da concentração de CD, existindo dois tipos de perfis: A e B.

O diagrama do tipo A, corresponde aos complexos solúveis, portanto, observa-se aumento da solubilidade do fármaco (molécula hóspede) com o aumento da concentração de CD. Podem ser de três tipos (BREWSTER e LOFTSSON, 2007):

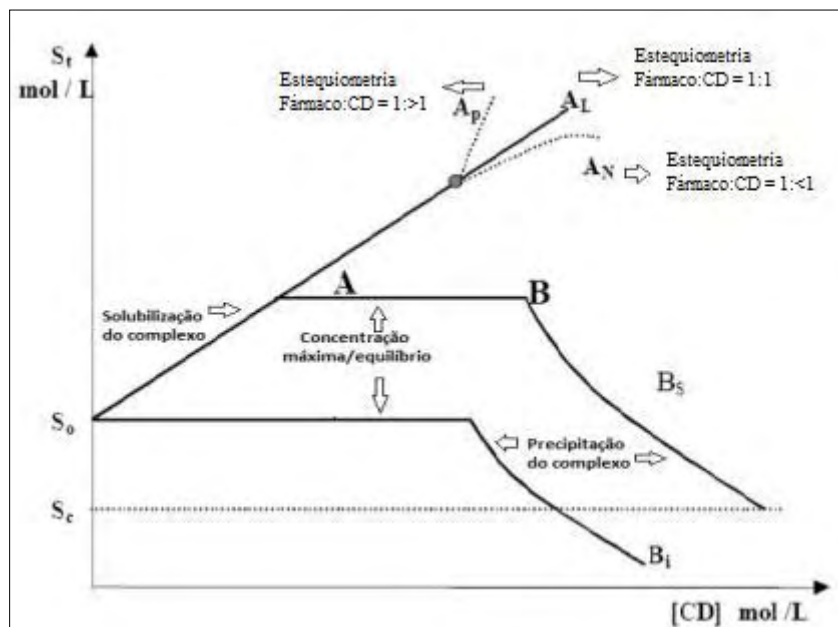
- A_L , diagrama linear: a solubilidade do fármaco aumenta linearmente com o aumento da concentração de CD. Os diagramas lineares resultam de complexos de primeira ordem em relação à CD e ao fármaco e se o declive for menor ou igual a 1, assume-se a estequiometria de 1:1. Por outro lado, se o declive for maior que 1, há formação de complexos de ordem superior a um em relação ao fármaco.
- A_P , diagrama com desvio positivo de linearidade: o complexo formado é o de primeira ordem em relação ao fármaco e de segunda ou superior em relação à CD. Neste caso, a solubilização é mais efetiva em concentrações elevadas de CD.
- A_N , diagrama com o desvio negativo: não possui interpretação generalizada devido a interações complexas entre soluto-soluto, que dependem de cada caso.

Os diagramas do tipo B correspondem à formação de complexos com solubilidade limitada ou complexos insolúveis e a concentração da molécula hóspede diminui com o aumento da concentração de CD, podendo ser de dois tipos:

- B_S , neste diagrama observa-se três pontos: primeiro existe um aumento da solubilidade, depois uma região de platô, que é considerada a máxima solubilidade, e na terceira, tem-se a precipitação do complexo insolúvel com o aumento da CD.
- B_I , refere-se a um complexo tão insolúvel que a possibilidade de aumento inicial na concentração do fármaco não é detectável (LOFTSSON et al., 2004).

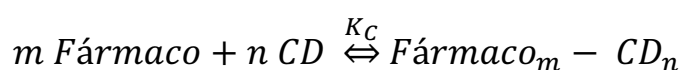
A informação obtida pelos diagramas de solubilidade de fases permite fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar o valor da constante de associação K_c . O valor de K_c é obtido pelo segmento linear dos diagramas observado nos perfis A_L , A_P e B_S na Figura 46 adaptado de Araújo e colaboradores (2003).

Figura 46. Tipos de diagrama de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármaco com ciclodextrina



Fonte: adaptado de PANDYA et al., 2008

Assumindo a formação de um complexo de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem para CD ($n=1$) e de primeira ordem para o fármaco ($m=1$), tem-se o seguinte equilíbrio estabelecido (CONNORS, 1997; LOFTSSON et al., 2004):



sendo o valor de K_C determinado pela Equação 11:

$$K_C = \frac{[\text{Fármaco}_m - \text{CD}_n]}{[\text{Fármaco}]^m \cdot [\text{CD}]^n} \tag{11}$$

Assim, a solubilidade total do fármaco pode ser calculada pelas Equações 12 e 13 (LOFTSSON et al., 2004):

$$S_t = S_0 + m \times [\text{Fármaco}_m - \text{CD}_n] \tag{12}$$

$$S_t = S_0 + \frac{K_c \times S_0}{1 + K_c \times S_0} [CD] \quad (13)$$

Em que: S_t corresponde à solubilidade do fármaco livre e complexado, S_0 a solubilidade intrínseca do fármaco, $[Fármaco_m - CD_n]$ ao complexo de estequiometria 1:1 (em que m e n são iguais a 1).

A representação gráfica de S_t , em função da concentração de CD é uma reta cuja ordenada é igual a S_0 e inclinação igual a $(K_c \times S_0) / (1 + K_c \times S_0)$. A constante de estabilidade (K_c) pode ser facilmente deduzida a partir da inclinação e da ordenada na origem do segmento linear. Assim, tem-se a Equação 14, desenvolvida por Higuchi e Connors (1965):

$$K_c = \frac{\text{inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{inclinação})} \quad (14)$$

Em que: S_0 corresponde à solubilidade intrínseca da molécula hóspede. Na Tabela 50 estão descritos os valores de K_c e força de ligação (CARRIER et al., 2007).

Tabela 50. Força de ligação entre a molécula hóspede e a CD conforme o valor de K_c

Valor de K_c (M^{-1})	Força de ligação
< 500	Muito fraca
500 – 1000	Fraca
1000 – 5000	Moderada
5000 – 20000	Forte
> 20000	Muito forte

Fonte: adaptado de ARAÚJO et al., 2003

7.1.8.2 Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI)

A Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI) é uma ferramenta utilizada para a caracterização físico-química de fármacos. De acordo com Issa & Ferraz (2011), a VDI pode ser definida como a velocidade de dissolução de uma substância ativa pura, quando são mantidas constantes as condições de área superficial, temperatura, agitação,

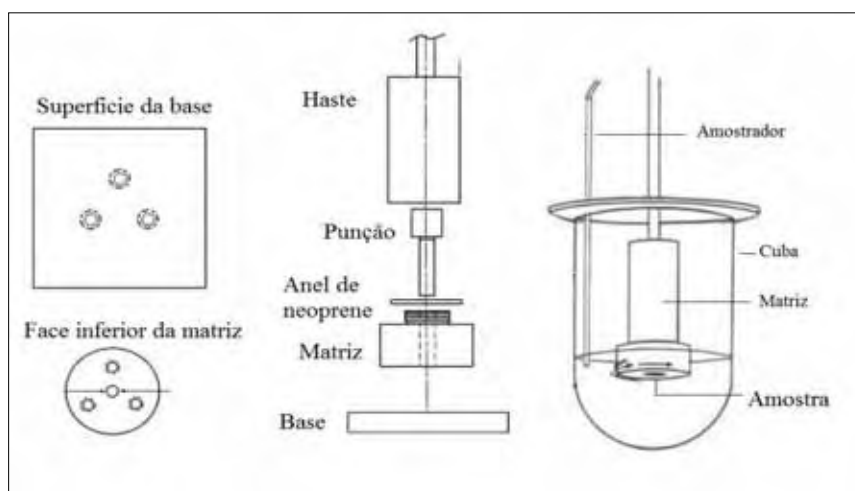
pH e força iônica do meio. Este ensaio não consta nas monografias farmacêuticas por ser um ensaio de caracterização (USP 35, 2012).

A VDI é reconhecida como uma valiosa ferramenta a ser utilizada no monitoramento dos fármacos durante o desenvolvimento e controle de qualidade, sendo utilizado para completar um estudo de solubilidade de uma substância. A VDI de um fármaco pode ser obtida empregando-se um acessório específico para tal, onde o fármaco compactado é exposto a um meio de dissolução sob uma área superficial constante, e o seu valor é expresso em $\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (USP 35, 2012).

Dois tipos de aparatos podem ser escolhidos para determinar a VDI: o sistema de disco fixo, descrito apenas na Farmacopeia Americana e o sistema de disco rotativo, conhecido como “Wood’s apparatus”, também descrito pela BP (2011), EP (2011) e USP 35 (2012).

O sistema de disco rotativo é composto por punção de aço, matriz, haste, anel de neoprene e a base de apoio (Figura 47). A base possui três entradas de parafusos para a fixação da matriz e auxiliando na compactação da amostra. A matriz possui uma cavidade com diâmetro de 0,4 cm, no qual o fármaco e o punção são inseridos e submetidos á pressão de compactação. Dessa maneira, após a separação da base, o material fica exposto na face da matriz que é acoplada na haste responsável pelo movimento (USP 35, 2012).

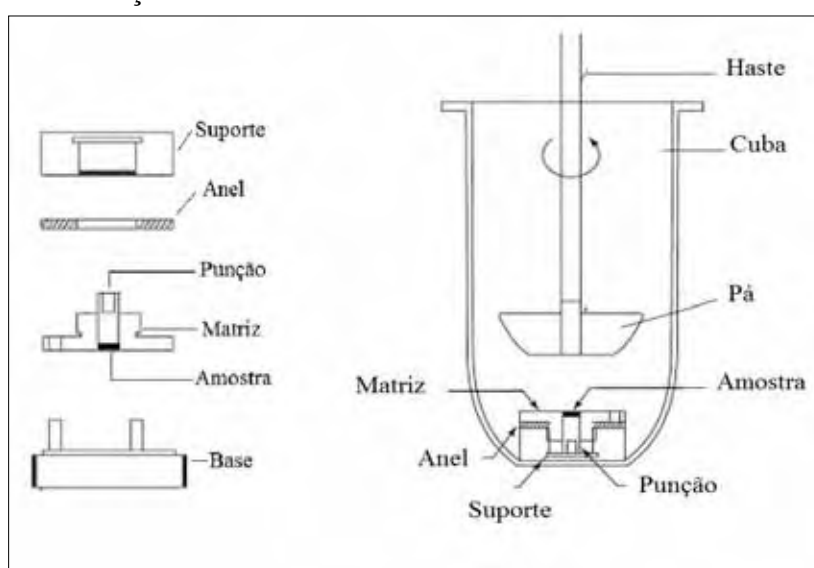
Figura 47. Sistema de disco rotativo (*Wood’s Apparatus*); aparato desmontado e demonstração do sistema no equipamento de dissolução, modelo USP (2012)



Fonte: adaptado de USP, 2012

O sistema de disco fixo é composto por punção de aço, matriz, anel de neoprene, base de apoio e suporte (Figura 48). O modelo de formação do compactado é semelhante ao aparato fixo, porém, nesse sistema há necessidade de um suporte para a sustentação da matriz e do punção sobre uma cuba de fundo plano, de modo que a área do fármaco fique fixa e exposta para cima, sendo o movimento rotacional de responsabilidade da pá do aparato n° 2 (USP 35, 2012).

Figura 48. Sistema de disco fixo; aparato desmontado e sistema configurado no equipamento de dissolução



Fonte: adaptado de USP, 2012

Através dos estudos de Noyes & Whitney estima-se o cálculo (Equação 15) para da VDI utilizado para determinar um fármaco puro ou também chamado de fluxo de dissolução (j) (USP 35, 2012).

$$j = \frac{dC}{dt} = [DAK_{w/o}(C_s - C_b)] \div [Vh]$$

(15)

Em que:

j = fluxo de dissolução ($\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)

D = Coeficiente de difusão do fármaco

A = área superficial da amostra dissolvida

$K_{a/o}$ = água/óleo coeficiente de partição do fármaco

V = volume de dissolução do meio

h = espessura da camada estagnante

(C_s – C_b) = concentração do gradiente para a difusão da substância

Assumindo que a condição *sink* é mantida e reorganizando a Equação 15 obtém-se a Equação 16:

$$\frac{dC}{A} = [DK_{a/o}C_s] \div [Vh] \times dt \quad (16)$$

A Equação 16 pode ser entendida de acordo com a Equação 17:

$$Y = M \times X \quad (17)$$

Em que:

Y = dC/A (mg/mL/cm²)

X = dt (min)

M = *slope* = [DK_{a/o}C_s]/[Vh] (cada *slope* do perfil de dissolução representando a velocidade de dissolução)

Através da equação de Noyes & Whitney, pode-se determinar a velocidade de dissolução, expressa geralmente pela massa de amostra dissolvida por unidade de tempo e o fluxo de dissolução, quando a área superficial é levada em consideração, expresso em velocidade de dissolução por unidade de área (USP 35, 2012).

7.1.8.3 *Análise térmica*

As técnicas termoanalíticas mais utilizadas para a avaliação de formação de complexos de inclusão com CDs são: DSC e TG. Geralmente são as primeiras a serem consideradas na investigação de formação de complexos por serem relativamente simples e utilizarem pouco tempo de análise (NOVÁK et al., 2006).

7.1.8.4 Espectrofotometria na região do infravermelho

A análise dos espectros na região do infravermelho pode ser feita comparando as bandas da molécula hóspede, da CD e do respectivo complexo. Quando ocorre a complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou até mesmo desaparecer (CORTI et al., 2009).

7.1.8.5 Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) determina a natureza cristalina de sólidos e é uma das melhores técnicas para caracterização de complexos de inclusão. Dependendo da forma cristalina da molécula hóspede, há formação de picos característicos no difratograma. Assim, a complexação é avaliada por alterações nos picos característicos da molécula hóspede e da CD com o complexo. A obtenção de um difratograma com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser um indicativo de ocorrência de complexação (CORTI et al., 2009).

7.1.8.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), amplamente utilizada para caracterização microestrutural, onde um fino feixe de elétrons focalizado sobre a área a ser analisada, gera uma série de sinais, que podem ser utilizados para caracterizar propriedades da amostra (CORTI et al., 2009).

7.2 Material

Para os estudos de complexação, utilizou-se norfloxacino matéria-prima (NOR-MP) seção 4.4. A ciclodextrina utilizada foi a β -ciclodextrina.

7.2.1 Preparo de soluções e complexo

- β -CD

A solução foi realizada de acordo com a especificação no rótulo do fornecedor. Uma quantidade de 4,3094 g de β -CD quantitativamente pesada em balança analítica

foi transferida para balão volumétrico de 250 mL com auxílio de água purificada. Levou-se para o ultra-som durante 40 minutos (devido à sua difícil solubilização); finalmente completou-se o volume com água purificada para obtenção da solução de β -CD.

- Tampão fosfato pH 6,0 – 0,2 M

Foram transferidos 6,8 g de fosfato de sódio monobásico e 0,22 g de NaOH, em balão volumétrico de 250,0 mL para dissolução com água purificada.

- Tampão fosfato pH 8,0 - 0,2 M

Foram dissolvidos 5,5 g de fosfato de sódio monobásico e 1,47 g de NaOH, em água purificada em balão volumétrico de 250,0 mL.

- Solução de NOR-MP

Foram transferidos 6,25 mg de NOR-MP (seção 4.4) para balão volumétrico âmbar de 25,0 mL, completando-se o volume com metanol para obtenção de solução em concentração de 250,0 μ g/mL.

- Maceração

Maceração (*kneading*): pesaram-se 7,0 g de β -CD com 1,96 g de NOR-MP de acordo com a massa molecular; misturou-se em gral e pistilo durante 45 minutos, adicionando-se gotas de solução acetona: água (50:50 v/v). A mistura foi então macerada até a evaporação da fase líquida, formando-se uma pasta que foi submetida à secagem até a eliminação total do solvente.

- Moagem conjunta

Moagem conjunta (*grinding*): pesaram-se 7,0 g de β -CD com 1,96 g de NOR-MP em gral e pistilo; misturou-se vigorosamente por um determinado tempo (30 minutos), sem uso de solvente.

- Liofilização

Foram transferidos 1,4 g de β -CD e 0,39 g de NOR-MP para balão volumétrico de 200,0 mL, completando-se o volume com água. Levou-se ao ultra-som por 30

minutos. A solução foi filtrada e então o filtrado foi colocado em recipientes de liofilização e congelado para posterior liofilização.

7.3 Métodos

7.3.1 Diagrama de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases tem por finalidade estudar a interação entre o fármaco (pouco solúvel) e um ligante solúvel, obtendo-se a estequiometria do composto através da estimativa de K_C , apresentado na seção 7.8.1.1. Foram preparados tubos de ensaio em triplicata com quantidades em excesso de fármaco e quantidades crescentes de β -CD; levou-se ao ultra-som por 30 minutos, manteve-se os tubos em banho maria a 25 °C, durante 72 horas. Posteriormente as amostras foram filtradas e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro na região do ultravioleta a 277 nm (FB 5, 2010). Realizaram-se os cálculos e obteve-se o gráfico referente ao tipo de isoterma encontrado.

Foram realizados diagramas de solubilidade de fases em água e tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0.

A Tabela 51 mostra como foram preparados os tubos (com a quantidade pesada de excesso de norfloxacino) e a quantidade adicionada de solução de β -CD em água purificada e tampão fosfato pH 6,0 e 8,0.

Tabela 51. Esquema de preparação dos tubos de ensaio para o diagrama de solubilidade em água purificada e tampão pH 6,0 e pH 8,0

Tubos	Norfloxacino (mg)	Solução de β – CD (mL)	Água purificada/ Tampão pH 6 e 8 (mL)
1	40,00	-	5,00
2	40,00	0,85	4,15
3	40,00	1,40	3,60
4	40,00	2,30	2,70
5	40,00	2,90	2,10
6	40,00	3,70	1,30
7	40,00	4,30	0,70
8	40,00	4,8	0,20

7.3.2 Velocidade de Dissolução Intrínseca

Este trabalho foi desenvolvido na *Virginia Commonwealth University (VCU)* no *Bioanalytical Laboratory in the Department of Pharmaceutics* (Richmond, VA, USA) com a colaboração do Professor Dr. Thomas Karnes.

O aparato de escolha foi o Aparato de Wood, desenvolvido por John Wood em 1963. Amostra de NOR-MP e de moagem conjunta demonstrado na seção 7.2.1 foram analisadas em triplicata para a determinação da VDI. As condições de estudo estão dispostas na Tabela 52.

Tabela 52. Parâmetros de escolha para o teste de dissolução intrínseca

Parâmetros	
Meio de dissolução	Tampão pH 4,0
Volume do meio de dissolução	900 mL
Compressão	5500 psi
Tempo de compressão	2 minutos
Temperatura do meio de dissolução	37°C
Velocidade de rotação	100 rpm

Foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos e analisadas pela metodologia desenvolvida e validada por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters Alliance modelo 2695, detector de DAD) nas mesmas condições da seção 6.2.3 deste trabalho. Os dados obtidos foram analisados pela Microsoft Excel[®].

7.3.3 Análise térmica

As curvas de DSC dos complexos obtidos por maceração (as amostras foram denominadas de amassado - AM), moagem conjunta (as amostras foram denominadas mescla física - MF) e liofilização (LIOF) foram obtidas com DSC TA 2920, e as curvas TG dos complexos obtidos por amassado, mescla física e liofilizado foram obtidas com TG TA 2920. O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é basicamente constituído por microbalança, forno, termopares e sistema de fluxo de gás. Amostras

para DSC (amassado 1,00 mg, mescla física 1,00 mg, liofilizado 0,61 mg) e para TG (amassado 1,68 mg, mescla física 1,43 mg e liofilizado 0,87 mg) foram colocadas em cápsulas de alumínio parcialmente fechadas, com razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25 °C até 350 °C, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 70 mL/min e suporte de Al₂O₃. Os dados obtidos foram analisados e processados através do *software* TA Instruments Universal Analysis 2000. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massas definidas.

7.3.4 Espectrofotometria na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com 1,0 mg de NOR-MP, β -CD, amassado, mescla física e liofilizado separadamente utilizando-se pastilhas de KBr dessecado a 105 °C.

7.3.5 Difração de raios-X

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em difratômetro de raios-X Siemens modelo D5000, com taxa de varredura de 0,1°/s a cada 0,05° em 2 θ , variando de 4° a 70°, e radiação de Cu monocromatizada por cristal de grafite.

7.3.6 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram submetidas à metalização com ouro (SPUTTERIG) para tornar a superfície condutora, e colocada em porta-amostra para avaliação em microscópio eletrônico marca JEOL (*Fiel Emission Scanning Electron Microscope*) modelo JSM-7500F.

7.3.7 Análise microbiológica dos complexos

Os complexos amassado, mescla física e liofilizado, foram analisados pelo método microbiológico desenvolvido e validado por turbidimetria descrito na seção 6.4 deste trabalho. As amostras dos complexos foram comparadas com a substância química de referência. As análises foram realizadas em triplicata e então calculada a potência dos complexos.

7.4 Resultados

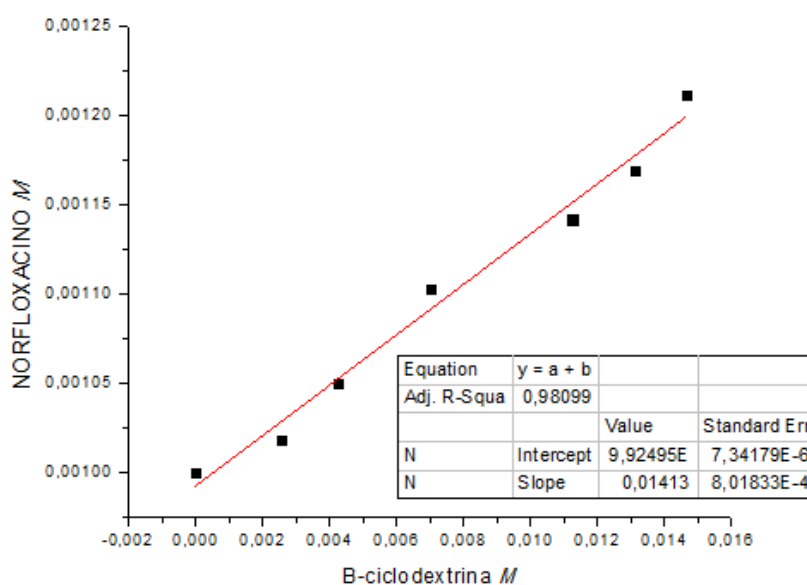
7.4.1 Diagrama de solubilidade de fases

O método da solubilidade de fases desenvolvido por Higuchi e Connors (1965) é utilizado como primeira verificação da formação de complexo de inclusão em solução, sendo monitoradas as alterações da solubilidade do fármaco em presença de quantidade crescente de ciclodextrina. A partir do tipo de diagrama disposto na Figura 46 (seção 7.1.6) foi estabelecida a estequiometria, bem como os valores de K_c . Para a determinação dos valores de K_c foi utilizada a Equação 14.

7.4.1.1 Diagrama de solubilidade de fases em água

Para determinação da isoterma de solubilidade, o norfloxacinó apresenta, em água (Figura 49), diagrama do tipo A_L e $K_c = 14,0 \text{ L.mol}^{-1}$, o que demonstra que em meio aquoso o norfloxacinó na presença de β -CD, tem sua solubilidade linear em função da concentração de β -CD, permitindo a estequiometria de 1:1.

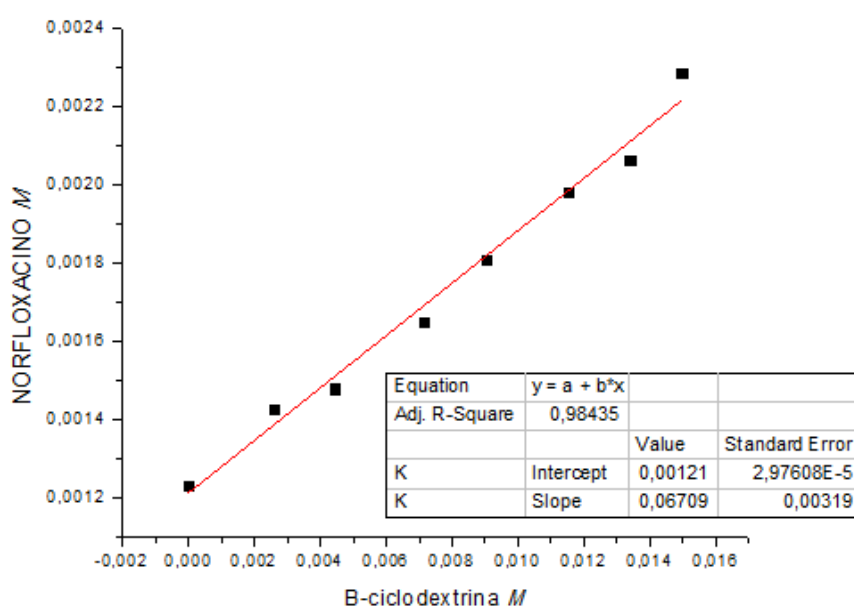
Figura 49. Isotherma de solubilidade do norfloxacinó/ β -CD em água



7.4.1.2 Diagrama de solubilidade de fases em solução tampão fosfato pH 6,0

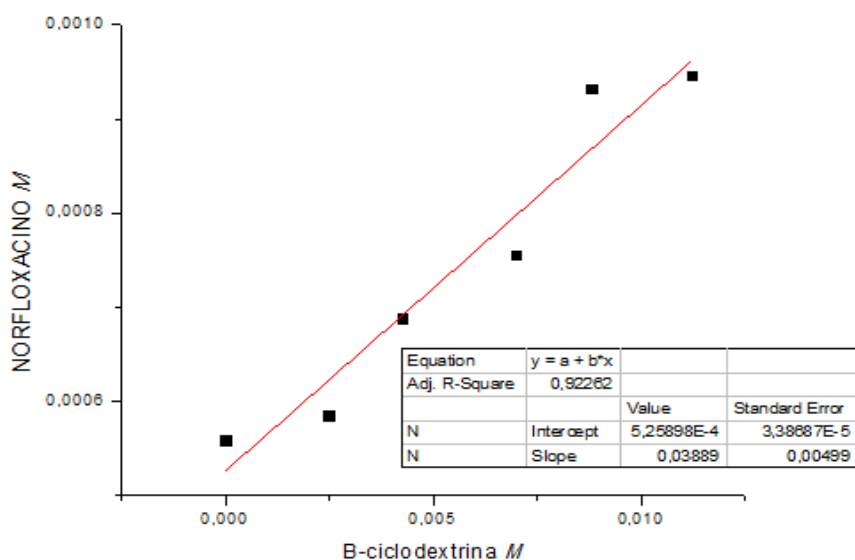
A isoterma em pH 6,0 (Figura 50), apresenta perfil do tipo A_L , onde há aumento linear da solubilidade do norfloxacino em concentrações crescentes de CD, com valor de $K_C = 58,0 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ e também, neste caso, permitindo a inferência de estequiometria 1:1.

Figura 50. Isoterma de norfloxacino/ β -CD em solução tampão fosfato pH 6,0



7.4.1.3 Diagrama de solubilidade de fases em solução tampão fosfato pH 8,0

Em pH 8,0 (Figura 51) o diagrama obtido indica perfil do tipo A_P e $K_C = 72,0 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando que os complexos formados são de ordem maior que um, em relação à molécula hospedeira após determinada concentração de CD.

Figura 51. Isoterma de norfloxacino/ β -CD em solução tampão fosfato pH 8,0

Os dados apresentados na Tabela 53 demonstram um aumento significativo da solubilidade do norfloxacino quando em presença da β -CD, onde em água e em solução tampão fosfato pH 6,0 a solubilidade foi aumentada, em relação à concentração máxima de β -CD. Tal fato é comprovado pelas isotermas de solubilidade que descrevem um perfil do tipo A_L . Em solução tampão fosfato pH 8,0, foi observado um aumento significativo na solubilidade do norfloxacino quando comparado na ausência e presença de β -CD, onde a isoterma apresentou-se do tipo A_P .

Assim, observados os dados da Tabela 44 e pelo que foi descrito anteriormente, pode-se compreender que a complexação do norfloxacino com a β -CD está associada à variação do pH do meio, sendo que em meio básico há uma maior solubilidade, pois a forma ionizada do fármaco é predominante.

Tabela 53. Dados referentes à solubilidade do norfloxacino nos diferentes meios, o valor de constante de estabilidade ($K_C M^{-1}$), a eficiência de complexação (CE) e o perfil de isoterma, 25 °C

Meio	S_o (mg/mL)	$S_{máx}$ (mg/mL)	Aumento de solubilidade	$K_C (M^{-1})$	(CE)	Tipo de Isoterma	pH final
Água	0,32	0,39	1,2	14	0,014	A_L	7,17
pH 6	0,39	0,73	1,9	58	0,07	A_L	6,19
pH 8	0,18	0,44	2,4	72	0,04	A_P	7,97

7.4.2 Velocidade de Dissolução Intrínseca

Foram construídos gráficos e efetuados todos os cálculos para as análises de NOR-MP e amostra de moagem conjunta em triplicata os resultados finais estão nas Tabelas 54 e 55, respectivamente.

Tabela 54. Resumo das três determinações de NOR-MP, pelo método da velocidade de dissolução intrínseca

Tempo (min)	Média (mg/mL/cm ²)*	DP ^a	DPR(%) ^b
0	0,00	0,00	0,00
1	0,01	1,01	16,48
2	0,01	3,13	23,00
3	0,02	1,53	7,85
4	0,03	0,86	3,34
5	0,03	1,92	6,09
10	0,06	5,01	8,12
15	0,09	6,25	6,77
20	0,12	9,48	7,87
25	0,15	12,56	8,29
30	0,18	16,62	9,20
45	0,27	23,95	8,96
60	0,35	23,10	6,61
75	0,43	23,23	5,36
90	0,52	41,83	8,10
105	0,60	47,14	7,89
120	0,68	51,13	7,52

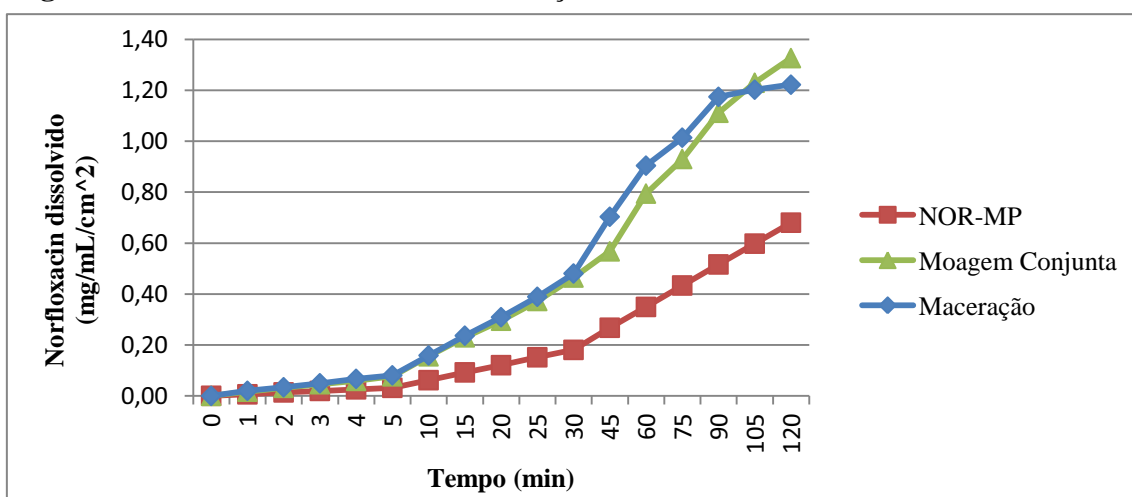
*Médias de três determinações; ^aDP: desvio padrão; ^bDPR: desvio padrão relativo

Tabela 55. Resumo das três determinações da amostra de maceração e moagem conjunta, pelo método da velocidade de dissolução intrínseca

Tempo (min)	Média (moagem) (mg/mL/cm ²)* e ^a DPR (%)	Média (maceração) (mg/mL/cm ²)* e ^a DPR (%)
0	0,00 – 0,0	0,00 – 0,0
1	0,02 – 37,80	0,02 – 24,85
2	0,03 – 31,83	0,03 – 23,93
3	0,05 – 29,65	0,05 – 25,83
4	0,06 – 23,20	0,07 – 19,63
5	0,08 – 16,87	0,08 – 26,23
10	0,16 – 16,80	0,16 – 30,20
15	0,23 – 11,02	0,24 – 24,18
20	0,30 – 10,36	0,31 – 21,48
25	0,37 – 8,95	0,39 – 20,48
30	0,46 – 4,78	0,48 – 20,06
45	0,57 – 22,38	0,70 – 21,01
60	0,79 – 4,60	0,90 – 15,23
75	0,93 – 7,15	1,01 – 11,71
90	1,11 – 6,93	1,17 – 9,49
105	1,23 – 6,53	1,20 – 10,35
120	1,33 – 2,87	1,22 – 9,35

*Médias de três determinações; ^aDPR: desvio padrão relativo

A Figura 52 ilustra a comparação do perfil de dissolução intrínseca do NOR-MP maceração e moagem conjunta, onde pode-se observar que o perfil da maceração e moagem conjunta (NOR-MP e β -CD) foi maior que apenas do NOR-MP.

Figura 52. Perfil da velocidade de dissolução do norfloxacino

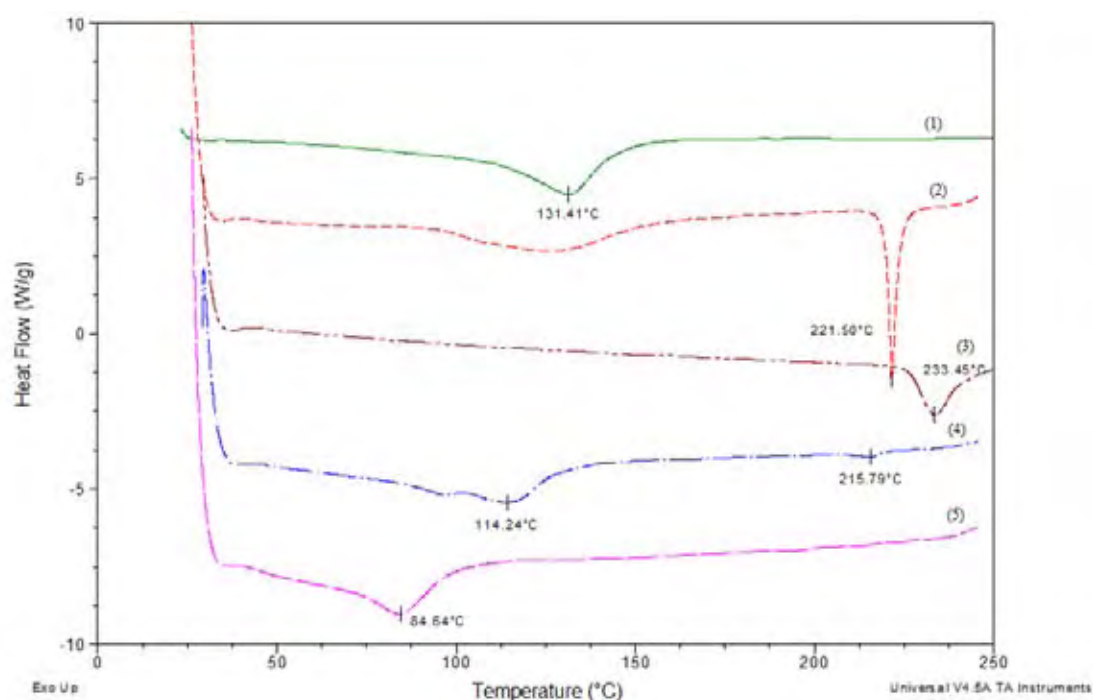
Yu e colaboradores (2004) determinaram que para fármacos onde é possível obter uma boa correlação entre a dissolução intrínseca e a solubilidade, o valor limítrofe para a divisão das classes seria $1,0 \text{ mg/min/cm} - 0,017 \text{ mg/min/cm}$, ou seja, fármacos com VDI acima desse valor seriam considerados de alta solubilidade e VDI abaixo desse limite, indicariam fármacos de baixa solubilidade.

De acordo com essa divisão o perfil de VDI da amostra de maceração e moagem conjunta em 120 minutos foi de $1,22$ e $1,33 \text{ mg/mL/cm}^2$, respectivamente e para o NOR-MP foi de $0,68 \text{ mg/mL/cm}^2$.

7.4.3 Análise térmica

Na análise de DSC, a β -CD apresenta um pico largo por volta de $131 \text{ }^\circ\text{C}$. A análise de formação do complexo pode ser feita comparando-se a curva DSC do complexo com a β -CD da molécula hóspede e da mistura física. O pico do fármaco NOR-MP apresenta fusão, um pico estreito bem definido (Figura 53) e quando ocorre a formação do complexo, pode-se observar que não ocorre a presença do pico do fármaco, indicando então a formação da complexação da amostra LIOF comparada ao fármaco livre.

Figura 53. Gráficos de calorimetria exploratória diferencial das amostras: β -CD (1), NOR-MP (2), AM (3), MF (4) e LIOF (5)



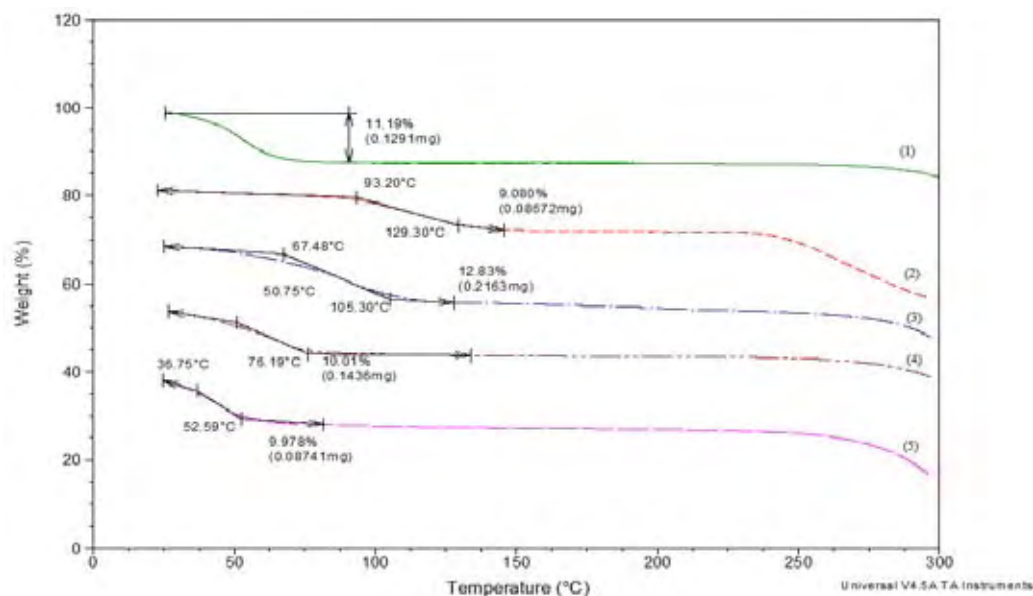
Analisou-se a TG comparando a temperatura de início da decomposição da molécula hóspede sozinha com o suposto complexo (Tabela 56 e Figura 54). O início da temperatura da perda de água do norfloxacino livre foi de 90 °C e a do complexo LIOF foi de 91 °C, identificando a complexação devido à maior temperatura, mostrando que o fármaco está protegido pelo complexo.

A análise também pode ser feita através da comparação da porcentagem de massa perdida do complexo em relação à mistura física e é também um indicativo da formação de complexos fármaco:CD. A perda de massa em questão corresponde à saída de água da cavidade da CD pela sua evaporação, o que ocorre em temperaturas de até, no máximo, 150 °C. Comparando a amostra LIOF com a MF, pode-se identificar que ocorreu a complexação devido à menor porcentagem de LIOF. Quando se verifica a diminuição de massa perdida correspondente à água no complexo, em comparação com a mistura física, é possível concluir que a molécula hóspede está ocupando o lugar da água na cavidade e, portanto, houve a formação de complexos de inclusão. Entretanto, na hipótese de não formação de complexos, a perda de água do complexo é igual à da mistura física.

Tabela 56. Perda de água e temperatura da perda de água dos gráficos de termogravimetria: β -CD, NOR-MP, AM, MF e LIOF

Amostra	Perda de água (massa)		Temperatura de
	mg	%	perda de água °C
β -CD	0,1291	11,19	90
NOR-MP	0,0867	9,08	90
AM	0,2163	12,83	85
MF	0,1436	10,01	90
LIOF	0,0874	9,97	91

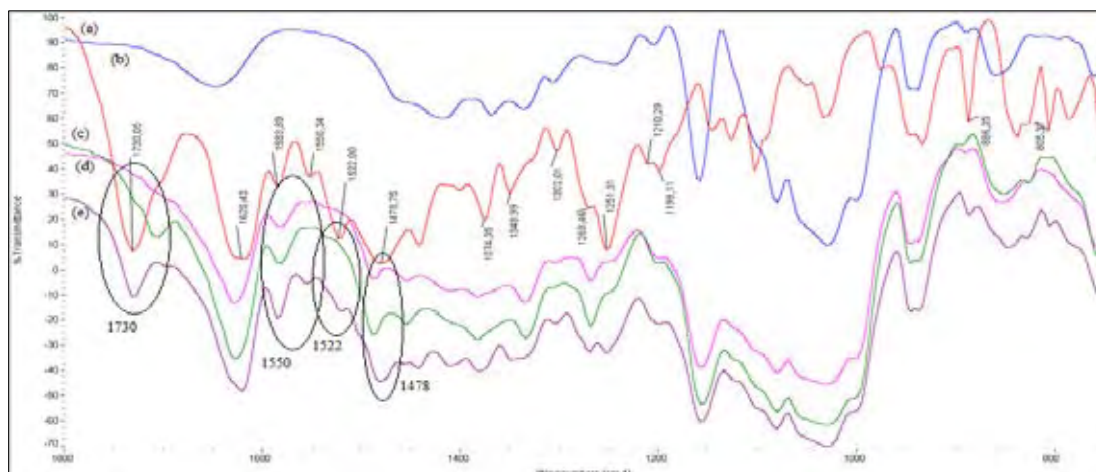
Figura 54. Gráficos de termogravimetria das amostras: β -CD (verde), NOR-MP (vermelho), AM (azul), MF (marrom) e LIOF (rosa)



7.4.4 Espectrofotometria na região do infravermelho

Os espectros obtidos na região do infravermelho foram comparados as bandas de β -CD, NOR-MP, norfloxacino liofilizado (LIOF), amassado (AM) e mescla física (MF). Na ocorrência da complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou até mesmo desaparecer. Os espectros de liofilizado e amassado apresentam mudanças e desaparecimentos de bandas 1730, 1550, 1522 e 1478, conforme indicado na Figura 55, sugerindo a formação do complexo com a β -CD.

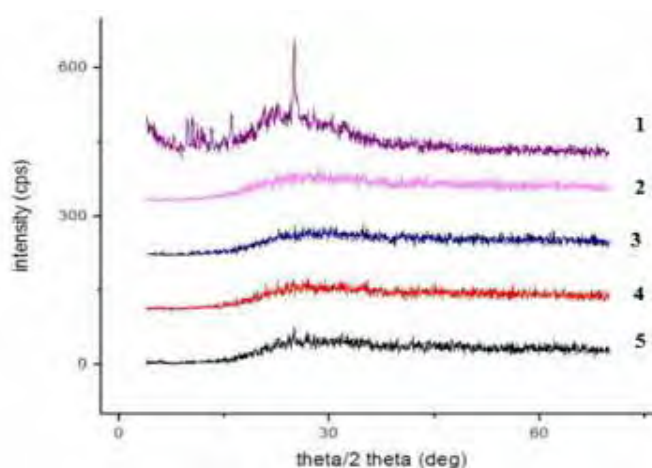
Figura 55. Espectro de absorção na região do infravermelho: NOR-MP (a); β -CD (b); LIOF (c); AM (d); MF (e)



7.4.5 Difração de raios-X

A Figura 56 mostra os difratogramas: 1) Norfloxacino MP, 2) β -CD, 3) Amassado, 4) liofilizado e 5) mescla física. O difratograma do norfloxacino possui pico bem definido e os sistemas obtidos por amassado e liofilização mostram interação com a β -CD, e a mescla física indica sinais de presença de fármaco cristalino e ausência de interação, com uma leve presença do norfloxacino.

Figura 56. Difratograma de 1) Norfloxacino MP, 2) β -CD, 3) Amassado, 4) liofilizado e 5) mescla física



7.4.6 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara-SP.

Foram analisadas e comparadas a morfologia do norfloxacino, β -CD e dos complexos obtidos por: amassado, mescla física e liofilização.

As Figuras 57, 58, 59, 60 e 61 mostram a morfologia do norfloxacino, β -CD e dos respectivos complexos.

Figura 57. Fotomicrografia do norfloxacino-MP, aumento 500 vezes

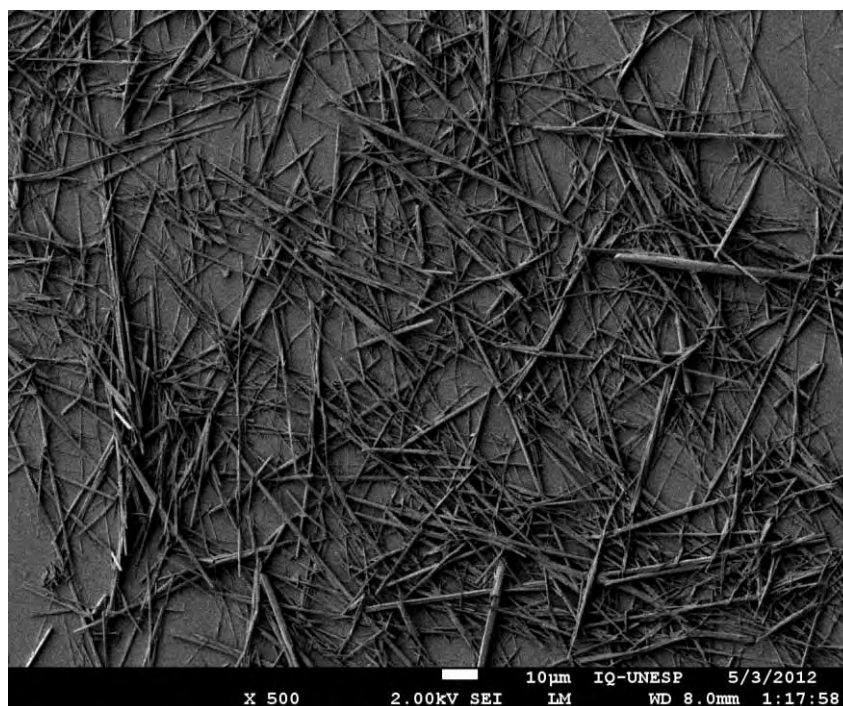


Figura 58. Fotomicrografia da β -CD, aumento 500 vezes

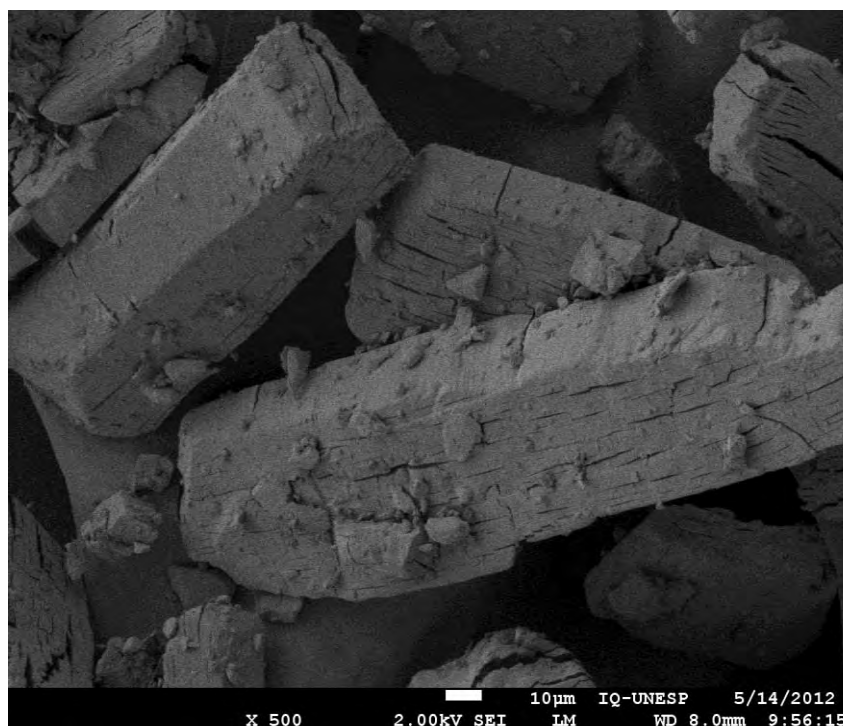


Figura 59. Fotomicrografia do complexo obtido por amassado (AM), aumento 500 vezes

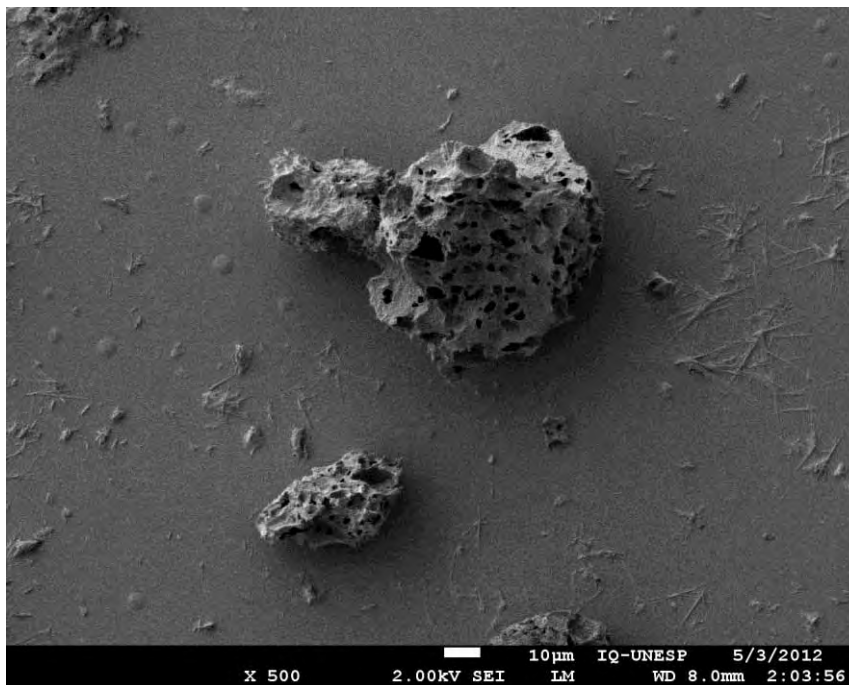


Figura 60. Fotomicrografia do complexo obtido por mescla física (MF) aumento de 500 vezes

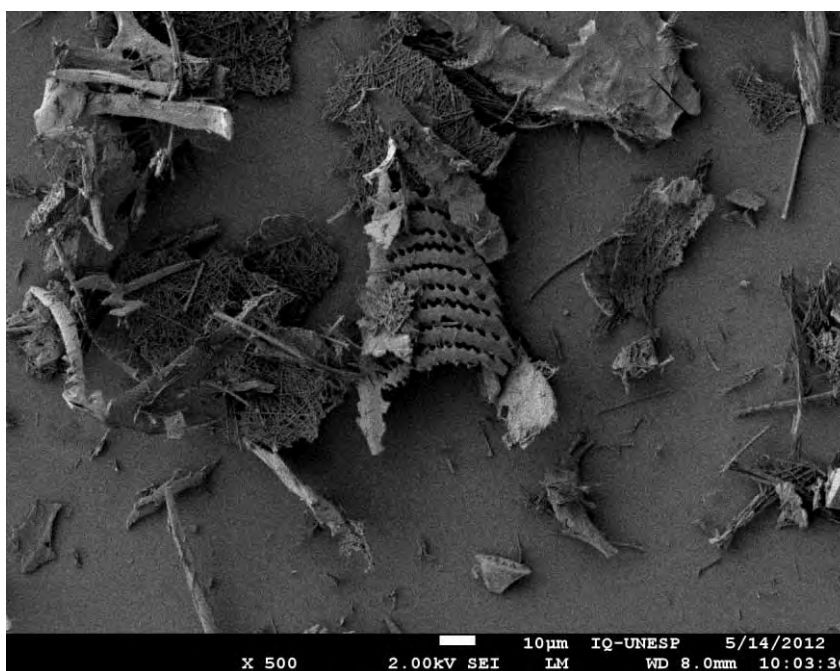
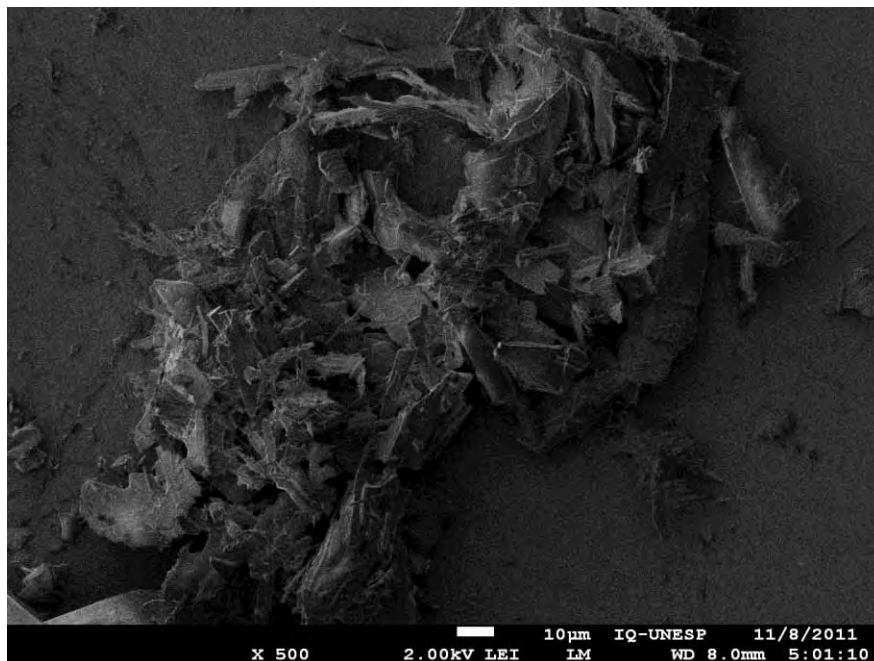


Figura 61. Fotomicrografia do complexo obtido por liofilização (LIOF) aumento de 500 vezes



As Figuras 59 e 61 mostram nitidamente como ocorreu a complexação do norfloxacino com a β -CD. Já a figura 60, mostra que não ocorreu a complexação, pois pode-se observar a presença do norfloxacino e da β -CD em sua forma livre.

7.4.7 Análise microbiológica dos complexos

Após a complexação do norfloxacino com a β -CD, a próxima etapa foi o ensaio microbiológico para determinar a potência dos complexos. A Figura 62 ilustra um gráfico comparando o teor (%) do fármaco livre NOR-MP com 102,5%, enquanto os complexos MF, AM e LIOF, tiveram potência de 97,18; 89,52 e 96,57% respectivamente, indicando que os complexos de inclusão tiveram uma boa atividade microbiológica para o micro-organismo *S. epidermidis*, utilizado no desenvolvimento da metodologia microbiológica por turbidimetria. Além disso, os complexos foram submetidos à degradação pela luz UVC durante um período de 7 horas, também avaliado pela mesma metodologia microbiológica. A Figura 63 destaca que a potência dos complexos diminuiu em 51,14; 48,05 e 60,31 % em relação ao complexo não

degradado, evidenciando que o suposto complexo deveria proteger o fármaco da radiação ultravioleta devido à suposta encapsulação do fármaco pela β -CD.

Figura 62. Representação gráfica da potência do NOR-MP e dos complexos MF, AM e LIOF

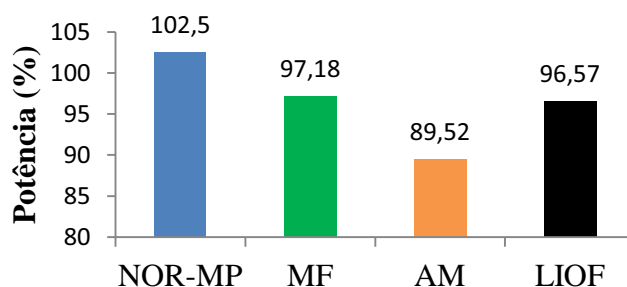
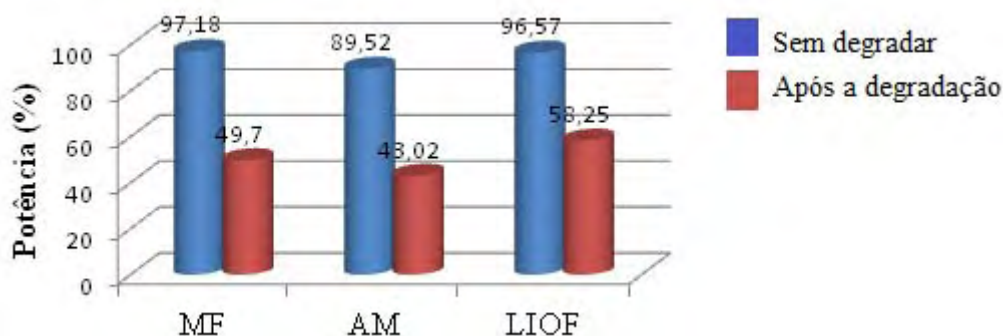


Figura 63. Representação gráfica indicando a potência dos complexos MF, AM, LIOF antes e após 7 horas de degradação em luz UVC



Kamal Dua e colaboradores (2007) investigaram a atividade do complexo norfloxacino e β -CD, utilizando-se a metodologia de difusão em ágar para as seguintes cepas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, para os quais, pode-se observar um pequeno aumento nos halos de inibição em relação ao fármaco livre. Em adição a este estudo, foram acrescentados ao complexo ácido ascórbico e ácido cítrico como um aditivo solubilizante, mostrando um aumento significativo dos halos de inibição, sendo realmente eficaz para a avaliação da atividade antimicrobiana.

7.5 *Discussão*

A técnica utilizada para a realização do diagrama de solubilidade de fases identificou que o norfloxacino apresentou um aumento de solubilidade frente a concentrações crescentes de β -CD e também que esta melhora é atribuída à variação do pH. De acordo com as técnicas de análise térmica, espectrofotometria na região do infravermelho, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura, o único procedimento que mostrou ser adequado para a obtenção do complexo foi a liofilização.

O estudo mostrou que a obtenção do complexo foi possível, uma vez que o efeito terapêutico de um fármaco depende da sua biodisponibilidade e da solubilidade das suas moléculas e com a complexação houve um aumento significativo da solubilidade. O norfloxacino é considerado um fármaco fotossensível, então após a complexação com β -CD foi testado sua fotossensibilidade e a mesma avaliada pelo método microbiológico, entretanto, apesar da complexação ter ocorrido não houve a proteção da complexação para o fármaco.

Os complexos obtidos neste trabalho foram aplicados ao teste microbiológico *in vitro* e demonstraram ter uma potência significativa para o micro-organismo *S. epidermidis*.

8. ESTUDO DE POLIMORFISMO

8.1 Polimorfismo

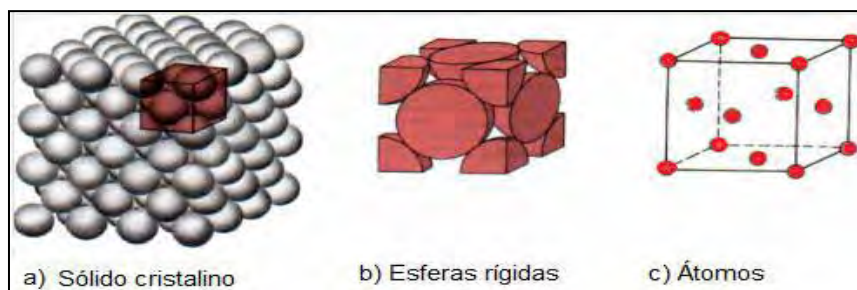
8.1.1 Introdução

O polimorfismo é a capacidade de um composto cristalizar em mais do que uma forma cristalina. Antes, devemos entender o conceito sobre célula unitária. De acordo com Bottom (1999), a distribuição espacial dos átomos, moléculas ou íons, podem ser classificados em: sólidos cristalinos (compostos por átomos, moléculas ou íons arranjados de uma forma periódica em três dimensões) ou sólidos amorfos (compostos por átomos, moléculas ou íons que não apresentam uma ordenação de longo alcance).

Os materiais cristalinos, denominados de estrutura cristalina, podem ser arranjados como esferas rígidas onde os átomos ou íons são representados como esferas de diâmetro fixo, podendo ser reticulado, sendo um conjunto de pontos, que podem corresponder a átomos ou grupos de átomos, que se repetem no espaço tridimensional com uma dada periodicidade e a célula unitária que pode ser definida como o menor agrupamento de átomos representativo de uma determinada estrutura cristalina específica (BOTTOM, 1999).

A célula unitária (Figura 64) representa a simetria de uma determinada estrutura cristalina, onde em a) temos um sólido cristalino, b) célula unitária representada por esferas rígidas e c) célula representada pelas posições ocupadas pelos átomos. Qualquer ponto da célula unitária que for transladado de um múltiplo inteiro de parâmetros de rede ocupará uma posição equivalente em outra célula unitária. Existem somente sete diferentes combinações dos parâmetros de rede. Cada uma dessas combinações constitui um sistema cristalino. Os sistemas cristalinos são: cúbico, hexagonal, tetragonal, ortorrômbico, monoclinico, triclinico e romboédrico (BOTTOM, 1999).

Figura 64. Ilustração de célula unitária.



Fonte: adaptado de BOTTOM, 1999

Diferentes polimorfos de fármacos são quimicamente idênticos, mas apresentam diferentes propriedades físico-químicas, incluindo solubilidade, ponto de fusão, textura, densidade, viscosidade, volume, dureza do cristal, condutividade, forma do cristal, cor, índice de refração, higroscopicidade, perfil de dissolução e estabilidade, que são essenciais para que um princípio ativo atinja níveis terapêuticos no organismo. Vale ressaltar que diferenças morfológicas nos cristais não revelam, necessariamente, a ocorrência de polimorfismo (GIRON, 1995).

Uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos de relevância farmacêutica podem ocorrer em uma ou mais formas cristalinas. Nos sólidos este conceito implica na formação de cristais ideais em que as unidades estruturais são repetidas regularmente e indefinidamente em três dimensões no espaço. Estas unidades têm uma forma definida e orientação, apresentando um volume definido, que contém os átomos e moléculas necessários para a geração do cristal (VIPAGUNTA et al., 2001).

Os polimorfos podem ser classificados em monotrópicos (uma forma polimórfica é instável em todas as temperaturas e pressões) ou, enantiotrópicos (um polimorfo pode ser transformado reversivelmente no outro por variação de temperatura ou pressão) com base nas suas propriedades termodinâmicas. O fármaco, uma vez caracterizado numa destas categorias, é pesquisada a existência de formas metastáveis do cristal. Formas metastáveis são associadas a uma maior energia e, conseqüentemente, maior solubilidade. Similarmente, a forma amorfa do fármaco é sempre mais adequada que a forma cristalina, devido a uma maior energia associada e a uma área de superfície aumentada (GIRON, 1995; SÁNCHEZ et al., 2007).

Geralmente, a forma anidra de um fármaco tem maior solubilidade que a forma hidratada. Isto porque as formas hidratadas já se encontram em interação com a água, possuindo deste modo menos energia livre para a ruptura dos cristais em comparação com as formas anidras (estado energético termodinâmico mais elevado) para adicional interação com a água. Alguns fármacos podem existir em uma forma amorfa (não possuem estrutura cristalina interna). Estes fármacos representam o estado energético mais alto e podem ser considerados como líquidos superarrefecidos. Eles têm maior solubilidade aquosa que as formas cristalinas porque necessitam de menos energia para transferir uma molécula para o solvente (GIRON, 1995; SÁNCHEZ et al., 2007).

O processo de obtenção de uma forma cristalina pode ser realizado através de diversos processos: cristalização por evaporação do solvente, cristalização por resfriamento, cristalização por adição de anti-solvente, cristalização por alteração do pH (para ácidos ou bases fracas), cristalização por introdução de aditivos, etc (LEE & WEBB, 2003; HUANG & TONG, 2004).

Na indústria farmacêutica, o estudo de polimorfismo está relacionado diretamente com o desenvolvimento de medicamentos, assim como as propriedades físico-químicas, de estabilidade, especialmente no que concerne a compatibilidade com excipientes. O processamento e a estabilidade do produto acabado, devem sempre estar de acordo para que se tenha um medicamento de qualidade (CHAWLA et al., 2004).

Mas de 90% dos medicamentos são utilizados em formas sólidas como comprimidos, cápsulas, aerossóis e suspensões, contendo o fármaco particulado e, em geral, na forma cristalina (BUGER, 2000). Vários estudos têm demonstrado que a modificação da forma cristalina e a entropia reduzem a entalpia de fusão, aumentando a taxa de dissolução da forma farmacêutica, o que pode interferir fortemente nas propriedades físico-químicas e na cinética de absorção do fármaco a partir do produto acabado (CHAWLA et al., 2004).

Na literatura há uma grande quantidade de artigos de revisão que reúne uma extensa lista de fármacos que apresentam polimorfos, sendo o mais atual a apresentada por Giron (1995). São vários fármacos que podem apresentar polimorfos, compostos como barbitúricos (70%), sulfonamidas (60%) e esteroides (23%) (REFNER et al., 1988).

A Tabela 57 representa uma lista dentre os fármacos registrados no Brasil junto à ANVISA até dezembro de 2004, aqueles que apresentam polimorfos. A RDC n° 136, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003b) exige que o relatório de registro de um novo medicamento especifique a discriminação das características do polimorfo utilizado no medicamento e de outros polimorfos relacionados ao princípio ativo.

Tabela 57. Lista de medicamentos que apresentam polimorfo registrado na ANVISA

Classe terapêutica	Princípio ativo	
Amebicida, giardícida e tricomonícida	Metronidazol	
Analgésicos não opioides e antitérmicos	Ácido acetilsalicílico	Paracetamol
Ansiolíticos	Cloridrato de buspirona	Diazepam, lorazepam
Antiagregantes plaquetários	Cloridrato de ticlopidina	
Antialérgicos	Dicloridrato de cetirizina	
Antianginoso e vasodilatador	Nifedipeno, nimodipino	Pentoxifilina
Anticonvulsivante	Carbamazepina	
Antiasmáticos, broncodilatadores	Fumarato de cetotifeno	
Antibacterianos	Amoxicilina, ampicilina, cefazolina	Cefalexina, norfloxacino , sulfametazol + trimetropina
Antidiabéticos	Cloridrato de metformina	Glibenclamida
Antieméticos	Bromoprida	
Antifúngicos	Cetoconazol	Nistatina
Anti-helmíntico	Mebendazol	
Anti-hipertensivos	Captopril, captopril + hidroclorotiazida de propanolol, enalapril, espironolactona, felodipino, hidroclorotiazida	Lisinopril, lisinopril + hidroclorotiazida, losartan, maleato de enalapril + hidroclorotiazida, metildopa, nitrendipino
Anti-inflamatórios não esteroidais	Diclofenaco, piroxicam	Tenoxicam
Antiulcerosos	Cimetidina	Cloridrato de ranitidina
Diuréticos	Cloridrato de amilorida	Furosemida
Glicocorticoide sistêmico	Prednisona	

Fonte: adaptado de BRASIL, 2003b

A FDA recomenda que, durante o desenvolvimento de novos produtos, sejam realizadas pesquisas de possíveis formas polimórficas e solvatos, empregando processos de recristalização. Aconselha-se ainda, um rigoroso acompanhamento da pureza física do fármaco durante o seu processo industrial e período de armazenamento (FDA, 2012b).

8.2 *Material*

Para recristalização de polimorfo, utilizou-se NOR-MP descrito na seção 4.4.

8.3 *Método*

8.3.1 *Preparo de formas cristalinas*

A forma polimórfica A, B e C do norfloxacino foi preparada de acordo com a literatura (BARBAS et al., 2007). Pesou-se 1,0 g de norfloxacino e adicionaram-se 100,0 de acetonitrila, isopropanol e acetona para obtenção das formas A, B e C, respectivamente, em um balão de destilação separadamente. As soluções ficaram em sistema de refluxo durante três horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram colocadas em banho maria (A e C em 85,0 °C e B em 56°C) e a cada dia foi diminuído 4 °C até chegar em 25 °C. Os cristais foram retirados manualmente do balão de destilação e armazenados em dessecador.

8.3.1.1 *Identificação de formas cristalinas*

8.3.1.1.1 *Análise térmica*

As curvas de DSC das três formas polimórficas A, B e C foram obtidas com DSC TA 2920, e as curvas TG das três formas polimórficas A, B e C foram obtidas com TG TA 2920. O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é basicamente constituído por uma microbalança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás. As massas das amostras utilizadas para DSC foram: A 0,97 mg, B 1,04 mg e C 0,91 mg e as massas para TG foram: A 1,09 mg, B 1,47 mg e C 1,09 mg. Posteriormente, foram colocadas em cápsulas de alumínio parcialmente fechadas, com razão de aquecimento

de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25 °C até 350 °C, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 70 mL/min, suporte de Al₂O₃. Os dados obtidos foram analisados e processados através do software TA Instruments Universal Analysis 2000. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massas definidas.

8.3.1.1.2 *Espectrofotometria na região do infravermelho*

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com 1,0 mg das formas A, B e C separadamente, utilizando-se pastilhas de KBr dessecada a 105 °C.

8.3.1.1.3 *Ressonância magnética nuclear de prótons*

A ressonância magnética nuclear de prótons baseia-se na absorção de radiação da rádio frequência do espectro eletromagnético, que resulta em modificação na orientação do *spin* do núcleo, quando submetido a um campo magnético.

8.3.1.1.4 *Difração de raios-X*

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em um difratômetro raios-X Siemens modelo D5000, com taxa de varredura de 0,1°/segundos a cada 0,05° em 2θ, variando de 4° a 70°, a radiação de Cu monocromatizada por cristal de grafite.

8.3.1.1.5 *Microscopia eletrônica de varredura*

As amostras foram submetidas à metalização com ouro (*SPUTTERIG*) para tornar a superfície condutora e colocada em um porta-amostra para avaliação em microscópio eletrônico marca JEOL (*Fiel Emission Scanning Electron Microscope*), modelo JSM-7500F.

8.3.2 *Análise microbiológica dos polimorfos*

As amostras de polimorfos A, B e C foram analisadas pela metodologia desenvolvida e validada por turbidimetria descrito na seção 6.4 deste trabalho. As

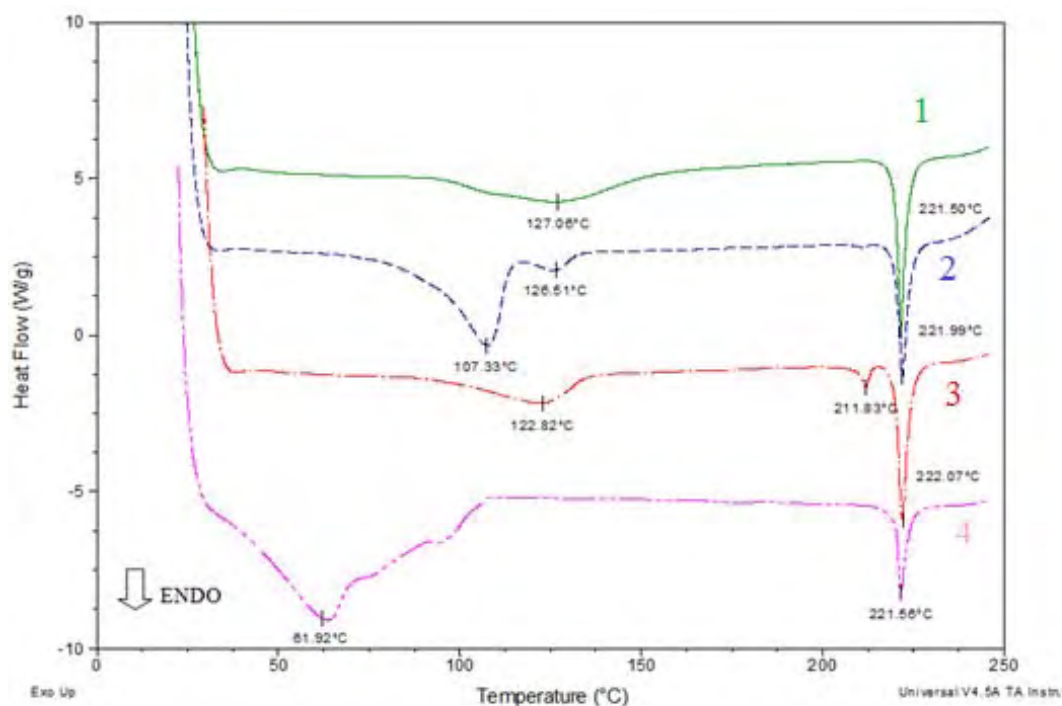
amostras dos polimorfos foram comparadas contra a substância química de referência. As análises foram realizadas em triplicata e então calculadas a potência dos complexos.

8.4 Resultados

8.4.1 Análise térmica

A Figura 65 de DCS mostra a substância de referência NOR-MP e as formas polimórficas C, B e A (apresenta um pequeno ruído devido à linha elétrica), respectivamente. A forma B está mais evidente devido ao fenômeno endotérmico em 211,83 °C. Os resultados corroboram com a literatura (BARBAS et al., 2007).

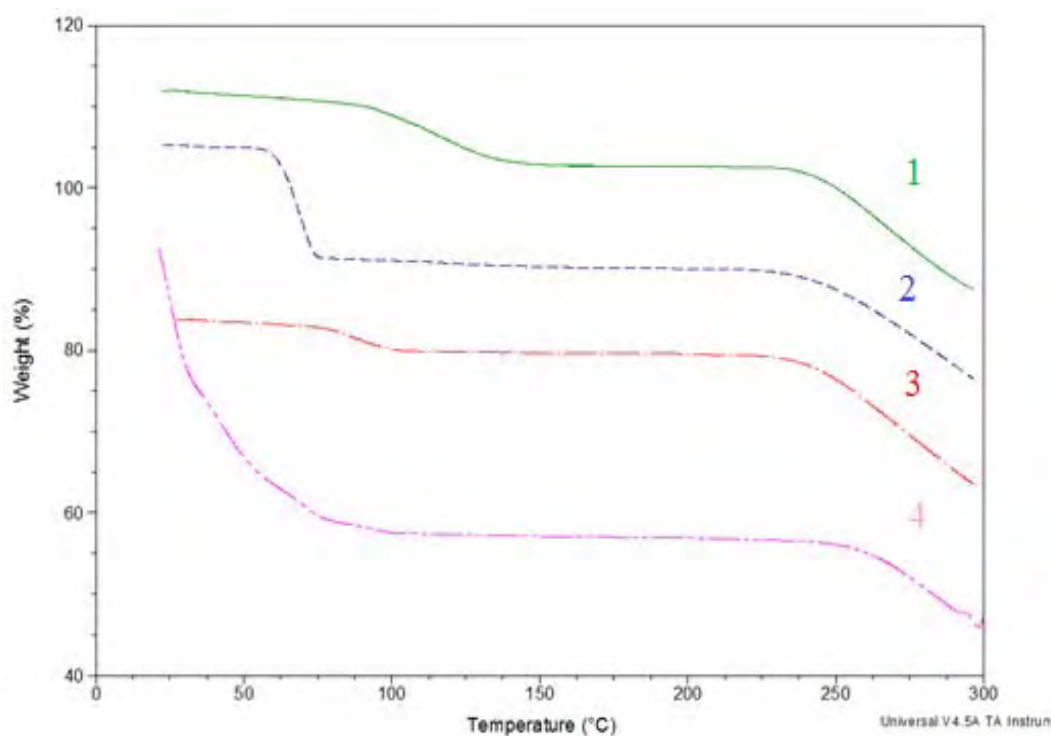
Figura 65. Curvas de DSC de formas polimórficas de norfloxacin. (1) NOR-SQR; (2) forma C; (3) forma B; (4) forma A



A Figura 66 de TG mostra a substância de referência NOR-MP e as formas polimórficas C, B e A (apresenta um pequeno ruído devido à linha elétrica) respectivamente, mostrando não ser um solvato e nem uma forma hidratada. O que nos permite verificar a diferença de pseudo-polimorfos, cujo diferencial é o estado de

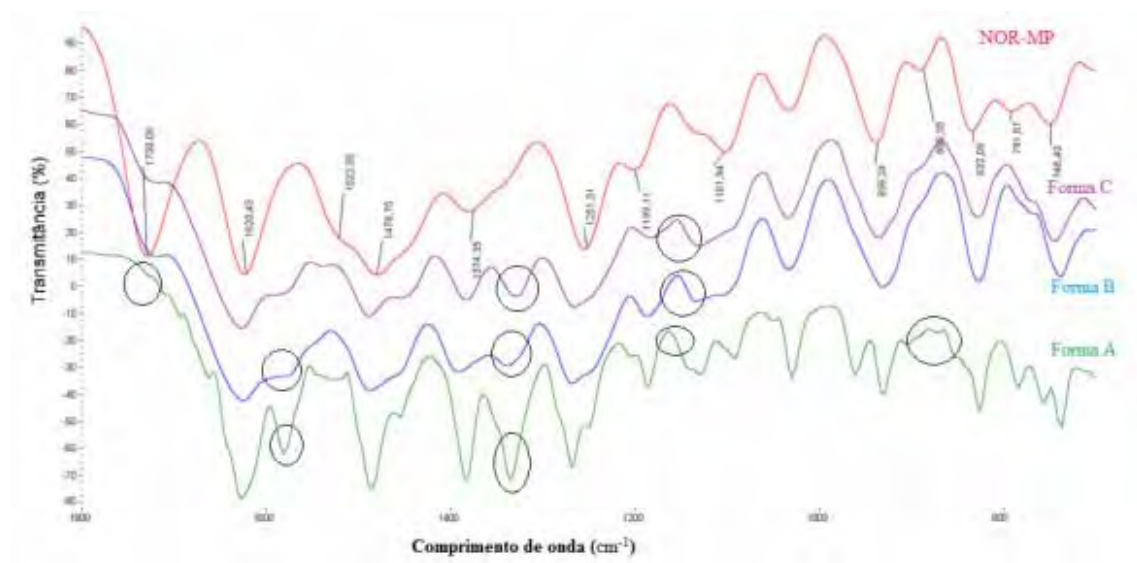
hidratação ou solvatação. É um método útil para distinguir o polimorfismo do pseudo-polimorfismo.

Figura 66. Curvas de TG de formas polimórficas de norfloxacino. (1) NOR-SQR; (2) forma C; (3) forma B; (4) forma A



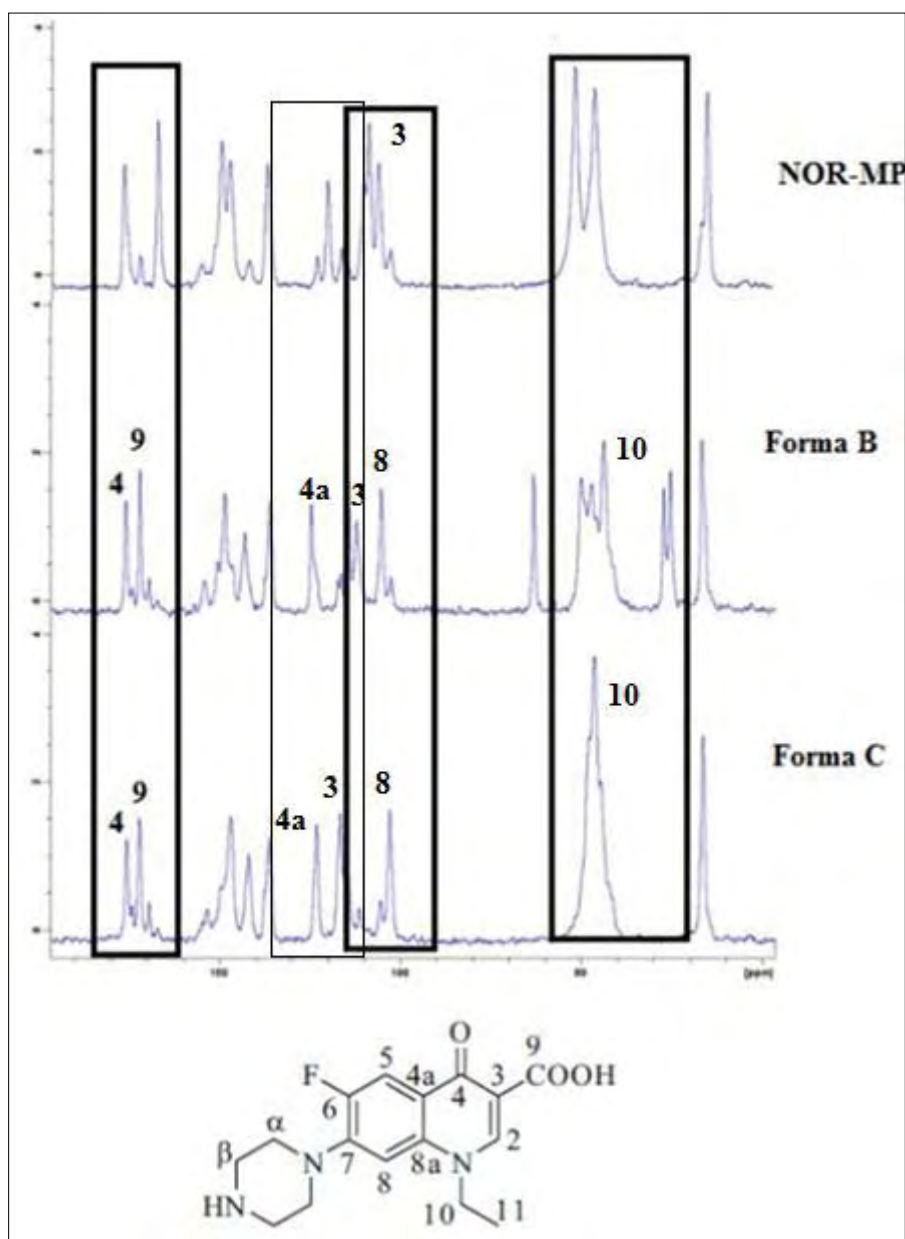
8.4.2 Espectrofotometria na região do infravermelho

A observação dos espectros de infravermelho demonstrados na Figura 67 indica que as técnicas de recristalização permitiram a obtenção das formas polimórficas C, B e A de norfloxacino, respectivamente. Os espectros obtidos neste trabalho coincidem com os espectros na literatura (BARBAS et al., 2007), onde as principais mudanças nas bandas estão representadas na Figura 67. Forma C e B: 1330, 1177 cm^{-1} ; Forma A: 1730, 1580, 1330 e 866 cm^{-1} .

Figura 67. Espectros de infravermelho de formas polimórficas de norfloxacino

8.4.3 Ressonância magnética nuclear de prótons

A Figura 68 mostra a caracterização por ressonância ^{13}C no estado sólido, onde pode-se observar os deslocamentos químicos semelhantes das formas polimórficas B e C quando comparados aos sinais do produto de referência NOR-MP. As formas B e C possuem amplitude e intensidades dos sinais diferentes de NOR-MP. Tais diferenças são evidências de polimorfismo. As principais diferenças estão no C10 grupamento etil; C3, C4 e C4a do anel aromático e no grupo carboxílico na posição 9, onde encontram-se destacadas (BARBAS et al., 2006; BARBAS et al., 2007).

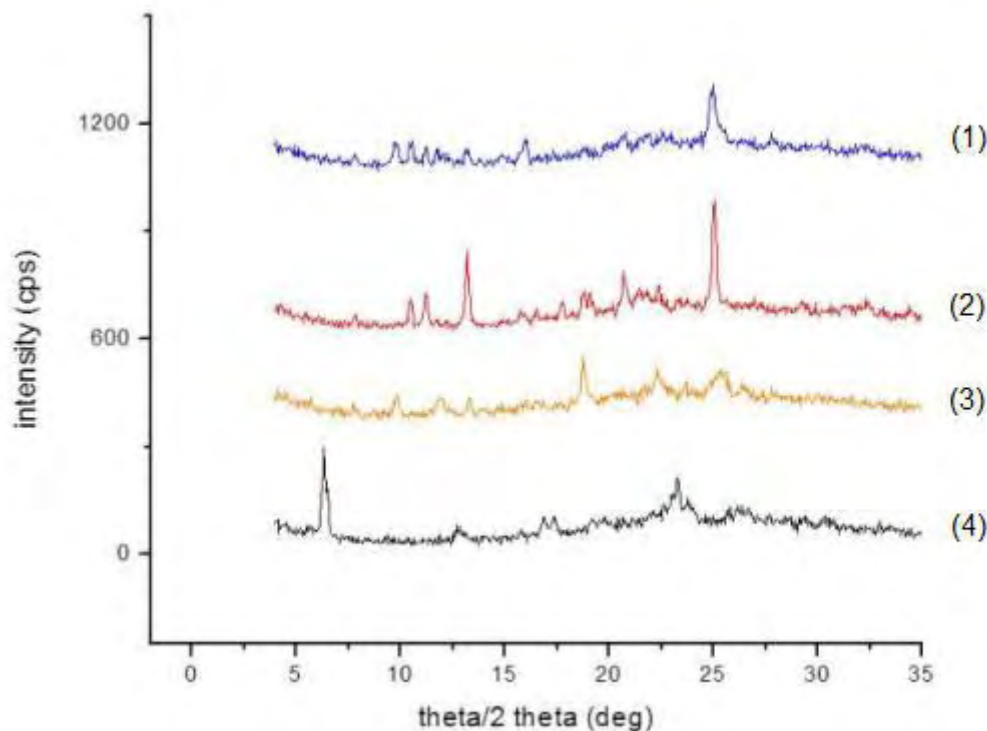
Figura 68. Espectros de RMN ^{13}C das formas polimórficas B e C

8.4.4 Difração de raios-X

Os difratogramas obtidos para diferentes formas polimórficas comparados ao NOR-MP estão apresentados na Figura 69, onde permite concluir que as técnicas de recristalização descritas na seção 8.1.3.1, permitem a obtenção das formas polimórficas

C, B e A do norfloxacino, respectivamente, pois os padrões de difração obtidos neste trabalho coincidem com os padrões demonstrados na literatura (BARBAS et al., 2007).

Figura 69. Difratoograma do NOR-MP (1) comparado aos difratogramas das formas polimórficas C (2), B (3) e A (4)



8.4.5 Microscopia eletrônica de varredura

A observação das fotos de microscopia eletrônica de varredura dos polimorfos de norfloxacino demonstradas nas Figuras 70, 71 e 72 permite confirmar que a técnica de recristalização foi eficaz e permitiu a obtenção das formas A, B e C de norfloxacino, respectivamente. Pode-se observar claramente que os polimorfos estão em diferentes formatos, comparado ao NOR-MP (Figura 57).

Figura 70. Fotomicrografia do polimorfo de norfloxacino (forma A) aumento de 1000x

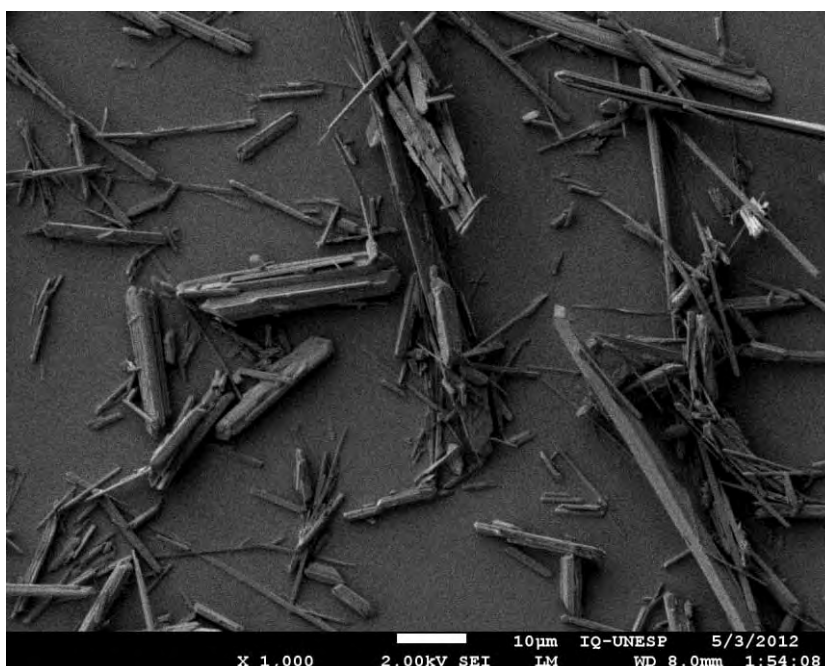


Figura 71. Fotomicrografia do polimorfo de norfloxacino (forma B) aumento de 1000x

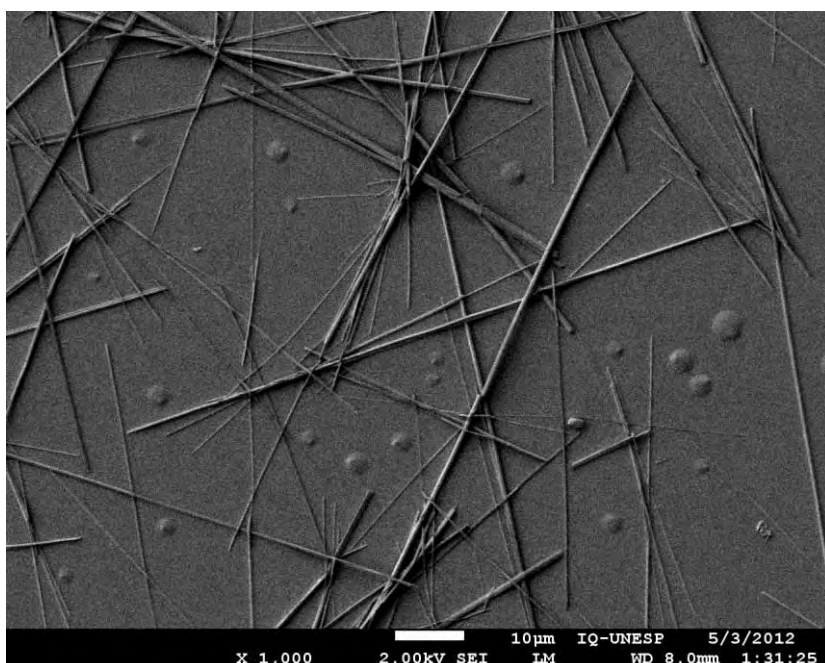
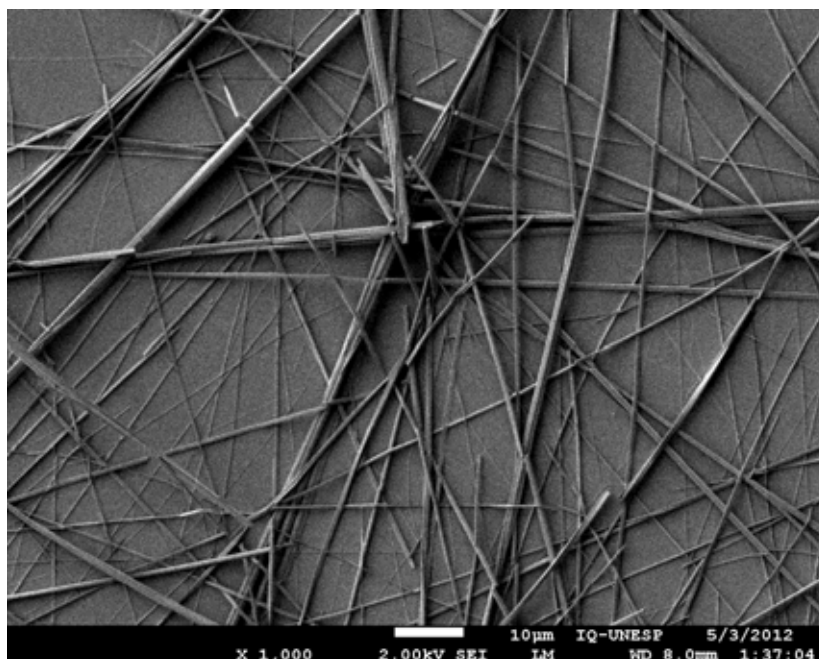
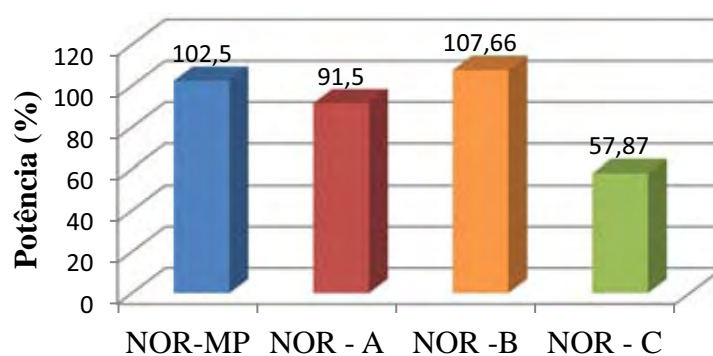


Figura 72. Fotomicrografia do polimorfo de norfloxacino (forma C) aumento de 1000x

8.4.6 Análise microbiológica dos polimorfismos

A análise das amostras dos polimorfos na forma A, B e C foram comparadas a amostra de referência NOR-MP, através da metodologia desenvolvida e validada na seção 6.4 deste trabalho. Os resultados estão dispostos na Figura 73, indicando que as formas A e B tiveram alta atividade microbiana.

Figura 73. Representação gráfica da potência do NOR-MP x polimorfos A, B e C.

Na literatura nenhum trabalho foi encontrado, onde teste de atividade antimicrobiana tenha sido realizado com polimorfos do fármaco norfloxacino. Este é um fato importante e principal objetivo no estudo de polimorfismo deste trabalho.

O polimorfo em um fármaco pode alterar drasticamente propriedades como: estabilidade química, purificação, processabilidade do medicamento, robustez do processo de fabricação, higroscopicidade e alterações físicas durante a armazenagem; já no medicamento, as modificações podem ser as mesmas apresentadas anteriormente, além de solubilidade e perfil de dissolução. Porém, o fato de o norfloxacino apresentar três formas polimórficas no estado anidro, não significa que elas possam diminuir sua atividade microbiana e sim, ser mais ativa que a forma amorfa.

8.5 *Discussão*

As formas polimórficas do norfloxacino A, B e C, foram obtidas através da recristalização e foram caracterizadas conforme as técnicas apresentadas neste trabalho de acordo com a literatura como formas anidras.

Um dos principais objetivos deste estudo de polimorfismo foi realizar o teste microbiológico e verificar se estas formas polimórficas teriam ou não atividade antimicrobiana.

Os resultados foram satisfatórios e podem estimular estudos futuros no que diz respeito a polimorfismo de agente antimicrobiano. Porém, este fato não descarta tal preocupação com certos polimorfos que outros produtos farmacêuticos apresentam. Portanto, do ponto de vista sanitário, a manutenção da qualidade dos medicamentos significa a garantia de que o mesmo apresentar-se-á sempre seguro e eficaz, em consonância com as evidências na literatura e os dados apresentados às autoridades quando de seu registro. Um desvio de qualidade pode significar uma perda de eficácia ou de segurança, expondo o paciente a um risco desnecessário. Tendo em vista as implicações que os polimorfos apresentam, faz-se necessário seu controle para garantir que o medicamento terá suas características mantidas de maneira uniforme a cada lote de produção.

9. DISCUSSÃO GERAL

O controle de qualidade para efetivamente garantir a eficácia e segurança do uso de medicamentos, depende da disposição de métodos analíticos validados. Face a isso, a realização de trabalhos cujos objetivos sejam relacionados a estes temas vem a ser relevante.

Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos usualmente descritos nos códigos oficiais e na literatura relacionados ao controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Além disso, a simplicidade de execução e o tempo de análise foram, considerados, tendo em vista que se buscaram métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina.

A escolha da metodologia de análise depende de diversos fatores. Além de atender aos requisitos de validação, comprovado através da avaliação dos parâmetros analíticos, os métodos devem ser compatíveis com os recursos usualmente disponíveis nos laboratórios de controle de qualidade. Dessa forma, o custo dos materiais e equipamentos necessários à utilização de um método de análise deve ser levado em consideração.

A caracterização da SQR e dos comprimidos de norfloxacin, peso médio, solubilidade e umidade estão de acordo com o especificado pelo fabricante, literatura e/ou Farmacopeia Brasileira 5 (2010).

A determinação da faixa de fusão permitiu caracterizar o norfloxacin SRQ e comprimidos.

Os métodos por cromatografia em camada delgada, análise térmica, espectroscopia na região do infravermelho, espectrofotometria na região do visível, CLAE e EC foram desenvolvidos para identificar o fármaco na forma farmacêutica. A partir dos resultados obtidos pelas técnicas utilizadas, foi possível confirmar, com confiabilidade, a identidade do norfloxacin SQR, bem como identificá-las nos comprimidos. As diferentes técnicas utilizadas propiciam alternativas versáteis na escolha do método de análise, embora, algumas vezes, seja conveniente aplicar mais de uma técnica para que resultados de alta confiabilidade possam ser obtidos.

A determinação de norfloxacin em comprimidos por espectrofotometria na região do visível a 520 nm, utilizando como reagente ácido cloranfílico 0,1% como reagente atendeu a todos os parâmetros de validação.

A análise quantitativa por CLAE apresenta inúmeras vantagens como a versatilidade, eficiência de separação e especificidade, razão pela qual se aplica ao monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos, com possibilidade de separação dos produtos de degradação formados, demonstrando satisfatório para a análise.

O método microbiológico, ensaio turbidimétrico, foi desenvolvido e validado utilizando o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, para determinação de norfloxacino em comprimidos.

A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa de norfloxacino na forma farmacêutica comprimidos por VIS, CLAE e turbidimétrico não apresentou diferença estatisticamente significativa. Todos os métodos atenderam aos requisitos de validação.

Nos estudos de complexação com a β -CD, foi demonstrado que a complexação pode ter influenciado no aumento significativo da solubilidade do fármaco. No entanto, além de ter aumentado a solubilidade do fármaco, também houve um aumento significativo em sua atividade microbiológica visto que o norfloxacino é um agente antimicrobiano.

Os polimorfos podem trazer diferenças significativas nas características físico-químicas, tais como faixa de fusão, densidade, morfologia, solubilidade e cor. Essas mudanças físicas e químicas podem ocorrer durante o processo de síntese ou até mesmo de fabricação do medicamento. Este por sua vez, pode ter um impacto sobre a estabilidade e biodisponibilidade, comprometendo o sucesso terapêutico do tratamento.

Neste trabalho foi demonstrado que duas formas polimórficas anidras do norfloxacino obtiveram atividade antimicrobiana. Tal fato justifica que a matéria-prima utilizada para a produção de medicamentos de norfloxacino deve passar por um rigoroso processo de controle de qualidade para realmente assegurar qual forma polimórfica se está trabalhando, evitando assim o comprometimento e sucesso terapêutico do medicamento.

10. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi realizada análise químico-farmacêutica de norfloxacino SQR e comprimidos, além dos estudos de complexação com β -CD e estudos de polimorfismo. Considerando a revisão da literatura e os resultados experimentais obtidos, conclui-se que:

A caracterização da SQR e comprimidos de norfloxacino, peso médio, solubilidade e umidade estão de acordo com o especificado pelo laudo do fornecedor, literatura e/ou Farmacopeia Brasileira 2010.

A determinação da faixa de fusão permitiu caracterizar o norfloxacino SQR e comprimidos.

Os métodos por CCD, espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica, espectrofotometria na região do visível, CLAE e EC, mostram-se adequados para a identificação do fármaco na forma farmacêutica.

A determinação de norfloxacino em comprimidos por espectrofotometria na região do visível a 520 nm, utilizando ácido clorânico 0,1% como reagente atendeu a todos os parâmetros de validação.

A análise quantitativa pelo método indicativo de estabilidade CLAE utilizando solução de ácido acético 5%: metanol (80:20) como fase móvel demonstrou sensibilidade, robustez, precisão e exatidão para a determinação de norfloxacino comprimidos, permitindo a separação do pico principal dos produtos de degradação formados.

O método microbiológico turbidimétrico foi desenvolvido e validado, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, para determinação de norfloxacino em comprimidos.

A comparação dos novos métodos validados para a determinação quantitativa de norfloxacino na forma farmacêutica comprimidos por VIS, CLAE e turbidimétrico não apresentou diferença estatisticamente significativa. Todos os métodos atenderam aos requisitos de validação.

A solubilidade aquosa de norfloxacino na presença de β -CD é aumentada em comparação ao fármaco livre, mostrando influência do pH do meio. A caracterização dos complexos mostrou-se satisfatória indicando que o melhor complexo foi obtido através do sistema de liofilização, a análise microbiológica pelo método turbidimétrico

apresentado neste trabalho mostra que os complexos obtidos não apresentaram boa atividade biológica comparado ao fármaco livre.

Os estudos de polimorfismo demonstram que as formas polimórficas (A e B) do fármaco norfloxacino permanecem com sua atividade microbiológica o que justifica que mesmo assim as indústrias farmacêuticas devem estar sempre monitorando a qualidade de matéria-prima utilizada nas fabricações de medicamentos e manter constante contato com as agências reguladoras nacionais informando sobre a ocorrência de polimorfos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

⁴Normas para referências e dissertação.

ABDEL-HAY, M.H.; HASSAN, E.M.; GAZY, A.A.; BELAL, T.S. Kinetic spectrophotometric analysis and spectrofluorimetric analysis of ciprofloxacin hydrochloride and norfloxacin in pharmaceutical preparations using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). **J. Chin. Chem. Soc.**, v.55, n.4, p.818-827, 2008.

AHN, H.J.; KIM, K.M.; CHOI, J.S.; KIM, C.K. Effects of cyclodextrin derivatives on bioavailability of ketoprofen. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v.23, n.4, p.397-401, 1997.

AHUJA, S.; JIMIDAR, M.I. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. 9 Ed. Burlington: Elsevier, 2008. p. 546.

AL-DEEB, O.A.; ABDEL-MOETY, E.M.; ABOUNASSIF, M.A.; ALZABEN, S.R. Stability-indicating high performance liquid chromatographic method for determination of norfloxacin in bulk and tablets. **Boll. Chim. Farm.**, v. 134, n. 9, p. 497-502, 1995.

AL-RASHOOD, K. A.; AL-KHAMIS, K. I.; EL-SAYED, Y. M.; AL-BELLA, S.; AL-YAMAHI, M. A.; ALAM, S. M.; DHAM, R. Bioequivalence evaluation of norfloxacin 400 mg tablets (Uroxin[®] and Noroxin[®]) in healthy human volunteers. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 21, p. 175-179, 2001.

ALNAJJAR, A.; IDRIS, A.M.; ABUSEADA, H.H. Development of a stability-indicating capillary electrophoresis method for norfloxacin and its inactive decarboxylated degradant. **Microchem. J.**, v. 87, p. 35-40, 2007a.

ALNAJJAR, A.; ABUSEADA, H.H.; IDRIS, A.M. Capillary electrophoresis for the determination of norfloxacin and tinidazole in pharmaceuticals with multi-response optimization. **Talanta**, v. 72, p. 842-846, 2007b.

AMBROSE, P.G.; GRASELA, D.M.; GRASELA, T.H.; PASSARELL, J.; MAYER, H.B.; PIERCE, P.F. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 10, p. 2793-2797, 2001.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharma. Res.**, v.12, n.3, p. 413-420, 1995.

AMIN, A.S.; EL-SAYED, G.O.; ISSA, Y.M. Utility certain π -acceptors for the spectrophotometric determination of norfloxacin. **Analyst**, v. 120, p. 1189-1193, 1995.

⁴ As seguintes normas foram utilizadas para a formatação desta dissertação: ABNT NBR 14724/2011; ABNT NBR 10520/2002 e ABNT NBR 6023/2002.

AMIN, A.S.; MOUSTAFA, M.E.; EL-DOSOKY, R.M.S. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in dosage forms and biological fluids using ion-pair complex formation. **Anal. Lett.**, v.41, p.837-852, 2008.

AMIN, A.S. Quantitation of some recently introduced antibacterial drugs using Sudam III as chromogenic reagent. **Mikrochim. Acta**, v.134, p.89-94, 2000.

ANDRIOLE, V.T. The Quinolones: past, present, and future. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 2, p. 113-119, 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; LOYD, V. **Farmacotécnica – Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 Ed. São Paulo: Premier, 2000. p. 568.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterial: past, present and future perspectives. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 16, p. 5-15, 2000.

AQUI, M.L.; GRACIA, L.G.; CAMPAÑA, A.M.G.; BLANCO, C.C. Sensitive determination of fluoroquinolone residues in waters by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Anal. Bional. Chem.**, v. 396, p. 1551-1557, 2009.

ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F.A.; PAULA, E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 53, n. 5, p. 663-671, 2003.

AVADHANULU, A.B.; MOHAN, Y.R.R.; SRINIVAS, J.S.; ANJANEYULU, Y. Spectrophotometric estimation of certain fluoroquinolone drugs in their pharmaceutical dosage forms using ammonium reineckate reagent. **Indian Drugs**, v.36, p.296-300, 1999.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, (Suppl T1), p. 17-24, 2000.

BARBAS, R.; MARTÍ, F.; PROHENS, R.; PUIGJANER, C. Polymorphism of norfloxacin: evidence of the enantiotropic relationship between polymorphs A and B. **Cryst. Growth Des.**, v. 6, n. 6, p. 1463-1467, 2006.

BARBAS, R.; PROHENS, R.; PUIGJANER, C. A new polymorph of norfloxacin. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 89, n. 3, p. 687-692, 2007.

BARBOSA, J.; FONRODONA, G.; MARQUÉS, I.; SANZ-NEBOR, V.; TORO, I. Solvent effects on protonation equilibria of peptides and quinolonas by factor analysis applied to the correlation between dissociation constants and solvatochromic parameters in acetonitrile-water mixtures. **Anal. Chim. Acta.**, v. 3, n. 1, p. 397-405, 1997.

BARBOSA, J.; BARRÓN, D.; LOZANO, E.J. Electrophoretic behavior of quinolones in capillary electrophoresis. Effect of pH and evaluation of ionization constants. **J. Chromatogr. A**, v. 839, p. 183-192, 1999.

- BARRÉ, J. Caractéristiques pharmacocinétiques des nouvelles fluorquinolones. **Med. Mal. Infect.**, v. 31, n. 5, p. 637-641, 2001.
- BARROW, P.C.; OLIVIER, P.; MARZIN, D. The reproductive and developmental toxicity profile of beta-cyclodextrin in rodents. **Reprod. Toxicol.**, v. 9, n. 4, p. 389-398, 1995.
- BEDOR, D.C.G.; GONÇALVES, T.M.; BASTOS, L.L.; SOUZA, C.E.M.; ABREU, L.R.P.; OLIVEIRA, E.J.; SANTANA, D.P. Development and validation of a new method for the quantification of norfloxacin by HPLC-UV and its application to a comparative pharmacokinetic study in human volunteers. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 2, p. 231-238, 2007.
- BELLINGER, M.E.; SMITH, T.G.; READ, R.; GOPINATH, C.; OLIVIER, P. Beta-cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995.
- BERGGEEN, J.; FRENNING, G.; ALDERBORN, G. Compression behaviour and tablet – forming ability of spray – dried amorphous composite particles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 22, p. 191-200, 2004.
- BILENSOY, E.; ROUF, M.A.; VURAL, I.; SEM, M.; HINCAL, A.A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal clotrimazole:β-cyclodextrin complex. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.7, p.E1-E7, 2006.
- BOGIALLI, S.; D’ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; NICOLARDI, S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. **Food Chem.**, v. 108, p. 354-360, 2008.
- BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high performance liquid chromatographic method in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 42, n. 1, 2012.
- BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Med. Clin. N. Am.**, v. 95, p. 793-817, 2011.
- BOND, L.; ALLEN, S.; DAVIES, M.C.; ROBERTS, C.J.; SHIVJI, A.P.; TENDLER, S.J.B.; WILLIAMS, P.M.; ZHANG, J. Differential scanning calorimetry and scanning thermal microscopy analysis of pharmaceutical material. **Int. J. Pharm.**, v. 243, n. 1, p. 71-82, 2002.
- BORREGO, M.C.; DÍAZ, M.C.; BERNABÉ, I.; DÍAZ, D.C. Determination of norfloxacin by fluorescence in the presence of different antacids: quantification of analytical interferences. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, p. 977-982, 1996.

BORREGO, M.C.; DÍAZ, M.C.; DÍAZ, D.C. Validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of norfloxacin and its application to stability studies (photo-stability study of norfloxacin). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, n. 6, p. 919-926, 1999.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning Calorimetry in the characterization drug molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **Int. J. Pharm.**, v. 192, p. 47-53, 1999.

BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classifications, and development of resistance. **Surv. Ophthalmol.**, v. 49, n. 2, p. 73-78, 2004.

BUGER, A. Polymorphism and preformulation studies of lifibrol. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 49, p. 65-72, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Habilitação de Laboratórios Analíticos em saúde – segundo os requisitos da ISO/IEC 17025 – Procedimento GGLAS 02/17025**, 2. Ed. Brasília, 2002.

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 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 136 de 29 de maio de 2003b. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Qualidade em Química Analítica – Uma Assistência à Acreditação**, v. 1, Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes: **Diário Oficial da União**. Brasília, 15 de janeiro de 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **DATAVISA**. Disponível em:
<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp>
Acesso em: 22 dez 2012.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Delivery Ver.**, v. 59, p. 645-666, 2007.

BREAUX, J.; JONES, K.; BOULAS, P. Analytical methods development and validation. **Pharm. Technol.**, p. 6-13, 2003.

BP. BRITISH PHARMACOPEIA. London: Her Majesty Stationery Office, 2011. v. II p. 1533.

- BYARUGABA, D. K. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 24, n. 2, p. 105-110, 2004.
- CAPUCHO, H.C. Farmacovigilância no Brasil: a relação entre polimorfismo de fármacos, efetividade e segurança dos medicamentos. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 3, p. 277-283, 2008.
- CARDOSO, M.H.W.M.; GOUVÊA, A.V.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S.M.P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, p. 63-72, 2010.
- CARRIER, R.L.; MILLER, L. A.; AHAMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **J. Control. Release**, v. 123, p. 78-99, 2007.
- CARDELLO, H.M.; CELESTINO, A.B. Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. **Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 2, p. 166-171, 1996.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.6, n.2, p.E-329-E357. 2005.
- CHAWLA, G.; BANSAL, A.K. Effect of processing on celecoxib and its solvates. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 9, n. 4, p. 419-433, 2004.
- CHECCHET, V.; FRAVOLINI, A.; SABATINI, S.; TABARRINI, O.; XIN, T. Dibenzo[1,6]naphthyridindiones as modified quinolone antibacterials. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 33, p. 899-903, 1998.
- CHENG, C.L.; FU, C.H.; CHOU, C.H. Determination of norfloxacin in rat liver perfusate using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v. 856, p. 381-385, 2007.
- CHRISTIAN, J.S. The quinolone antibiotics. **Infect. Dis. Update**, v. 3, n. 3, p. 87-92, 1996.
- CHRISTODOULOU, E.A.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. **J. Chromatogr. B**, v. 859, p. 246-255, 2007.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. p. 452.
- CONNORS, K.A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 1325-1357, 1997.

CORTI, M.; RIGHI, M.F.; MAESTRELLI, F.; MURA, P.; VALLER, M. Development of glyburide fast-dissolving tablets based on the combined use of cyclodextrins and polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 35, p. 73-82, 2009.

CUIPING, C.; XINGRONG, L.; RUJIN, W. High-performance liquid chromatographic method for the determination of norfloxacin glutamate and glucuronate in solid and liquid dosage forms and its application to stability testing. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 11, n. 8, p. 717-721, 1993.

DARWISH, I.A.; SULTAN, M.A.; AL-ARFAJ, H.A. Novel selective kinetic spectrophotometric method for determination of norfloxacin in its pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 78, p. 1383-1388, 2009.

DERMOTT, P.F.; ZHAO, S.; WAGNER, D.D.; SIMJEE, S.; WHITE, R.D. The food safety perspective of antibiotic resistance. **Anim. Biotechnol.**, v. 13, n. 1, p. 71-84, 2002.

DE-SOUZA, M.V.N. A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Far-Manguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, n. 1, p. 9-16, 2009.

DEL-VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DENG, B.; SU, C.; KANG, Y. Determination of norfloxacin in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Anal. Bional. Chem.**, v. 385, p. 1336-1341, 2006.

DÍAZ, M.C.; BORREGO M.C.; DÍAZ, D.C. Modification of fluorescent properties of norfloxacin in the presence of certain antacids. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 565-571, 1998a.

DÍAZ, M.C.; BORREGO, M.C.; DÍAZ, C.D. The effect of photodegradation on the fluorescent properties of norfloxacin (Photodegradation and fluorescence of norfloxacin). **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 18, p. 865-870, 1998b.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 3, p. 377-392, 1997.

DRUNKLER, D.A.; FETT, R.; BORDIGNON LUIZ, M.T. Polímeros de ciclodextrina: características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 17, n.1, p.21-32, 1999.

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.

EHLE, I.N. Assay of ciprofloxacin and norfloxacin in serum and urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 416, p. 207-211, 1987.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by ion-pair complex formation with cobalt (II) tetrathiocyanate. **J. Chin. Chem. Soc.**, v.52, p.77-84, 2005a.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric and atomic absorption spectroscopic determination of some fluoroquinolone antibacterials by ion-pair complex formation with bismuth (III) tetraiodide. **J. Chin. Chem. Soc.**, v.52, p.253-262, 2005b.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by binary complex formation with xanthene dyes. **II Farmaco**, v.59, p.809-817, 2004a.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v.25, n.3, p.365-372, 2004b.

EL-KHATEEB, S.Z.; RAZEK, S.A.A.; AMER, M.M. Stability-indicating methods for the spectrophotometric determination of norfloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, p. 829-840, 1998.

EL-WALILY, A.F.M.; BELAL, S.F.; BAKRY, R.S. Spectrophotometric and spectrofluorimetric estimation of ciprofloxacin and norfloxacin by ternary complex formation with eosin and palladium (II). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.14, p.561-569, 1996.

EP. EUROPEAN PHARMACOPEIA. 7.ed. Yarrow – Millefolli Herba. Council of Europe, 2011.

ERMER, J. Validation in pharmaceuticals analysis. Part I: an integrated approach. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 31, p. 229-242. 2001.

ESPONDA, S.M.; PADRÓN, E.T.; FERREA, Z.S.; RODRÍGUEZ, J.J.S. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluorquinolones residues in water samples. **Anal. Bional. Chem.**, v. 394, p. 927-935, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Supl 2001, p. 163.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FARMACPEIA PORTUGUESA. 8 Ed.. Lisboa: Tipografia Peres, 2005. p. 2578. 2 vol.

FERDIG, M.; KELETA, A.; THUY DIEP THANH V.O.; BUCHBERGER, W. Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro)quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1047, p. 305-311, 2004.

FIERENS, C.; HILLAERT, S.; VAN DEN BOSSCHE, W. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 22, p. 736-772, 2000.

FINCH, R. Antimicrobial therapy: principles of use. **Medicine**, v. 37, n. 10, p. 545-550, 2009.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of chromatographic methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1994.

FDA. FOOD DRUG ADMINISTRATION, 2000. **Analytical Procedures and Methods Validation**, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Regulatory%20Information/Guidances/UCM128049.pdf>> Acesso em: 22 nov. de 2012a.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Pharmaceutical Solid Polymorphism**. 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>> .Acesso em: 26 nov. 2012b.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Norfloxacin Drug Details**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>>. Acesso em: 07 nov. de 2012c.

FLÓREZ, J.; ARMIJO, J.A.; MEDIAVILLA, A. **Farmacologia Humana**. 3ª Ed. Masson, Barcelona, 1997.

FORCHETTI, C.; FLAMMINI, D.; CARLUCCI, G.; CAVICCHIO, G.; VAGGI, L.; BOLOGNA, M. High-performance liquid chromatographic procedure for the quantitation of norfloxacin in urine, serum and tissues. **J. Chromatogr.**, v. 309, p. 177-182, 1984.

FRENCH, D. The Schardinger dextrans. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v.12, p.189-260, 1957.

FROEHLICH, P.E.; SCHAPOVAL, E.E.S. Doseamento microbiológico do norfloxacinó método da difusão em ágar (cilindros em placas). **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 12, p. 161-165, 1990a.

FROEHLICH, P.E.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BORTOLAN, S. Doseamento físico-químico do norfloxacino método espectrofotométrico do cloreto de ferro III. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 12, p. 171-176, 1990b.

FROEHLICH, P.E.; SCHAPOVAL, E.E.S. Doseamento físico-químico do norfloxacino método espectrofotométrico do reativo de Marquis. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 12, p. 177-182, 1990c.

FROEHLICH, P.E.; SCHAPOVAL, E.E.S. Doseamento físico-químico do norfloxacino espectrofotometria no ultravioleta. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 12, p. 167-170, 1990d.

FRÖMMING, K.H.; SZEJTLI, J. Preparation and characterization of cyclodextrin complexes. In: cyclodextrins in pharmacy. **Kluwer. Academic. Publishers**, v.5, p.83, 1994.

GAJDA, A.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; GBYLIK, M.; BLADEK, T. Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food. Chem.**, v. 135, p. 430-439, 2012.

GAL FÜZY, M.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J.; HARANQUI, J. Cyclodextrins– stabilize volatile substance for inhalation therapy. **Pharmazie**, v.39, 1984.

GARNERO, C.; ZOPPI, A.; GENOVESE, D.; LONGHI, M. Studies on trimethoprim: hydroxypropyl- β -cyclodextrin: aggregate and complex formation. **Carbohydr. Res.**, v. 345, n. 17, p. 2550-2556, 2010.

GALARINI, R.; FIORONI, L.; ANGELUCCI, F.; TOVO, G.R.; CRISTOFANI, E. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 8158-8164, 2009.

GIGOSOS, P.G.; REVESADO, P.R.; CADAHÍA, O.; GENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **J. Chromatogr. A**, v. 871, p. 31-36, 2000.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterizations of polymorphs and solvates. **Thermochim. Acta**, v. 248, p. 1-59, 1995.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Mac Grawhill, 2006.

GRANGÉ, J.D.; ROULOT, D.; PELLETIER, G.; PARIENTE, É. A.; DENIS, J. INK, O.; BLANC, P.; RICHARDET, J. P.; VINEL, J. P.; DELISLE, F.; FISCHER, D.; FLAHAUT, A.; AMIOT, X. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial. **J. Hepatol.**, n. 29, p. 430-436, 1998.

GOWDA, B.G.; SEETHARAMAPPA, J. Extractive spectrophotometric determination of fluoroquinolones and antiallergic drugs in pure and pharmaceutical formulations. **Anal. Sci.**, v.19, p.461-464, 2003.

GROENEVELD, A.J.N.; BROUWERS, J.R.B.J. Quantitative determination of ofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin in serum by high pressure liquid chromatography. **Pharm. Weekbl. Sci.**, v. 8, p. 79-84, 1986.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêuticas e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novo agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUYOT, M.; FAWAZ, F.; BILDET, J.; BONINI, A.; LAGUENY, A.M.. Physicochemical characterization and dissolution of norfloxacin/ cyclodextrin inclusion compounds and PEG solid dispersions. **Int. J. Pharm.**, v. 123, p. 53-63, 1995.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19 Ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. p. 1552.

HERNÁNDEZ, M.; BORRULL, F.; CALULL, M. Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction. **J. Chromatogr. B**, v. 742, p. 255-265, 2000.

HEWITT, W. **Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach**. Londres, Interpharm, 2004. p. 244.

HIGUCHI, T.; CONOORS, K. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Inst.**, p. 117-212, 1965.

HOOPER, D.C. Clinical applications of quinolones. **Biochim. Biophys. Acta**, p. 45-61, 1998.

HUANG, L.F.; TONG, W.Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 321–334, 2004.

HUSSAIN, M.S.; OBIJUNWA, V.C.; MICETICH, R.G. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for norfloxacin utilizing fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v. 663, p. 379-384, 1995.

ICH. **International Conference on Harmonization** of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use – ICH. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances – Q6A, 1999.

ICH. **International Conference on Harmonization** – ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, 2005.

- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**. RJ, Brasil, 2003.
- IONASHIRO, M. **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: GIZ, 2005. p. 80.
- IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.**, v.86, n.2, p.147-161, 1997.
- ISSA, M.G.; FERRAZ, H. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. **Dissol. Technol.**, v. 18, p. 6-13, 2011.
- KAMAL DUA; RAMANA, M.V.; SINGH SARA, U.V.; HIMAJA, M.; AGRAWAL, A.; GARG, V.; PABREJA, K. Investigation of enhancement of solubility of norfloxacin β -cyclodextrin in presence of acidic solubilizing additives. **Curr. Drug Deliv.**, v. 4, p. 21-25, 2007.
- KAMAT, B.P. Study of the interaction between fluoroquinolones and bovine serum albumin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 39, p. 1046-1050, 2005.
- KASSAB, N.M.; SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMAM, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 4, p. 507-513, 2005.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 9 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 649-652.
- KHAN, G.A.; LINDBERG, R.; GRABIC, R.; FICK, J. The development and application of a system for simultaneously determining anti-infectives and nasal decongestants using on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 66, p. 24-32, 2012.
- KONOMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica Americana, 1989. 730 p.
- KOTRETSOU, S.I. Determination of aminoglycosides and quinolones in food using tandem mass spectrometry: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 44, p. 173-184, 2004.
- KOWALSKI, P.; OLEDZKA, I.; LAMPARZYK, H. Capillary electrophoresis in analysis of veterinary drugs. **Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 937-947, 2003.
- LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

- LABRO, M.T. Antibacterial agents/phagocytes: new concepts for old in immunodulation. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 10, p. 11-21, 1998.
- LAGANÁ, A.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; MARINO, A.; ROTATORI, M. High performance liquid chromatographic determination of norfloxacin in human tissues and plasma with fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 417, p. 135-142, 1987.
- LAGANÀ, A.; MARINO, A.; ROTATORI, M.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; MIANO, L. High-performance liquid chromatographic analysis of norfloxacin in human tissues and plasma with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 6, n. 3, p. 221-228, 1988.
- LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 4. ed. São Carlos: RiMa, 2010.
- LEE, D.S.; HAN, H.J.; KIM, K.; PARK, W.B.; CHO, J.K.; KIM, J.H. Dissociation and complexation of fluoroquinolone analogues. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 12, n. 2, p. 157-164, 1994.
- LEE, D.C.; WEBB, M. **Pharmaceutical Analysis**. Nova York: Blackwell Publishing, 2003. 364 p.
- LEE, H.B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1139, p. 45-52, 2007.
- LEYVA, S.; LEYVA, E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. **Bol. Soc. Quím. Méx.**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2008.
- LILLENBERG, M.; YURCHENKO, S.; KIPPER, K.; HERODES, K.; PIHL, V.; SEPP, K.; LÖHMUS, R.; NEI, L. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 5949-5954, 2009.
- LIMING, D.; QINGQIN, X.; JIANMEI, Y. Fluorescence spectroscopy determination of fluoroquinolones by charge-transfer reaction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.33, p.693-698, 2003.
- LIN, C.E.; DENG, Y.J.; LIAO, W.S.; SUN, S.W.; LIN, W.Y.; CHEN, C.C. Electrophoretic behavior and pK_a determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 1051, p. 283-290, 2004.
- LINDNER, K.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Food flavoring with β -cyclodextrin complex flavor substances. **Acta Alimentaria**, v. 10, n. 3, p. 175-185, 1981.

- LIU, Y.M.; CAO, J.T.; WANG, H. Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for the analysis of quinolone drugs and pharmacokinetics study. **Chin. Chem. Lett.**, v. 19, p. 962-964, 2008.
- LOFTSSON, T.; MÅSSON, M.; BREWSTER, M.E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, p.1091-1099, 2004.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996.
- LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.**, v. 329, p. 1-11, 2007.
- MANSILLA, A.E.; PEÑA, A.M.; GÓMEZ, D.G.; 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.
- MANSILLA, A.E.; PEÑA, A.M.; GÓMEZ, D.G.; LÓPEZ, F.S. Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection. **Talanta**, v. 68, p. 1215-1221, 2006.
- MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in pharmaceutical formulations using bromothymol blue. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.26, n.3, p.501-504, 2001.
- 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.
- MASCHER, H.J.; KIKUTA, C. Determination of norfloxacin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, v. 812, p. 381-385, 1998.
- MCCOURT, J.; BORDIM, G.; RODRÍGUES, A.R. Development of a capillary zone electrophoresis-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the analysis of fluoroquinolone antibiotics. **J. Chromatogr. A**, v. 990, p. 259-269, 2003.
- MEDVEDOVICI, A.; SORA, D.L.; LONESCU, S.; HILEBRAND, M.; DAVID, V. Characterizations of a new norfloxacin metabolite monitored during a bioequivalence study by means of mass spectrometry and quantum computation. **Biomed. Chromatogr.**, n. 22, p. 1100-1107, 2008.
- MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; MORAES, C.M.; BRITO, C.L. TOSSINI, G.H.G.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxiipropil- β -ciclodextrina. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 1, p. 35-44, 2007.

- MING-DU, L.; YAN YAO, H.; FU, M. Spectrofluorimetric study of the charge-transfer complexation of certain fluoroquinolones with 7,7,8,8- tetracyanoquinodimethane. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.61, p.281-286, 2005.
- MITANI, K.; KATAOKA, H. Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta.**, v. 562, p. 16-22, 2006.
- MITSCHER, L.A. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 559-592, 2005.
- MOAMEN, S.; ELFALAKY, A.; ELESH, E. Spectroscopic and physical measurements on charge-transfer complexes: Interactions between norfloxacin and ciprofloxacin drugs with picric acid and 3,5-dinitrobenzoic acid acceptors. **J. Mol. Struct.**, v. 990, p. 217-226, 2011.
- MOEMA, D.; NINDI, M.M.; DUBE, S. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta.**, v. 730, p. 80-06, 2012.
- MONTAY, G.; TASSEL, J.P. Improved high-performance liquid chromatographic determination of pefloxacin and its metabolite norfloxacin in human plasma and tissue. **J. Chromatogr.**, v. 339, p. 214-218, 1985.
- MORE, V. R.; MOTE, U.S.; PATIL, S.R.; KOLEKAR, G.B. Spectroscopic studies on the interaction between norfloxacin and p-amino benzoic acid: analytical application on determination of norfloxacin. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 74, p. 771-775, 2009.
- MORTON, S.J.; SHULL, V.H.; DICK, J.D. Determination of norfloxacin and ciprofloxacin concentrations in serum and urine by high-pressure liquid chromatography. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, n. 2, p. 325-327, 1986.
- MOUTON, J.W.; DUDLEY, M.N.; CARS, O.; DERENDORF, H.; DRUSANO, G.L. Standardization of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, p. 601-607, 2005.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S. **Microbiologia médica**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2010. 1072p.
- MUSA, K.A.K.; ERIKSSON, L.A. Theoretical assessment of norfloxacin redox and photochemistry. **J. Phys. Chem. A**, v. 113, p. 10803-10810, 2009.
- NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A.F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; DALE RAY; BORNMANN, W.G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of β -lapachone using cyclodextrin inclusion complex. **Pharm. Res.**, v.20, n.10, p.1626-1633, 2003.

- NAIK, P.N.; CHIMATADAR, S.A.; NANDIBEWOOR, S.T. Kinetics and oxidation of fluoroquinolone antibacterial agent, norfloxacin, by alkaline permanganate: a mechanistic study. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, p. 2548-255, 2009.
- NERY, C.G.C.; PIRES, M.A.S.; PIANETTI, G.A.; VIANA-SOARES, C.D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.
- NOVÁK, C.; EHEN, Z.; FODOR, M.; JICSNSZKY, L.; ORGOVANYI, J. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 84, n. 3, p. 693-701, 2006.
- O'DONNELL, O.; GELONE, S.P. Fluoroquinolones. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, n. 2, p. 489-493, 2000.
- OLIVEIRA, P.R.; BERNARDI, L.S.; MENDES, C.; CARDOSO, S.G.; SANGOI, M.S.; SILVA, M.A.S. Liquid chromatographic determination of norfloxacin in extended-release tablets. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 47, n. 9, p. 739-744, 2009.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M. I. GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.
- O'NEIL, M.J. (Ed). **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14th. ed. Whitehouse Station: Merck, 2006.
- OTERO, E.F.J.; ANGUIANO IGEA, S.; BLANCO MENDEZ, J.; VILA JATO, J.L. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.**, v.70, p.35-41, 1991.
- OWENS, R.C.; AMBROSE, P.G. Clinical use of fluoroquinolones. **Med. Clin. North Am.**, v. 84, p. 1447-1469, 2000.
- PANDYA, S.; MANSURI, M.J.S.; PATEL, P. Compatible polymer used as complexes in various drug delivery systems: β -cyclodextrin. **Pharma. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 1-8, 2008.
- PASQUINI, N.C.; PASQUINI, N.L. Biodisponibilidade da azitromicina livre e complexada em β -ciclodextrinas. **Rev. Elet. Farm.**, v. 1, n.1, p. 46-51, 2008.
- PATEL, P.; PATEL, K.; BHATT, K.K.; PATEL, S. New improved RP-HPLC method for determination of norfloxacin and ornidazole in their combined dosage form. **Int. J. Research. Pharm. Biomed. Sci.**, v. 2, n.2, p. 710-713, 2011.
- PAYÁN, M.R.; LÓPEZ, M.A.B.; TORRES, R.F.; GONZÁLEZ, J.A.O.; MOCHÓN, M.C. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environment matrices. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, p. 332-341, 2011.

- PECORELLI, I.; GALARINI, R.; BIBI, R.; AL. FLORIDI.; CASCIARRI, E.; FLORIDI, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta.**, v. 483, p. 81-89, 2003.
- PEIXOTO, M.M.; JÚNIOR, A.F.S.; SANTOS, C.A.A.; JÚNIOR, E.C. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em feira de Santana – BA. **Infarma**, v. 16, p. 13-14, 2005.
- PISTOS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; KOUPPARIS, M. Investigation of the retention/pH profile of zwitterionic fluoroquinolones in reversed-phase and ion-interaction high performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 39, p. 438-443, 2005.
- POOLE, C.F.; POOLE, S.K. **Chromatography today.**, Amsterdam, Elsevier Science. 1991.
- POJANAGAROON, T.; WATANESK, S.; RATTANAPHANI, V.; LIAWRUNGRATH, S. Reverse flow injection spectrophotometric determination of iron(III) using norfloxacin. **Talanta**, v. 58, p. 1293-1300, 2002.
- PRISTA, L.V.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R.; LOBO, J.M.S. **Tecnologia farmacêutica**. 6. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. p. 325-478.
- QIN, W.; LIU, Q.; FAN, Y. CE determination of quinolones in the presence of bovine serum albumin. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 118-124, 2009.
- RAHMAN, N.; AHMAD, Y.; AZMI, S. N. H. Kinetic spectrophotometric method for the determination of norfloxacin in pharmaceutical formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 57, p. 359-367, 2004.
- RAGAB, G.H.; AMIN, A.S. Atomic absorption spectroscopic, conductometric and colorimetric methods for determination of fluoroquinolone antibiotics using ammonium reineckte ion-par complex formation. **Spectrochim. Acta**, Part A, v. 60, p. 973-978, 2004.
- RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 3, p. 281-299, 2005.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 672-674.
- RAO, R.N.; NAGARAJU, V. Separation and determination of synthetic impurities of norfloxacin by reversed-phase high performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 34, p. 1049-1056, 2004.

- REFFNER, J.A.; FERRILLO, G. Thermal analysis of polymorphism. **J. Therm. Anal.**, v. 34, p. 19-36, 1988.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, L.S.S; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Phisicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivate is solution and solid state. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 20, p. 253-266, 2003.
- RIPPERE, R.A. Some principles of microbiological turbidimetric assay of antibiotics. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 62, n. 4, p. 951-956, 1979.
- ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R. OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; TAVERES, T.T.; MARZANO, I.M.; PEREIRA-MAIA, E.C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova**, v. 34, n.1, p. 111-118, 2011.
- RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicações de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-7, 2005.
- RONER, M.R.; CARRAHER, C.E.; ROEHR, J.L.; BASSETT, K.D.; SIEGMANN-LOUDA, D.W. Anti-Viral activity of norfloxacin and ampicillin and dibutyltin polymers derived from norfloxacin and ampicillin against reovirus ST3, vaccina virus, herpes simplex virus (HSV-1) and varicela zoster virus (VZV). **Polym. Mater. Sci.**, v. 91, p. 744-746, 2004.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6 ed. London: Chicago Pharmaceutical Press, 2009. 918 p.
- RUFINO, J.L.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Sequential injection analysis system with spectrophotometric detection for determination of norfloxacin and ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. **Quim. Nova.**, v. 34, n. 2, p. 256-261, 2011.
- RUBIN, J.; WALKER, R.D.; BLICKENSTAFF, K.; BODIES-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.
- SÁ BARRETO, L.C.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 4, p. 629-36, 2008.
- SALEM, H. Spectrofluorimetric, atomic absorption spectrometric and spectrophotometric determination of some fluoroquinolones. **Am. J. Sci.**, v. 2, n.3, p. 719-729, 2005.

SCHMITH-KOPPLIN, Ph.; BURHENNE, J.; FREITAG, D.; SPITELLER, M.; KETTRUP, A. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application on the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. **J. Chromatogr. A**, v. 837, p. 253-265, 1999.

SALGADO, H.R.N.; RIBEIRO, Y.A.; RIBEIRO, C.A; SCHAPOVAL, E.E.S. Análise térmica de esparfloxacino. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n.2, p. 119-123, 2005.

SÁNCHEZ, E.G.; HELGI JUNG, C.; YÉPEZ, L.M.; HERNÁNDEZ-ABAB, V. Relevancia del polimorfismo en el area farmacéutica. **Rev. Mex. Cienc. Farmac.**, v. 38, n. 2, p. 56-76, 2007.

SASTRY, C.S.P.; RAO, K.R.; PRASAD, D.S. Extractive spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in pure and dosage forms. **Talanta**, v.42, n.3, p.311-316, 1995.

SEBAIY, M.M.; EL-SHANAWANY, A.; EL-ADL, S.M.; ABDEL-AZIZ, L.M.; HASHEM, H.A. Rapid RP-HPLC method for simultaneous estimation of norfloxacin and tinidazole in tablet dosage form. **Asian J. Pharm. Anal.**, v. 1, p. 79-84, 2011.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. of Chromatogr. A.**, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SHAIKH, A.R.; GIRIDHAR, R.; YADAV, M.R.; Bismuth-norfloxacin complex: synthesis, physicochemical and antimicrobial evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 332, n. 1, p. 24-30, 2007.

SHAO, B.; CHEN, D.; ZHANG, J.; WU YONGNING.; SUN CHENGJUN. Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 8312-8318, 2009.

SHEARS, P. Antibiotic resistance in the tropics. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 127-130, 2001.

SHER, M.; HUSSAIN, M.A.; MEHMOOD, M.H.; HASSAN, M.N.; BASHIR, S. Bioequivalence of norfloxacin by HPLC-UV method. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 55, n. 2, p. 203-205, 2010.

SHERVINGTON, L.A.; ABBA, M.; HUSSAIN, B.; DONNELLY, J. The simultaneous separation and determination of five quinolone antibiotics using isocratic reversed-phase HPLC: Application to stability studies on an ofloxacin tablet formulation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 39, p. 769-775, 2005.

SHIMPI, S.; CHAUMAHAN, B.; SHIMPI, PRAJAKTA. Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration. **Acta Pharm.**, v. 55, p. 139-156, 2005.

SIEFERT, H.M.; DOMDEY-BETTE, A.; HENNINGER, K.; HUCKE, F.; KOHLSDORFER, C.; STASS, H.H. Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, suppl B, p. 69-76, 1999.

SIGURDSSON, H.H.; STEFÁNSSON, E.; GUDMUNDSDÓTTIR, E. Cyclodextrin formulations of dorzolamide and its distribution in the eye after topical administration. **J. Control. Release**, v.102, p. 255-262, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 1022-1035.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F. X. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SIMONOVSKA, B.; ANDRENSEK, S.; VOVK, I.; PROSEK, M. High-performance thin-layer chromatography method for monitoring norfloxacin residues on pharmaceutical equipment surfaces. **J. Chromatogr. A**, v. 862, p. 209-215, 1999.

SOLANGI, A.R.; MEMON, S.Q.; MALLAH, A.; KHUHAWAR, M.Y.; BHANGER, M.I. Quantitative separation of oxytocin, norfloxacin and diclofenac sodium in milk samples using capillary electrophoresis. **Biomed. Chromatogr.**, v. 23, p. 1007-1013, 2009.

SONG, L.X.; BAILL.; XU, X.M.; HE, J.; PAN, S.Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. **J. Coord. Chem. Rev.**, v. 253, p. 1276-1284, 2009.

SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; COURI, M.R.C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Rev. Bras. Farm.**, v. 85, n.1, p. 13-18, 2004.

SOUZA, J.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 403, p. 93-129, 2012.

SMITA, S.; ANAND, G.; RANJIT, S.; VIKRANT, V. A review on different activity of quinolona derivatives. **Int. J. Pharm. Res. Develop.**, v. 3, n. 4, p. 164-171, 2011.

STEJTLEI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem. Rev.**, p. 1743-1753, 1998.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PROFUMO, A. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 7316-7322, 2010.

STRATTON, C.W. Mechanisms of activity and resistance for fluoroquinolones. **Antimicrob. Infect. Dis.**, v. 14, n. 10, p. 69-72, 1995.

SUN, S.W.; CHEN, L.Y. Optimization of capillary Electrophoretic separation of quinolone antibacterials using the overlapping resolution mapping scheme. **J. Chromatogr. A**, v. 766, p. 215-224, 1997.

SUN, S.W.; WU, A.C. Determination of fluoroquinolone antibacterials in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.**, v. 22, n. 2, p. 281-296, 1999.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. **Analytical method development and validation**. New York, Marccel Dekker, 1997, p. 25-26.

SYNDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCK, J.I. **Practical HPLC method development**. 3. Ed. Portland: John Wiley & Sons, 1998, p. 2-21.

SZEJTLI, L. Limits of cyclodextrins application in oral drug preparations. **J. Inclus. Phenom. Macroc. Chem.**, v. 2, p. 487-501. 1984.

TAVARES, M.F.M.; JAGER, A.V.; DA SILVA, C.L.; MORAES, E.P.; PEREIRA, E.A.; DE LIMAS, E.C.; FONSECA, F.N.; TONIN, F.G.; MICKE, G.A.; SANTOS, M.R.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; DE MORAES, M.L.L.; VAN KAMPEN, M.H.; FUJIYA, N.M. Applications of capillary electrophoresis to the analysis of compounds of clinical, forensic, cosmetological, environmental, nutritional and pharmaceutical importance. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, p. 281-290, 2003.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 599.

TRASNEL, M.; GAYOT, A.T. Practice of validation. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v, 21, n. 1, p. 79-91, 1995.

ULU, S.T. Spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in pharmaceutical preparations. **Spectrochim. Acta. Part. A**, v. 72, p. 138-143, 2009.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31st ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2008.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33rd ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2010.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2012.

UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in Drug Carrier Systems. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v.3, p.1-40, 1997.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Estado de arte de figuras de mérito analítico em calibração multivariada. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VARSHNEY, S.; TIWARI, A.K.; NEGI, D.; KHULBE, P.; SINGHAL, P. Solubility enhancement of norfloxacin. **Rev. J. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 30-35, 2012.

VÁZQUEZ, M.M.P.; VAZQUEZ, P.P.; GALERA, M.M.; GIL GARCÍA, M.D. Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 748, p. 20-27, 2012.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006.

VENTURINI, C.G.; NICOLI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim. Nova**, n. 31, p. 360-368, 2008.

VÍLCHEZ, J.J.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; PALENCIA, G.S.; NAVÁLON, A. Determination of the antibacterial norfloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. **Anal. Chim. Acta**, v. 444, p. 279-286, 2001.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 48, p. 3-26, 2001.

VIJAN, L.E.; CONCI, M. Absorption study of norfloxacin – DNA interaction. **Macromol. Symp.**, n. 265, p. 260-267, 2008.

WAGENLEHNER, F.M.E.; BJÖRN, W; PERLETTI, G. Antimicrobials in urogenital infections. **Int. J. Antim. Agents.**, v. 385, p. 3-10, 2011.

WALLIS, C.S.; CHARLES, B.G.; GAHAN, L.R. Rapid and economical high-performance liquid chromatographic method for the determination of norfloxacin in serum using a microparticulate C₁₈ guard cartridge. **J. Chromatogr. B**, v. 674, p. 306-309, 1995.

WAN, G.H.; CUI, H.; PAN, Y.L.; ZHENG, P.; LIU, L.J. Determination of quinolones residues in prawn using high-performance liquid chromatography with Ce(IV)-Ru(bpy)₃²⁺-HNO₃ chemiluminescence detection. **J. Chromatogr. B**, v. 843, p. 1-9, 2006.

WANG, Y.; BAEYENS, W.R.G.; HUANG, C.; FEI, G.; LI HE; OUYANG, J. Enhanced separation of seven quinolones by capillary electrophoresis with silica nanoparticles as additive. **Talanta**, v. 77, p. 1667-1674, 2009.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 382p.

WHO - World Health Organization. Technical Report Series, **Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations**. N° 961, 2011.

WRIGHT, D.H.; BROWN, G.H.; PETERSON, M.L.; ROTSCHAFER, J.C. Applications of fluoroquinolone pharmacodynamics. **J. Antim. Chem.**, v. 46, p. 669-683, 2000.

YAMADA, M.; MOCHIZUKI, H.; YAMADA, K.; KAWAI, M.; MASHIMA, Y. Aqueous humor levels of topically applied levofloxacin, norfloxacin, and lomefloxacin in the same human eyes. **J. Cataract. Refract. Surg.**, v. 29, p. 1771-1775, 2003.

YAN, H.; WANG, H.; QIN, X.; LIU, B.; DU, J. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 54, p. 53-57, 2011.

YANG, Z.; WANG, X.; QIN, W.; ZHAO, H. Capillary electrophoresis-chemiluminescence determination of norfloxacin and prulifloxacin. **Anal. Chim. Acta**, v. 623, p. 231-237, 2008.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 270, p. 221-227, 2004.

ZHANG, L.W.; WANG, K.; ZHANG, X.X. Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method. **Anal. Chim. Acta.**, v 603, p. 102-120, 2007.