UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DO ÁCIDO FUSÍDICO EM FORMULAÇÕES DE CREME

MARIANE MACHADO CURBETE

ORIENTADORA: Profª. Drª. Hérida Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA–SP

2015

MARIANE MACHADO CURBETE

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DO ÁCIDO FUSÍDICO EM FORMULAÇÕES DE CREME

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: Profª. Drª. Hérida Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA–SP

2015

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

C975a

Curbete, Mariane Machado
Análise químico-farmacêutica do ácido fusídico em formulações de creme / Mariane Machado Curbete – Araraquara, 2015
150 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérida Regina Nunes Salgado

1. Ácido fusídico. 2. CLAE. 3. Controle de qualidade. 4. Métodos analíticos. 5.Turbidimetria. 6. Validação I. Salgado, Hérida Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

MARIANE MACHADO CURBETE

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DO ÁCIDO FUSÍDICO EM FORMULAÇÕES DE CREME

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Araraquara-SP.

Aprovado em 03 de junho de 2015

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado (FCFar-UNESP)

Presidente/orientadora

Prof. Dr. Marlus Chorilli (FCFar-UNESP)

Prof. Dr. Martin Steppe (UFRGS)

ARARAQUARA-SP

2015

Dedico este trabalho à minha família, por todo amor, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e me incentivararem nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me concedido discernimento, coragem, perseverança, capacidade e sabedoria para seguir em frente e concretizar este trabalho. Senhor, a Ti ofereço esta e todas as outras conquistas que hão de acontecer em minha vida, pois Tu és minha fortaleza, meu refúgio e minha vitória. Nada seria possível se não fosse de Tua vontade.

Aos meus pais, Aparecida Geni Machado Curbete e Itamar Luiz Curbete, por todo apoio, por acreditarem em mim e fornecerem toda estrutura necessária para que essa conquista se tornasse possível. Agradeço também todo carinho, cumplicidade e paciência. A vocês, minha eterna admiração e gratidão.

Às minhas irmãs Mariele Machado Curbete e Mayara Machado Curbete, pela amizade, carinho, palavras de conforto e incentivo de sempre.

Agradeço também todos os meus familiares que torceram por mim, em especial minha tia Sandra Cristina Machado por sempre estar presente nos momentos mais difíceis, pela compreensão, paciência e dedicação.

Ao meu namorado Tárik Ocon Braga Polo, serei eternamente grata pelo incentivo, paciência, amizade e companheirismo. Obrigada por estar sempre presente na minha vida e por torná-la cada dia mais feliz.

À minha orientadora Profª. Drª. Hérida Regina Nunes Salgado, pela oportunidade concedida, pela confiança, paciência, compreensão, amizade e acima de tudo pelo aprendizado.

Aos colegas do laboratório Controle Biológico Tahisa Marcela Pedroso, Danilo Rodrigues, Caroline Magnani Spagnol, Felipe Hugo Fernades e Lucas Chierentin, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço à Josilene Chaves Ruela Corrêa, Lívia Paganini Consortti e Eliane Gandolpho Tótoli, por sempre estarem presentes, me apoiando, trocando conhecimentos, angústias e alegrias. Obrigada por tudo.

À técnica do laboratório de Controle Biológico Maria de Fátima Rodrigues Moreti, pelos conselhos, incentivo, amizade, dedicação e exemplo de profissionalismo.

Aos docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, câmpus de Araraquara/SP, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação científica. Em especial, ao Prof. Dr. José

Paschoal Batistuti, Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, Profª. Drª. Natália Valadares de Moraes, Prof. Dr. Marlus Chorilli, Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa e Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, por sempre estarem dispostos em me ajudar.

Agradeço também aos docentes do Instituto de Química - UNESP, câmpus de Araraquara/SP, Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, do Departamento de Química Orgânica e aos docentes Prof. Dr. Celso Valentim Santilli e Profª. Drª. Sandra Helena Pulcinelli, do Departamento de Físico-Química, por abrirem as portas de seus laboratórios de forma tão solicita, contribuindo no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, às técnicas Juliana Rodrigues e Danúbia Cristina Gava, pelo auxílio na realização dos experimentos.

À Profª. Drª. Maria José Vieira Fonseca e Profª. Drª. Josilene Chaves Ruela Corrêa, por terem participado do meu exame geral de qualificação, e igualmente ao Prof. Dr. Martin Steppe e Prof. Dr. Marlus Chorilli, por comporem a comissão examinadora da minha defesa, colaborando com correções e sugestões pertinentes para tornar este trabalho melhor.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos Daniela Hartmann Jornada, Natalia Noronha Ferreira, Diego Eidy Chiba, Márcia Cristina Vilchenski, Lígia Cury Casula, Kamila Rotolo e Ana Cláudia Depaoli por todo apoio, incentivo e principalmente pela amizade durante esta jornada. A vocês, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório Farmacêutico Leo Pharma pela gentil doação das amostras de creme (Verutex®).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo incentivo à pesquisa e pela bolsa concedida (Processo Nº 2013/02861-3).

Ao PADC-FCF-UNESP e aos funcionários, pelo apoio e suporte técnico concedido durante esta jornada de trabalho.

Enfim, agradeço com enorme prazer e carinho, todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

"Tudo posso naquele que me fortalece"

Filipenses 4:13

RESUMO

O ácido fusídico é um antimicrobiano esteroide, indicado no tratamento de infecções graves causadas por micro-organismos do gênero *Staphylococcus* e de outras espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo espécies resistentes à penicilina e a outros antimicrobianos. Pesquisas envolvendo o desenvolvimento de métodos analíticos mais práticos são relevantes para otimizar as análises de rotina na indústria farmacêutica e garantir a qualidade do produto comercializado. Desta forma, este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, seguros para os operadores, econômicos e de fácil execução, em comparação aos métodos descritos na literatura para a determinação do ácido fusídico na forma farmacêutica de creme dermatológico. O ácido fusídico foi analisado quanto às suas características organolépticas e físico-químicas. Também foi realizada análise qualitativa pelo método de espectrofotometria de absorção na região do visível e por cromatografia em camada delgada. Para quantificação do ácido fusídico, foram desenvolvidos e validados dois métodos: método por cromatografia líquida de alta eficiência indicadivo de estabilidade, na faixa de concentração de 5,0 a 95,0 µg/mL, utilizando fase móvel composta por acetonitrila e água (72:28, v/v), pH 3,5 ajustado com ácido acético e comprimento de onda de 210 nm, este método apresentou tempo de retenção médio de 8,12 minutos, exatidão de 101,22% e teor de 104%; ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, na faixa de concentração de 0,25 a 2,25 µg/mL, utilizando caldo casoy e 6% do micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, cuja exatidão e percentual médio foram de 101,95% e 104,60%, respectivamente. Os métodos foram validados de acordo com as diretrizes do ICH e da legislação brasileira e mostraram ser precisos, robustos, seletivos, exatos e equivalentes para a quantificação do ácido fusídico, ao nível de significância de 5%. Assim sendo, ambos os métodos podem ser empregados na análise do ácido fusídico na forma farmacêutica de creme dermatológico na indústria farmacêutica, contribuindo para melhorar o controle de qualidade do fármaco, principalmente quando se considera a ausência de métodos padronizados na Farmacopeia Brasileira para esta forma farmacêutica comercializada no país.

Palavras-chave: ácido fusídico, CLAE, controle de qualidade, métodos analíticos, turbidimetria, validação.

ABSTRACT
Fusidic acid is an antimicrobial steroid, indicated in the treatment of serious infections caused by microorganisms of the genus *Staphylococcus* and other Gram-positive bacteria species, including resistant species to penicillin and other antimicrobials. Research involving the development of more practical analytical methods are relevant to optimize the analysis in the pharmaceutical industry and secure the quality of commercialized product. Thus, this study aimed to develop faster analytical methods, safer for operators, economical and easy to perform, compared to the methods described in the literature for the determination of fusidic acid in the pharmaceutical form of dermatological cream. Fusidic acid was analyzed for its organoleptic and physical-chemical characteristics. Qualitative analysis was performed method by spectrophotometric absorption in the visible region and by thin layer chromatography. For quantification of fusidic acid, were developed and validated two methods: stability indicative method by high performance liquid chromatography, in the concentration range from 5.0 to 95.0 µg mL^{-1}, using mobile phase composed by acetonitrile and water (72:28, v/v), pH 3.5 adjusted with acetic acid and at a wavelength at 210 nm, this method presented average retention time of 8.12 minutes, accuracy of 101.22% and content of 104%; microbiological assay by turbidimetric method, in the concentration range from 0.25 to 2.25 µg mL^{-1}, using casoy broth and 6% of the microorganism *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, whose accuracy and mean percentage were 101.95% and 104.60%, respectively. The methods were validated according to ICH guidelines and Brazilian legislation and shown to be accurate, robust, selective, accurate and equivalent to quantify the fusidic acid, at a significance level of 5%. Thus, both methods can be employed in the analysis of fusidic acid in pharmaceutical form of dermatological cream in the pharmaceutical industry, helping to improve the quality control of the drug, mainly considering the lack of standardized methods in the Brazilian Pharmacopoeia for this pharmaceutical form marketed in the country.

Keywords: fusidic acid, HPLC, quality control, analytical methods, turbidimetry, validation.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 26

2 **OBJETIVOS** 28

2.1 OBJETIVO GERAL 28

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

3 **REVISÃO DA LITERAURA** 29

3.1 ANTIMICROBIANOS 29

3.2 ÁCIDO FUSÍDICO 29

3.2.1 ***Espectro de ação e aplicações clínicas*** 31

3.2.2 ***Farmacocinética*** 33

3.2.3 ***Mecanismo de ação*** 34

3.2.4 ***Reações adversas*** 34

3.2.5 ***Resistência bacteriana*** 35

3.2.6 ***Métodos analíticos*** 37

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 47

3.3.1 ***Parâmetros de validação*** 48

3.3.1.1 *Linearidade e faixa linear de trabalho* 48

3.3.1.2 *Seletividade e especificidade* 50

3.3.1.3 *Precisão* 51

3.3.1.4 *Limite de detecção* 52

3.3.1.5 *Limite de quantificação* 53

3.3.1.6 *Exatidão* 54

3.3.1.7 *Robustez* 55

4 **ASPECTOS GERAIS** 57

4.1 DESCRIÇÃO GERAL DO ÁCIDO FUSÍDICO 57

4.2 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA 57
4.3 PRODUTO ACABADO 57
5 **CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS** 58
5.1 MÉTODOS 55
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
6 **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS** 59
6.1 MATERIAL E MÉTODO 59
6.1.1 ***Determinação da faixa de fusão da substância química de referência*** 59
6.1.2 ***Determinação do pH do produto acabado*** 59
6.1.3 ***Determinação da densidade do produto acabado*** 59
6.1.4 ***Determinação da viscosidade do produto acabado*** 59
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES 60
6.2.1 ***Determinação da faixa de fusão da substância química de referência*** 60
6.2.2 ***Determinação do pH do produto acabado*** 61
6.2.3 ***Determinação da densidade do produto acabado*** 61
6.2.4 ***Determinação da viscosidade do produto acabado*** 61
7 DETERMINAÇÃO DO PESO MÉDIO DO PRODUTO ACABADO 63
7.1 MATERIAL E MÉTODO 63
7.2 RESULTADO E DISCUSSÃO 63
8 **DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO SEM O PRINCÍPIO ATIVO - PLACEBO** 65
8.1 MATERIAL E MÉTODO 65
8.2 RESULTADOS 63
8.3 DISCUSSÃO 67
9 **ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO VISÍVEL** 70
9.1 MATERIAL E MÉTODO 71
9.1.1 ***Preparo das soluções do produto acabado*** 71

9.1.2 ***Preparo do reagente 1*** 72

9.1.3 ***Preparo do reagente 3*** 73

9.2 RESULTADOS 73

9.3 DISCUSSÃO 76

10 **CROMATOGRAFIA** 80

10.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA 81

10.1.1 ***Material e método*** 83

10.1.1.1 *Fases móveis* 84

10.1.2 ***Resultados e discussão*** 84

10.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 88

10.2.1 ***Material e método*** 91

10.2.1.1 *Desenvolvimento do método cromatográfico* 92

10.2.1.2 *Conformidade do sistema cromatográfico* 93

10.2.1.3 *Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado - Extração* 95

10.2.1.4 *Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência* 95

10.2.1.4.1 Linearidade e faixa linear de trabalho 96

10.2.1.4.2 Seletividade e estudo de degradação forçada 96

10.2.1.4.3 Precisão 98

10.2.1.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação 99

10.2.1.4.5 Exatidão 99

10.2.1.4.6 Robustez 100

10.2.1.5 *Determinação do teor do ácido fusídico no produto acabado* 102

10.2.2 ***Resultados*** 102

10.2.2.1 *Desenvolvimento do método cromatográfico* 102

10.2.2.2 *Conformidade do sistema cromatográfico* 103

10.2.2.3 *Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado - Extração* 104

10.2.2.4 *Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência* 105

10.2.2.4.1 Linearidade e faixa linear de trabalho 105

10.2.2.4.2 Seletividade e estudo de degradação forçada 108

10.2.2.4.3 Precisão 111

10.2.2.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação 112

10.2.2.4.5 Exatidão 112

10.2.2.4.6 Robustez 113

10.2.2.5 *Determinação do teor do ácido fusídico no produto acabado* 114

10.2.3 ***Discussão*** 114

11 **MÉTODO MICROBIOLÓGICO POR TURBIDIMETRIA** 120

11.1 MATERIAL E MÉTODO 121

11.1.1 ***Ensaio*** 121

11.1.2 ***Desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria*** 121

11.1.3 ***Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado – Extração*** 123

11.1.4 ***Validação do método microbiológico por turbidimetria*** 123

11.1.4.1 *Linearidade* 123

11.1.4.2 *Seletividade* 124

11.1.4.3 *Precisão* 125

11.1.4.4 *Exatidão* 125

11.1.4.5 *Robustez* 126

11.1.5 ***Determinação do percentual médio do ácido fusídico no produto acabado*** 126

11.2 RESULTADOS 127

11.2.1 ***Desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria*** 127

11.2.2 ***Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado – Extração*** 127

11.2.3 ***Validação do método microbiológico por turbidimetria*** 128

11.2.3.1 *Linearidade* 128

11.2.3.2 *Seletividade* 129

11.2.3.3 *Precisão* 130

11.2.3.4 *Exatidão* 130

11.2.3.5 *Robustez* 131

11.2.4 ***Determinação do percentual médio do ácido fusídico no produto acabado*** 131

11.3 DISCUSSÃO 132

12 **ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS** 134

12.1 RESULTADOS 134

12.2 DISCUSSÃO 135

13 **CONCLUSÕES** 136

REFERÊNCIAS 137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura-atividade do AF..... 30

Figura 2 Curva da viscosidade em função da taxa de cisalhamento do produto acabado. 62

Figura 3 Variação do conteúdo de 10 bisnagas de creme dermatológico (15 g cada)..... 64

Figura 4 Curvas das viscosidades em função das taxas de cisalhamentos das formulações 1, 2, 3 e do produto acabado..... 66

Figura 5 Espectro de absorção na região do Vis do AF SQR, produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 1..... 73

Figura 6 Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 2..... 74

Figura 7 Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 3..... 74

Figura 8 Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 4..... 75

Figura 9 Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 5..... 75

Figura 10 Formação do complexo ácido acetilhidroxâmico de ferro III a partir do AF..... 76

Figura 11 Coloração púrpura, característica da reação de identificação do AF, nas soluções do AF SQR, produto acabado e placebo..... 76

Figura 12 Classificação das técnicas cromatográficas..... 81

Figura 13 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: água e álcool etílico (60:40, v/v), pH 2,5 ajustado com ácido acético..... 84

Figura 14 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: água e álcool metílico (60:40, v/v)..... 85

Figura 15 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: água, acetato de etila e álcool etílico (20:20:60, v/v/v)..... 85

Figura 16 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: *n*-butanol, água e ácido acético (85:10:5, v/v/v)..... 86

Figura 17 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: hexano e acetato de etila (65:35, v/v)..... 86

Figura 18 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: hexano e álcool etílico (50:50, v/v)..... 87

Figura 19 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: acetato de etila e álcool etílico (60:40, v/v)..... 87

Figura 20 Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: hexano, acetato de etila e ácido acético (60:30:10, v/v/v)..... 88

Figura 21 Espectro na região do UV do AF SQR na concentração de 35 µg/mL em álcool etílico..... 103

Figura 22 Cromatograma, espectro de absorção na região do UV e curva de pureza do pico cromatográfico do AF presente no produto acabado..... 105

Figura 23 Curva analítica do AF SQR obtida por CLAE..... 107

Figura 24 Faixa linear de trabalho do AF SQR, obtida por CLAE..... 107

Figura 25 Análise de resíduos do AF SQR, obtida por CLAE..... 107

Figura 26 Seletividade do método por CLAE..... 108

Figura 27 Degradação oxidativa do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos 0, 1 h e 5 h em comparação ao branco..... 110

Figura 28 Degradação neutra do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos 0, 1 h, 5 h, 9 h, 24 h, 48 h e 72 h em comparação ao branco..... 110

Figura 29 Degradação fotolítica do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos 0, 1 h, 5 h, 9 h, 24 h, 48 h, 6 dias e 10 dias em comparação ao branco..... 110

Figura 30 Degradação ácida (HCl 0,01 mol/L) do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos: 0, 1 h, 5 h, 9 h e 24 h em comparação ao branco..... 111

Figura 31 Degradação alcalina (NaOH 0,001 mol/L) do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos: 0 e 1 h em comparação ao branco..... 111

Figura 32 Curva analítica das soluções do AF SQR e produto acabado, obtidas pelo método microbiológico por turbidimetria..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Formas de comercialização do AF em vários países..... 31

Tabela 2 Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes..... 40

Tabela 3 Ensaios necessários para a validação do método analítico segundo sua finalidade..... 48

Tabela 4 Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico..... 56

Tabela 5 Faixa de fusão obtido para as amostras do AF SQR..... 60

Tabela 6 Peso médio das amostras do produto acabado..... 63

Tabela 7 Formulações do placebo desenvolvidas..... 65

Tabela 8 Valores de pH, densidade relativa e viscosidade das formulações do placebo.... 66

Tabela 9 Análise estatística (ANOVA) dos valores de viscosidade da formulação 1 em relação ao produto acabado..... 67

Tabela 10 Análise estatística (ANOVA) dos valores de viscosidade da formulação 2 em relação ao produto acabado 67

Tabela 11 Análise estatística (ANOVA) dos valores de viscosidade da formulação 3 em relação ao produto acabado 67

Tabela 12 Categorias funcionais dos adjuvantes presentes na formulação do creme dermatológico (Verutex®) 68

Tabela 13 Relação entre a cor de luz absorvida e a cor observada do composto..... 70

Tabela 14 Ensaios realizados no desenvolvimento do método por CLAE..... 93

Tabela 15 Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico e recomendações..... 95

Tabela 16 Preparo das soluções para o ensaio de recuperação do método por CLAE..... 100

Tabela 17 Parâmetros analíticos e suas alterações "inferiores" e "superiores" utilizados para avaliar a robustez do método por CLAE..... 102

Tabela 18 Parâmetros cromatográficos estabelecidos para a determinação do AF no produto acabado, pelo método de CLAE..... 103

Tabela 19 Análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para determinação do AF por CLAE..... 104

Tabela 20 Áreas do pico do AF no produto acabado, em relação ao tempo de extração..... 104

Tabela 21 Análise estatística (ANOVA) dos valores da área do AF obtidos no procedimento de extração nos tempos de 10, 15 e 30 minutos, utilizando o método por CLAE..... 104

Tabela 22 Valores das áreas, médias, DP e DPR das áreas referentes ao pico do AF SQR. 106

Tabela 23 Análise estatística (ANOVA) dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica do AF SQR, utilizando o método por CLAE..... 106

Tabela 24 Degradações oxidativa, neutra, fotolítica, ácida e alcalina do AF SQR, analisada por CLAE..... 109

Tabela 25 Precisão por repetibilidade do método por CLAE..... 112

Tabela 26 Precisão intermediária do método por CLAE..... 112

Tabela 27 Exatidão do método por CLAE..... 113

Tabela 28 Teores do AF determinados na análise da robustez do método por CLAE..... 113

Tabela 29 Efeitos observados na avaliação da robustez do método por CLAE..... 113

Tabela 30 Determinação do teor do AF no produto acabado pelo método por CLAE..... 114

Tabela 31 Ensaios preliminares realizados durante o desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria..... 122

Tabela 32 Preparo das soluções para teste de recuperação do método microbiológico por turbidimetria..... 126

Tabela 33 Parâmetros estabelecidos para a determinação do AF no produto acabado pelo método microbiológico por turbidimetria..... 127

Tabela 34 Absorvâncias do AF presente no produto acabado, em relação ao tempo de extração..... 127

Tabela 35 Análise estatística (ANOVA) dos valores de absorvância do AF obtidos no procedimento de extração nos tempos de 15 e 30 minutos, utilizando o método microbiológico por turbidimetria..... 127

Tabela 36 Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica do AF, pelo método microbiológico por turbidimetria..... 128

Tabela 37 Análise estatística (ANOVA) dos valores médios das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica do AF, utilizando o método microbiológico por turbidimetria..... 128

Tabela 38 Seletividade do método microbiológico por turbidimetria..... 129

Tabela 39 Análise estatística (ANOVA) do parâmetro de seletividade do método microbiológico por turbidimetria..... 129

Tabela 40 Precisão por repetibilidade do método microbiológico por turbidimetria..... 130

Tabela 41 Precisão intermediária do método microbiológico por turbidimetria..... 130

Tabela 42 Exatidão do método microbiológico por turbidimetria..... 130

Tabela 43 Parâmetros da avaliação da robustez do método microbiológico por turbidimetria para análise do AF..... 131

Tabela 44 Percentual médio do AF no produto acabado, calculado a partir do método microbiológico por turbidimetria..... 131

Tabela 45 Valores obtidos na determinação do teor do AF pelo método de CLAE e do percentual médio do AF pelo método turbidimétrico, em amostras do produto acabado..... 134

Tabela 46 Análise estatística (ANOVA) dos resultados obtidos no doseamento do AF no produto acabado, pelo método de CLAE e turbidimétrico..... 134

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 Equação da reta..... 49

Equação 2 Limite de detecção..... 53

Equação 3 Limite de quantificação..... 54

Equação 4 Densidade relativa..... 59

Equação 5 Fator de retenção para análise em CCD..... 83

Equação 6 Assimetria do pico cromatográfico..... 94

Equação 7 Fator de renteção para análise em CLAE..... 94

Equação 8 Número de pratos do pico cromatográfico..... 94

Equação 9 Resolução cromatográfica..... 98

Equação 10 Diferença percentual entre as análises (precisão intermediária)..... 98

Equação 11 Porcentagem do AF recuperada (%)..... 100

Equação 12 Concentração do AF no produto acabado (µg/mL)..... 100

Equação 13 Concentração percentual doAF no produto acabado (%)..... 101

Equação 14 Percentual médio do AF no produto acabado..... 124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Estrutura química e solubilidade dos adjuvantes presentes na formulação do creme dermatológico (Verutex®)..... 79

Quadro 2 Teste de Youden..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido fusídico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
As	Assimetria do pico
ATCC	*American Type Culture Collection*
BHI	*Brain-Heart Infusion*
BPF	Boas práticas de fabricação
C_{18}	Octadecilsilano
CAS	*Chemical Abstract Service*
CBBG	Corante aniônico *comassie blue G*
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE ou HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQ	Controle de qualidade
DAD	Detector de arranjo de diodos
DDABr	Corante brometo de didodecildimetilamônio
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
D_r	Densidade relativa
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EF-G	Alongamento do fator G
ELL	Extração líquido-líquido

ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por *eletrospray*
FDA	*Food and Drug Administration*
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FS	Fusidato de sódio
GDP	Guanosina difosfato inativa
gl	Graus de liberdade
GQ	Garantia da qualidade
GTP	Guanosina trifosfato ativa
HSM	*Polarizing hot-stage microscopy*
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Inclinação da curva analítica
ICH	*International Conference on Harmonization*
IDR	Taxa de dissolução intrínseca
k'	Fator de retenção
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MQ	Médias quadráticas
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
N	Número de pratos
NATA	*National Association of Testing Authorites*
r	Coeficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
$\mathbf{R_s}$	Resolução
SDBD	*Surfactant to dye binding degree*

SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
TGA	Análise termogravimétrica
USP	*The United States Pharmacopeia*
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
VRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina
XRD	Difração de raios –X
α	Seletividade
ε	Força de eluição
λ	Lâmbda

1 INTRODUÇÃO

A preocupação em relação à qualidade e eficácia dos medicamentos é o que estimula o desenvolvimento de milhares de pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo em relação ao controle de qualidade – CQ (LA ROCA et al., 2007). Nas últimas décadas, após inúmeros episódios desastrosos envolvendo o uso de medicamentos e com a consciência dos riscos inerentes ao seu uso, os órgãos fiscalizadores passaram a exigir de forma mais rigorosa dados que comprovem a qualidade das análises químicas (RIBANI et al., 2004).

Para que a qualidade de um medicamento seja alcançada de forma confiável, é fundamental a implantação de um sistema de Garantia da Qualidade (GQ) que incorpore, entre outras ferramentas, as Boas Práticas de Fabricação (BPF). As BPF têm como finalidade assegurar que todas as atividades executadas em um determinado ensaio sejam realizadas de forma planejada e sistemática, garantindo que os medicamentos produzidos satisfaçam os padrões de qualidade exigidos (ANVISA, 2003b; 2006).

Em geral, as ações envolvidas nas BPF se referem à definição detalhada dos procedimentos que devem ser utilizados na produção dos medicamentos, bem como, a adequação do espaço físico, utilização de equipamentos apropriados, armazenamento e distribuição dos medicamentos de forma correta, contratação de analistas qualificados e a implantação do CQ laboratorial. O CQ, por sua vez, é a parte da GQ responsável por assegurar que os materiais não sejam liberados para uso, nem os produtos liberados para venda, antes que a sua qualidade seja julgada satisfatória. Além disso, é o setor encarregado de realizar amostragens, ensaios e de emitir laudos das análises (ANVISA, 2003b).

O aumento significativo no número de fármacos comercializados, assim como o avanço e transformação das tecnologias utilizadas na produção, aumentou o interesse de diferentes seções da sociedade ligadas à área da saúde, pela busca de medidas que garantam a integridade dos medicamentos comercializados (ANVISA, 2003b) e promoveu ampliação do conceito de CQ que era simplesmente industrial, para uma abordagem mais científica. Nesse sentido, as Universidades tem executado papel fundamental servindo como centros de pesquisas para o desenvolvimento de métodos analíticos, contribuindo significantemente para o enriquecimento científico na área.

A validação de métodos pode ser entendida como um processo baseado na obtenção, documentação e análise de dados, o qual permite tanto descrever de forma detalhada, como identificar e controlar os fatores de variação (BREAUX; JONES; BOULAS, 2003). O objetivo da validação é assegurar a reprodutibilidade dos resultados e estabelecer limites de aceitação de possíveis erros analíticos, exigindo a adoção de procedimentos que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação, pois sabe-se que dados analíticos

incorretos podem conduzir a decisões contraditórias e a prejuízos financeiros irrecuperáveis (RIBANI et al., 2004).

Além da preocupação com a qualidade dos dados analíticos, existe cada vez mais a preocupação com o meio ambiente. A química analítica verde apresenta como finalidade o desenvolvimento sustentável, destinado à remoção ou à minimização do impacto ambiental causado por vários tipos de métodos analíticos (ZYGMUNT; BANEL; WASIELEWSKA, 2011). Este conceito vem sendo amplamente aplicado em várias áreas, como por exemplo, na síntese orgânica, em procedimentos analíticos aplicados em laboratório ou em escala industrial (ARMENTA; GARRIGUES; GUARDIA, 2008; KEITH; GRON; YOUNG, 2007).

As indústrias farmacêuticas, por sua vez, tendem adotar uma postura de redução, prevenção ou eliminação dos resíduos de processo, por meio da substituição de técnicas analíticas que empreguem solventes orgânicos por outras que não os utilizem, ou que minimizem seu uso, bem como pela substituição de matérias-primas ou insumos por outros de menor toxicidade (NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006).

Seguindo este raciocínio, o desenvolvimento de novos métodos de análise ou mesmo a modificação de métodos descritos na literatura se faz necessário, sempre que se perceba o uso desnecessário de materiais e solventes, desgaste de equipamentos e geração excessiva de resíduos. Uma vez desenvolvido e validado, os métodos permitem quantificar, bem como identificar fármacos em matérias-primas e/ou em produtos acabados, a fim de analisar a qualidade, eficácia terapêutica e segurança dos medicamentos já comercializados, tanto no âmbito da indústria farmacêutica, bem como em farmácias magistrais públicas e privadas (TRAISNEL; GAYOT, 1995).

O ácido fusídico (AF) é um antimicrobiano que pertence à classe dos esteroides (GODTFREDSEN; VANGEDAL, 1962), indicado no tratamento de infecções graves causadas por micro-organismos Gram positivos, em particular contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (SPELMAN, 1999). Embora esteja presente no mercado há mais de 50 anos, existem poucos artigos científicos na literatura que descrevem o desenvolvimento de métodos analíticos para sua determinação. Além disso, não existe monografia deste antimicrobiano na Farmacopeia Brasileira (2010), mesmo sendo comercializado no Brasil.

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos métodos analíticos eficazes e confiáveis, que além disso, priorizem a rapidez, facilidade de execução, minimização de custos e do uso de solventes orgânicos, em relação àqueles descritos na literatura para análise do AF, são essenciais para reduzir o impacto ambiental, garantir a qualidade do produto final e, consequentemente, a segurança do consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos para o CQ do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as características organolépticas e físico-químicas do AF substância química de referência (SQR) e do produto acabado (creme dermatológico - Verutex®);
- ✓ Desenvolver método qualitativo por espectrofotometria de absorção na região do visível (Vis), para a identificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico;
- ✓ Identificar o AF no produto acabado pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD);
- ✓ Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta (UV) para a identificação e quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico;
- ✓ Desenvolver e validar método microbiológico por turbidimetria para doseamento do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico;
- ✓ Realizar análise comparativa dos métodos desenvolvidos e validados para análise do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico.

3 REVISÃO DA LITERAURA

3.1 Antimicrobianos

A teoria microbiana foi descrita pela primeira vez em 1857 por Louis Pasteur, que afirmava que os micro-organismos eram capazes de sobreviver em outros organismos, causando patologias. Seguindo este raciocínio, procurou-se dar maior atenção a sua prevenção e tratamento (TAVARES, 1999).

O surgimento da quimioterapia, definida como o uso de substâncias químicas contra infecções, teve início em 1909, com a descoberta do *salvarsan*, pelo pesquisador Paul Ehrlich, considerado pai da quimioterapia. Este produto foi obtido a partir de combinações de arsênico, utilizado no tratamento da sífilis (WALSH, 2003).

Apesar destes e outros achados, a grande revolução na quimioterapia ocorreu com a descoberta da penicilina G, ou benzilpenicilina, pelo microbiologista escocês Alexander Fleming em 1928 (PATRICK, 2009). Após a industrialização deste fármaco, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, observou-se no decorrer das últimas décadas um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos eficientes no combate de infecções, o que revolucionou o tratamento médico e ocasionou uma significativa redução da mortalidade (RANG et al., 2008) e consequente aumento da expectativa de vida da população.

Os medicamentos antimicrobianos podem apresentar ação bactericida, quando promovem a morte dos micro-organismos, ou ação bacteriostática, quando simplesmente inibem sua multiplicação, e são divididos em antibióticos e quimioterápicos (TAVARES, 1999).

O termo antibiótico antigamente se referia estritamente a substâncias de origem biológica ou compostos naturais, enquanto que o termo quimioterápico se referia aos agentes químicos sintetizados em laboratórios. No entanto, com o conhecimento da sua estrutura química, alguns antibióticos passaram a ser modificados quimicamente, bem como foram obtidos inteiramente por síntese (TAVARES, 1999).

3.2 Ácido fusídico

O AF foi isolado pela primeira vez a partir do fungo *Fusidium coccineum*, em 1960 (GODTFREDSEN et al., 1962). Posteriormente, outras fontes fúngicas, como *Acremonium fusidioides, Calcarisporium arbuscula, Cephalosporium lamellaecula, Cephalosporium acremonium, Epidermophyton floccosum, Gabarnaudia tholispora, Mucor ramannianus,*

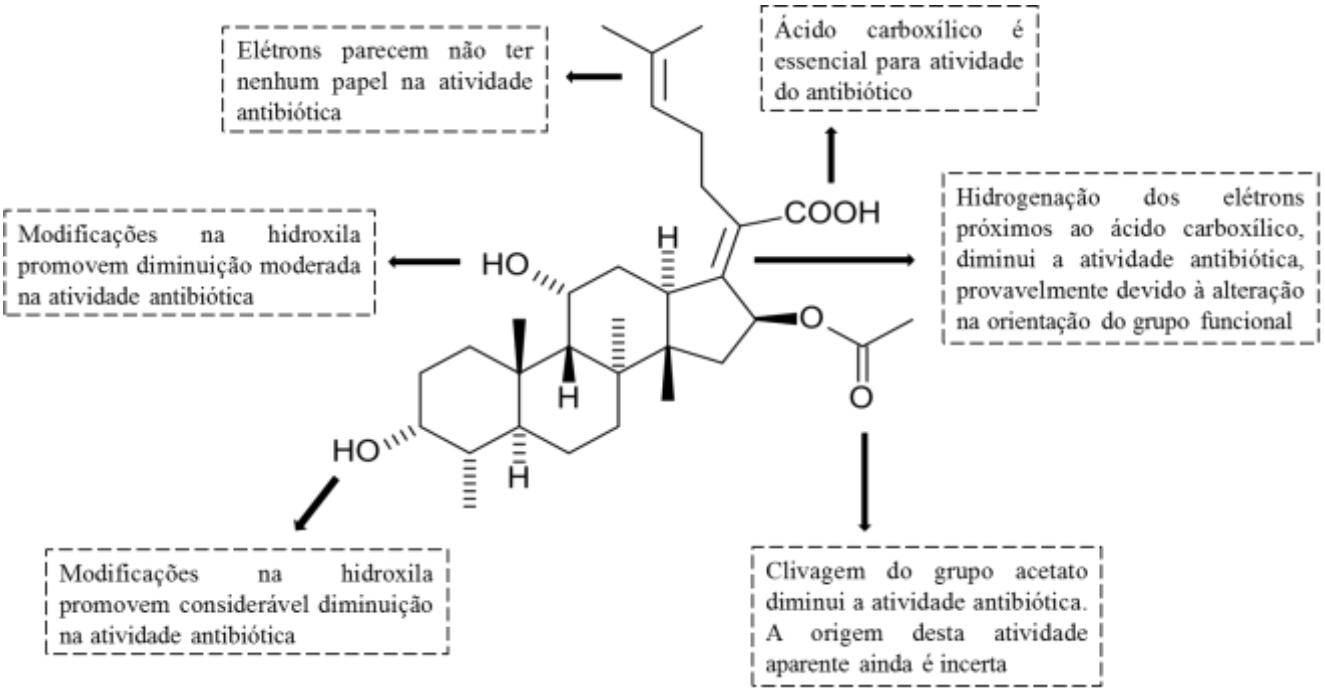
Paecilomyces fusidioides também foram relatadas (COLE; SCHWEIKERT, 2003; GODTFREDSEN et al., 1979; PERRY et al., 1983).

O AF é considerado o antimicrobiano mais potente do grupo dos fusidanos (COSTI et al., 2005; PERRY et al., 1983; ZHAO et al., 2013), e por apresentar um sistema de anel ciclopentenoperidrofenantreno, pertence à classe dos esteroides (GODTFREDSEN; VANGEDAL, 1962), mas não contém nenhum efeito corticoide (WILKINSON, 1998). O grupo dos fusidanos, por sua vez, compõe uma pequena classe dos *nor*-triterpenos tetracíclicos, que podem ser estruturalmente considerados como 29-*nor* protostano triterpenos (ZHAO et al., 2013).

A estrutura-atividade do AF foi determinada por Godtfredsen e colaboradores, em 1966 (Figura 1), por meio de uma série de modificações químicas em que alteravam ou removiam os grupos funcionais (GODTFREDSEN et al., 1966). Estas modificações foram testadas com cepas de *Staphylococcus aureus*, os quais são sensíveis à presença do fármaco (SILVA; CHAHER; BERNHARD, 1965).

Sabe-se que a cadeia lateral e o grupo funcional ácido carboxílico do AF são indispensáveis para a sua atividade biológica (DUVOLD et al., 2001; GODTFREDSEN et al., 1966). Modificações estruturais neste fármaco demonstravam que, entre os 51 derivados produzidos, nenhum apresentou atividade antibacteriana melhor do que o composto original, com exceção apenas do derivado 24,25-ácido diidro fusídico, cuja atividade foi semelhante (GODTFREDSEN et al., 1966).

Figura 1- Estrutura-atividade do AF



Fonte extraída e adaptada: DUVOLD et al., 2001

Segundo informações da Indústria LEO Pharma, atualmente o AF é comercializado principalmente na forma farmacêutica de creme e pomada por muitos países, conforme apresentado na Tabela 1. No Brasil, o AF está disponível apenas na forma farmacêutica de creme dermatológico, com o nome comercial de Verutex®. Além da LEO Pharma, laboratórios como Neo Quimica, Pizer, Brainfarma e Prati Donaduzzi produzem e comercializam apresentações genéricas do fármaco.

Tabela 1- Formas de comercialização do AF em vários países

País	Nome comercial	Forma farmacêutica	Concentração	Tipo de embalagem	Tamanho da embalagem
Brasil	Verutex®	Creme	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g
França	Fucidine®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g
Portugal	Fucidine®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g
Espanha	Fucidine®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g e 30 g
Austrália	Fucidin®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g
Canadá	Fucidin®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g e 30 g
Dinamarca	Fucidin®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	15 g e 30 g
Itália	Fucidin®	Pomada	20 mg/g	Tubo de alumínio	30 g
Grécia	Fucidin®	Pomada e Gaze	20 mg/g	Tubo de alumínio e *Kliklok*	15 g e 10 x 10 cm

Fonte: Indústria LEO Pharma Ltda

O AF em combinação com outros princípios ativos está disponível em várias formulações para administrações oral (comprimido e suspensão), intravenosa e tópica (creme, pomada e gel) (TURNIDGE, 1999) em vários países (GONTIJO; PEREIRA; SILVA, 2003).

Embora seja amplamente utilizado durante décadas, o AF nunca foi aprovado nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA). Por este motivo, um regime de dosagem tem sido patenteado, visando a utilização do fármaco via oral como monoterapia, uma vez que apresenta-se como uma alternativa segura e eficaz no combate às cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina – MRSA (FERNANDES; PEREIRA, 2011).

3.2.1 Espectro de ação e aplicações clínicas

Desde 1962, o AF tem sido amplamente utilizado no tratamento sistêmico e tópico de infecções estafilocócicas (JONES et al., 2011; SPELMAN, 1999), incluindo estafilococos coagulase-negativo e cepas resistentes à penicilina e a outros antibacterianos (KOROLKOVAS, 2010), o que o torna uma alternativa no tratamento de doenças causadas por cepas MRSA (ANDERSON, 1980; FALAGAS; KOPTERIDES, 2007; VERBIST, 1990). Também é ativo contra cepas Gram-positivas

anaeróbias e demonstra atividade *in vitro* contra *Neisseria* spp., *Bordetella pertussis* e *Moraxella catarrhalis,* mas não apresenta atividade contra outras espécies Gram-negativas aeróbicas (COLLIGNON; TURNIDGE, 1999).

Devido à sua atividade contra uma gama de bactérias Gram-positivas, o AF tem sido também utilizado no tratamento de uma variedade de situações clínicas, como conjuntivite bacteriana (ADENIS et al., 1989), colite causada por *Clostridium difficile*, fibrose cística, na profilaxia em cirúrgicas oftálmicas e neurológicas, também tem sido utilizado como adjuvante no tratamento de endoftalmite bacteriana, *Legionella pneumonia*, hanseníase (GOLLEDGE, 1999), infecções ósseas, articulares (DARLEY; MACGOWAN, 2004; DAVIS, 2005; TRAMPUZ; ZIMMERLI, 2005; ZIMMERLI; TRAMPUZ; OCHSNER, 2004) e infecções de tecidos moles (LONG, 2008).

A eficácia terapêutica do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico está relacionada com sua extraordinária capacidade de penetração na superfície cutânea intacta, que promove elevada concentração do fármaco no local da infecção (STÜTTGEN; BAUER, 1988). Além disso, estudo demonstrou que o AF apresenta atividade aumentada em meio ácido (BIEDENBACH et al., 2010). Esta característica torna ainda mais recomendável a utilização deste fármaco no tratamento de infecções causadas por estafilococos, que em geral, se desenvolvem em compartimentos ácidos ou levemente ácidos (WEINRICK et al., 2004), tal como, mucosas e a pele.

A pele saudável é colonizada por grande número de bactérias que vivem em sua superfície ou nos folículos pilosos como comensais. Algumas vezes, o supercrescimento dessas bactérias causa dermatoses e, em outras ocasiões, bactérias que não fazem parte da microbiota da pele podem colonizá-la e provocar patologias. As piodermites estão entre os problemas dermatológicos mais comuns e importantes da clínica pediátrica, assim como a acne, na adolescência, que também está entre as dermatoses mais prevalentes (GONTIJO; PEREIRA; SILVA, 2003).

Nesse sentido, o AF é indicado por muitos dermatologistas no tratamento de infecções secundárias, como dermatite atópica, dermatite de contato, prurigo e neurodermatite (LONG, 2008), bem como para o tratamento de infecções da pele causadas por estafilococos, estreptococos ou outros micro-organismos sensíveis a esta substância ativa, sendo que as indicações mais frequentes são para o tratamento de furúnculos, antraz ou carbúnculo, eritema, foliculite, acne, paroníquia, hidradenite, infecções de feridas por queimadura e impetigo (GEORGE; RUBIN, 2003; KOROLKOVAS, 2010; SMEENK; SEBENS; HOUWING, 1999; SPELMAN, 1999; WILKINSON, 1998).

No tratamento do impetigo, o AF apresenta significância frente a outros antimicrobianos tópicos e também é mais eficaz em comparação às combinações de neomicina e bacitracina, além de

ter apresentado resultados semelhantes aos de um antimicrobiano oral no tratamento de infecções cutâneas localizadas (GEORGE; RUBIN, 2003).

Em geral, os antimicrobianos tópicos são uma opção importante na profilaxia e tratamento de várias infecções (CHRISTIANSEN, 1999; GRAYSON et al., 2010), pois podem alcançar altas concentrações no local específico da infecção, apresentando efeitos colaterais mínimos, comparado com os tratamentos sistêmicos (GEORGE; RUBIN, 2003; LUQUE, 2007; STRINGEL et al., 1989).

3.2.2 Farmacocinética

Na literatura não existem muitos trabalhos que caracterizam detalhadamente a farmacocinética do AF. Sabe-se que o fármaco ao ser administrado via oral e/ou via intravenosa apresenta boa penetreção em vários tecidos, incluindo ossos (CHATER; FLYNN; WILSON, 1972; HIERHOLZER; KNOTHE; REHN, 1970), próstata, tecido adiposo, rim, coração e fluido sinovial (DEODHAR et al., 1972; SATTAR; BARRETT; CAWLEY, 1983), mesmo se ligando fortemente às proteínas, cerca de 95 a 97% (TURNIDGE, 1999).

Em relação ao tratamento tópico, foi demonstrado em estudo utilizando câmara de penetração e pele humana, que após administração tópica do AF incorporado em diferentes bases farmacêuticas (creme, pomada e gel), este apresentou boa penetração em toda a espessura da pele, independente do tempo de aplicação, sendo que na presença de alterações espontâneas no estrato córneo, como verrugas seborreicas ou outras condições similares que comprometem sua integridade, o fármaco atingiu níveis mais elevados, por apresentar melhor permeação (STÜTTGEN; BAUER, 1988). Por este motivo, o AF é frequentemente utilizado no tratamento de infecções profundas como é o caso, de paroníquia e furúnculos (REEVES, 1987).

Para corroborar, estudo *in vitro* realizado em 2007 também demonstrou a elevada permeabilidade do AF na pele (SIMONSEN; FULLERTON, 2007). Alguns autores relatam ainda que a penetração cutânea do AF é semelhante à de esteroides tópicos, no entanto, não apresenta ação anti-inflamatória como é esperado para esta classe de fármaco (VICKERS, 1969).

Em relação à sua meia-vida de eliminação, vários valores foram descritos dependendo da forma como os ensaios cinéticos foram realizados e o intervalo de dosagem administrado (TURNIDGE, 1999). O AF é eliminado por mecanismos não renais, sendo que uma proporção do fármaco é transformada em vários metabólitos que podem ser excretados via biliar (BROWN; REEVES; MCMULLIN, 1997).

3.2.3 Mecanismo de ação

O AF é um antimicrobiano de ação principalmente bacteriostática (KOROLKOVAS, 2010), mas, em altas concentrações, pode apresentar ação bactericida (WILKINSON, 1998).

Segundo Turnidge (1999), o AF é considerado um antibacteriano único, que atua inibindo a síntese das proteínas bacterianas pela ligação ao fator de alongamento G (EF-G). O EF-G é uma proteína bacteriana essencial que promove a translocação no ribossomo, após a formação da ligação peptídica durante a síntese de proteínas (CUNDLIFFE, 1972; TANAKA, KINOSHITA, MASUKAWA, 1968).

O AF, ao se ligar com o EF-G no ribossomo em combinação com guanosina difosfato inativa (GDP) ou guanosina trifosfato ativa (GTP), promove a inibição da função da GTPase do EF-G, evitando qualquer outro alongamento adicional (CUNDLIFFE, 1972; TANAKA, KINOSHITA, MASUKAWA, 1968). Em procariontes, o fator de alongamento sensível à ação do fármaco é o EF-2, e nas células eucarióticas, existem outros fatores de alongamento, como a EF-Tu e EF-1, que podem desempenhar as funções do EF-2 (MAZUMDER, 1975).

3.2.4 Reações adversas

Ao contrário dos ensaios atualmente realizados com os novos antimicrobianos, a introdução do AF na clínica médica não foi acompanhada por estudos aprofundados sobre sua toxicidade e efeitos adversos (CHRISTIANSEN, 1999), e por isso, suas reações adversas ainda não são completamente conhecidas (KOROLKOVAS, 2010).

Os primeiros estudos relataram que o AF é um fármaco não tóxico, cujos principais efeitos colaterais são desconforto gastrointestinal, diarreia e cefaleia. Casos de hepatotoxicidade foram relatados a partir de 1972, na qual análise retrospectiva demonstrou que este efeito é reversível, principalmente quando associado com a administração intravenosa. A administração intravenosa, por sua vez, deve ser realizada lentamente, pois pode causar tromboflebite (IWARSON et al., 1981; WEBB; WILSON; RAO, 1968).

A administração do AF, especialmente na forma intravenosa, em pacientes com alguma patologia hepática não é contra indicada, mas deve ser realizada com cautela (HUMBLE; EYKYN; PHILLIPS, 1980). No caso da administração em recém-nascidos, um cuidado maior deve ser tomado, principalmente se forem prematuros ou apresentarem icterícia e/ou acidose (BRODERSEN, 1985).

No tratamento de conjuntivite bacteriana pode ocorrer ardência nos olhos, mas, este efeito foi pouco relatado (ADENIS et al., 1989), assim como granulocitopenia (EVANS, 1988; REVELL;

NICHOLSON; PEARSON, 1988), leucopenia e trombocitopenia (LEIBOWITZ et al., 1991). No tratamento de infecções de tecidos moles e da pele, o AF apresenta baixa incidência de reações adversas, em relação a outras terapias antibacterianas tópicas e sistêmicas (LONG, 2008). A maioria dos seus efeitos adversos são geralmente transitórios e não requerem a descontinuação do tratamento (CHRISTIANSEN, 1999). Além disso, é considerado hipoalergênico (GONTIJO; PEREIRA; SILVA, 2003).

As reações na pele, incluindo aparecimento de prurido, exantemas e ressecamento, são incomuns (HOGAN, 1988; ROMAGUERA; GRIMALT, 1985), mas podem acometer pacientes hipersensíveis. Sabe-se também que este antimicrobiano é contraindicado em infecções cutâneas causadas por vírus ou fungos (KOROLKOVAS, 2010).

Na bula do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico, a classificação e a intensidade das reações adversas são divididas por sistemas:

- ✓ *Sistema imunológico e nos olhos:* as reações são raras (>1/10.000 e < 1/1.000), mas, pode ocorrer reação alérgica e irritação conjuntival, respectivamente;
- ✓ *Pele e tecido subcutâneo:* as reações são incomuns (>1/1.000 e < 1/100), como por exemplo, exantema de vários tipos (eritematoso, maculopapular e pustular), irritação da pele no local da aplicação, incluindo dor, sensação de queimação, eritema, prurido, dermatite de contato. As reações de urticária, edema angioneurótico (inchaço subcutâneo), eczema (inflamação aguda ou crônica da pele), edema periorbital (inchaço próximo aos olhos) ainda apresentam frequência e intensidade desconhecidas (VERUTEX, 2011).

3.2.5 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é definida como a insensibilidade da bactéria à ação dos antibacterianos (TAVARES, 2000; WRIGHT, 2007), e é classificada como um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo assim, a ação das substâncias ativas. Entre os diferentes mecanismos, incluem a destruição da substância ativa, inativação e alteração do alvo na enzima bacteriana, ou alteração de um estado fisiológico da própria bactéria (TAVARES, 2000; WALSH, 2000).

Estudos apontam que a resistência bacteriana está sendo considerada como um dos riscos mais graves para a saúde pública (SILVA, 2012), e isso ocorre devido ao descaso da população com a dosagem e o tempo de duração do tratamento, automedicação, prescrição desnecessária por parte dos profissionais da área saúde, descarte inadequado, utilização na produção agropecuária e facilidade de

aquisição em farmácias e drogarias (NICOLINI et al., 2008; TAVARES, 2000), mesmo após a RDC 44, publicada em 26 de outubro de 2010, pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010), que proíbe a venda dos antibióticos sem a retenção da prescrição médica.

Segundo pesquisas, a resistência bacteriana impõe sérias limitações aos pesquisadores e às opções de tratamento, o que torna as infecções mais dispendiosas economicamente e mais difíceis de serem controladas (BYARUGABA, 2004; SHEARS, 2001). As doenças infecciosas são a causa da maior parte de mortalidade no mundo, e o aumento da resistência de alguns micro-organismos Gram-positivos, é preocupante. Este aumento tem sido observado principalmente no ambiente hospitalar, e a bactéria mais comumente envolvida é o *Staphylococcus aureus* (BADDOUR; ABUELKHEIR; FATANI, 2006).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, oportunista, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis. No entanto, pode provocar patologias que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos), até infecções mais graves, como é o caso da pneumonia, meningite, peritonite, endocardite, infecções ósseas e síndrome do choque tóxico (SANTOS et al., 2007). O grau de severidade dos sintomas apresentados pelo paciente, se deve aos diferentes tipos de toxinas e enzimas produzidas pela bactéria, que induzem respostas imunes diferenciadas (IWATSUKI et al., 2006).

Apesar de a penicilina ter sido bastante eficiente nos tratamentos, em 1944, foi constatado que algumas cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de material clínico, mostravam-se resistentes a este antimicrobiano, devido à produção da penicilinase (TAVARES, 2000). Em 1960, com o uso das penicilinas semissintéticas, como a meticilina, que não eram suscetíveis à ação das penicilinases, surgiram as cepas MRSA, cuja resistência se estendeu a outros antimicrobianos β-lactâmicos (VOSS et al., 1994).

Posteriormente, surgiram também cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), aos glicopeptídeos (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005), aos antimicrobianos da classe dos macrolídeos (SCHMITZ et al., 2000) e fluoroquinolonas (KOTLUS et al., 2006).

Desde o início do aparecimento das cepas resistentes, ocorreu uma drástica redução na identificação e introdução de novos protótipos antibióticos na terapia clínica (LOPES, 2009), com consequente aumento no interesse da utilização de antimicrobianos antigos, como foi o caso do AF (BERGEN et al., 2012).

A resistência *in vitro* ao AF foi verificada em 1984 (GUENTHNER; WENZEL, 1984) e manteve-se em níveis extremamente baixos, mesmo sendo amplamente utilizado em vários países europeus, na Austrália e no Canadá (CHEN et al., 2010). Além disso, o fármaco não apresenta

resistência cruzada com outros antimicrobianos utilizados na prática clínica (β-lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos), provavelmente por apresentar estrutura química muito diferente destas classes de antimicrobianos (GONTIJO; PEREIRA; SILVA, 2003). Levantamentos demonstraram também que o AF manteve atividade constante contra as cepas multirresistentes (PFALLER et al., 2010), ao contrário de antimicrobianos mais recentes e de amplo espectro como a linezolida (TOH et al., 2007) e a daptomicina (YANG et al., 2010).

Apesar disso, o combate à resistência bacteriana exige investimentos em pesquisas científicas que visem à descoberta de novos fármacos, destinados ao tratamento específico dessas bactérias multirresistentes (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; LIVERMORE, 2004; WISE; PIDDOCK, 2010), bem como medidas complementares, que devem ser assumidas pelas autoridades e agentes da saúde, no que diz respeito à orientação e conscientização dos pacientes em relação ao uso racional dos antibacterianos (TAVARES, 2000).

3.2.6 Métodos analíticos

Estudos científicos envolvendo o desenvolvimento de novos métodos analíticos, bem como a otimização e validação de métodos já descritos na literatura, são fundamentais para garantir a qualidade do produto comercializado. Nesse sentido, algumas técnicas tem sido desenvolvidas para a determinação do AF em fluidos biológicos e diferentes formas farmacêuticas.

O AF e o fusidato de sódio (FS) nas formas farmacêuticas de cápsula e pomada, foram determinados por meio da espectrofotometria na região UV, por primeira derivada, utilizando comprimento de onda de 208 nm (HASSAN; AMER; AMER, 1987). Outros estudos espectrofotométricos também foram desenvolvidos para identificação do AF na forma farmacêutica de suspensão oral (VLADIMIROV et al., 1995) e controle de processo de biossíntese (SATAROVA et al., 1989), por meio de reações denominadas reações de identificação ou reações colorimétricas, realizadas na região do visível.

Morgan e colaboradores (2001) realizaram estudo por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para a determinação e quantificação de 24 antimicrobianos em fermentações, incluindo o AF. As quantificações foram realizadas por detecção das moléculas protonadas, utilizando tempo programado de monitorização de um único íon (SIM), sendo que o íon detectado para o AF foi de +1056.

Estudo de ionização dissociativa do AF e de seus derivados com subsequente identificação dos produtos de degradação do fármaco após termólise (30-250°C) foi desenvolvido pelo método de espectrometria de massas (KLYUEV et al., 1980).

Método de espectrometria de absorção atômica também foi desenvolvido para determinar AF em pó a granel e na forma farmacêutica de creme dermatológico. Neste método, o fármaco foi submetido à reação com nitrato de prata, acetato de cobre e cloreto de ferro, para a formação de complexos sólidos (AL-SHAALAN, 2010).

Método do grau de ligação surfactante-corante foi realizado para a determinação do AF e FS em comprimidos, pomadas e cremes. Esta análise baseou-se na modificação do grau de ligação do surfactante catiônico brometo de didodecildimetilamônio (DDABr) com o corante aniônico *comassie blue G* (CBBG), cuja formação do composto DDABr-CBBG foi monitorada a partir de mudanças nas características espectrais do corante. A adição destes antimicrobianos, a partir de misturas aquosas com DDABr-CBBG, causou diminuição no grau de ligação de corante–surfactante e promoveu a formação de DDABr–composto agregado. Como resultado, foi demonstrado que o método *Surfactant to dye binding degree* (SDBD) apresentou vantagens em relação aos métodos convencionais utilizados no CQ do AF e do FS, em termos de sensibilidade (detectou 0,6 mg/L), seletividade, preparo da amostra, precisão (desvios padrão relativos – DPR de 1,5-2,0%), rapidez e redução de custos (COSTI et al., 2005).

Método por cromatografia em camada delgada (CCD) com detecção densitométrica em 240 nm foi realizado para determinação simultânea do AF, *m, p*-hidroxibenzoatos e butil-hidroxianisol em pomada (KRZEK et al., 2006). A Farmacopeia Britânica (2010) e a Farmacopeia Europeia (2010) também descrevem o método por CCD para identificação do AF.

Vários métodos por CLAE envolvendo análise do AF são encontrados na literatura (ANKAM et al., 2010; BYRNE; VELASCO-TORRIJOSB; REINHARDT, 2014; GOSWAMI; GUPTA; JOGIA, 2013; HIKAL, 1983; HIKAL; SHIBL; EL-HOOFY, 1982; HONG; RONG, 2012; KOK-KHIANG; TZE-FUNG, 2000; NAWAZ et al., 2014; NIANFEN; YANDONG; MOOLING, 2009; RAHMAN; HOFFMAN, 1988; SHAIKH et al, 2009; SORENSE, 1988) e em compêndios farmacopeicos (FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010).

Outro estudo utilizando o método por CLAE foi desenvolvido para verificar a estabilidade física e química do AF. Neste estudo, amostras do fármaco em combinação com a eritromicina e metilprednisolona em infusões intravenosas foram submetidas a congelamento e descongelamento utilizando forno de micro-ondas durante 12 meses. Em todas as amostras, não houve nenhuma perda significativa, de modo que as três substâncias foram estáveis nestas condições analisadas (SEWELL; PALMER, 1991).

Outros métodos analíticos também foram utilizados para estudar as características físicas e químicas do AF. Em 1962, Godtfredsen e Vangedal realizaram as primeiras análises elementares

para a caracterização da estrutura química do fármaco, localização dos seus grupos funcionais e a identificação de seus derivados, confirmados tanto pela estrutura química proposta, como pelo peso equivalente obtido por titulação. Além disso, a estereoquímica do AF também começou a ser investigada. No entanto, apenas em 1965 que Godtfredsen, Von Daehne e Vangedal conseguiram identificar uma estereoquímica absoluta para este fármaco. No ano seguinte, um outro estudo foi realizado para avaliar as possíveis mudanças do AF e identificar quais as formas mais estáveis (DIASSI et al., 1966).

Posteriormente, estudo para caracterizar as propriedades do AF no estado sólido também foi desenvolvido. A forma comercial do fármaco foi preparada utilizando diferentes solventes: acetonitrila, ou mistura de álcool metílico e água (50:50, v/v), ou diclorometano. Os polimorfos foram caracterizados utilizando difração de raios–X (XRD), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), *polarizing hot-stage microscopy* (HSM) e taxa de dissolução intrínseca (IDR). Estes testes forneceram evidências para a identificação e caracterização de dois polimorfos anteriormente não declarados para o AF (GILCHRIST; LETCHFORD; BURT, 2012).

Método de separação eletroforética, para quantificação do AF administrado em combinação com outros antimicrobianos, foi descrito, com subsequente ensaio microbiológico (CARLSTROM, DORNBUSCH; HAGELBERG, 1977).

Alguns estudos descrevem a determinação do percentual médio do AF por ensaio de difusão em ágar (BARTOSHEVICH et al., 1976; HIKAL; SHIBL; HOOFY-EL, 1982; KANAZAWA; KURAMATA, 1964; KOROLEVA, 1971). No entanto, nenhum método microbiológico por turbidimetria foi encontrado.

Os parâmetros utilizados nos métodos analíticos descritos na literatura e em compêndios oficiais para a determinação do AF em diferentes matrizes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(continua)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
Difusão em ágar	Micro-organismo teste: *Staphylococcus aureus* 209P; meio de cultura: ágar Mueller Hinton; placa de Petri: 85-90 mm; método: *cup-plate*	AF em fluidos corporais	KANAZAWA; KURAMATA, 1964
Difusão em ágar	Micro-organismo teste: *Corynebacterium xerosis* 928	AF em soro de coelho, cão, rato, cavalo e humano	KOROLEVA, 1971
Difusão em ágar automatizado	ND*	AF	BARTOSHEVICH et al., 1976
Eletroforese e ensaio microbiológico	Electroforese: gel de agarose Ensaio microbiológico: ND*	AF em soro	CARLSTROM; DORNBUSCH; HAGELBERG, 1977
Espectrometria de massas e análise térmica	Processos de fragmentação do AF e de alguns derivados, sob a ação do impacto de elétrons e investigação dos produtos da sua degradação térmica (30-250°C), utilizando espectrometria de massa e derivatografia	AF	KLYUEV et al., 1980
CLAE e difusão em ágar	CLAE: faixa de concentração: 50-1000 µg/mL Difusão em ágar: micro-organismo teste: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6571)	AF em comprimido, suspensão e pomada	HIKAL; SHIBL; EL-HOOFY, 1982

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(continuação)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
CLAE	Coluna analítica (300 x 4 mm), preenchida com micropartículas de sílica (Microporasil, Waters Associates); FM: hexano, diclorometano e álcool etílico (69:25:6, v/v/v); vazão: 1,8 mL/min; volume de injeção: 80 µL; detecção: 254 nm; t_R: 4,5 min	AF em plasma	HIKAL, 1983
Espectrofotometria na região UV por primeira derivada	Espectrofotômetro Beckman *DU7*; comprimento de onda: 228 nm; faixa de concentração: 3 a 40 µg/mL; solvente: solução tampão borato pH 8,6	AF e FS em cápsula e pomada	HASSAN; AMER; AMER, 1987
CLAE	Coluna analítica (150 x 4,6 mm, 5 µm), preenchida cianopropil; FM: acetonitrila e di-hidrogenofosfato de sódio 20 m*M* (39:61 v/v), pH 3,5 ajustado com ácido fosfórico 85%; volume de injeção: 80 µL; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 204 nm; t_R: ± 8 min	AF em plasma	RAHMAN; HOFFMAN, 1988
CLAE	Coluna analítica LiChrosorb RP C_{18} - Merck, Darmstadt, F.R.G. (250 x 4 mm; 7 µm); pré-coluna (Waters Guarda-PAKTM - C_{18}); FM: acetonitrila, álcool metílico e ácido fosfórico 0,01 mol/L (50:20:30, v/v/v); vazão: 3,0 mL/min; volume de injeção: 75 µL; detecção: 235 nm; t_R: ± 5 min	AF em soro humano	SORENSE, 1988
Espectrofotometria na região do Vis	Reação do AF com uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado (4:1, v/v); análise em 585 nm, durante dois minutos	AF: controle do processo de biossíntese, isolamento e purificação	SATAROVA et al., 1989

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(continuação)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
CLAE	Coluna analítica (125 x 4,9 mm, 5 µm), ODS-2 (Phase Separações, Clwyd, Reino Unido). No caso do AF: FM: acetonitrila, ácido pentanossulfônico 0,01 mol/L (70:30, v/v), pH 3,0 ajustado com ácido sulfúrico 1 *N*; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 215 nm	AF, eritromicina e metilprednisolona em infusões intravenosas	SEWELL; PALMER, 1991
Espectrofotometria na região do Vis	Reação do AF com o complexo ácido acetilhidroxâmico-Fe III; análise em 524 nm	AF em suspensão e FS em comprimido	VLADIMIROV et al., 1995
CLAE	Coluna analítica: Supelcosil L® C_{18}, pré-coluna (Upchurch Scientific, Oak Harbour, WA); faixa de concentração do AF: 0,3 a 1,2 mg/mL; FM: acetonitrila e hidrogeno-ortofosfato dissódico 0,01 mol/L (70:30, v/v), pH 6,0 ajustado com ácido acético glacial; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 235 nm; t_R: ± 8 min	AF e dipropionato de betametasona em creme	KOK-KHIANG; TZE-FUNG, 2000
ESI-MS	Detecção das moléculas protonadas em tempo programado de monitorização de um único íon (SIM); potencial da agulha: 3,5 kV; capilar aquecido: 200ºC; dessolvatação: bainha de gás (taxa 300 L/h de vazão); varredura: quadrupolo; *m/z*: 0-1600; tempo de varredura de 1 s, íon detectado para o AF: +1056	AF e outros antimicrobianos em fermentações	MORGAN et al., 2001

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(continuação)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
Método do grau de ligação surfactante-corante	Titulações: Metrohm 794 Basic Titrino; detecção: espectrofotômetro Metrohm 662 equipado com sonda de imersão; *software*: Metrohm TiNet 2.5 Light; recipiente de titulação: Deward termostatizada por circulação de água	AF e FS em comprimido, pomada e creme	COSTI et al., 2005
CCD com detecção densitométrica	Placas de sílica gel 60 F_{254} (10 x 10 cm); FM: *n*-hexano, acetato de etila e ácido acético glacial (60:30:10, v/v/v); migração: 9 cm; densitometria: 240 nm	AF e *m*, *p* hidroxibenzoatos em pomada	KRZEK et al., 2006
CLAE	Coluna analítica: Diamonsil C_{18} (250 × 4,6 mm, 5 µm); FM: ácido fosfórico 0,01 mol/L, acetonitrila e álcool metílico (16:64:20, v/v/v); forno de coluna: 40ºC; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 235 nm	AF em emulsão oftálmica	NIANFEN; YANDONG; MOOLING, 2009
CLAE	Coluna analítica: Symmetry C_8 Waters® (150 × 3,9 mm, 5 µm); faixa de concentração do AF: 200 a 600 µg/mL; FM: solução tampão de acetato de amônio 1,5% e acetonitrila (55:45, v/v), pH 3,8 ajustado com ácido ortofosfórico; vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 240 nm; t_R: ± 5 min	AF, clorocresol, furoato de mometasona em creme	SHAIKH et al., 2009
Espectrometria de absorção atômica	Spectronic Genesys® UV/Vis; *software* Winspec. Shimadzu®; reação com nitrato de prata, acetato de cobre e cloreto férrico, para a formação de complexos sólidos; solvente: água	AF em pó a granel e em creme	AL-SHAALAN, 2010

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(continuação)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
CLAE	Coluna analítica: Zorbax SB-fenil (250 x 4,6 mm, 5 µm) Agilent®; FM: tampão de trietilamina 0,1%, pH 2,0 ajustado com ácido ortofosfórico; acetonitrila e álcool metílico (40:35:25, v/v); vazão: 1,5 mL/min; volume de injeção: 50 µL; forno de coluna: 30ºC; detecção: 240 nm; t_R: 30 min	AF e halobetasol em creme, e identificação de impurezas	ANKAM et al., 2010
CLAE e CCD	CLAE: Coluna analítica: Lichrospher 100 C_{18} (125 x 4 mm, 5 µm); FM: álcool metílico, ácido ortofosfórico 0,05 mol/L e acetonitrila (10:40:50, v/v/v); vazão 2,5 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 235 nm; t_R: 3,5 min CCD: sílica gel F_{254} (Merck®); FM: álcool metílico, ácido acétido glacial, ciclohexano, clorofórmio (2,5:10:10:80, v/v/v/v); aplicação de 10 µL, concentração de 4,0 mg/mL (creme) e 2,0 mg/mL (colírio), placa de 12,5 cm; revelação: luz a 254 nm	AF em creme e colírio	FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010
CLAE	1) Coluna analítica: LiChrospher 100 C_{18} (125–150 mm x 4–5 mm, 5 µm); FM: álcool metílico, ácido ortofosfórico 1%, água e acetonitrila (10:20:20:50, v/v/v/v); vazão: 2,0 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 235 nm; t_R: 3,5 min 2) Coluna analítica: LiChrosorb C_{18} (200 x 4,6 mm, 5 µm); FM: álcool metílico, ácido acético glacial 1% e acetonitrila (10:30:60, v/v/v); vazão: 1,5 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 235 nm; t_R: 3,5 min	AF em suspensão	FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(continuação)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
CLAE e CCD	CLAE: Coluna analítica: C_{18} (125-0,015 mm x 4-5 mm, 5 µm); FM: álcool metílico, solução de ácido ortofosfato (10g/L), água e acetonitrila (10:20:20:25, v/v/v/v); vazão: 2,0 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 235 nm; t_R: 3,5 min CCD: sílica gel F_{254}; FM: álcool metílico, ciclohexano, ácido acétido glacial, clorofórmio (2,5:10:10:80, v/v/v/v); aplicação de 10 µL; concentração de 2,0 mg/mL; placa de 12,5 cm; revelação: luz a 254 nm	AF	FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010
DSC, TGA, IDR, XRD e HSM	Caracterização das propriedades do AF no estado sólido. Preparação das formas sólidas: solvente transformação polimórfica: mistura de acetonitrilo e metanol: água (50:50, v/v), ou recristalização a partir do solvente diclorometano	AF	GILCHRIST; LETCHFORD; BURT, 2012
CLAE	Coluna analítica: C_{18}; FM: ácido fosfórico 0,05 mol/L, acetonitrila e álcool metílico (40:50:10, v/v/v); detecção: 239 nm	AF em creme	HONG; RONG, 2012
CLAE	Coluna analítica: Zorbax CN Agilent® (250 x 4,6 mm, 5 µm); concentração do AF: 500 µg/mL; FM: solvente A (tampão de fosfato 0,01 mol/L e ácido fosfórico 0,1%, pH 2,5 ajustado com solução de amônia) e solvente B (acetonitrila) - 50:50, v/v; vazão: 1,0 mL/min; forno de coluna: 25°C; volume de injeção: 10µL; detecção: 240 nm; t_R: ± 18 min	AF e halometasona em creme	GOSWAMI; GUPTA; JOGIA, 2013

Tabela 2– Métodos analíticos publicados na literatura para determinação qualitativa e/ou quantitativa do AF em várias matrizes

(final)

MÉTODOS	CONDIÇÕES	FÁRMACO(S)/MATRIZ	REFERÊNCIAS
CLAE	Coluna analítica: Ascentis Express C_{18} (100 × 3,0 mm), FM: mistura A e B: A. acetonitrila e álcool metílico (83:17, v/v). B. 10 g/L solução ácido fosfórico 85% em água; eluição em gradiente; forno de coluna: 30ºC; vazão: 0,75 mL/min; volume de injeção: 10 µL; detecção: 240 nm; t_R: ± 27 min	AF e betametasona -17 – valerato em creme	BYRNE; VELASCO-TORRIJOSB; REINHARDT, 2014
CLAE	Coluna analítica: Medeterrane C_{18} (125 × 0,46 mm, 5 µm); FM: álcool metílico, acetonitrila e ácido fosfórico (10:60:30, v/v/v); vazão: 1,7 mL/min; volume de injeção: 20 µL; detecção: 235 nm; t_R: ± 15 min	AF a granel e em plasma humano	NAWAZ et al., 2014

*ND: dados não disponíveis

AF: ácido fusídico; ATCC: *American Type Culture Collection*; CCD: cromatografia em camada delgada; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DSC: calorimetria exploratória diferencial; ESI-MS: Espectrometria de massas com ionização por eletrospray; FM: fase móvel; FS: fusidato de sódio; HSM*: Polarizing hot-stage microscopy*; IDR: taxa de dissolução intrínseca; TGA: análise termogravimétrica; t_R: tempo de retenção; UV: ultravioleta; Vis: visível; XRD: difração de raios–X

3.3 Validação de métodos analíticos

A validação é um processo constante e dinâmico, que fornece evidência objetiva de que o método tem a capacidade de performance consistente em relação à sua aplicação, ou seja, o método deve ser adequado à finalidade pretendida. Por este motivo, a validação garante por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, possibilitando o conhecimento das limitações, reprodutibilidade e da confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003a).

Apesar da existência de documentos que exigem a validação de métodos analíticos após o seu desenvolvimento, ainda não está claro como estas validações devem ser executadas. É importante esclarecer que as resoluções são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidos, e os guias são recomendações vagas que possibilitam aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser utilizado, ou seja, são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos à interpretação (FDA, 2012).

Os parâmetros analíticos também conhecidos como parâmetros de desempenho analítico (EURACHEM, 2014; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) devem ser selecionados com base na intenção do uso do método, em geral, podem ser avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e robustez.

A ANVISA (2003a) e a USP 37 (2014) classificam os métodos analíticos em 4 categorias e os parâmetros analíticos requeridos em cada uma destas categorias se encontram na Tabela 3.

Categoria I – Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

Categoria III – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).

Categoria IV – Testes de identificação.

Tabela 3– Ensaios necessários para a validação do método analítico segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão por 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 à comprovação da precisão intermediária.

Fonte: ANVISA, 2003a

Os parâmetros analíticos tem sido definidos por várias organizações, entre elas, ANVISA (2003a) e USP 37 (2014), no entanto, algumas destas definições se diferem. Como tentativa de harmonizar estas diferenças, representantes de indústrias e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão criaram o *International Conference on Harmonisation* - ICH (ICH, 1995).

3.3.1 Parâmetros de validação

3.3.1.1 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade consiste na capacidade de um método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação especificada (ANVISA, 2003a; ICH, 1995; USP 37, 2014).

A correlação entre o sinal medido e a concentração da substância a ser quantificada raramente é conhecida. Em geral, esta correlação é determinada empiricamente a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas da substância de interesse (AUGUSTO; DE ANDRADE; CUSTODIO, 2000). Essa relação matemática é expressa por uma equação de reta, conforme demonstrado na Equação 1.

$$y = ax + b \qquad \text{Equação 1}$$

Em que:

y = Sinal medido

x = Massa ou concentração da substância a ser quantificada

a = Coeficiente angular da reta

b = Coeficiente linear da reta

A equação fornecida pela reta, denominada de curva analítica, demonstra a resposta do método em função de uma quantidade conhecida do analito a ser quantificado (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes da curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada utilizando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação - *r* (CUSTODIO; DE ANDRADE; AUGUSTO, 1997). O *r* expressa a relação de *x* e *y* na curva, na qual os valores ideais são 1 ou -1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior a probabilidade de existir uma relação linear definida. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um *r* maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; INMETRO, 2011). No Brasil, a ANVISA (2003a) recomenda que o *r* seja maior ou igual a 0,99 e o INMETRO (2011) que seja maior que 0,90.

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear descrita pela Equação 1, só é válida até um determinado intervalo de massas ou concentrações da substância medida. Este intervalo, dentro do qual se pode construir um curva analítica linear, é denominado de faixa linear dinâmica, ou faixa linear de trabalho (AUGUSTO; DE ANDRADE; CUSTODIO, 2000).

Ainda que as causas para a perda da linearidade sejam características de cada técnica, este é um fenômeno que pode ocorrer com qualquer conjunto de dados. Assim, cálculos dos coeficientes de regressão de uma curva analítica devem ser analisados, para verificar se todos os pontos a serem utilizados estão dentro da faixa dinâmica correspondente. As diretrizes da ANVISA (2003a) e ICH (2005) determinam um mínimo de cinco níveis de concentração para um intervalo linear.

3.3.1.2 Seletividade e especificidade

O termo seletividade é frequentemente utilizado da mesma forma e com o mesmo significado que o termo especificidade. O método que produz resposta para um único analito é chamado de específico, e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; HUBER, 1998). No sentido de que poucos métodos respondem a apenas um único analito, o termo seletividade pode ser considerado o mais apropriado (RIBANI et al., 2004).

A seletividade consiste em avaliar, de forma inequívoca, o(s) analito(s) na presença de compostos que podem interferir na sua determinação, tais como, outra substância ativa, adjuvantes, impurezas, produtos de degradação, e/ou outros compostos de propriedades similares (NATA, 1997; USP 37, 2014), garantindo que a quantificação seja exclusivamente do(s) analito(s) de interesse. Entender os diferentes mecanismos que podem causar essas interferências fornece conhecimento necessário para solucionar os problemas que podem vir a ocorrer durante as análises (RIBANI et al., 2004).

A seletividade de um método pode ser avaliada de várias maneiras:

- ✓ Comparação dos resultados contendo a matriz isenta do analito (placebo), com o resultado da matriz contendo o analito (produto acabado). Quando não for possível obter o placebo, o método de adição de analito no produto acabado também pode ser avaliado. Neste caso, é construída uma curva analítica com adição do analito no produto acabado e outra contendo apenas o analito em solução. Os resultados destas duas curvas e seus coeficientes são então representados em um mesmo gráfico em função da concentração do analito adicionado.
- ✓ Avaliação por meio da utilização de detectores DAD e/ou espectrômetros de massas, que permitem a comparação do espectro do composto separado com o do analito puro.
- ✓ Avaliação da interferência dos produtos de degradação do analito. Quando não se dispõe de impurezas de referência, tanto pela ausência como pelo custo elevado, é preciso expor de modo intencional o fármaco a condições extremas, como calor (50 ou 60ºC), ácido (HCl), base (NaOH), oxidação (H_2O_2), radiação por UV/Vis ou luz fluorescente.
- ✓ Realização de outra análise utilizando uma técnica cromatográfica, ou uma técnica que seja específica para verificar a estrutura do analito, como por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do infravermelho ou bioensaios específicos, após coleta do(s) analito(s) de interesse.

Testes de especificidade, por sua vez, necessitam de uma pesquisa muito mais cautelosa e de conhecimento específico na área da aplicação, para que se encontrem todos ou a maioria dos componentes que precisam ser testados. Sendo assim, o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas utilizadas no processo, subprodutos, produtos de degradação, metabólitos e reagentes em branco devem ser rigorosamente analisados. Após assegurada a seletividade e/ou especificidade de um método, os demais parâmetros analíticos devem ser avaliados no processo de validação (ICH, 1995; SHABIR, 2003; VESSMAN et al., 2001).

3.3.1.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas (ANVISA, 2003a), e representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos, de uma mesma amostra, sob condições definidas. A precisão é analisada em função do desvio observado entre os resultados ou desvio dos resultados em relação a sua média. Tal desvio pode ser expresso através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores dentro da qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável contínua (ICH, 2005; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Em geral, métodos que quantificam compostos em quantidades relativamente consideráveis requerem um DPR de 1 – 2% (RIBANI et al., 2004). Embora, o critério de aceitabilidade da precisão recomendado pela ANVISA (2003a) é de que o DPR seja igual ou inferior a 5% para métodos analíticos e 15% para métodos microbiológicos.

A precisão de um método pode ser considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA, 2003a).

A repetibilidade do método, também conhecida como precisão intra corrida ou intra dia ou intra ensaios, representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método para uma determinada amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local) realizadas em um curto intervalo de tempo (ANVISA, 2003a; FDA, 2012; ICH, 2005). Essas medições devem ser realizadas com a mesma amostra, mas de massas independentes, ou seja, preparações individualizadas (GREEN, 1996; SHABIR, 2003). Nesse sentido, não se deve confundir repetibilidade com precisão instrumental, em que avalia-se a média e DPR das respostas observadas (ICH, 1995).

A precisão intermediária, também conhecida como precisão inter corrida ou inter dias ou inter ensaios, indica a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003a; FDA, 2012;

ICH, 2005). Este tipo de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada, porém é menos eficiente quando comparada com os estudos de reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

A reprodutibilidade consiste em estudos em colaboração com outros laboratórios, em que a análise é realizada nas mesmas condições, no entanto, em laboratórios diferentes, com equipamentos e instrumentos também diferentes (ANVISA, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

3.3.1.4 Limite de detecção

O LD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (ANVISA, 2003a; CURRIE, 1999; FDA, 2012; ICH, 2005; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

De acordo com a ANVISA (2003a) e o ICH (2005), o LD pode ser determinado por várias maneiras, dependendo do procedimento utilizado, se este é um método instrumental (CLAE, cromatografia gasosa, absorção atômica) ou não instrumental (CCD, titulação, comparação de cor):

- ✓ *Com base na avaliação visual:* esta análise pode ser realizada tanto para métodos instrumentais ou não-instrumentais. O LD é geralmente determinado por meio da análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o nível mínimo ao qual a substância a analisar pode ser detectada com confiabilidade, ou seja, o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado.
- ✓ *Com base no sinal-ruído:* esta análise só pode ser aplicada a procedimentos analíticos que apresentam ruído na linha de base. Determinação da razão sinal-ruído é realizada comparando os sinais medidos a partir de amostras conhecidas com baixas concentrações da substância a analisar com aqueles das amostras em branco a qual é estabelecido a concentração mínima em que a substância a analisar pode ser detectada com confiabilidade. Uma razão sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para estimar o LD.
- ✓ *Com base no desvio padrão (DP) do intercepto e da inclinação da curva analítica:* nesta análise, o LD pode ser expresso por meio da Equação 2.

$$LD = \frac{3{,}3\,\sigma}{IC} \qquad \text{Equação 2}$$

Em que:

LD = Limite de detecção

σ = Desvio padrão do intercepto/resposta (b)

IC = Inclinação da curva analítica (a)

A inclinação da curva analítica pode ser calculada a partir da curva analítica da substância a ser analisada e a estimativa do σ pode ser realizada por várias maneiras:

- ✓ *Com base no DP do branco:* a medição da resposta analítica é realizada por meio da análise de um número adequado de amostras do branco e do cálculo do DP destas respostas.
- ✓ *Com base na curva analítica:* uma curva analítica específica deve ser construída utilizando amostras contendo a substância a analisar na faixa do LD. O DP da linha de regressão ou o DP das intercepções das linhas de regressão podem ser utilizados como o DP no cálculo.

3.3.1.5 Limite de quantificação

O LQ representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com confiabilidade, ou seja, que possa ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003a; CURRIE, 1999; FDA, 2012; ICH, 2005; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, o resultado torna-se menos preciso. Se houver a necessidade de uma maior precisão, uma concentração maior deverá ser registrada para o LQ (CURRIE, 1999). Assim como o LD, várias maneiras podem ser utilizadas para a determinação do LQ, dependendo se o procedimento é instrumental ou não-instrumental (ANVISA, 2003a; ICH, 2005):

- ✓ *Com base na avaliação visual:* esta análise pode ser realizada tanto para métodos instrumentais ou não-instrumentais. O LQ é geralmente determinado por meio da análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o nível mínimo ao qual a substância a analisar pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis.
- ✓ *Com base na aproximação do sinal-ruído:* esta análise só pode ser aplicada a procedimentos analíticos que apresentam ruído na linha de base. Determinação da razão sinal-ruído é realizada comparando os sinais medidos a partir de amostras conhecidas

com baixas concentrações da substância a analisar com aqueles das amostras em branco, na qual é estabelecida a concentração mínima em que a substância a analisar pode ser quantificada de forma confiável. Uma razão sinal-ruído aceitável é de 10:1.

- ✓ *Com base no DP do intercepto e da inclinação da curva analítica:* nesta análise o LQ pode ser expresso por meio da Equação 3.

$$\mathrm{LQ} = \frac{10\,\sigma}{\mathrm{IC}} \qquad \text{Equação 3}$$

Em que:

LQ = Limite de quantificação

σ = Desvio padrão do intercepto/resposta (b)

IC = Inclinação da curva analítica (a)

A inclinação da curva analítica pode ser calculada a partir da curva analítica da substância a ser analisada, e a estimativa do σ pode ser realizada por várias maneiras:

- ✓ *Com base no DP do branco:* a medição da resposta analítica é realizada por meio da análise de um número adequado de amostras do branco e do cálculo do DP destas respostas.
- ✓ *Com base na curva analítica:* uma curva analítica específica deve ser construída utilizando amostras contendo a substância a analisar na faixa do LQ. O DP da linha de regressão ou o DP das intercepções das linhas de regressão podem ser utilizados como o DP no cálculo.

O LQ é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas. É expresso como concentração do analito, como por exemplo, porcentagem p/p ou p/v, partes por milhão, na amostra em análise (ANVISA, 2003a).

3.3.1.6 Exatidão

A exatidão consiste na proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor considerado verdadeiro (ANVISA, 2003a; FDA, 2012; ICH, 2005). Para este ensaio, devem ser realizados um mínimo de nove determinações envolvendo três diferentes níveis de concentração (ANVISA, 2003a; ICH, 2005).

Segundo ANVISA (2003a) e o ICH (2005), este parâmetro pode ser determinado por diversas maneiras, dependo da natureza da amostra a ser analisada:

- ✓ *Fármaco:* pode-se aplicar o método analítico proposto para análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), ou comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido anteriormente estabelecida, ou ainda, a exatidão pode ser deduzida, uma vez que a precisão, linearidade e especificidade do método tenham sido estabelecidas.
- ✓ *Forma farmacêutica:* é possível determinar a exatidão pela análise de uma amostra, na qual adiciona-se quantidade conhecida do fármaco (padrão de referência) a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Aceita-se também a análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas do fármaco (padrão de referência) ao medicamento, denominado método de enriquecimento. A exatidão pode ser deduzida, uma vez que a precisão, linearidade e especificidade do método tenham sido estabelecidos.
- ✓ *Impurezas:* a exatidão pode ser determinada pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco. No caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado, como metodologia farmacopeica ou outro procedimento analítico validado. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

Independente do processo utilizado, a exatidão de um método deve ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003a; ICH, 2005). Como critério de aceitabilidade, o resultado final deve ser próximo ao valor verdadeiro (100%), sendo que uma pequena faixa de variação pode ser aceita, devido ao erro analítico inerente ao método.

3.3.1.7 Robustez

A robustez é um parâmetro utilizado para verificar a capacidade de um método em permanecer inalterado frente a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas, ou seja, tem como finalidade indicar sua confiabilidade durante a realização das análises (ANVISA, 2003a; ICH, 2005).

Nesse sentido, durante o desenvolvimento de métodos, algumas variações nos parâmetros considerados críticos e passíveis de erros devem ser realizadas, a fim de monitorar e avaliar o comportamento do método, no entanto, estas variações dependem do tipo de procedimento em estudo. A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação da resposta do método (ANVISA, 2003a; ICH, 2005).

Por meio desta análise, também é possível determinar as condições que necessitam de um controle mais rigoroso, sendo que recomendações de prudência são fundamentais e devem ser incluídas aos procedimentos de execução do ensaio. Dessa forma, o método vai ser considerado robusto quando as alterações testadas não produzirem mudanças significativas nos resultados finais (ANVISA, 2003a; ICH, 2005).

Tabela 4- Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico

Preparo da amostra	Estabilidade das soluções analíticas Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução Temperatura Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Variação do pH da FM Diferentes lotes ou fabricantes de coluna analíticas Temperatura Vazão da FM
Cromatografia gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de coluna analíticas Temperatura Velocidade do gás de arraste

Fonte: ANVISA, 2003a

4 ASPECTOS GERAIS

4.1 Descrição geral do ácido fusídico

Nome: Ácido fusídico - AF

Nome químico: ent-(17Z)-16α-(acetyloxy)-3β,11β-dihydroxy-4β,8,14-trimethyl-18-nor-5β,10α-cholesta-17(20),24-dien-21-oic acid hemihydrate (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010)

CAS: 6990-06-3

Fórmula molecular: $C_{31}H_{48}O_6$, $^1/_2$ H_2O (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010)

Peso molecular: 516,71 g/mol (O'NEIL, 2006)

pKa: 5,7 (ANKAM, 2010; TURNIDGE, 1999)

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se na forma de pó branco, pouco higroscópico. É praticamente insolúvel em água (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010; O'NEIL, 2006), éter, hexano (O'NEIL, 2006) e facilmente solúvel em álcool etílico 96% (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010; ANKAM, 2010), acetona, clorofórmio, piridina, dioxano (O'NEIL, 2006) e acetonitrila (ANKAM et al., 2010)

Categoria: Antibacteriano (FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010) ou antimicrobiano (ANVISA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010)

4.2 Substância química de referência

A SQR utilizada foi adquirida comercialmente pela empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda, com teor declarado de 100% (Lote: SLBC4119V, prazo de validade: 12 de agosto de 2015).

4.3 Produto acabado

Foram utilizadas amostras de creme dermatológico (20 mg/g) em bisnagas de 15 g, comercializadas com o nome de Verutex®, teor rotulado de 2% (Lote: EG5696, data de fabricação: 27 de agosto de 2012, data de validade: 27 de agosto de 2015). Verutex® creme contém em sua formulação ácido fusídico e os adjuvantes ácido clorídrico, álcool cetílico, butil-hidroxianisol, glicerol, petrolato branco, polissorbato 60, petolato líquido, sorbato de potássio e água purificada.

Estas amostras foram doadas gentilmente pela indústria LEO Pharma Ltda de Itapevi-SP, mas produzidas pela indústria LEO Pharma Ltda em Dublin, na Irlanda.

5 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

5.1 Métodos

A SQR e o produto acabado, descritos nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente, foram avaliados visualmente em relação ao aspecto, cor e odor.

5.2 Resultados e discussão

A SQR apresentou-se sob a forma de pó branco e inodoro, conforme descrito na Farmacopeia Europeia (2010) e laudo do fabricante (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

As amostras do produto acabado apresentaram-se sob a forma de creme, com odor característico, conforme descrito na Farmacopeia Britânica (2010) e laudo do fabricante (LEO Pharma Ltda).

6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

6.1 Material e método

6.1.1 Determinação da faixa de fusão da substância química de referência

A faixa de fusão do AF SQR foi determinada pelo método do capilar, utilizando taxa de aquecimento de 1,0ºC por minuto, até a completa fusão do fármaco. Neste ensaio, a SQR foi introduzida e compactada até aproximadamente 5 mm de altura, em tubo capilar fechado com 1,6 mm de espessura e 7,5 cm de comprimento (Satelit®), e inserida verticalmente no equipamento Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire®).

6.1.2 Determinação do pH do produto acabado

Nesta análise, foi utilizado o peagômetro modelo B474 (Micronal®) previamente calibrado com soluções de referência (pH 4,0 e pH 7,0). Após calibração, o pH foi determinado diretamente no creme dermatológico, conforme recomendado na Farmacopeia Britânica (2010).

6.1.3 Determinação da densidade do produto acabado

A determinação da densidade relativa (D_r) da formulação de creme dermatológico foi realizada por picnometria, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). As pesagens foram realizadas utilizando a balança semi-analítica modelo B160 (Micronal®) e picnômetro de vidro de 10 mL. O valor da D_r foi obtido após a realização do cálculo demonstrado na Equação 4.

$$D_r = \frac{M_p - M_v}{M_a - M_v} \qquad \text{Equação 4}$$

Em que:

D_r= Densidade relativa

M_p= Massa do picnômetro com produto acabado

M_v= Massa do picnômetro vazio

M_a= Massa do picnômetro com água

6.1.4 Determinação da viscosidade do produto acabado

A viscosidade da formulação de creme dermatológico foi determinada por reologia, utilizando reômetro AR2000ex da TA Instrument, sensor do tipo placa-placa de 40 mm (Serial

Number: 930732), no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, Departamento de Físico Química, laboratório do Prof. Dr. Celso Valentim Santilli e da Profª. Drª. Sandra Helena Pulcinelli.

A taxa de cisalhamento foi de 0-100 s^{-1} para curva ascendente e de 100-0 s^{-1} para curva descendente, ambas analisadas por um período de 120 segundos. Todos os ensaios foram realizados a temperatura controlada (25 ± 1º C), em triplicata. Os gráficos foram plotados no *software* Origin 7.0.

6.2 Resultados e discussões

6.2.1 Determinação da faixa de fusão da substância química de referência

A faixa de fusão de uma determinada substância consiste na temperatura inicial e final em que esta se fluidifica, evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Esta análise foi determinada visualmente, em triplicata, e os resultados obtidos no início e final de cada fusão do AF SQR encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5- Faixa de fusão obtida para as amostras do AF SQR

Ensaio	Início da fusão (ºC)	Final da fusão (ºC)
1	190,8	192,2
2	191,2	192,7
3	191,9	193,6
Média	191,6	192,8
DP	0,49	0,71
DPR (%)	0,26	0,37

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Nos compêndios oficiais (FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010), a faixa de fusão do AF não é apresentada. No entanto, no Merck Index, a faixa de fusão especificada para do fármaco é de 192-193ºC (O'NEIL 2006). O início da fusão do AF SQR foi visualizado em torno de 191,6ºC, e a sua fusão completa foi observada em 192,8ºC, o que corrobora com o valor descrito na literatura e evidencia a pureza da matéria-prima adquirida comercialmente.

A determinação da faixa de fusão é um método simples, econômico e rápido, que pode ser empregada na caracterização ou indicação do grau de pureza de um composto. Sabe-se que a presença de impurezas, mesmo em pequena quantidade na amostra, pode alargar a faixa de fusão,

promovendo diminuição da temperatura do início da fusão, comparada com a temperatura determinada para a substância pura. Isso ocorre por que as interações intermoleculares entre a substância pura e as impurezas são mais fracas que as interações entre as moléculas da própria substância pura (CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2014).

6.2.2 Determinação do pH do produto acabado

A determinação do pH é realizada por potenciometria, na qual mede-se a diferença potencial entre dois eletrodos – o de referência e o de medida, imersos na amostra a ser analisada. Este tipo de medida é verificada de forma fácil e rápida, e depende da atividade dos íons de hidrogênio na amostra (ANVISA, 2000).

O pH determinado para o produto acabado foi de 5,35. O resultado obtido nesta análise encontra-se de acordo com as especificações da Farmacopeia Britânica (2010), que estabelece a faixa de pH entre 4,5 a 6,0 para o AF na forma farmacêutica de creme dermatológico.

6.2.3 Determinação da densidade do produto acabado

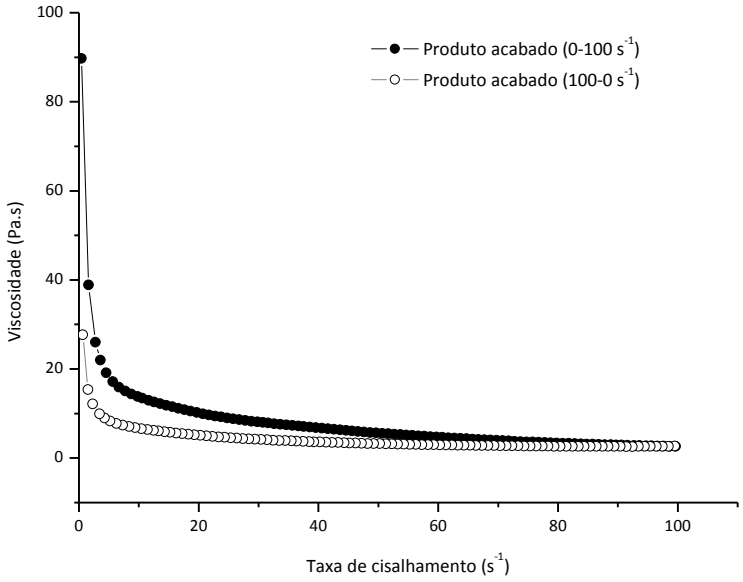
A determinação da D_r de uma substância baseia-se na razão entre a densidade (relação entre massa e volume) de uma dada amostra e a densidade de uma substância de referência, na qual foi utilizado a água. Esta análise pode ser realizada por meio da utilização de picnômetro, balança hidrostática ou densímetro (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A D_r da formulação de creme dermatológico, foi realizada por picnometria, cujo valor calculado foi de 0,9349 g/mL.

6.2.4 Determinação da viscosidade do produto acabado

A viscosidade consiste em medir a resistência de um material ao fluxo por meio da fricção ou do tempo de escoamento. Este parâmetro depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material, e pode ser realizada por vários métodos. Os mais frequentes utilizam viscosímetros rotativos, de orifício e capilares (ANVISA, 2000). No entanto, dependendo da quantidade e da consistência da amostra, a viscosidade também pode ser determinada por reômetro.

A viscosidade aparente mínima da formulação de creme dermatológico foi determinada por meio do maior ponto da taxa de cisalhamento, cujo valor foi de 2,59. A curva da viscosidade em função da taxa de cisalhamento está representada na Figura 2.

Figura 2- Curva da viscosidade em função da taxa de cisalhamento do produto acabado



Esta análise além de avaliar a consistência das emulsões, pode estabelecer um parâmetro de referência para verificar sua estabilidade (WILKINSON; MOORE, 1990) e/ou sua contaminação microbiológica (PINTO, KANEKO; PINTO, 2010), pois a viscosidade de uma dada formulação pode ser alterada em resposta à presença de diferentes compostos. Dessa forma, a determinação da viscosidade é considerada como parâmetro importante no CQ de formulações semissólidas.

7 DETERMINAÇÃO DO PESO MÉDIO DO PRODUTO ACABADO

7.1 Material e método

Em balança analítica, modelo H10 (Mettler Toledo®), foram pesadas individualmente 10 bisnagas de creme (15 g cada). Em seguida, os conteúdos foram removidos e as embalagens foram lavadas com água e álcool etílico absoluto (Qhemis®). Após a total secagem das bisnagas a temperatura ambiente, as embalagens foram novamente pesadas, juntamente com as respectivas partes que foram cortadas para a remoção total do conteúdo. O conteúdo das bisnagas foi colocado em recipiente, protegido da luz e armazenado em temperatura adequada (15 e 30°C), conforme orientação do fabricante. Posteriormente, este *pool* foi utilizado para a realização de todas as análises deste trabalho.

O peso médio das amostras de creme dermatológico foi avaliado segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), cujos resultados foram calculados, por meio da diferença entre as duas pesagens: bisnaga cheia e bisnaga vazia.

7.2 Resultado e discussão

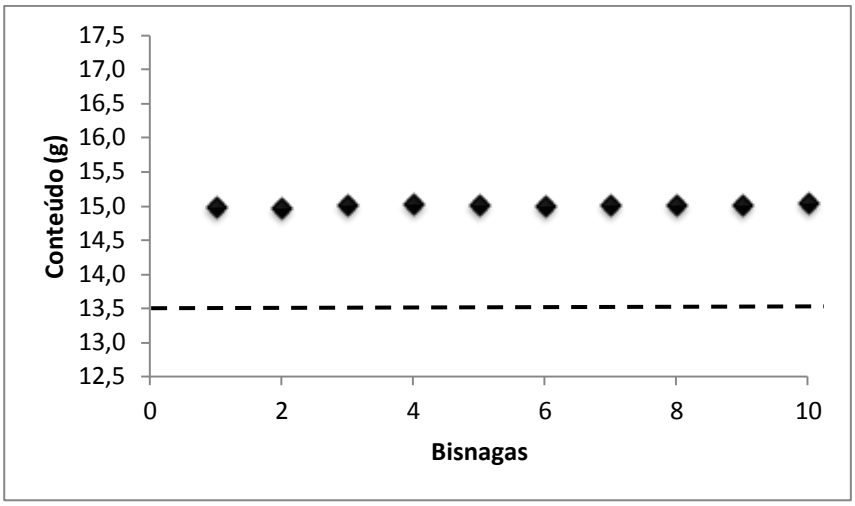
Os resultados do peso médio das 10 bisnagas de creme dermatológico analisadas aleatoriamente estão dispostos na Tabela 6. Na Figura 3, encontram-se os resultados dispostos graficamente.

Tabela 6- Peso médio das amostras do produto acabado

Bisnaga	Cheia	Vazia	Diferença de peso
1	18,6343	3,5965	15,0378
2	18,6570	3,6102	15,0468
3	18,6145	3,5807	15,0338
4	18,6462	3,5910	15,0552
5	18,6384	3,6200	15,0184
6	18,6270	3,6036	15,0234
7	18,6182	3,5718	15,0464
8	18,6486	3,5940	15,0546
9	18,6393	3,5767	15,0626
10	18,6422	3,5961	15,0461
Média	18,6366	3,5941	15,0425
DP	0,0134	0,0150	0,0100

DP: desvio padrão

Figura 3- Variação do conteúdo de 10 bisnagas de creme dermatológico (15 g cada)



A Farmacopeia Brasileira (2010) especifica que a porcentagem mínima em relação ao peso declarado não pode ser inferior a 90% do seu peso total, e como pode ser observado na Figura 3, nenhuma das 10 bisnagas de creme analisadas apresentou peso inferior a 13,5 g. Além disso, o peso médio das bisnagas encontra-se dentro do especificado no rótulo do produto que é 15 g, cujo DP observado foi praticamente nulo.

8 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO SEM O PRINCÍPIO ATIVO - PLACEBO

A formulação sem o princípio ativo, denominada de placebo, é utilizada para avaliar a seletividade do método durante seu desenvolvimento e validação. Por meio desta amostra, é possível comprovar a capacidade do método em identificar o(s) analito(s) de interesse, mesmo na presença de outros componentes presentes na matriz do medicamento (ANVISA, 2003a; ICH, 2005).

O placebo do creme dermatológico Verutex® utilizado neste trabalho não pode ser adquirido, assim como as concentrações exatas de cada adjuvante utilizado no preparo da formulação não puderam ser informadas pela indústria LEO Pharma Ltda. Por este motivo, algumas formulações foram desenvolvidas (Tabela 7), a fim de obter uma amostra que apresentasse características adequadas comparadas com às do produto acabado, tais como, pH, densidade e viscosidade. No preparo das formulações do placebo, a princípio, as proporções de cada adjuvante especificado na bula do medicamento foram retiradas da literatura (AULTON, 2005) e, posteriormente, alguns ajustes foram realizados.

Tabela 7- Formulações do placebo desenvolvidas

	Formulação		
Adjuvante	**1**	**2**	**3**
Ácido clorídrico	0,1%	0,05%	0,005%
Álcool cetílico	5%	10%	12%
Butil-hidroxianisol	0,05%	0,05%	0,05%
Glicerol	5%	3%	3%
Petrolato branco	5%	3%	3%
Petrolato líquido	5%	3%	3%
Polissorbato 60	3%	5%	5%
Sorbato de potássio	0,18%	0,18%	0,18%
Água ultrapura	qsp	qsp	qsp

8.1 Material e método

No desenvolvimento das formulações, os adjuvantes foram separados e pesados de acordo com suas polaridades. Em um béquer, permaneceu os adjuvantes com características lipossolúveis: butil-hidroxianisol (Sigma-Aldrich®), álcool cetílico (Audaz®), petrolato branco (Tec-Lab®) e petrolato líquido (Columbia®), e em outro béquer, os adjuvantes com características hidrossolúveis: glicerol (Ely Martins®), sorbato de potássio (Rica Nata®), polissorbato 60 (LabSynth®), ácido clorídrico (LabSynth®) e água ultrapura (Milli-Q®). Todas as pesagens foram realizadas utilizando balança analítica (Mettler Toledo®). Ambos os béqueres foram submetidos ao banho de aquecimento até atingirem aproximadamente 75°C; este controle foi realizado utilizando dois termômetros

(Inconterm®, L-203). Em seguida, a fase hidrossolúvel foi vertida na fase lipossolúvel, mantendo a agitação constante até o total resfriamento da mistura. Após 24 horas, o pH, a densidade e a viscosidade das formulações foram avaliados, a fim de verificar se estas características eram semelhantes com as características observadas na formulação do produto acabado. Estas análises foram realizadas por meio dos mesmos ensaios descritos nos itens 6.1.2, 6.1.3 e 6.1.4, respectivamente. No entanto, os resultados da viscosidade foram submetidos à análise estatística (ANOVA), uma vez que visualmente a diferença neste parâmetro foi significativa, no que diz respeito à consistência das emulsões observadas.

8.2 Resultados

Os resultados da determinação do pH, D_r e viscosidade aparente mínima das formulações, encontram-se na Tabela 8. As curvas das viscosidades das formulações em função das taxas de cisalhamentos em comparação ao produto acabado estão representadas na Figura 4. Nas Tabelas 9 a 11, encontram-se os resultados da análise estatística (ANOVA), considerando nível de significância de 5%.

Tabela 8– Valores de pH, densidade relativa e viscosidade das formulações do placebo

Formulação	pH	D_r (g/mL)	Viscosidade
1	4,52	0,9854	1,31
2	4,81	0,9271	2,17
3	5,26	0,9165	2,27

Figura 4- Curvas das viscosidades em função das taxas de cisalhamentos das formulações 1, 2, 3 e do produto acabado

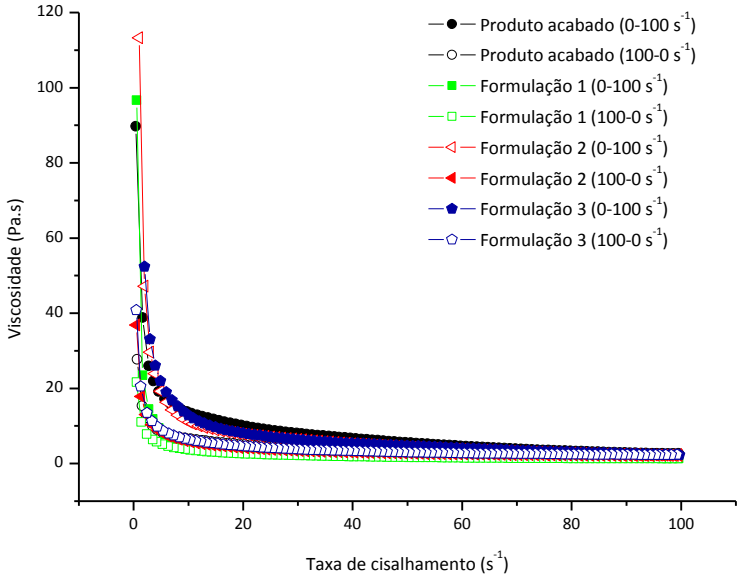


Tabela 9- Análise estatística (ANOVA) dos valores de viscosidade da formulação 1 em relação ao produto acabado

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	2,47812	1	2,47812	1610,04	2,30505E-06	7,70847
Dentro dos grupos	0,00616	4	0,00154			
Total	2,48428	5				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

Tabela 10- Análise estatística (ANOVA) dos valores de viscosidade da formulação 2 em relação ao produto acabado

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	0,26418	1	0,26418	296,388	6,67921E-05	7,70847
Dentro dos grupos	0,00357	4	0,00089			
Total	0,26775	5				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

Tabela 11- Análise estatística (ANOVA) dos valores de viscosidade da formulação 3 em relação ao produto acabado

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	0,1536	1	0,1536	1,575436	0,277746	7,708647
Dentro dos grupos	0,389987	4	0,097497			
Total	0,543587	5				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

8.3 Discussão

Os cremes consistem em formas farmacêuticas semissólidas obtidas por emulsão, formadas por uma fase lipofílica e uma fase hidrofílica, que podem conter um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base apropriada. Normalmente, são utilizados para aplicação externa na pele ou nas membranas mucosas. As emulsões, por sua vez, são formas farmacêuticas líquidas compostas por um ou mais princípios ativos, que consistem de um sistema de duas fases que envolvem pelo menos dois líquidos imiscíveis, na qual um líquido é disperso na forma de pequenas gotas (fase interna ou dispersa) através de outro líquido (fase externa ou contínua), estabilizados por um ou mais agentes emulsificantes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Nos produtos tópicos contendo esteroides, as emulsões do tipo óleo e água (O/A) são mais comuns e merecem destaque por apresentarem facilidade de aplicação, espalhabilidade sobre a pele e, principalmente, facilidade de veiculação, pois sua natureza anfifílica e de similaridade com a epiderme humana permitem elevada eficiência na veiculação do(s) princípio(s) ativo(s) envolvidos na formulação (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005).

Os fármacos contidos em uma formulação tópica são incorporados aos adjuvantes, que ao se combinarem, apresentam composição e consistência diversas. O tipo e concentração dos adjuvantes também vão determinar a natureza, espalhabilidade e o grau de penetrabilidade da fomulação (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). Deve-se levar em consideração que geralmente os elementos oleosos são muito variados e podem estar isolados ou em combinação, desempenhando muitas funções sobre o transporte do fármaco através da pele e a viscosidade do produto final (AULTON, 2005), bem como o glicerol, substância aquosa, que auxilia na permeação cutânea.

Seguindo este raciocínio, entre os adjuvantes presentes no creme dermatológico (Verutex®), o butil-hidroxianisol (BHA) e o sorbato de potássio, utilizados como antioxidante e conservante respectivamente, provavelmente não apresentariam interferência nos parâmetros analisados.

Os parâmetros de densidade e viscosidade poderiam ser mais afetados pela proporção utilizada do petrolato branco (vaselina sólida), petrolato líquido (parafina líquida, vaselina líquida, óleo mineral), glicerol (glicerina), polissorbato 60 (tween® 60) e, principalmente, pelo álcool cetílico, devido suas funções. Na Tabela 12, encontram-se todas as categorias funcionais dos adjuvantes utilizados no preparo da formulação placebo.

Tabela 12- Categorias funcionais dos adjuvantes presentes na formulação do creme dermatológico (Verutex®)

Adjuvante	Categoria funcional
Ácido clorídrico	Acidificante
Álcool cetílico	Emiliente, agente de aumento de viscosidade e emulsificante
Butil-hidroxianisol	Antioxidante
Glicerol	Conservante, co-solvente, emoliente, umectante, plastificante, solvente, edulcorante e agente de tonicidade
Petrolato branco	Emoliente e pomada base
Petrolato líquido	Emoliente, lubrificante e veículo oleaginoso
Polissorbato 60	Agente dispersante, emulsionante, tensoativo não iônico, agente de solubilização, de suspensão e agente molhante
Sorbato de potássio	Conservante

Fonte: ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009

Na análise das três formulações da amostra isenta da substância ativa (placebo), a formulação 1 apresentou D_r maior e viscosidade menor em comparação às do produto acabado, além disso, apresentou pH abaixo do considerado satisfatório (pH 5,35).

A formulação 2, por sua vez, apresentou D_r satisfatória, mas os valores de viscosidade e pH não foram adequados, por isso, na formulação 3, a concentração do ácido clorídrico e do álcool cetílico foram adequadamente ajustadas, alcançando pH e viscosidade estatisticamente iguais às do produto acabado (F calculado = 1,575436 foi menor que o F tabelado = 7,708647), ao nível de significância de 5%.

O tensoativo não-iônico álcool cetílico, por ser considerado um excelente emoliente, utilizado como agente estabilizante e doador de consistência para as emulsões cosméticas e farmacêuticas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), apresentou significativa contribuição na adequação do parâmetro de viscosidade. Como também pode ser observado, o aumento deste adjuvante (composto graxo) promoveu redução nas D_r das formulações 2 e 3, no entanto, ambas foram consideradas semelhantes à D_r do produto acabado (0,9349 g/mL).

Dessa forma, a formulação 3 apresentou todos os parâmetros (pH, D_r e viscosidade), próximos aos valores da amostra do creme dermatológico, sendo a escolhida como formulação placebo.

9 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO VISÍVEL

A espectrofotometria é um método de análise óptico muito utilizado em investigações biológicas e físico-químicas, que baseia-se na interação da substância com a energia radiante, resultando na absorção ou transmissão de luz pela substância química analisada. A absorção das radiações UV, Vis e infravermelho depende da estrutura molecular de cada substância (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1998).

A parte do espectro eletromagnético que fica entre 400 e 750 nm é a região do Vis. As ondas de luz com comprimento entre esses limites parecem coloridas quando a luz branca é transmitida através dela ou é refletida a partir dela. As moléculas que absorvem luz na região do Vis não possuem a cor correspondente ao comprimento de onda da luz absorvida, pelo contrário, há uma relação inversa entre a cor observada e a absorvida, conforme apresentado na Tabela 13. A cor observada é conhecida como a *cor complementar* da cor absorvida (HARRIS, 2001; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010).

Tabela 13- Relação entre a cor de luz absorvida e a cor observada do composto

Comprimento de onda da luz absorvida (nm)	Cor da luz absorvida	Cor observada
400	violeta	amarelo
450	azul	laranja
500	verde-azulado	vermelho
530	verde-amarelado	violeta-avermelhado
550	amarelo	violeta
600	vermelho-alaranjado	verde-azulado
700	vermelho	verde

Fonte: HARRIS, 2001, p. 425; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010, p. 393

A espectrofotometria na região do Vis é amplamente utilizada em determinações analíticas de formas farmacêuticas, e pode também ser aplicada na identificação e quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos nos laboratórios de CQ. A utilização desta técnica para a quantificação do AF em suspensão oral foi descrita em 1995 (VLADIMIROV et al., 1995), no entanto, nenhuma técnica para a determinação deste fármaco em creme dermatológico foi encontrado na literatura, o que torna o seu desenvolvimento inovador e economicamente mais viável, pois esta técnica exige equipamento de baixo custo, quando comparado aos instrumentos necessários para a realização das outras técnicas de identificação e quantificação, como é o caso do infravermelho e da CLAE.

9.1 Material e método

Como procedimento geral, foram transferidos com auxílio de micropipeta (Labmate soft®), 0,5 mL da solução do produto acabado (item 9.1.1) e 0,3 mL do reagente 1 (item 9.1.2) para balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, esta mistura foi aquecida a 70ºC em banho de aquecimento (Quimis®), durante 40 minutos, e após arrefecimento, o volume foi completado com o reagente 3 (item 9.1.3), para obter solução com concentração de 100 µg/mL.

O mesmo procedimento foi realizado para as soluções do placebo, preparadas da mesma forma que as soluções do produto acabado, no entanto, em todas as pesagens as quantidades correspondentes do AF que estariam presentes na formulação do creme dermatológico, foram descontadas. O procedimento utilizando solução do AF SQR foi realizado apenas no primeiro teste, para verificar o perfil de absorção do fármaco. No preparo desta solução, foram pesados 5,0 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com álcool etílico, para obter a solução estoque com concentração de 1,0 mg/mL.

As leituras foram realizadas, por meio de varredura (400–800 nm), utilizando espectrofotômetro UV/Vis, Shimadzu®, modelo UVmini-1240, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, contra branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

Os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica OHAUS®, modelo: DV215CD - Classe I, banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique®), peagômetro da modelo B474 (Micronal®), álcool etílico (LabSynth®), álcool metílico (LabSynth®), acetonitrila (J. T. Baker®), diclorometano (LabSynth®), hexano (Qhemis®), água ultrapura (Milli-Q®), ácido nítrico - HNO_3 (LabSynth®), ácido clorídrico – HCl a 37% (LabSynth®), ácido bórico - H_3BO_3 (LabSynth®), sulfato de sódio anidro - Na_2SO_4 (Ecibra®), cloridrato de hidroxilamina - $NH_2OH.HCl$ (F. MAIA Indústria e Comércio Ltda), hidróxido de sódio - NaOH (LabSynth®), nitrato férrico - $Fe(NO_3)_3$ (Vetec®) e papel de filtro Qualy® (J. Prolab).

9.1.1 Preparo das soluções do produto acabado

As soluções do produto acabado foram preparadas de várias formas, de acordo com cada teste realizado:

- ✓ *Teste 1:* em béquer de 25 mL, foram pesados 1,25 g do produto acabado (equivalem a 25,0 mg do AF), adicionados 23 mL de álcool etílico e colocado em banho ultrassônico. Após aproximadamente 20 minutos, esta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com álcool etílico, para obter solução estoque de

concentração de 1,0 mg/mL, e procedeu-se a filtração em frasco de vidro utilizando papel de filtro.

- ✓ *Teste 2:* o preparo da amostra foi realizado da mesma forma que no teste 1, no entanto, o solvente utilizado foi a acetonitrila.
- ✓ *Teste 3:* em béquer de 25 mL, foram pesados 2,0 g do produto acabado (equivalem a 40,0 mg do AF), adicionados 20 mL de solução de HCl 0,5 mol/L e colocado em banho ultrassônico. Após aproximadamente 10 minutos, esta solução foi transferida para funil de separação de 125 mL e o AF foi extraído com 4 × 10 mL de diclorometano, obtendo solução com concentração de 1,0 mg/mL. Na fase orgânica, foram adicionados 2,5 g de Na_2SO_4, e após 5 minutos de repouso, a solução foi filtrada e armazenada em frasco de vidro.
- ✓ *Teste 4:* em béquer de 25 mL, foram pesados 4,0 g do produto acabado (equivalem a 80,0 mg do AF), adicionados 20 mL de hexano e colocado em banho ultrassônico. Após aproximadamente 10 minutos, esta solução foi transferida para funil de separação de 125 mL e o AF foi extraído com 4 × 20 mL de solução tampão borato pH 8,4, obtendo solução com concentração de 1,0 mg/mL. Para o preparo da solução tampão borato pH 8,4, foram pesados 2 g de NaOH e 1,21 g de H_3BO_3, transferidos para balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água ultrapura. Posteriormente, o pH foi confirmado e ajustado para 8,4 com NaOH.
- ✓ *Teste 5:* a amostra foi preparada da mesma forma que no teste 3. No entanto, a fase orgânica, foi levada à capela para evaporação parcial do diclorometano. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de hexano e esta solução foi filtrada. O pó retido no papel de filtro foi solubilizado com 40 mL de álcool etílico, para obter solução estoque com concentração teórica de 1,0 mg/mL.

9.1.2 Preparo do reagente 1

O reagente 1 consistiu numa mistura de $NH_2OH.HCl$ e NaOH, ambos a 12,5%. Em béqueres de 25 mL, foram pesados 3,125g de $NH_2OH.HCl$ e de NaOH, adicionados 23 mL de álcool metílico, e colocados em banho ultrassônico. Após aproximadamente 15 minutos, estas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com álcool metílico. Posteriormente, em outro béquer de 25 mL, foram transferidos com auxílio de pipetas volumétricas, 5 mL de cada solução metanólica, e procedeu-se a filtração em frasco de vidro utilizando papel de filtro.

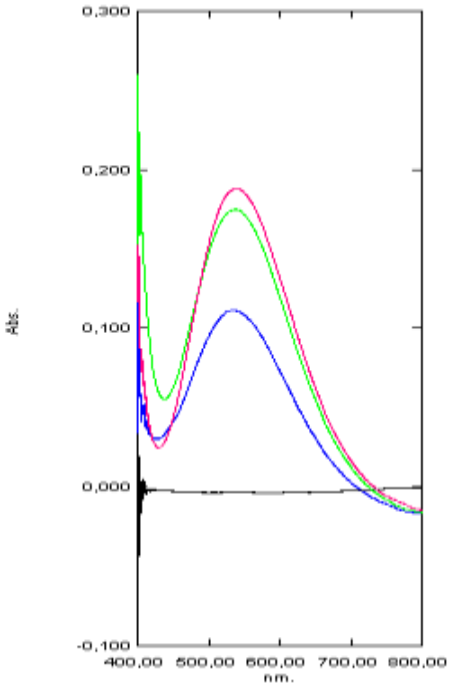
9.1.3 Preparo do reagente 3

Em balão volumétrico de 25 mL, foram transferidos 0,3 mL de HNO_3 e 1 mL do reagente 2, e o volume foi completado com álcool etílico. Para o preparo do reagente 2, foram pesados em béquer de 25 mL, 1,25 g de $Fe(NO_3)_3$, adicionados 2,5 mL de água ultrapura e de HNO_3. Em seguida, esta mistura foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com álcool etílico.

9.2 Resultados

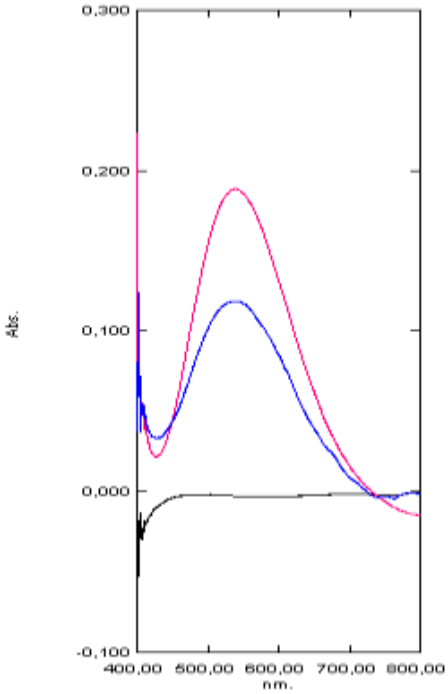
Os espectros de absorção na região do Vis, obtidos nos testes 1 a 5, estão sobrepostos nas Figuras 5 a 9, respectivamente. Em todos os testes a concentração final do AF, após o procedimento foi de 100 µg/mL.

Figura 5- Espectro de absorção na região do Vis do AF SQR, produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 1



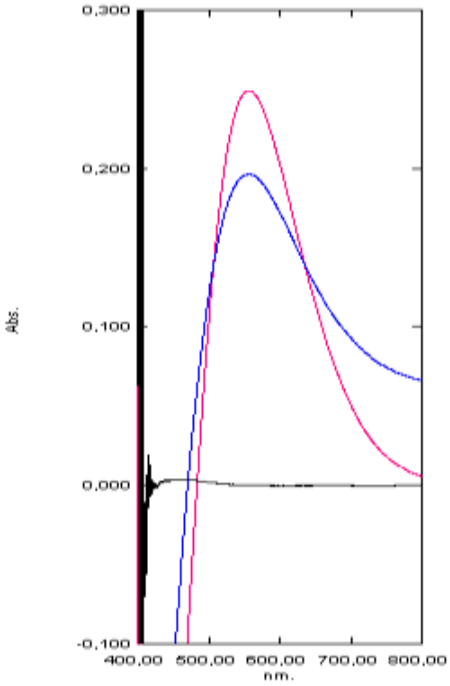
Verde: ácido fusídico substância química de referência. Rosa: produto acabado. Azul: placebo. Preto: branco

Figura 6- Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 2



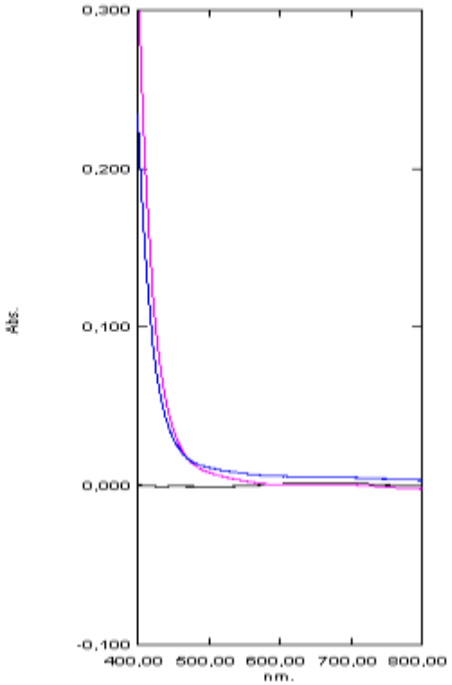
Rosa: produto acabado. Azul: placebo. Preto: branco

Figura 7- Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 3



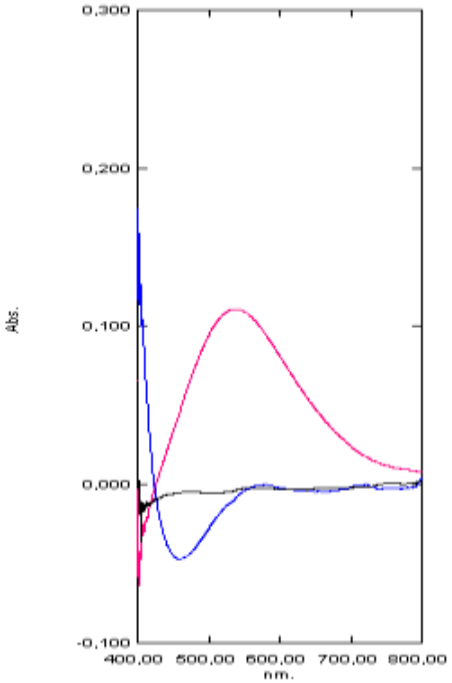
Rosa: produto acabado. Azul: placebo. Preto: branco

Figura 8- Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 4



Rosa: produto acabado. Azul: placebo. Preto: branco

Figura 9- Espectro de absorção na região do Vis do produto acabado, placebo e branco, obtidos a partir do teste 5



Rosa: produto acabado. Azul: placebo. Preto: branco

9.3 Discussão

Os primeiros métodos colorimétricos desenvolvidos para a quantificação do AF não foram suficientemente seletivos, pois algumas impurezas, como o 3-ácido cetofusídico e o ácido 16β-desacetilfusídico, interferiram na reação comprometendo a análise. Com o objetivo de minimizar e, até mesmo, eliminar os interferentes, foi desenvolvido em 1974, um método geral para a determinação de derivados de ácidos orgânicos, tais como ésteres, amidas, imidas cíclicas e lactonas. A reação basicamente consiste na formação de um complexo entre a substância e os íons férrico, após sua conversão quantitativa em ácido hidroxâmico (PESEZ; BARTOS, 1974).

No caso do AF, para que ocorra esta conversão, é preciso que a solução esteja em meio alcalino e permaneça a 70°C durante 40 minutos, devido ao impedimento estereoquímico da molécula. Após este procedimento, a solução ao ser colocada em meio ácido contendo íons férrico, ocorre imediatamente a formação do complexo ácido acetilhidroxâmico de ferro III - AcHA-Fe (III), conforme demonstrado no esquema na Figura 10. Este complexo é responsável pela coloração púrpura (Figura 11) e apresenta absorção na região do Vis, em aproximadamente 524 nm (VLADIMIROV et al., 1995).

Figura 10– Formação do complexo ácido acetilhidroxâmico de ferro III a partir do AF

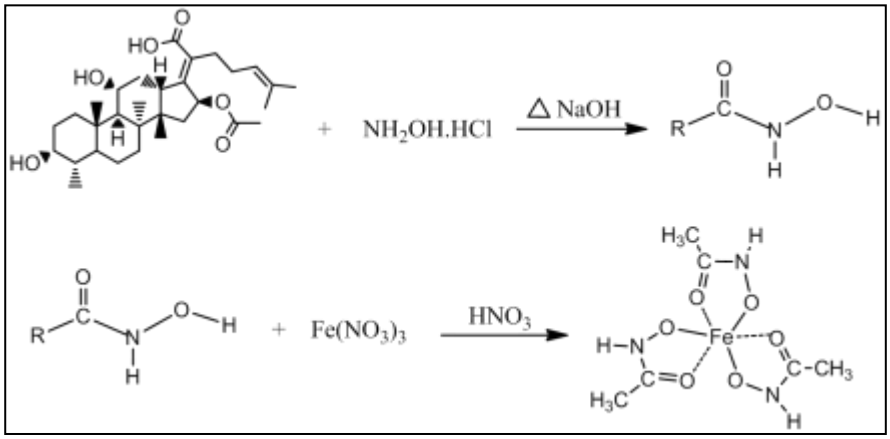
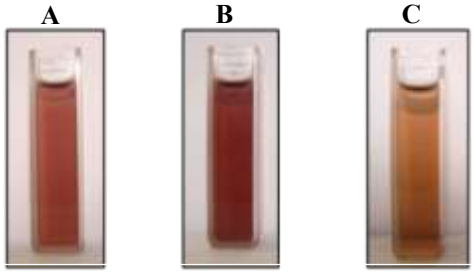


Figura 11- Coloração púrpura, característica da reação de identificação do AF, nas soluções do AF SQR, produto acabado e placebo



(A) ácido fusídico substância química de referência (B) produto acabado (C) placebo

A coloração púrpura alcança intensidade máxima imediatamente em temperatura ambiente, e permanece estável por, pelo menos, 4 horas. A estabilidade do complexo formado, depende principalmente, da concentração dos íons férrico e do pH da mistura final (NOTARI, 1969). Assim sendo, sob estas condições, as impurezas ou produtos de degradação não devem interferir na reação química, tornando possível a identificação e quantificação do AF nas formulações, sem prévia separação (VLADIMIROV et al., 1995).

À princípio no preparo das amostras do produto acabado, optou-se por um método de extração simples, utilizando banho ultrassônico. Nos últimos anos, alguns artigos (BENDICHO et al., 2012; CAPELO; MADURO; VILHENA, 2005) e livros (CAPELO-MARTINEZ, 2009; CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007) foram publicados sobre a versatilidade do uso do ultrassom. O ultrassom pode ser utilizado tanto em procedimentos gerais, como na desgaseificação e limpeza de materiais, como também para fins mais específicos, como em procedimentos de extração, derivatização, homogeneização e emulsificação (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007).

O pré-tratamento de amostras assistida por ultrassom é claramente "mais verde" do que os métodos clássicos que utilizam grandes quantidades de solventes e longos tempos de operação, além da complexidade da maioria desses métodos. Dessa forma, sua implantação nos procedimentos de extração é muito importante, principalmente quando se pensa em química analítica verde (GUARDIA; ARMENT, 2010; GUARDIA; GARRIGUES, 2011; GUARDIA; GARRIGUES, 2012).

Nesse sentido, a utilização do ultrassom no pré-tratamento de amostras é considerado um recurso ecológico, de baixo custo, eficiente, que utiliza energia limpa e que tem melhorado drasticamente muitos protocolos, devido aos princípios focados na aceleração, simplificação, miniaturização e automação, que aumenta consideravelmente a produtividade e o rendimento no procedimento de extração. Para isto, é necessário a utilização de um solvente extrator, em que a substância de interesse apresente solubilidade adequada (BENDICHO et al., 2012).

No teste 1, o solvente de escolha foi o álcool etílico, por ser de baixo custo e de baixa toxicidade. No teste 2, foi utilizado a acetonitrila como solvente extrator, uma vez que Ankam e colaboradores (2010) relataram que os adjuvantes presentes na formulação do creme não eram solúveis neste solvente. No entanto, na Figura 6, pode ser observado que os adjuvantes presentes na matriz do creme foram solúveis, apresentando espectro de absorção praticamente igual ao espectro do produto acabado, o que inteferiu na identidicação do fármaco.

A partir destas conclusões, foi necessário utilizar procedimentos de preparo de amostra considerados mais seletivos, desde que fossem de fácil execução e de baixo custo. Sendo assim,

optou-se pela extração líquido-líquido (ELL). A ELL, também conhecida como extração por solvente ou partição, consiste basicamente na transferência de um soluto solubilizado em um solvente, para outro solvente em que o soluto apresente maior afinidade. Os dois solventes escolhidos devem ser imiscíveis, para que sejam formadas duas fases: uma chamada aquosa e outra orgânica. Normalmente, são utilizados à água e um solvente orgânico (éter etílico, hexano, éter de petróleo, diclorometano, clorofórmio). O solvente que tem densidade menor que a da água (1 g/mL) permanece na parte superior na separação, e no caso da utilização de solvente com densidade maior que a da água, o contrário é observado (LANÇAS, 2009; VOGEL, 1971).

A ELL é a técnica analítica mais utilizada no preparo de amostras complexas (POOLE; POOLE, 1991) e pode ser de dois tipos: contínua ou descontínua. Na ELL descontínua, utiliza-se funil de separação, em que ambos os solventes são adicionados. Com a agitação do funil, o soluto passa para a fase que contém o solvente de maior afinidade. Este tipo de técnica é indicada quando existe grande diferença de solubilidade do soluto nos dois solventes. Na ELL contínua, o solvente orgânico passa continuamente sobre a solução contendo o soluto, levando parte deste consigo, até o balão de aquecimento, onde o soluto é concentrado. Este tipo de extração é amplamente utilizada quando não existe muita diferença de solubilidade entre o soluto em ambos os solventes (LANÇAS, 2009).

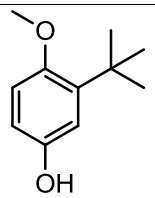
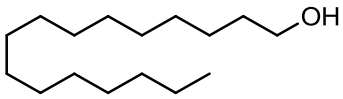
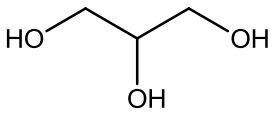
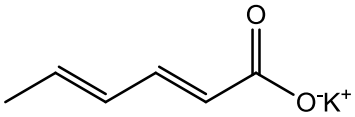
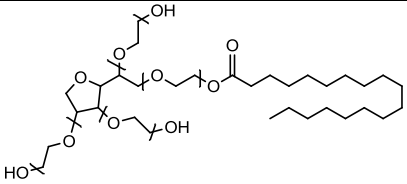
De acordo com os conceitos apresentados, nos testes 3 a 5 foram realizados a ELL do tipo descontínua. No teste 3, assim como nos testes 1 e 2, ocorreram interferências, pois as solubilidades dos adjuvantes presentes na formulação de creme são muito semelhantes às do AF, impossibilitando a identificação confiável do fármaco (Quadro 1).

A extração realizada no teste 4 foi baseada nos estudos de Hassan, Amer e Amer (1987), na qual utilizou solução tampão borato como solvente extrator. Porém, neste procedimento, o perfil espectral característico do AF não foi observado (Figura 8).

No teste 5 foi realizado basicamente o mesmo procedimento do teste 3, mas acrescentando o processo de precipitação em hexano, pois sabe-se que o AF é insolúvel neste solvente orgânico (O'NEIL, 2006). Como pode ser observado na Figura 9 o resultado foi alcançado, no entanto, ocorreram perdas durante este procedimento, o que inviabiliza a utilização desta técnica de extração para a quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico. Por outro lado, a identificação do fármaco pode ser realizada de forma confiável, pois a reação final apresentou coloração púrpura característica, o AF apresentou absorção máxima no comprimento de onda específico (524 nm) sem interferência dos adjuvantes presentes na matriz da formulação. Além disso, este método apresentou vantagem em relação ao método desenvolvido por Vladimirov e

colaboradores (1995), pois o $Fe(NO_3)_3$ utilizado neste procedimento é economicamente mais viável e, principalmente, não apresenta característica explosiva como o perclorato férrico, o que promove maior segurança no procedimento de execução da técnica e possibilita esta substituição nas análises de identificação e quantificação do AF em outras formas farmacêuticas.

Quadro 1- Estruturas químicas e solubilidades dos adjuvantes presentes na formulação do creme dermatológico (Verutex®)

ADJUVANTE	ESTRUTURA QUÍMICA	SOLUBILIDADE
Butil-hidroxianisol		Solúvel em álcool etílico 95%, álcool metílico, éter, tolueno, acetona, benzeno, óleos fixos e óleo mineral. Praticamente insolúvel em água, glicerina e propilenoglicol.
Álcool cetílico		Solúvel em álcool etílico 95% e éter. Praticamente insolúvel em água. Miscível quando fundido com gorduras e parafina.
Glicerol		Solúvel em álcool etílico 95%, álcool metílico e água. Ligeiramente solúvel em acetona e éter. Praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, triclorometano e óleos.
Petrolato líquido e Petrolato branco	HIDROCARBONETOS > C_{25}	Solúvel em clorofórmio, éter e hidrocarbonetos. Moderadamente solúvel em álcool etílico. Praticamente insolúvel em água.
Sorbato de potássio		Solúvel em álcool etílico e propilenoglicol. Pouco solúvel em acetona. Muito pouco solúvel em clorofórmio, óleo de milho e éter. Insolúvel em benzeno.
Polissorbato 60		Solúvel em álcool etílico, água, álcool isopropílico. Insolúvel em óleo mineral e óleos vegetais.
Ácido clorídrico	HCl	Solúvel em álcool etílico, álcool metílico e éter dietílico. Miscível em água.

Fonte: ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009

10 CROMATOGRAFIA

A cromatografia consiste em um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre um sistema heterogêneo bifásico, composto pela fase estacionária (FE) e pela fase móvel (FM) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

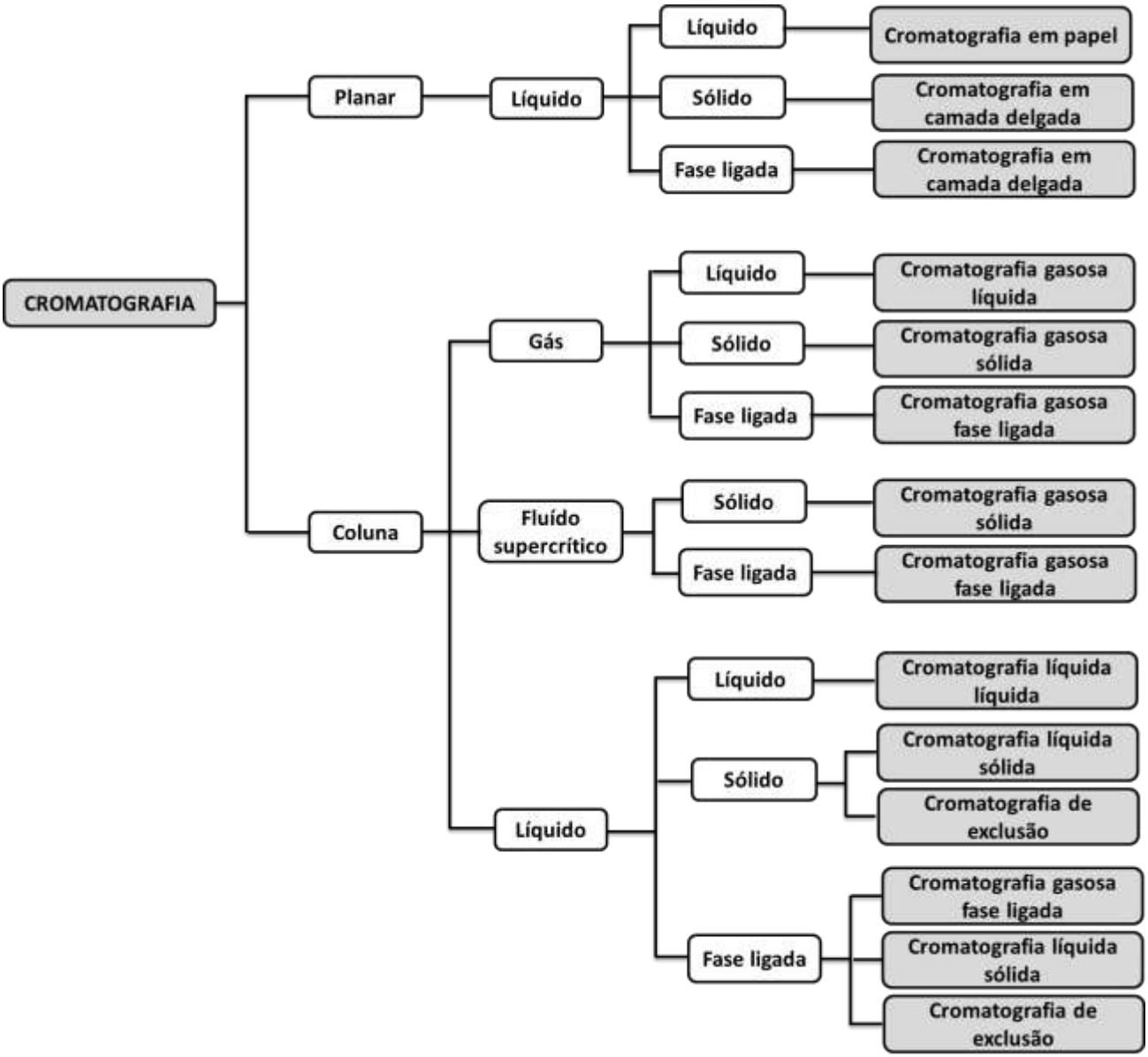
A técnica cromatográfica foi sistematizada no início do século XX pelo botânico russo Mikhail Tswett, ao descrever suas experiências na separação de pigmentos coloridos presentes no extrato de folhas. Neste estudo, a passagem de éter de petróleo através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio, à qual foi adicionado o extrato, levou à separação dos componentes em faixas coloridas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Ainda que outros pesquisadores na mesma época tenham desenvolvido e publicado trabalhos envolvendo separações similares, Tswett foi o primeiro a compreender e interpretar o processo cromatográfico assim como hoje é aceito, empregando pela primeira vez, o termo cromatografia. O nome deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrita), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Entre os métodos modernos de análise, a técnica cromatográfica tem sido aplicada em milhares de laboratórios no mundo para separação, identificação e quantificação de diferentes espécies químicas, bem como para purificação de compostos, por meio da separação de substâncias indesejáveis (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

São vários os critérios utilizados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo mais comuns aqueles relacionados à técnica empregada, aos mecanismos de separação envolvidos e aos diferentes tipos de fases utilizadas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A Figura 12 representa um esquema geral da classificação das técnicas cromatográficas.

Figura 12- Classificação das técnicas cromatográficas



Fonte extraída e adaptada: COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006, p. 24

10.1 Cromatografia em camada delgada

A CCD foi reintroduzida em 1938 por Izmailov e Schraiber com intuito de analisar produtos farmacêuticos. No entanto, somente a partir de 1960, passou a ser amplamente utilizada para tal finalidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Esta técnica consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retida sobre uma superfície plana. Pode ter aplicação analítica ou preparativa, cuja escala depende da espessura da camada de adsorvente e da quantidade de amostra aplicada durante a análise (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Porém, ao utilizar FE tratadas pode ocorrer também separação por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrófilas. O mercado dispõe de uma grande variedade de adsorventes para fins cromatográficos, os quais podem ser adquiridos para confecções de placas ou como placas pré-fabricadas. A sílica gel é a FE mais utilizada em CCD, seguida pela alumina, pela terra diatomácea, pela celulose e pela poliamida (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A sílica apresenta caráter fracamente ácido e geralmente é utilizada na separação de aldeídos, cetonas, fenóis, aminoácidos, alcaloides e ácidos graxos. A alumina pode apresentar características alcalina, neutra ou ácida e, geralmente, é empregada na separação de compostos lipofílicos. A terra diatomácea é um adsorvente neutro amplamente utilizado como suporte nas separações por partição, é menos adsorvente e apresenta menor poder de resolução que a sílica e alumina. A celulose tem sido empregada como suporte da FE líquida em cromatografia por partição ou troca iônica, e é utilizada na separação de ácidos carboxílicos, aminoácidos, carboidratos, cátions inorgânicos e fosfatos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A poliamida, por sua vez, é utilizada na separação de ácidos carboxílicos e fenóis. Em geral, a separação dos solutos ocorre por meio da competição pela formação de ligações de hidrogênio com o adsorvente e a FM (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A CCD é uma técnica amplamente utilizada na purificação de substâncias, identificação de frações coletadas em cromatografia líquida clássica e no acompanhamento de reações orgânicas, devido às múltiplas vantagens que oferece, tais como, método visual de fácil compreensão e execução, separação em breve espaço de tempo, alta reprodutibilidade, versatilidade e custo acessível (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998), além do baixo consumo de solventes e do volume reduzido de resíduos gerados ao meio ambiente.

Na literatura, foram encontrados apenas dois métodos descritos que utilizam a CCD na determinação do AF (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; KRZEK et al., 2006). Entre estes dois métodos, a FM desenvolvida por Krzek e colaboradores, em 2006 (hexano:acetato de etila:ácido acético, 60:30:10, v/v/v) é menos tóxica, no entanto, ainda não é considerada ideal quando se pensa em química “verde”. Nesse sentido, foi proposto o desenvolvido de uma FM que apresentasse vantagens, como maior simplicidade e, principalmente, menor toxicidade dos solventes orgânicos utilizados.

10.1.1 Material e método

Na execução do ensaio, 30 mL da FM (item 10.1.1.1) foram transferidos para cuba cromatográfica, que permaneceu durante 30 minutos, até sua completa saturação. Alíquotas de 10 µL das soluções do AF SQR e produto acabado, na concentração de 1,0 mg/mL foram aplicadas com auxílio de microsseringa de vidro (Hamilton®) na cromatoplaca TLC sílica gel 60 F_{254} (Merck®) com dimensões de 11,0 x 5,0 cm, previamente ativadas em estufa modelo 702.780 (Quimis®) a 105 ºC por 1 hora.

Para o preparo da solução do AF SQR, foram pesados 5,0 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com álcool metílico. No caso da solução do produto acabado, foram pesados em béquer de 10 mL, 500,0 mg do creme (equivalem a 10,0 mg do AF), adicionados 8 mL de álcool metílico e colocado no banho ultrassônico (modelo USC2800A, Unique®). Após aproximadamente 10 minutos, esta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com álcool metílico, e procedeu-se a filtração em frasco de vidro utilizando papel de filtro Qualy® (J. Prolab).

Após aplicação das soluções, a cromatoplaca foi colocada na cuba para eluição dos compostos. Após a FM atingir o percurso de 9 cm, esta foi retirada para secagem a temperatura ambiente, e submetida ao procedimento de revelação. A revelação foi realizada por duas maneiras: primeiramente, as manchas da cromatoplaca foram observadas em câmara de luz UV (254 nm) e em seguida, a cromatoplaca foi submetida a vapores de iodo (Synth®), até o aparecimento total das manchas.

Os valores dos fatores de retenção das manchas do AF presentes na SQR e no produto acabado foram calculados de acordo com a Equação 5 e comparados. Posteriormente, as manchas também foram comparadas em relação a forma, posição, tamanho e coloração.

$$R_f = \frac{d_s}{d_{fm}} \qquad \text{Equação 5}$$

Em que:

R_f: Fator de retenção

d_s: Distância percorrida pelo AF SQR ou AF presente na amostra do produto acabado

d_{fm}: Distância percorrida pela fase móvel desde o ponto de aplicação

Nesta análise, os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo®), álcool metílico (Synth®), hexano (Qhemis®), acetato de etila (Synth®) e ácido acético (Qhemis®).

10.1.1.1 Fases móveis

FM 1: água:álcool etílico (60:40, v/v), pH 2,5 ajustado com ácido acético

FM 2: água:álcool metílico (60:40, v/v)

FM 3: água:acetato de etila:álcool etílico (20:20:60, v/v/v)

FM 4: *n*-butanol:água:ácido acético (85:10:5, v/v/v)

FM 5: hexano:acetato de etila (65:35, v/v)

FM 6: hexano:álcool etílico (50:50, v/v)

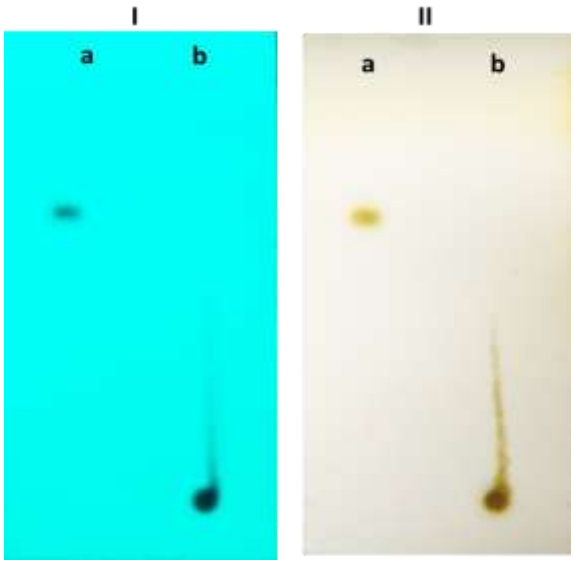
FM 7: acetato de etila:álcool etílico (60:40, v/v)

10.1.2 Resultados e discussão

Nas Figuras 13 a 19, encontram-se as fotografias das cromatoplacas do AF SQR e do produto acabado. Na Figura 20 encontram-se as fotografias das cromatoplacas do AF SQR, produto acabado e placebo, referentes ao teste de identificação.

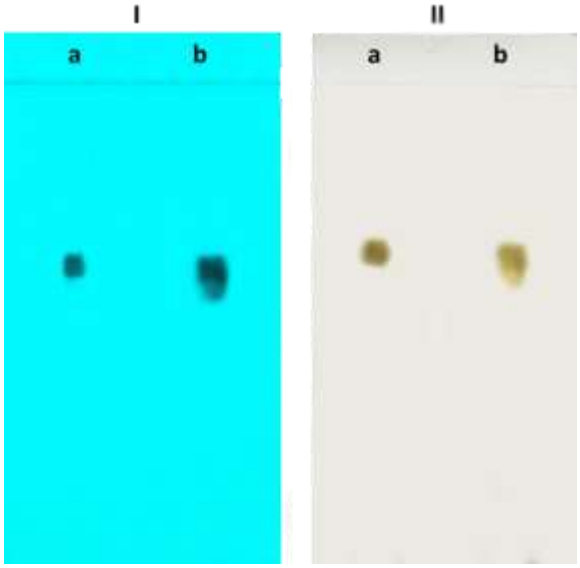
A solução do placebo foi preparada da mesma forma que do produto acabado (item 10.1.1), no entanto, a quantidade correspondente ao AF que estaria presente na formulação (10 mg), foi descontada. Todas as cromatoplacas foram reveladas em câmara UV (254 nm) e em vapores de iodo.

Figura 13- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: água e álcool etílico (60:40, v/v), pH 2,5 ajustado com ácido acético



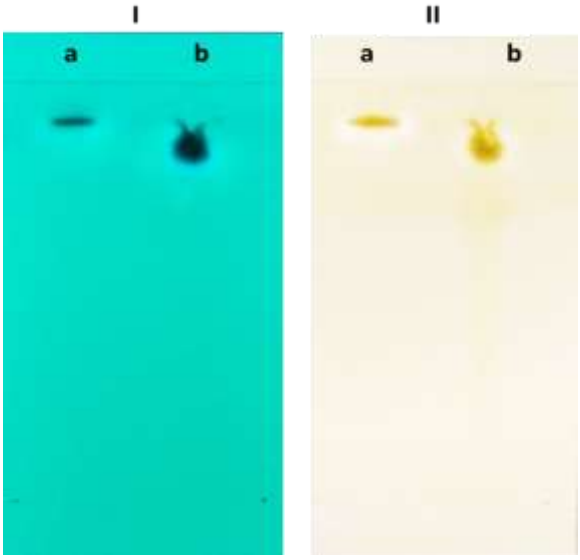
(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 14- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: água e álcool metílico (60:40, v/v)



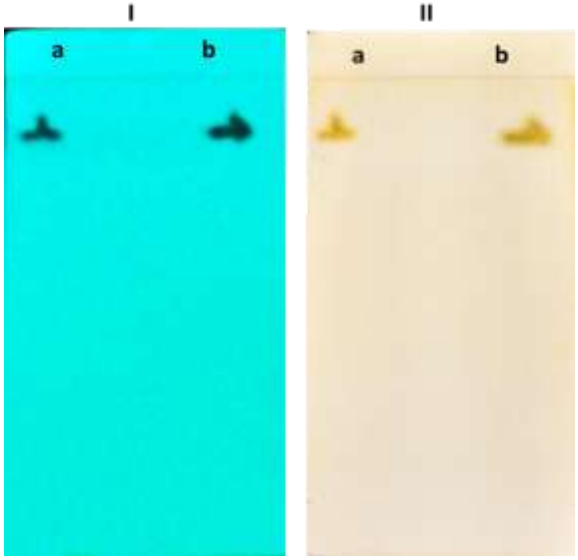
(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 15- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: água, acetato de etila e álcool etílico (20:20:60, v/v/v)



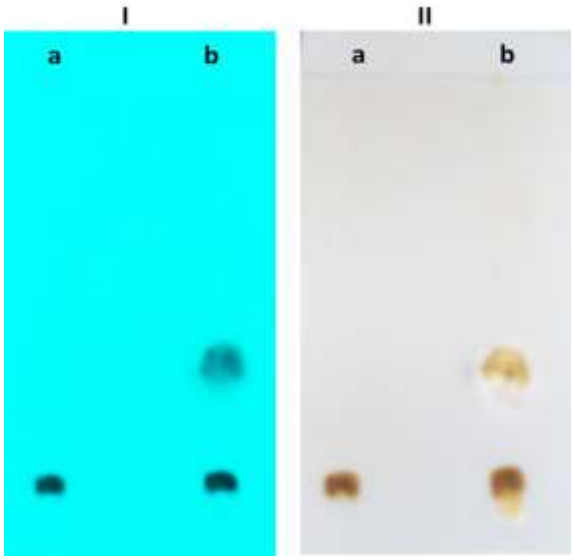
(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 16- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: *n*-butanol, água e ácido acético (85:10:5, v/v/v)



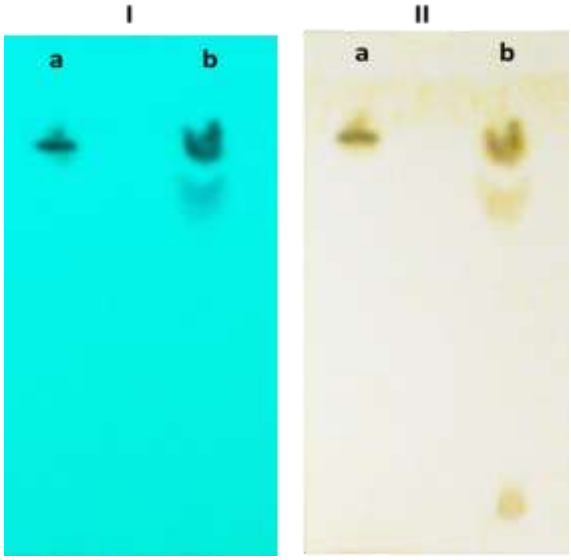
(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 17- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: hexano e acetato de etila (65:35, v/v)



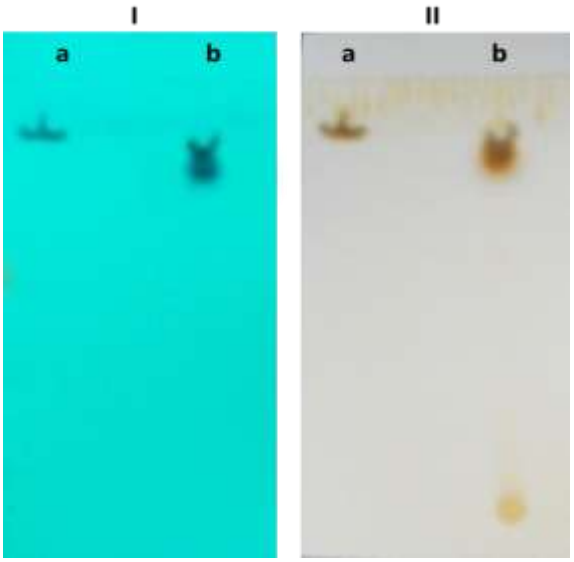
(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 18- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: hexano e álcool etílico (50:50, v/v)



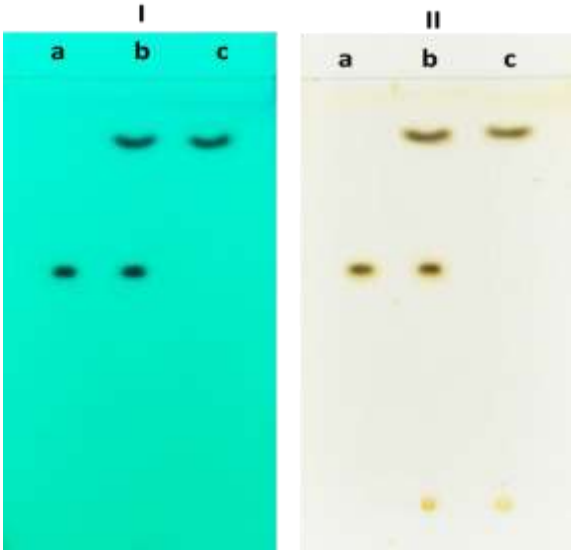
(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 19- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: acetato de etila e álcool etílico (60:40, v/v)



(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado

Figura 20- Cromatoplacas reveladas em luz UV a 254 nm (I) e vapores de iodo (II), da FM: hexano, acetato de etila e ácido acético (60:30:10, v/v/v)



(a) ácido fusídico substância química de referência
(b) produto acabado (c) placebo

Como pode ser observado nas Figuras 13 a 19, todas as FM testadas não foram adequadas para identificar o AF na forma farmacêutica de creme dermatológico. Por este motivo, os fatores de renteção não foram calculados e optou-se por reproduzir o método desenvolvido por Krzek e colaboradores (2006), como forma de identificação do fármaco no produto acabado (Figura 20). Este método demonstrou ser adequado e reprodutível, uma vez que o valor do fator de retenção calculado para o AF (0,54) aproximou-se do valor declarado pelo autor (0,53). Além disso, os resultados indicaram que o AF é facilmente identificável, apresentando mancha característica e intensa de coloração roxa, em câmara de UV 254 nm e marrom em vapores de iodo.

10.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Na década de 1960, os pesquisadores Karr, Jentoft, Gouwn, Huber, Hulsman, Snyder e Kirkland foram os responsáveis pelo desenvolvimento da CLAE (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), considerada na época e até hoje, como uma técnica de separação inovadora (RAMBLA-ALEGRE et al., 2011), que pode ser utilizada tanto para fins qualitativos (identificação), como para a quantificação do(s) analito(s) de interesse presentes em produtos acabados e/ou em matérias-primas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LANÇAS, 2009; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

O cromatógrafo a líquido de alta eficiência é composto basicamente por seis componentes:

- ✓ *Reservatório do solvente:* normalmente, são utilizados frascos de vidro âmbar para acondicionar a FM, também chamado de eluente. O solvente ou a mistura de solventes utilizado na preparação da FM devem apresentar elevado grau de pureza (grau cromatográfico ou HPLC), alta capacidade de solubilizar os componentes da amostra, compatibilidade com sistema de detecção, elevado ponto de ebulição e força de eluição (ε) e seletividade (α) adequadas.
- ✓ *Bomba de alta pressão:* permite vencer a resistência à passagem da FM exercida pelas partículas da FE, propiciando vazão contínua da FM a todo o sistema cromatográfico, sem pulsos e com alta reprodutibilidade, precisão e exatidão. As partes da bomba que entram em contato com a FM são produzidas de aço inoxidável 316 (material inerte a praticamente todos os solventes orgânicos). Os canais da bomba podem ser compostos por um sistema isocrático, que apresenta um único canal de solvente, ou pode ser constituído por um sistema gradiente, composto por mais de um canal, que pode ser binário, ternário ou quaternário.
- ✓ *Sistema de introdução da amostra (injetor):* existem dois tipos de injetores, os automáticos e os manuais. Entre os manuais, o mais comum é a válvula de seis pórticos. Esta válvula possui seis orifícios conectados internamente e uma alça de amostragem (*loop*), que normalmente é um tubo de aço inoxidável 316. O comprimento e o diâmetro interno deste tubo vão definir o volume da alça a ser empregado na introdução da amostra.
- ✓ *Coluna cromatográfica:* é considerada o coração do sistema cromatográfico, pois é nela que ocorrem as separações. É composta por um tubo de aço inoxidável 316, preenchido com a FE. Em suas extremidades encontram-se os *frits*, que funcionam como filtros, que são de aço inoxidável e de pequena porosidade. A conecção da coluna cromatográfica com o injetor e detector ocorre por meio do *end fittings*, dispositivo que pode ser de aço inoxidável ou *peek*.
- ✓ *Detector:* é um transdutor que converte o sinal físico ou químico do analito eluído, em sinal elétrico, transformando-o em pico cromatográfico. Existem vários tipos de detectores e, independente do tipo utilizado, não podem promover a destruição do soluto e devem apresentar as seguintes características: alta sensibilidade e reprodutibilidade, baixo limite de detecção e de ruído, resposta rápida e linear as alterações de concentrações dos solutos, mudanças na FM e na temperatura.
- ✓ *Sistema de dados:* são compostos por *softwares*, utilizados para controlar todas as operações do cromatógrafo, possibilitando análise adequada.

Além destes componentes, o sistema cromatográfico pode apresentar pré-coluna ou coluna de guarda, desgaseificador e forno de coluna. A pré-coluna é instalada entre o injetor e a coluna, cuja função é remover partículas que teriam forte interação com a FE, ou substâncias que possam precipitar quando em contato com a FM ou FE. O desgaseificador é responsável pela eliminação de ar dissolvido no líquido, que pode promover a formação de cavidade ou bolhas de ar, por meio do precesso denominado cavitação. Este fenômeno causa prejuízos na eficiência cromatográfica, devido ao aumento do ruído na linha de base. Sistemas cromatográficos que apresentam este componente dispensam a desgaseificação/desaeração prévia. O forno de coluna é normalmente utilizado quando o(s) analito(s) de interesse apresentam solubilidade em temperaturas específicas, que devem ser rigorosamente controladas (ETTRE, 1993; LANÇAS, 2009; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Em CLAE, o modo de eluição da FM pode ser realizada de forma isocrática ou em gradiente. No modo isocrático, a FM permanece em proporção constante durante toda a análise, ou seja, a polaridade da FM não se altera ao longo do tempo. É indicada na análise de compostos específicos. No modo gradiente, a proporção da FM se altera ao longo do tempo, e é indicada na separação de analitos com ampla faixa de fatores de retenção, por otimizar o tempo de análise (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Neste trabalho foi utilizado a cromatografia líquida em fase reversa, cuja FE escolhida foi a octadecilsilano (C_{18}), por ser de fácil acessibilidade nos laboratórios e também por apresentar capacidade de separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e estruturas químicas. Na cromatografia de fase reversa, o fato da FE ser apolar, a FM normalmente é composta por solventes polares, sendo a água considerada como solvente base (SCHLUTER, 1999). O aumento da porcentagem dos solventes orgânicos, chamados modificadores, promove considerável aumento na força de eluição. Quanto maior for a força de eluição, menor será a retenção do analito na coluna e, consequentemente, menor vai ser o fator de retenção, pois a força de eluição e o fator de retenção são inversamente proporcionais (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A CLAE é considerada um método analítico de alto custo, tanto pelo material de consumo que se faz de solventes com alto grau de pureza (grau HPLC), como pelo custo do próprio equipamento. Mas, mesmo assim, ainda é a técnica de escolha e ocupa lugar de destaque entre os métodos modernos de análise, devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das substâncias químicas e de seus produtos de degradação, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas, denominada de técnicas hifenadas. Além destas vantagens, as análises por CLAE são normalmente realizadas numa escala de tempo de poucos minutos, com alta

resolução, eficiência e sensibilidade (JEFFERY et al., 1992; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Na literatura, existem alguns métodos desenvolvidos que utilizam a CLAE para a identificação e quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico (ANKAM et al., 2010; BYRNE; VELASCO-TORRIJOSB; REINHARDT, 2014; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010; GOSWAMI; GUPTA; JOGIA, 2013; HONG; RONG, 2012; KOK-KHIANG; TZE-FUNG, 2000; SHAIKH et al., 2009). No entanto, alguns destes métodos utilizam solução tampão como constituinte da FM. Este tipo de solvente promove desvantagens ao método, uma vez que os sais que compõem estas soluções tendem a se adsorverem na coluna, podendo causar entupimento e, consequentemente, aumento da pressão do sistema cromatográfico, além disso, o armazenamento mesmo sob refrigeração, pode ocasionar o aparecimento de fungos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; WATSON, 2005), em outros métodos, o tempo de corrida, o volume de injeção, a vazão da FM e a concentração do fármaco são consideravelmente elevados. Nesse sentido, foi proposto o desenvolvimento de um novo método analítico, buscando melhorar a composição da FM, diminuir o desgaste e aumentar o tempo de vida útil da coluna cromatográfica, além de reduzir o tempo de análise, minimizando a geração de resíduos ao meio ambiente.

10.2.1 Material e método

Na análise por CLAE todas as soluções utilizadas foram preparadas e previamente filtradas em membrana com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Minisart®). As FM utilizadas foram compostas por diferentes proporções de solvente orgânico grau HPLC (acetonitrila ou álcool metílico ou etílico - J. T. Baker®) e de água ultrapura (Milli-Q®), cujos pHs foram ajustados com ácido acético (J. T. Baker®), utilizando peagômetro digital, modelo B474 (Micronal®). Posteriormente, cada solvente foi filtrado em membrana de *nylon* (0,45 µm), sob vácuo, armazenado em frasco de vidro de 2 L e degaseificado em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique®), durante aproximadamente 20 minutos. As proporções dos solventes de cada FM foram ajustadas no *software* Empower®, antes de iniciar as análises.

Nas análises foi empregado o cromatógrafo a líquido Waters®, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, EUA), composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, conectado a detector UV/Vis Waters 2487, injetor manual 7725i com *loop* de 20 µL (Rheodyne Breeze, CA, EUA) e *software* Empower. A separação cromatográfica foi realizada por meio de condições isocráticas, utilizando coluna analítica Zorbax Eclipse XDB C_{18} Agilent® (4,6 x

250 mm, 5 µm) e pré-coluna Metaguard Polaris 4,6 mm 5U C_{18} PTC – Agilent®. Os resultados foram analisados por meio do *software* Microsoft Excel (2010).

A pureza do pico cromatográfico do AF foi avaliada no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, Departamento de Química Orgânica, laboratório do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, no cromatógrafo a líquido Shimadzu®, equipado com duas bombas (LC-10AD), injetor automático (SIL-10AF), detector DAD (SPD-M10A-VP), módulo de comunicação CBM-20ª e *software* LCSolution.

Nos estudos de degradação forçada, foi utilizado solução de ácido clorídrico (Qhemis®) a 0,1 mol/L e 0,01 mol/L, solução de hidróxido de sódio (Cinética®) a 0,1 mol/L, 0,01 mol/L e 0,001 mol/L e solução de peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina®) a 3%.

Os seguintes materiais também foram utilizados: banho de aquecimento modelo Q334M (Quimis®), balança analítica OHAUS®, modelo: DV215CD - Classe I, câmara UV com espelhos em seu interior, equipada com lâmpada UVC (254 nm), seringa de vidro Hamilton®, micropipeta (Labmate soft®) e papel de filtro Qualy® (J. Prolab).

10.2.1.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Ensaios preliminares foram realizados com o objetivo de obter um método cromatográfico confiável, rápido, com alta sensibilidade e eficiência adequada. A coluna cromatográfica, pré-coluna, volume de injeção, modo de eluição da FM e temperatura de análise, foram previamente determinados. Na Tabela 14, estão dispostos os ensaios que foram realizados para selecionar os outros parâmetros cromatográficos que não foram estabelecidos, tais como, composição, vazão e pH da FM.

As análises foram realizadas utilizando solução do AF SQR na concentração de 500,0 µg/mL e comprimento de onda de 220 nm. Para o preparo desta solução foram pesados 12,5 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com o solvente orgânico que constituía a FM a ser testada. O comprimento de onda foi determinado por varredura utilizando espectrofotômetro UV/Vis, Shimadzu®, modelo UVmini-1240 e cubetas de quartzo 1 cm de caminho óptico e solução do AF SQR na concentração de 35,0 µg/mL.

Tabela 14- Ensaios realizados no desenvolvimento do método por CLAE

Fase móvel (v/v)	pH	Vazão (mL/min)
Álcool etílico e água (50:50)	2,5	1,0
Álcool etílico e água (60:40)	2,5	1,3
Álcool etílico e água (70:30)	2,5	1,0 e 0,5
Álcool etílico e água (65:35)	2,5	1,0
Álcool etílico e água (68:32)	2,5	1,0 e 1,3
Álcool etílico e água (68:32)	3,0	1,0
Álcool metílico e água (70:30)	2,5	1,0
Álcool metílico e água (80:20)	2,5	1,0
Álcool metílico e água (85:15)	2,5	1,0 e 1,3
Álcool metílico e água (88:12)	2,5	1,0
Álcool metílico e água (85:15)	3,0	1,0
Acetonitrila e água (50:50)	2,5	1,0
Acetonitrila e água (80:20)	2,5	1,0
Acetonitrila e água (70:30)	2,5	1,0
Acetonitrila e água (72:28)	2,5; 3,0; 3,5;4,0	1,0

10.2.1.2 Conformidade do sistema cromatográfico

A conformidade do sistema cromatográfico foi verificada injetando sete replicatas da solução do AF SQR na concentração de 50,0 µg/mL. Para o preparo das soluções, foram pesados 2,5 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético), para obter solução estoque com concentração de 100,0 µg/mL. Em seguida, foi preparada a solução de trabalho na concentração de 50,0 µg/mL, transferindo 2,5 mL da solução estoque para balão volumétrico de 5 mL, cujo volume foi completado com FM.

Posteriormente, os parâmetros de assimetria do pico, fator de retenção e números de pratos foram avaliados, assim como o tempo de retenção e área do pico do AF e o DPR destes parâmetros.

A assimetria é a medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido longitudinal. Este parâmetro foi calculado conforme apresentado na Equação 6 (USP 37, 2014; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Segundo USP 37 (2014), o fator de encaudamento é calculado da mesma forma que a assimetria, sendo assim, podem ser considerados como mesmo parâmetro.

$$As = \frac{W_{0,05}}{2 \times f} \qquad \text{Equação 6}$$

Em que:

As = Assimetria do pico cromatográfico

$W_{0,05}$ = Largura do pico a 5% da sua altura

f = Valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da sua altura

O fator de retenção é a medida da posição do pico de interesse relativo ao composto não retido, ou seja, é a razão de distribuição do analito entre FE e a FM. Quanto maior for o fator de retenção, maior é sua afinidade pela FE e assim, maior será o tempo de retenção do analito. Este parâmetro foi calculado por meio da Equação 7 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; USP 37, 2014).

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \qquad \text{Equação 7}$$

Em que:

k'= Fator de retenção

t_R = Tempo de retenção do pico do analito de interesse

t_M = Tempo morto (tempo em que elui o primeiro componente que não interage com a fase estacionária)

O número de pratos é definido como uma medida da eficiência da análise cromatográfica, que consiste na relação entre o tempo de permanência do analito na coluna e alargamento do pico. Este parâmetro foi calculado segundo a Equação 8 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; USP 37, 2014).

$$N = 5{,}54 \times \left(\frac{t_R}{W_{\frac{h}{2}}}\right)^2 \qquad \text{Equação 8}$$

Em que:

N = Número de pratos

t_R = Tempo de retenção do analito de interesse

$W_{h/2}$ = Largura do pico medido na sua meia altura

Os resultados foram avaliados de acordo com os valores estabelecidos pela FDA (2004), conforme demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15- Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico e recomendações

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção (k')	k' ≥ 2
Repetibilidade	DPR < 2%. O n > 5 é desejável
Resolução (Rs)	Rs > 2 entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação)
Assimetria do pico (As)	As ≤ 2
Número de pratos (N)	N ≥ 2000

DPR: desvio padrão relativo
Fonte: FDA, 2004

10.2.1.3 Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado - Extração

Neste ensaio, quatro soluções com o produto acabado na concentração de 50,0 µg/mL foram preparadas: em béquer de 25 mL, foram pesados 125,0 mg do produto acabado (equivalem a 2,5 mg do AF), adicionados 23 mL de acetonitrila e colocados em banho ultrassônico nos tempos pré-estabelecidos (5, 10, 15 e 30 minutos). Após estes tempos, as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com acetonitrila, para obter soluções estoques com concentração de 100,0 µg/mL. Posteriormente, foram preparadas as soluções de trabalho na concentração de 50,0 µg/mL, transferindo 2,5 mL das soluções estoques, para balões volumétricos de 5 mL, cujos volumes foram completados com FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético).

Estas soluções foram analisadas em triplicata, por meio de análise estatística (ANOVA) das áreas dos picos cromatográficos do AF nos diferentes tempos, sendo que a extração total foi considerada quando as áreas foram estatisticamente iguais, considerando um nível de significância de 5%. Após esta análise, o tempo de retenção do AF SQR na concentração de 50,0 µg/mL (item 10.2.1.2) foi comparado com o tempo de retenção do AF presente no produto acabado, com posterior verificação da pureza do pico cromatográfico, utilizando detector DAD.

10.2.1.4 Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência

Na validação do método foram verificados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), LQ, LD, robustez e exatidão (ANVISA, 2003a; FDA, 2004; ICH, 2005).

10.2.1.4.1 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade e a faixa linear de trabalho foram analisadas em triplicata, com base nos resultados obtidos na curva analítica. A equação da reta e o *r* foram determinados. Os resultados foram submetidos à análise de regressão e a análise de resíduos também foi avaliada.

Para obtenção da curva analítica foram preparadas sete soluções do AF SQR a partir da solução estoque com concentração de 100,0 µg/mL (item 10.2.1.2). Posteriormente, alíquotas de 0,25; 1,0; 1,75; 2,5; 3,25; 4,0; 4,75 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e os volumes foram completados com FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético), para obter soluções de trabalho com concentrações de 5,0; 20,0; 35,0; 50,0; 65,0; 80,0; 95,0 µg/mL, respectivamente.

10.2.1.4.2 Seletividade e estudo de degradação forçada

Os testes de seletividade foram realizados por meio da sobreposição do cromatograma do AF SQR, com os cromatogramas do produto acabado, da matriz isenta do analito (placebo) e da FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético). As concentrações utilizadas das soluções do AF SQR e do produto acabado foram de 50,0 µg/mL, conforme descrito nos itens 10.2.1.2 e 10.2.1.3 (10 minutos de banho ultrassônico), respectivamente. A solução do placebo foi preparada da mesma forma que do produto acabado, no entanto, a quantidade correspondente ao AF que estaria presente na formulação (2,5 mg) foi descontada.

Como forma de avaliar se o método era indicativo de estabilidade e se era seletivo para os produtos de degradação do AF, as amostras do AF SQR foram submetidas a degradação oxidativa, neutra, fotolítica, ácida e alcalina. As degradações foram interrompidas quando o fármaco tinha degradado pelo menos 5-20%, como recomendado por Alsante e colaboradores (2007).

Para o preparo das soluções do AF SQR utilizadas no estudo de degradação forçada, foram pesados 17,5 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com FM, para obter solução estoque com concentração de 350,0 µg/mL. Posteriormente, foram preparadas as soluções de trabalho com concentração de 50,0 µg/mL, para as condições de degradação oxidativa, neutra e fotolítica. As soluções de trabalho para as condições ácida e alcalina foram preparadas na concentração de 100,0 µg/mL e foram neutralizadas antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os procedimentos de preparo das soluções utilizadas neste estudo estão descritas abaixo:

- ✓ *Degradação oxidativa:* foram transferidos 3,57 mL da solução estoque do AF SQR para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução de H_2O_2 a 3%, para obter solução com concentração de 50,0 µg/mL. Esta solução foi mantida em banho aquecido a 60ºC durante 5 horas.
- ✓ *Degradação neutra:* foram transferidos 3,57 mL da solução estoque do AF SQR para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água ultrapura, para obter solução com concentração de 50,0 µg/mL. Esta solução foi mantida em banho aquecido a 60ºC durante 72 horas.
- ✓ *Degradação fotolítica:* foram transferidos 3,57 mL da solução estoque do AF SQR para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água ultrapura, para obter solução com concentração de 50,0 µg/mL. Esta solução foi exposta à lâmpada UV (254 nm) 20 W durante 10 dias.
- ✓ *Degradação ácida*: foram transferidos 7,14 mL da solução estoque do AF SQR para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com HCl 0,01 mol/L, para obter solução com concentração de 100,0 µg/mL. Esta solução foi mantida em banho aquecido a 60ºC durante 24 horas. A degradação utilizando HCl 0,1 mol/L também foi realizada, no entanto, no tempo zero o fármaco foi totalmente degradado.
- ✓ *Degradação alcalina:* foram transferidos 7,14 mL da solução estoque do AF SQR para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com NaOH 0,001 mol/L, para obter solução com concentração de 100,0 µg/mL. Esta solução foi mantida em banho aquecido a 60ºC durante 1 hora. As degradações utilizando NaOH 0,1 mol/L e 0,01 mol/L também foram realizadas, no entanto, no tempo zero em ambas as concentrações, o fármaco foi totalmente degradado.

As soluções dos brancos foram compostas pela FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético) e a condição degradante (oxidativa, neutra, fotolítica, ácida e alcalina), submetidas às condições de estresse correspondentes.

As condições de degradação que promoveram o aparecimento de outros picos cromatográficos, o parâmetro de resolução foi avaliado. A resolução é a medida da separação entre dois picos adjacentes, calculada conforme Equação 9 (USP 37, 2014). A resolução foi considerada satisfatória quando o valor foi igual ou superior a 2,0, conforme recomendado pela FDA (2004).

$$Rs = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)} \qquad \text{Equação 9}$$

Em que:

Rs = Resolução cromatográfica obtida entre o pico principal do AF e seus produtos de degradação

t_{R2} e t_{R1} = Tempos de retenção do segundo e do primeiro pico, respectivamente

w_2 e w_1 = Larguras correspondentes às bases do segundo e do primeiro pico, respectivamente, obtidos pela medida da tangente

10.2.1.4.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada em triplicata, em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Na precisão por repetibilidade foram analisadas nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, foram utilizadas três concentrações: baixa (5,0 µg/mL), média (50,0 µg/mL) e alta (95,0 µg/mL) da solução do produto acabado. O preparo da solução estoque do produto acabado na concentração de 100,0 µg/mL foi realizado conforme descrito no item 10.2.1.3 (10 minutos de banho ultrassônico). Posteriormente, alíquotas de 0,25; 2,5; 4,75 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e os volumes foram completados com FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético), para obter soluções de trabalho nas concentrações de 5,0; 50,0; 95,0 µg/mL, respectivamente. Estas amostras foram submetidas a análises sucessivas, realizadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, mesmo laboratório e mesmo analista, cujos resultados foram avaliados com base no DPR.

A determinação da precisão intermediária foi realizada da mesma forma que a precisão por repetibilidade, no entanto, as amostras foram submetidas a análises realizadas em dias diferentes (inter dia) e por analistas diferentes (entre analista), mas sob as mesmas condições experimentais e mesmo laboratório. Os resultados foram avaliados com base no DPR, e também por meio da diferença entre as áreas médias dos picos cromatográficos referente ao experimento realizado por cada analista (Equação 10).

$$\text{Dif}\ (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100 \qquad \text{Equação 10}$$

Em que:

Dif = Diferença em porcentagem entre as análises (%)

m_1 = Média das medidas referente ao experimento realizado pelo analista 1

m_2 = Média das medidas referente ao experimento realizado pelo analista 2

10.2.1.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação

No método por CLAE, o LD pode ser avaliado visualmente, ou por meio da relação sinal-ruído, ou ainda por meio inclinação da curva analítica, e o LQ pode ser determinado utilizando três vezes o valor do LD obtido visualmente, ou pela relação sinal-ruído, ou pela estimativa do DPR do coeficiente linear de três curvas analíticas ou também por meio da inclinação da curva analítica (ANVISA, 2003a; ICH, 2005). Nesse sentido, o LD e LQ foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente, cujos resultados consistiram em informações adicionais, mas não necessárias para a finalidade proposta, uma vez que estes parâmetros não são exigidos para a intenção do método desenvolvido, pois pertence à Categoria I, segundo a Tabela 2 (ANVISA, 2003a).

10.2.1.4.5 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação, também chamado de fator de recuperação (ANVISA, 2003a; ICH, 2005), no qual quantidades conhecidas do AF SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas do produto acabado. A recuperação foi realizada em três níveis de recuperação, conforme estabelecido pela FDA (2004; 2012), a partir da concentração do meio da curva (50,0 µg/mL = R_2 – 100%), sendo que, o R_1 consistiu em 80% (40,0 µg/mL) e R_3 em 120% (60,0 µg/mL) da concentração de 50,0 µg/mL.

As soluções estoques do AF SQR e produto acabado, na concentração de 100,0 µg/mL foram preparadas conforme descritas nos itens 10.2.1.2 e 10.2.1.3 (10 minutos de banho ultrassônico), respectivamente. Posteriormente, foram realizadas diluições para obter soluções com concentração de 5,0 µg/mL, transferindo 0,25 mL das soluções estoques, para balões volumétricos de 5 mL e os volumes foram completados com FM (acetonitrila e água, 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético). Em outros balões volumétricos de 5 mL identificados como R_1, R_2, R_3, foram transferidas alíquotas de 0,25 mL da solução estoque do produto acabado e alíquotas de 1,75; 2,25; 2,75 mL da solução estoque do AF SQR, respectivamente, e os volumes foram completados com FM, para obter soluções com concentrações de 40,0; 50,0; 60,0 µg/mL, conforme demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16- Preparo das soluções para o ensaio de recuperação do método por CLAE

	Produto acabado (mL) [100,0 µg/mL]	AF SQR (mL) [100,0 µg/mL]	Concentração final (µg/mL)
Produto acabado	0,25	----	5,0
R_1	0,25	1,75	40,0
R_2	0,25	2,25	50,0
R_3	0,25	2,75	60,0
AF SQR	----	0,25	5,0

AF SQR: ácido fusídico substância química de referência

A porcentagem do AF recuperada foi calculada por meio da Equação 11, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

$$R(\%) = \left[\frac{C_R - C_P}{C_{SQR}}\right] \times 100 \qquad \text{Equação 11}$$

Em que:

R = Fator de recuperação em porcentagem (%)

C_R = Concentração encontrada da solução do produto acabado adicionada da SQR (µg/mL)

C_P = Concentração encontrada do produto acabado (µg/mL)

C_{SQR} = Concentração teórica adicionada da solução da SQR (µg/mL)

10.2.1.4.6 Robustez

A robustez do método por CLAE foi analisada pelo Teste de Youden, por meio de doseamento (Equações 12 e 13), utilizando soluções do AF SQR e produto acabado, na concentração de 50,0 µg/mL, preparadas conforme descrito nos itens 10.2.1.2 e 10.2.1.3 (10 minutos de banho ultrassônico), respectivamente.

$$C_p = \frac{A_p \times C_{SQR}}{A_{SQR}} \qquad \text{Equação 12}$$

Em que:

C_p = Concentração do produto acabado (µg/mL)

A_p = Área do pico do produto acabado

C_{SQR} = Concentração da substância química de referência

A_{SQR} = Área do pico da substância química de referência

$$C_p(\%) = \frac{C_p \times 100}{C_t}$$ Equação 13

Em que:

C_p = Concentração percentual do produto acabado (%)

C_p = Concentração do AF encontrada no produto acabado (µg/mL)

C_t = Concentração teórica do AF presente no produto acabado (µg/mL)

No Teste de Youden são avaliadas sete variáveis, combinadas em oito experimentos, na qual as condições nominais (normais) são representadas por letras maiúsculas e as condições alteradas, por letras minúsculas, conforme demonstrado no Quadro 2. As condições alteradas consistem em pequenas e deliberadas variações promovidas nos valores nominais. Estas condições devem ser condizentes com a realidade prática, e por este motivo, foram realizadas modificações tanto "inferiores" como "superiores", nos parâmetros cromatográficos (Tabela 17).

Os resultados, representados pelas letras de *s* a *z* (Quadro 2), são obtidos por meio da subtração da média dos valores das condições nominais, em relação aos valores das condições alteradas. Para que o método seja considerado robusto, estas diferenças devem ser menores que o valor resultante de duas vezes o DP de todas as médias do ensaio (YOUDEN; STEINER, 1975).

Quadro 2- Teste de Youden

Variáveis	**Experimentos**							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
V1	A	A	A	A	a	a	a	a
V2	B	B	b	b	B	B	b	b
V3	C	c	C	c	C	c	C	c
V4	D	D	d	d	d	d	D	D
V5	E	e	E	e	e	E	e	E
V6	F	f	f	F	F	f	f	F
V7	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	*s*	*t*	*u*	*v*	*w*	*x*	*y*	*z*

Fonte: YOUDEN; STEINER, 1975

Tabela 17- Parâmetros analíticos e suas alterações "inferiores" e "superiores" utilizados para avaliar a robustez do método por CLAE

Variável		Alterações "inferior" e "superior"
V1	Lote da coluna Agilent® (250 x 4,6 mm, 5 µm)	**A:** B08125 **a:** B09180
V2	pH	**B:** 3,5 **b:** 3,4 e 3,6
V3	Vazão (mL/min)	**C:** 1,0 **c:** 0,9 e 1,1
V4	Marca da acetonitrila	**D:** J. T. Baker **d:** Tedia
V5	Proporção da FM (acetonitrila e água)	**E:** 72:28 **e:** 70:30 e 74:26
V6	Comprimento de onda (nm)	**F:** 210 **f:** 209 e 211
V7	Temperatura da sala (ºC)	**G:** 25 **g:** 23 e 27

10.2.1.5 Determinação do teor do ácido fusídico no produto acabado

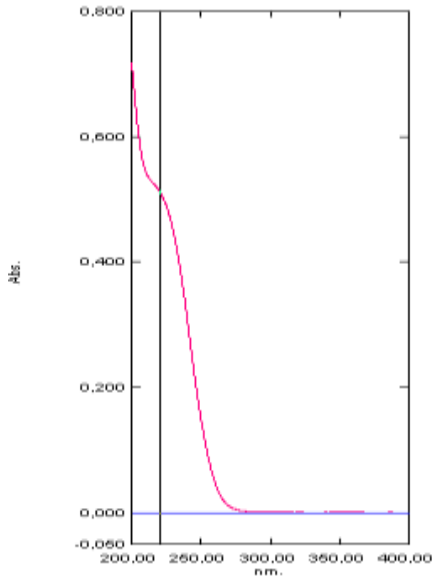
O teor do AF no produto acabado foi determinado por meio de cálculos, conforme demonstrado nas Equações 12 e 13, em triplicata. Para a realização deste ensaio, foram preparadas soluções do AF SQR (item 10.2.1.2) e do produto acabado (item 10.2.1.3, utilizando 10 minutos de banho ultrassônico) na concentração de 50,0 µg/mL.

10.2.2 Resultados

10.2.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Nos ensaios preliminares, o comprimento de onda selecionado foi 220 nm (Figura 21), pois o álcool metílico utilizado em alguns ensaios durante o desenvolvimento do método, apresenta absorção em aproximadamente 205 nm e a utilização de comprimento de onda menor do que foi selecionado promoveria interferência nas análises. Na Tabela 18 estão dispostos os parâmetros cromatográficos estabelecidos para o método por CLAE.

Figura 21- Espectro na região do UV do AF SQR na concentração de 35 µg/mL em álcool etílico



Rosa: ácido fusídico substância química de referência. Azul: álcool etílico

Tabela 18- Parâmetros cromatográficos estabelecidos para a determinação do AF no produto acabado, pelo método de CLAE

Coluna	Zorbax Eclipse XDB C_{18} Agilent® (4,6 x 250 mm, 5 µm)
Pré–coluna	Metaguard Polaris 4,6 mm 5U C_{18} PTC – Agilent®
Detecção	UV/Vis
Comprimento de onda	210 nm
Fase móvel	Acetonitrila e água 72:28 (v/v), pH 3,5 ajustado com ácido acético
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20,0 µL
Modo de eluição	Isocrático
Temperatura	25ºC ± 1ºC

10.2.2.2 Conformidade do sistema cromatográfico

Os resultados dos parâmetros de assimetria do pico, fator de retenção e número de pratos, bem como tempo de retenção e área do pico cromatográfico do AF SQR, estão demonstrados na Tabela 19.

Tabela 19- Análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para determinação do AF por CLAE

	Assimetria (≤ 2,0)	Fator de retenção (≥ 2,0)	Nº de pratos (≥ 2000)	Tempo de retenção	Área
	1,00	2,05	13264,70	8,128	948315
	1,00	2,04	13229,82	8,143	945820
	1,00	2,05	13298,35	8,113	949291
	1,00	2,05	13156,60	8,164	940586
	1,00	2,04	13208,41	8,151	944292
	1,00	2,05	13273,90	8,127	948974
	1,00	2,05	13247,13	8,130	947059
Média	1,00	2,05	13239,84	8,137	946334
DPR (%)	0,00	0,24	0,36	0,21	0,33

DPR: desvio padrão relativo

10.2.2.3 Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado - Extração

Os resultados do procedimento de extração encontram-se nas Tabelas 20 e 21. A pureza do pico cromatográfico do AF no produto acabado foi comprovado utilizando detector DAD (Figura 22), e o grau de pureza calculado pelo *software* foi de 100%.

Tabela 20- Áreas do pico do AF no produto acabado, em relação ao tempo de extração

	5 min	10 min	15 min	30 min
	940576	987366	990128	986115
	936703	986439	990805	985427
	939861	989297	981152	991520
Média	939046,67	987700,67	987361,67	987687,33
DPR (%)	0,22	0,15	0,55	0,34

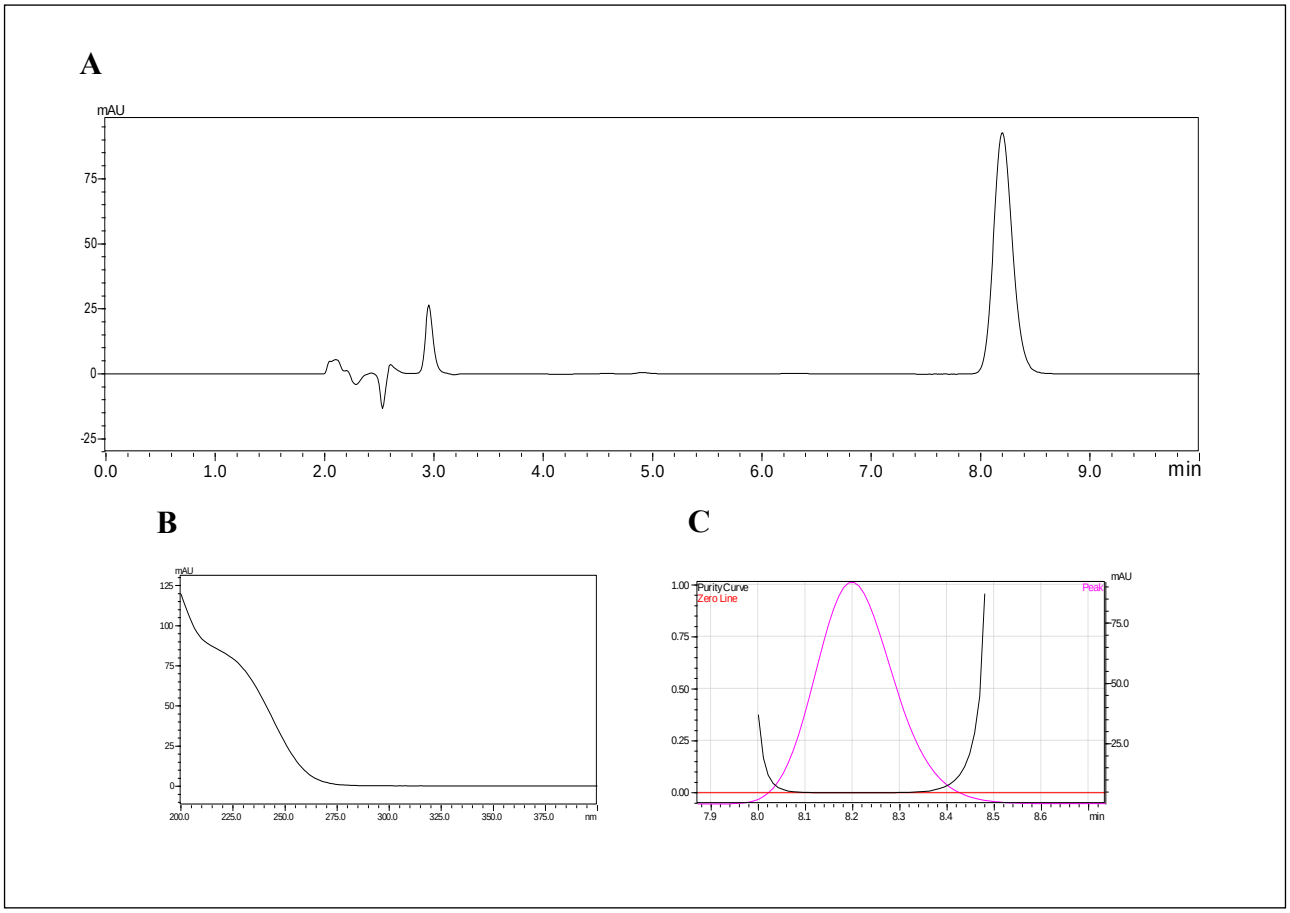
DPR: desvio padrão relativo

Tabela 21- Análise estatística (ANOVA) dos valores da área do AF obtidos no procedimento de extração nos tempos de 10, 15 e 30 minutos, utilizando o método por CLAE

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	221157,5556	2	110578,778	0,0078	0,9922	5,1433
Dentro dos grupos	84591862	6	14098643,7			
Total	84813019,56	8				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

Figura 22- Cromatograma, espectro de absorção na região do UV e curva de pureza do pico cromatográfico do AF presente no produto acabado



(A) cromatograma do produto acabado. (B) espectro na região ultravioleta do pico cromatográfico do ácido fusídico presente no produto acabado. (C) curva de pureza do pico cromatográfico do ácido fusídico presente no produto acabado

10.2.2.4 Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência

10.2.2.4.1 Linearidade e faixa linear de trabalho

Os valores das áreas do AF SQR obtidos durante avaliação da linearidade do método estão demonstrados na Tabela 22. Os resultados obtidos na análise estatística (ANOVA) estão dispostos na Tabela 23. Nas Figuras 23, 24 e 25, encontram-se a curva analítica construída a partir das médias das áreas dos picos cromatográficos do AF SQR, nas concentrações de 5,0; 20,0; 35,0; 50,0; 65,0; 80,0 e 95,0 µg/mL, faixa linear de trabalho e a análise de resíduos, respectivamente.

Tabela 22- Valores das áreas, médias, DP e DPR das áreas referentes ao pico do AF SQR

Concentração (µg/mL)	Área	Área média ± DP	DPR (%)
5,0	104385 103827 103507	103906,33 ± 444,34	0,43
20,0	397918 394690 395641	396083,00 ± 1658,77	0,42
35,0	672919 671913 665727	670186,33 ± 3894,52	0,58
50,0	945148 949243 952712	949034,33 ± 3786,31	0,40
65,0	1244971 1242341 1256641	1247984,33 ± 7611,35	0,61
80,0	1540050 1547427 1532584	1540020,33 ± 7421,54	0,48
95,0	1811303 1823216 1825258	1819925,67 ± 7536,92	0,41

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Tabela 23- Análise estatística (ANOVA) dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica do AF SQR, utilizando o método por CLAE

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	2,2936E+12	2,29357E+12	42906,6545*	4,97604E-11
Resíduo	5	267274056	53454811,17		
Total	6	2,2938E+12			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*
Interseção	7004,492063	5371,09191	1,304109516	0,249001226	-6802,339225	20811,32335
Variável X 1	19080,31111	92,1134662	207,1392153	4,97604E-11	18843,52591	19317,09631

*$p < 0,05$

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

Figura 23- Curva analítica do AF SQR obtida por CLAE

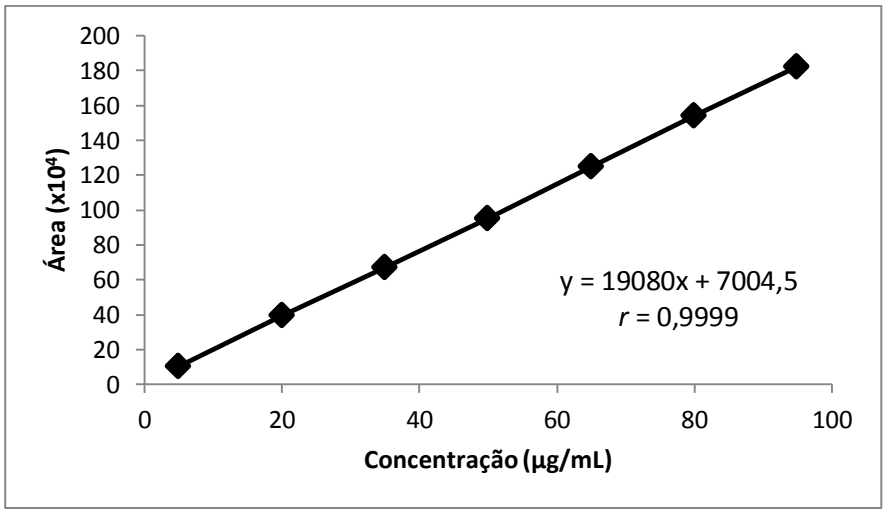


Figura 24- Faixa linear de trabalho do AF SQR, obtida por CLAE

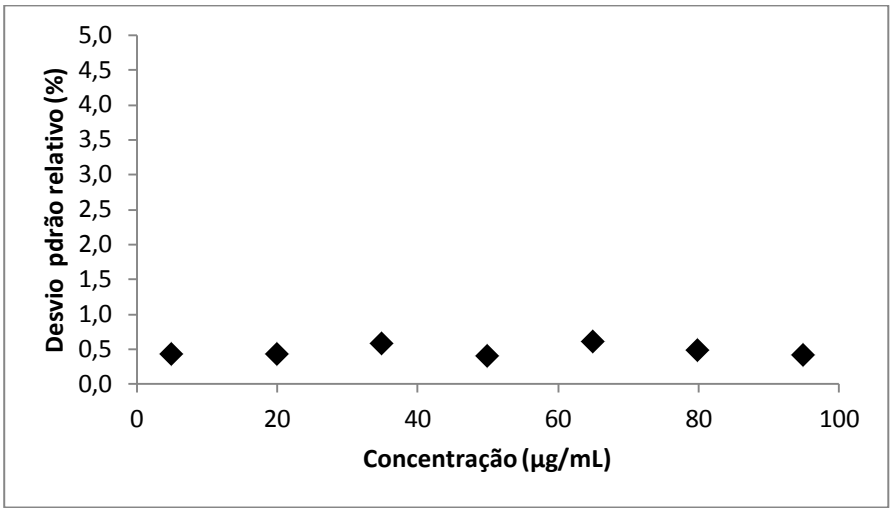
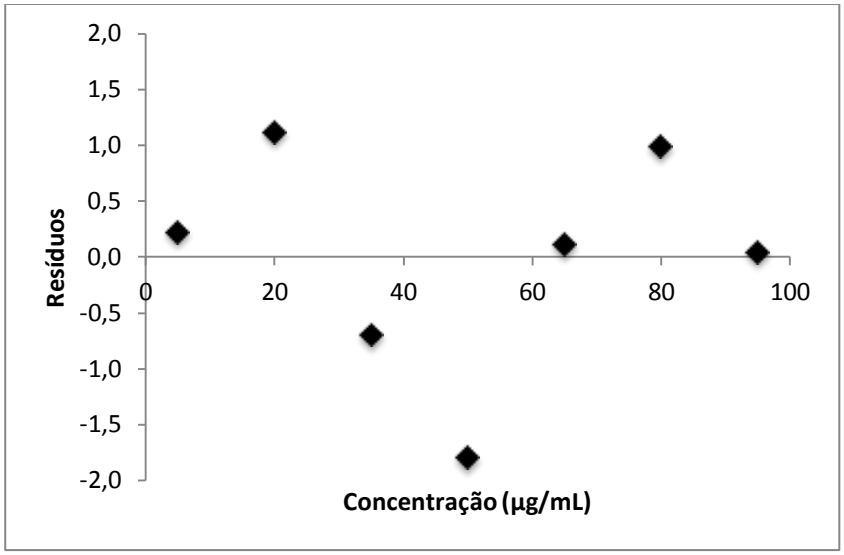


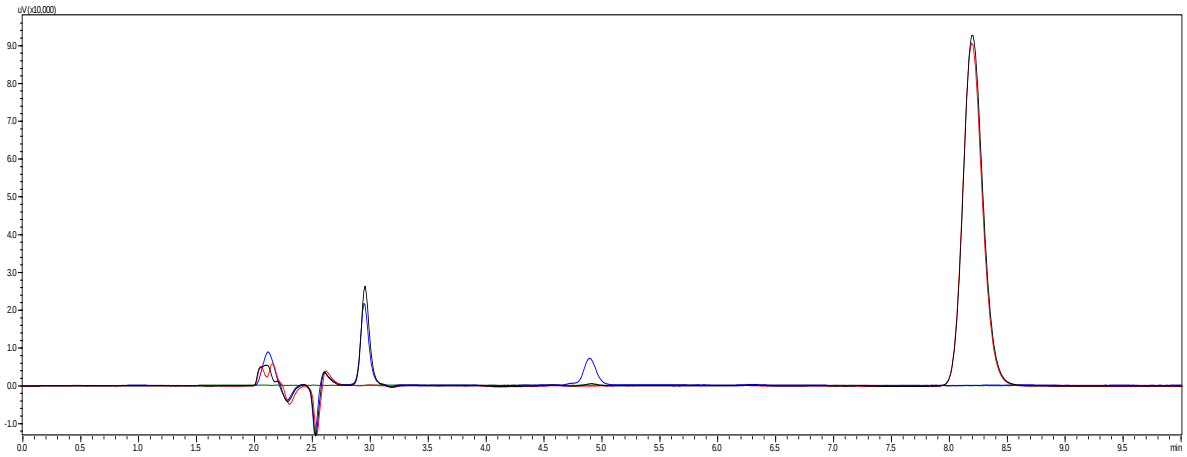
Figura 25- Análise de resíduos do AF SQR, obtida por CLAE



10.2.2.4.2 Seletividade e estudo de degradação forçada

Na Figura 26 estão sobrepostos os cromatogramas referentes ao AF SQR, produto acabado, placebo e FM (acetonitrila e água 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético). Como pode ser observado, nenhum adjuvante presente na formulação do creme coeluiu com o AF, interferindo na análise.

Figura 26- Seletividade do método por CLAE



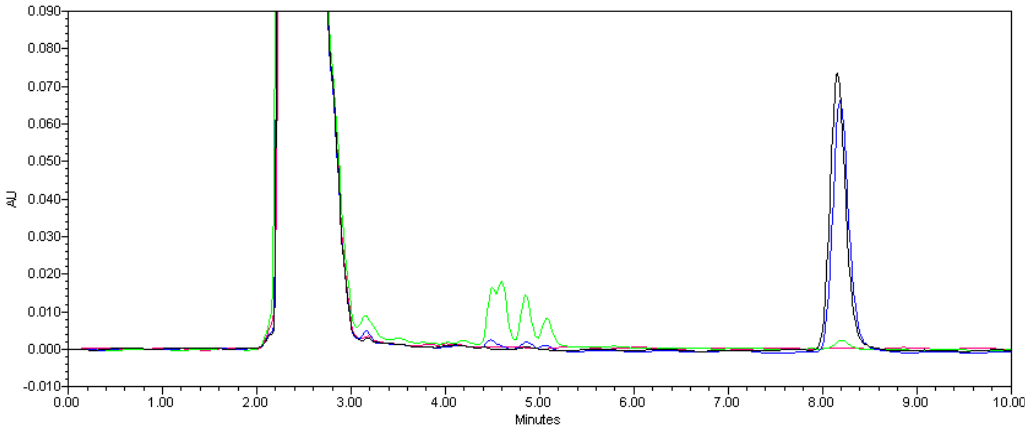
Vermelho: ácido fusídico substância química de referência. Preto: produto acabado. Azul: placebo. Verde: fase móvel (acetonitrila e água 72:28 v/v, pH 3,5 ajustado com ácido acético)

Em relação ao estudo de estresse, na Tabela 24 encontram-se os resultados obtidos nas condições de degradação oxidativa, neutra, fotolítica, ácida e alcalina. As sobreposições dos cromatogramas obtidos após estas degradações em relação ao branco, encontram-se nas Figuras 27 a 31. Picos de degradação adicionais foram observados nas condições neutra, fotolítica e ácida, cujas resoluções cromatográficas foram 2,49, 12,70 e 11,36, respectivamente.

Tabela 24- Degradações oxidativa, neutra, fotolítica, ácida e alcalina do AF SQR, analisada por CLAE

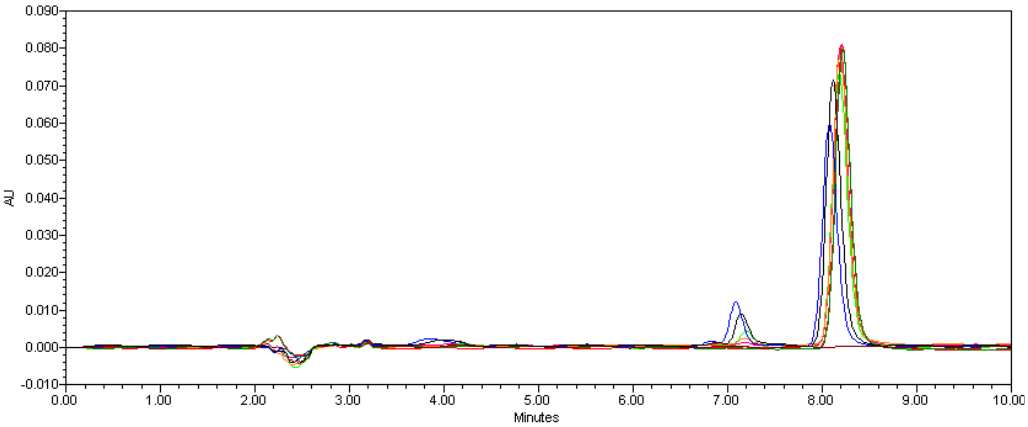
Condição de Estresse	Tempo	Área	Valor remanescente (%)	Degradação (%)
Oxidativa	T_0	901509	94,99	5,01
	T_{1h}	811306	85,67	14,33
	T_{5h}	39434	4,16	95,84
Neutra	T_0	945092	99,50	0,50
	T_{1h}	941939	99,25	0,75
	T_{5h}	940295	99,00	1,00
	T_{9h}	913181	96,22	3,78
	T_{24h}	878964	92,62	7,38
	T_{48h}	813703	85,74	14,26
	T_{72h}	686187	72,30	27,70
Fotolítica	T_0	945702	99,65	0,35
	T_{1h}	943067	99,37	0,63
	T_{5h}	938815	98,92	1,08
	T_{9h}	907679	95,64	4,36
	T_{24h}	901835	96,08	3,92
	T_{48h}	889723	93,75	6,25
	T_{6dias}	888964	93,67	6,33
	T_{10dias}	816855	86,07	13,93
Ácida (HCl 0,01 mol/L)	T_0	918419	96,77	3,23
	T_{1h}	908076	95,68	4,32
	T_{5h}	875212	92,22	7,78
	T_{9h}	811629	85,52	14,48
	T_{24h}	663337	69,90	30,10
Alcalina (NaOH 0,001 mol/L)	T_0	778535	82,03	17,97
	T_{1h}	615019	64,80	35,20

Figura 27- Degradação oxidativa do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos 0, 1 h e 5 h em comparação ao branco



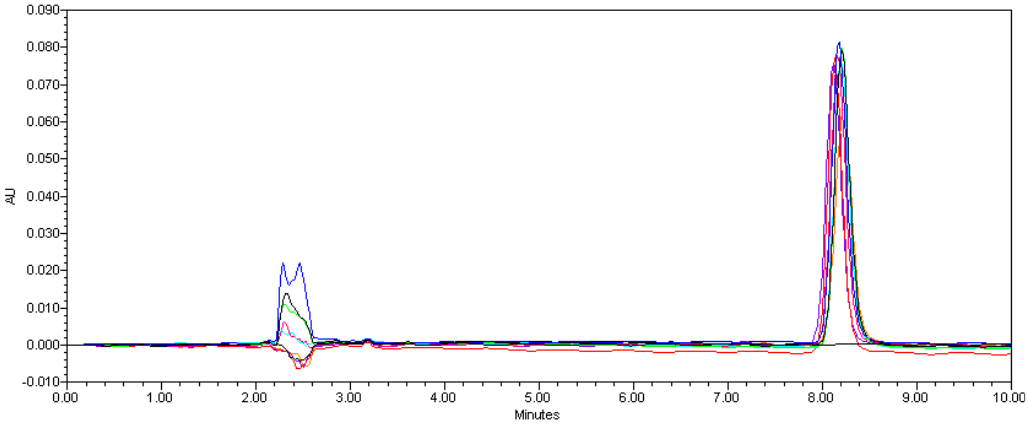
Tempos: 0 (preto), 1 hora (azul), 5 horas (verde claro) e branco (rosa)

Figura 28- Degradação neutra do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos 0, 1 h, 5 h, 9 h, 24 h, 48 h e 72 h em comparação ao branco



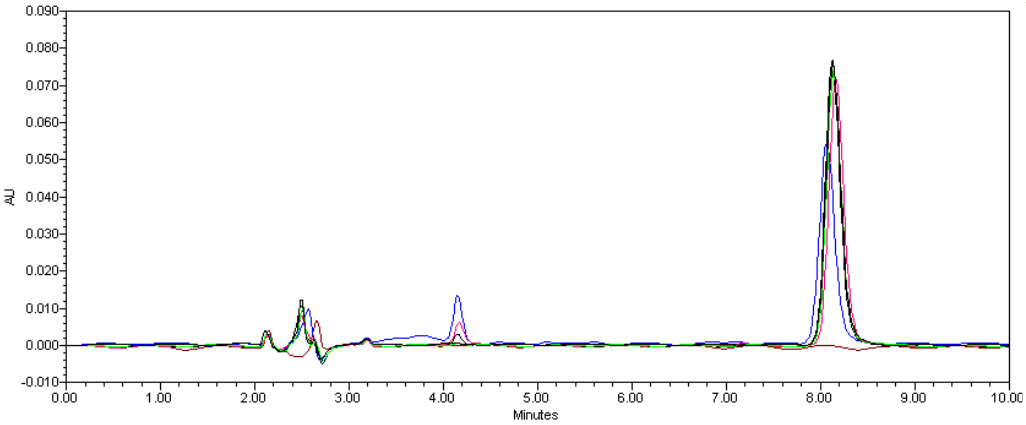
Tempos: 0 (verde escuro), 1 h (alaranjado), 5 h (vermelho), 9 h (rosa), 24 h (verde claro), 48 h (preto), 72 h (azul) e branco (marrom)

Figura 29- Degradação fotolítica do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos 0, 1 h, 5 h, 9 h, 24 h, 48 h, 6 dias e 10 dias em comparação ao branco



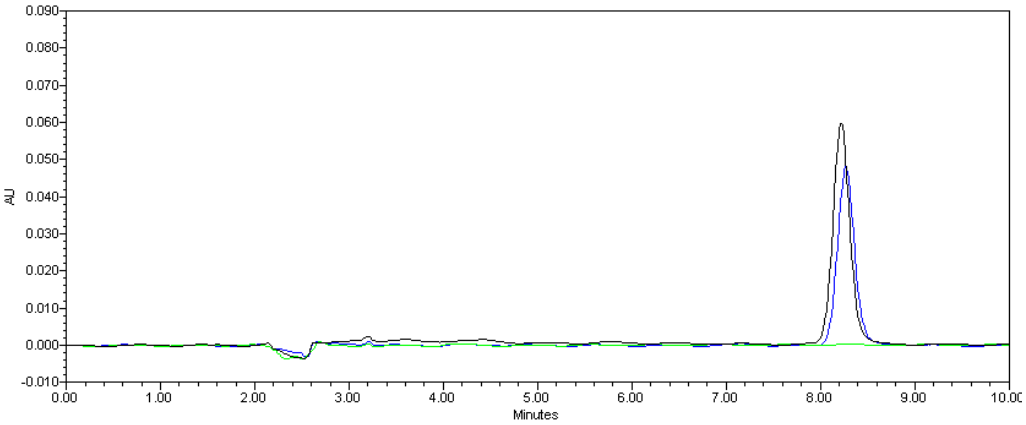
Tempos: 0 (alaranjado), 1 h (vermelho), 5 h (roxo), 9 h (verde água), 24 h (rosa), 48 h (verde claro), 6 dias (preto), 10 dias (azul) e branco (marrom)

Figura 30- Degradação ácida (HCl 0,01 mol/L) do AF SQR, analisada por CLAE nos tempos: 0, 1 h, 5 h, 9 h e 24 h em comparação ao branco



Tempos: 0 (verde claro), 1 h (verde escuro), 5 h (preto), 9 h (rosa), 24 h (azul) e branco (marrom)

Figura 31- Degradação alcalina (NaOH 0,001 mol/L) do AF SQR, analisada por CLAE no tempo 0 e 1 h em comparação ao branco



Tempos: 0 (preto), 1 h (azul) e branco (verde)

10.2.2.4.3 Precisão

Os resultados da precisão do método por repetibilidade e precisão intermediária estão dispostos na Tabela 25 e 26, respectivamente.

Tabela 25- Precisão por repetibilidade do método por CLAE

Concentração (µg/mL)	Área	Área média ± DP	DPR (%)	DPR médio total (%)
5,0	108930 108752 106989	108223,67 ± 1072,95	0,99	
50,0	977933 985407 969249	977529,67 ± 8086,55	0,83	0,80
95,0	1861386 1885479 1893760	1880208,33 ± 16818,26	0,89	

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Tabela 26- Precisão intermediária do método por CLAE

	ANALISTA 1			ANALISTA 2			
Concentração (µg/mL)	Área	Área média ± DP	DPR (%)	Área	Área média ± DP	DPR (%)	Dif média total (%)
5,0	108930 108752 106989	108223,67 ± 1072,95	0,99	108812 105983 106281	107025,33 ± 1554,46	1,45	
50,0	977933 985407 969249	977529,67 ± 8086,55	0,83	975625 990514 984641	983593,33 ± 7499,59	0,76	0,72
95,0	1861386 1885479 1893760	1880208,33 ± 16818,26	0,89	1889630 1872788 1854167	1872195,00 ± 17738,94	0,95	

Dif: diferença em porcentagem entre as análises; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

10.2.2.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores calculados para o LD e LQ foram 0,43 µg/mL e 1,31 µg/mL, respectivamente.

10.2.2.4.5 Exatidão

A recuperação média calculada no ensaio de exatidão foi de 101,22%, conforme demonstrado Tabela 27.

Tabela 27- Exatidão do método por CLAE

	Concentração final esperada (µg/mL)	Concentração final encontrada* (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R_1	40,0	40,68	100,63		
R_2	50,0	50,88	101,38	101,22	0,52
R_3	60,0	61,16	101,64		

*Média de três determinações. DPR: desvio padrão relativo

10.2.2.4.6 Robustez

Os teores do AF determinados nos experimentos estão dispostos na Tabela 28. Os resultados dos efeitos de cada variável, em relação às alterações "inferiores" e "superiores" nos parâmetros cromatográficos encontram-se na Tabela 29.

Tabela 28- Teores do AF determinados na análise da robustez do método por CLAE

Experimento	Teores	
	Alteração "inferior"	Alteração "superior"
1	104,00	104,00
2	105,58	104,61
3	104,48	103,44
4	104,95	103,16
5	105,17	104,37
6	102,51	103,97
7	105,26	104,36
8	104,58	103,28
Média	104,57	103,90
DP	0,97	0,55

DP: desvio padrão

Tabela 29- Efeitos observados na avaliação da robustez do método por CLAE

Variável	|Efeitos|	
	Alteração "inferior"	Alteração "superior"
Lote da coluna	0,37	-0,20
pH	-0,51	0,68
Vazão	0,32	0,29
Marca acetonitrila	0,58	0,33
Proporção da FM	-1,35	-0,45
Comprimento de onda	0,22	-0,39
Temperatura da sala	-0,77	-0,05

10.2.2.5 Determinação do teor do ácido fusídico no produto acabado

Na Tabela 30, estão dispostos os resultados obtidos na determinação da concentração percentual (teor) do AF presente na formulação de creme.

Tabela 30- Determinação do teor do AF no produto acabado pelo método por CLAE

	Área AF SQR	**Área Produto acabado**	**C_p (%)**
	942065	975949	103,60
	939933	983531	104,64
	954249	990152	103,76
Média	945415,67	983210,67	104,00
DPR (%)	0,82	0,72	0,54

AF SQR: ácido fusídico substância química de referência;
C_p: concentração percentual; DPR: desvio padrão relativo

10.2.3 Discussão

No desenvolvimento de um método por CLAE alguns parâmetros cromatográficos devem ser avaliados, tais como, o tipo e tamanho da coluna cromatográfica, composição, vazão e modo de eluição da FM, volume de injeção da amostra, necessidade da utilização de pré-coluna e de forno de coluna. Neste estudo, a coluna cromatográfica, pré-coluna, volume de injeção, modo de eluição da FM e temperatura de análise foram previamente determinados antes da realização dos ensaios preliminares.

O tamanho da coluna interfere significativamente na eficiência cromatográfica, pois é através deste segmento que ocorre o equilíbrio termodinâmico entre FM, FE e analito(s) de interesse (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Seguindo este raciocínio, quanto maior for o comprimento da coluna, maior vai ser a eficiência cromatográfica observada, desde que esta comparação seja realizada com colunas que apresentem partículas internas de mesmo tamanho. Desta forma, testar uma coluna de tamanho menor da que foi utilizada na análise provavelmente diminuiria a eficiência cromatográfica e, a utilização de coluna maior, além de não ser comumente utilizada em análises de CLAE analítica (LANÇAS et al., 2009), promoveria aumento no tempo de análise.

A pré-coluna por apresentar capacidade de remover possíveis partículas que possam ter forte interação com a FE (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), foi necessária durante as análises, uma vez que a amostra analisada é composta por uma matriz considerada complexa.

No cromatógrafo a líquido utilizado, o sistema de introdução de amostras foi manual (20 µL). Neste tipo de injetor, a alteração do volume de injeção necessita da substituição do *loop*, e este procedimento não pode ser realizado. A alteração do *loop* se faz necessária, principalmente, quando modificações dos outros parâmetros cromatográficos não são suficientes para obter picos com alta eficiência. O modo de eluição isocrático foi utilizado, pois é indicado em análises de compostos específicos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Como o AF não necessita de temperatura específica, as análises foram realizadas em temperatura ambiente (25ºC ± 1 ºC).

A FM que apresentou eficiência e sensibilidade adequadas, além de menor tempo de análise (± 8 min) foi composta por acetonitrila e água (72:28, v/v), pH 3,5 ajustado com ácido acético. A acetonitrila, por ser um solvente de baixa viscosidade, possibilitou baixa pressão do sistema cromatográfico. Sabe-se que a alta pressão pode levar à descompactação das partículas no interior da coluna e também pode danificar o selo da bomba, exigindo constante substituição. Além desta vantagem, o fato da acetonitrila apresentar absorção em aproximadamente 190 nm (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), permitiu a utilização de um comprimento de onda menor (210 nm), o que promoveu melhoria na sensibilidade do método, pois o AF apresenta maior absorção em comprimento de onda próximo a 200 nm (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010), conforme representado na Figura 21.

A determinação do pH da FM consiste em um parâmetro importante e que exige cautela, pois pH muito ácido pode comprometer a integridade do sistema cromatográfico. Além disso, na escolha do pH, deve ser levado em consideração a ionização do analito para que o pico cromatográfico não apresente baixa eficiência e/ou encaudamento (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Nesse sentido, o pH 3,5 foi selecionado, uma vez que no cromatograma utilizando FM com pH 4,0 foi observado considerável diminuição na eficiência cromatográfica.

Em relação a vazão da FM foi observado durante os experimentos que, para obter fator de retenção satisfatório, este parâmetro deveria apresentar valor menor que 1,3 mL/min, mas por outro lado, a utilização da vazão de 0,5 mL/min ocorria alargamento do pico do AF. Desta forma a vazão selecionada para as análises foi de 1,0 mL/min.

O alargamento do pico cromatográfico resulta de processos de difusão e transferência de massas. A difusão pode ser do tipo turbulenta, também chamada de difusão de Eddy, ou pode ser do tipo difusão longitudinal. A difusão turbulenta ocorre quando a molécula do analito realiza vários caminhos ao passar por um caminho que apresenta canais irregulares. Assim as moléculas tomam caminhos distintos, chegando ao final da coluna em tempos diferentes, causando alargamento da área do pico. A difusão molecular longitudinal ocorre quando as moléculas da amostra se difundem

de uma região de maior concentração, para uma região de concentração menor. Já a transferência de massas consiste na difusão de uma fase para a outra e de volta, cujo mecanismo pode ocorrer tanto na FM quanto na FE. A transferência de massas na FM é o processo no qual a amostra solubilizada na FM é trazida à superfície da FE. A transferência de massas na FE é análoga (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

De acordo com os resultados apresentados, o método proposto apresentou vantagens em relação aos métodos descritos na literatura, por promover redução do consumo de solventes orgânicos e da quantidade de resíduos tóxicos gerados ao meio ambiente, em que o volume de injeção, a vazão da FM, bem como o tempo de retenção do AF (± 8 min), foram menores do que os parâmetros encontrados nos métodos da literatura. Além disso, a FM é simples e não foi utilizada solução tampão como constituinte da FM.

Testes que avaliam a conformidade do sistema (*System suitability*) devem ser realizados antes do procedimento de validação ou mesmo antes das análises de rotina. O teste de conformidade é definido como um conjunto de experimentos que visam garantir que o equipamento, bem como o método que está sendo desenvolvido é capaz de gerar resultados com exatidão e precisão satisfatórios (PASCHOAL; RATH, 2008).

Para o ICH (2005), a conformidade do sistema consiste em verificar se a resolução e a repetibilidade do sistema cromatográfico estão adequados para a análise pretendida, e estabelece que este parâmetro deve ser considerado como parte integrante da validação do método. Assim, como o sistema cromatográfico deve ser qualificado, todos os equipamentos e variáveis que são necessários no desenvolvimento de um método, como balança analítica, vidrarias, estabilidade das soluções, FM e reagentes, também devem ser qualificados (PASCHOAL, RATH, 2008).

De acordo com a FDA (2004), para que a conformidade do sistema seja confiável e reprodutível, é necessário realizar no mínimo dois dos seguintes testes: repetibilidade, resolução, assimetria, número de pratos e fator de retenção. A assimetria é um parâmetro muito importante, pois previne o encaudamento do pico cromatográfico, que por sua vez, pode promover erros na quantificação do(s) analito(s) de interesse (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). À medida que este valor aumenta o procedimento de integração e, por conseguinte, a exatidão e precisão do método são menos confiáveis (FDA, 2004; USP 37, 2014).

O número de pratos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições de análise, a quantidade da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna cromatográfica. O fator de retenção tem como finalidade assegurar que o método desenvolvido é capaz de produzir uma separação cromatográfica adequada. Este parâmetro está intimamente relacionado com o tempo

de retenção do analito. Um fator de retenção baixo, desde que esteja dentro dos limites aceitáveis, promove menor custo, menor tempo de análise e, consequentemente, diminui a formação de resíduos (LANÇAS, 2009; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Os testes de conformidade do sistema mostraram que os parâmetros cromatográficos estabelecidos no desenvolvimento do método são capazes de fornecer resultados com precisão e exatidão confiáveis, visto que, o valor médio de assimetria calculado apresentou-se abaixo do valor limite de 2,0 e os valores médios do número de pratos e do fator de retenção foram superiores a 2000 e 2,0, respectivamente, conforme especificado pela FDA (2004). Além disso, foi verificada precisão adequada entre os valores de tempo de retenção e das áreas do pico cromatográfico do AF, cujos DPR encontraram-se abaixo de 2%, valor recomendado para testes de conformidade (FDA, 2004).

O método de preparo da forma farmacêutica de creme teve como principais objetivos, a utilização de pequena quantidade de solvente, minimização da geração de resíduos e, principalmente, rapidez no preparo da amostra, por isso, optou-se pela utilização do banho ultrassônico (BENDICHO et al., 2012). Como pode ser observado na Tabela 21, o tempo de 10 minutos foi suficiente para promover a extração do AF na matriz do creme, uma vez que não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos tempos de 15 e 30 minutos (F calculado = 0,0078 foi menor que o valor do F tabelado = 5,1433).

Após o procedimento de extração, a pureza do pico cromatográfico do AF presente na amostra de creme foi avaliada com intuito de comprovar a ausência de interferência dos adjuvantes presentes na formulação. Esta análise pode ser determinada de várias maneiras, entre elas, destacam-se a espectrometria de massas e análise em DAD. O detector DAD é composto por uma série de fotodiodos que são posicionados lado a lado num cristal de silício de modo que cada lâmbda (λ) difratado pela grade atinja um diodo. A absorvância de uma amostra pode ser determinada em todos os λ de modo simultâneo, por meio de varredura. Os *softwares* permitem determinar a pureza do pico cromatográfico por meio da comparação dos espectros na região do UV obtidos em diferentes pontos do pico, ou por meio da construção de uma curva de pureza, ou ainda por meio de um cálculo específico realizado pelo *software*, em que relaciona a razão da absorvância em cada ponto do pico cromatográfico (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Segundo o manual do *software* utilizado (LCSolution), a região em que a curva de pureza se desloca para valores abaixo de zero indica a presença de impurezas, o que não foi observado na análise (Figura 22, imagem C), pois a razão permaneceu constante. Além disso, a pureza do pico pode ser comprovada por meio da comparação dos espectros em toda a sua extensão e por meio do

cálculo realizado pelo *software*, cujo grau de pureza foi de 100%. Desta forma, o método desenvolvido pode ser validado, pois demonstrou ser adequado para a determinação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico.

Na validação do método, o parâmetro de linearidade foi constatado no intervalo de concentração de 5,0 a 95,0 µg/mL, pois o *r* foi excelente (0,9999) e na análise estatística, o resultado mostrou que o método apresenta regressão linear satisfatória, ao nível de significância de 5%, pois o *p*-valor ($4{,}97604E^{-11}$) foi inferior a 0,05. Além disso, na plotagem dos resíduos, os pontos apresentaram-se de forma aleatória, o que também é indicativo de boa regressão. A faixa linear de trabalho foi analisada considerando um DPR máximo de 5% (Figura 24), e segundo os resultados, não apresentou desvios de linearidade, pois os DPR calculados em todas as concentrações foram praticamente nulos, o que mais uma vez, confirma a linearidade do método na faixa de concentração estabelecida.

A seletividade do método foi comprovada, uma vez que os adjuvantes presentes na formulação do creme, a fase móvel, bem como os produtos de degradação não interferiram na detecção, identificação e quantificação do AF. Em todas as condições de degradação (oxidativa, neutra, fotolítica, ácida e alcalina) houve decréscimo do pico do AF, sendo que nas degradações neutra, fotolítica e ácida, picos adicionais foram observados, e as resoluções foram satisfatórias. O AF foi mais estável à degradação fotolítica e apresentou maior degradação em condição alcalina. Além disso, foi comprovado que o método desenvolvido é indicativo de estabilidade, pois foi capaz de diferenciar o AF dos demais produtos de degradação observados.

Na análise da precisão do método por repetibilidade e precisão intermediária, os DPR das áreas obtidas em todas as concentrações avaliadas, assim como a diferença em porcentagem entre as análises realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes, não foram superiores a 2%, indicando boa precisão do método cromatográfico.

Os valores de LD e LQ indicaram a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade o AF em formulações de creme na faixa linear estabelecida.

O teste de recuperação demonstrou que o método apresenta exatidão satisfatória, pois considerando o erro analítico de ± 2%, o intervalo de recuperação pode variar entre 98-102%, e a média recuperada foi de 101,22%.

Na análise da robustez pelo teste de Youden, nenhum efeito considerado significativo foi observado no método quando submetido às alterações propostas, pois todas as alterações "inferiores" apresentaram efeitos menores que 1,94, assim como nas alterações "superiores" os efeitos foram inferiores que 1,10, valores estes que correspondem ao valor resultante de duas vezes

o DP de todas as médias dos respectivos ensaios. O teste de Youden permite não só avaliar se o método é robusto, mas também aponta a influência de cada parâmetro analítico nos resultados finais. A ideia básica deste teste é introduzir várias mudanças de uma só vez, de tal maneira que os efeitos das mudanças individuais possam ser determinados (INMETRO, 2011; YOUDEN; STEINER, 1975). Nesse sentido, o maior efeito observado entre as alterações "inferiores" e "superiores" foram a variação do solvente orgânico (1,35) e a variação do pH (0,68), respectivamente.

O teor médio do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico foi de 104%, o qual encontra-se de acordo com o intervalo de 90 a 110%, especificado na Farmacopeia Britânica (2010).

Portanto, o método cromatográfico desenvolvido e validado, além de apresentar vantagens em relação aos métodos descritos na literatura (tempo de retenção, volume de injeção, vazão e composição da FM), pode ser utilizado como indicativo de estabilidade, uma vez que apresentou características de performance apropriadas e satisfatórias (linearidade, seletividade, precisão, LD, LQ, exatidão e robustez), demonstrando ser adequado para a identificação e quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico na rotina da indústria farmacêutica.

11 MÉTODO MICROBIOLÓGICO POR TURBIDIMETRIA

O percentual médio dos antimicrobianos é avaliada por meio da resposta do micro-organismo teste frente ao fármaco. Esta resposta consiste em uma função direta da concentração da substância ativa presente no produto comparada ao padrão, que produz inibição similar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Compêndios oficiais descrevem dois métodos para a avaliação do percentual médio dos antimicrobianos: o método microbiológico por turbidimetria e por difusão em ágar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010; USP 37, 2014).

No ensaio microbiológico por difusão em ágar, a substância em análise se difunde em meio de cultura sólido inoculado com o micro-organismo teste (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Após aproximadamente 21 horas, observa-se o halo de inibição, cujo diâmetro é proporcional à concentração da amostra (HEWITT, 2003). Neste ensaio é imprescindível que se tenha crescimento microbiano homogêneo para formação de halos de inibição regulares e bem delimitados. Dentre suas limitações, destacam-se a dificuldade de difusibilidade de alguns fármacos no meio de cultura sólido e a reatividade entre o meio de cultura e o fármaco em determinados casos. Estes limitantes podem ser eliminados utilizando o método microbiológico por turbidimetria, que baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido pela turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos sensíveis ao antimicrobiano, contidos em meio de cultura líquido (ESMERINO et al., 2004).

O método microbiológico por turbidimetria pode ser utilizado para avaliar o percentual médio dos antimicrobianos de forma mais prática e rápida, quando comparado aos tradicionais ensaios microbiológicos por difusão em ágar (PEDROSO; SALGADO, 2014; SILVA; SALGADO, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2013; VIEIRA; FIUZA; SALGADO, 2014). No entanto, soluções coloridas e turvas podem interferir na determinação da resposta. Em ambos os métodos, substâncias inibidoras de crescimento microbiano, como por exemplo, solventes orgânicos utilizados em processos extrativos e substâncias presentes na amostra, devem ser adequadamente neutralizadas antes do início da realização do ensaio (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; RIPPERE, 1979).

Na literatura, existem alguns trabalhos que descrevem a quantificação do AF em diversas matrizes, utilizando o método de difusão em ágar (BARTOSHEVICH et al., 1976; HIKAL; SHIBL, A.; EL-HOOFY, 1982; KANAZAWA; KURAMATA, 1964; KOROLEVA, 1971), no entanto, nenhum método utilizando o ensaio turbidimétrico foi encontrado. Neste contexto, o desenvolvimento deste ensaio microbiológico para avaliação do percentual médio do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico faz-se necessária e indispensável frente às vantagens deste método em relação ao que atualmente é preconizado.

11.1 Material e método

11.1.1 Ensaio

Neste método foi utilizado o ensaio de delineamento de retas paralelas 3x3 preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010). Como procedimento geral, no dia anterior ao experimento, tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura devidamente fechados com tampão de algodão envolvido em gaze foram esterilizados por 15 minutos a 121ºC, em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Luferco®), juntamente com erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL do mesmo meio de cultura, alguns frascos de vidro, ponteiras e água purificada (osmose reversa). Os meios de cultura foram preparados conforme especificado nos rótulos pelos fabricantes, e as pesagens foram realizadas em balança semi-analítica modelo B160 (Micronal®).

Após resfriamento do erlenmeyer contendo 30 mL do meio de cultura estéril, procedeu-se o preparo do inóculo: os micro-organismos testes foram inoculados utilizando alça de platina em fluxo laminar, e mantidos em estufa ECB 1.2 digital (Odontobrás®) a temperatura de 35ºC ± 2ºC, durante 24 horas anteriores à realização do experimento, para promover adequado crescimento. Posteriormente, este inóculo foi padronizado em espectrofotômetro modelo DU 530 (Beckman Coulter®) em 580 nm, obtendo-se transmitância de 25% ± 2% e utilizado imediatamente, conforme recomendado na Farmacopeia Brasileira (2010).

No dia do experimento após o preparo das soluções, foram transferidos 200 µL das soluções de trabalho e quantidade específica do inóculo padronizado para os tubo de ensaio, com auxílio de micropipeta (Labmate soft®). Além destes tubos, foram preparados um tubo para o controle positivo (10,0 mL de caldo, quantidade específica de inóculo) e um para o controle negativo (10,0 mL de caldo). Os tubos de ensaio foram acondicionados em incubadora *shaker* modelo MA420 (Marconi®), com 32 rotações por minuto a temperatura de 35°C ± 2°C, durante 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se o crescimento bacteriano com adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% (Qhemis®) em todos os tubos, inclusive nos tubos controle positivo e controle negativo, e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 530 nm.

Os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo®), banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique®), álcool etílico (LabSynth®) e papel de filtro Qualy® (J. Prolab).

11.1.2 Desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria

No desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria, vários testes preliminares foram realizados a fim de padronizar as condições a serem utilizadas, tais como, micro-organismo,

meio de cultura, solventes, concentrações do inóculo e do fármaco. Os solventes utilizados no preparo das soluções foram estabelecidos antes da realização dos experimentos, pois as soluções tampões de pH 6 e pH 8 não foram adequadas para solubilizar a amostra de creme.

Sendo assim, foi utilizado álcool etílico no preparo da solução estoque e água purificada no preparo das soluções de trabalho. Os meios de cultura também foram previamente selecionados frente ao micro-organismo teste. No entanto, os parâmetros concentrações do inóculo e do fármaco foram modificados de acordo com o micro-organismo utilizado em cada ensaio (Tabela 31).

Tabela 31- Ensaios preliminares realizados durante o desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria

Micro-organismo	Parâmetro
Bacillus subtilis ATCC 9372 IAL 1027	✓ Meio de cultura: caldo BHI ✓ Solventes: álcool etílico e água purificada ✓ Concentrações do inóculo: 1%; 3%; 5%; 8% ✓ Concentrações do AF: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 µg/mL (Razão 2)
Kocuria rhizophila ATCC 9341 IAL 636	✓ Meio de cultura: caldo BHI ✓ Solventes: álcool etílico e água purificada ✓ Concentrações do inóculo: 4%; 6%; 8% ✓ Concentrações do AF: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 µg/mL (Razão 2)
Staphylococcus aureus ATCC 25923 IAL 1606	✓ Meio de cultura: caldo BHI ✓ Solventes: álcool etílico e água purificada ✓ Concentrações do inóculo: 3%; 5%; 7% ✓ Concentrações do AF: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 µg/mL (Razão 2)
Staphylococcus aureus ATCC 25923 IAL 1606	✓ Meio de cultura: caldo BHI ✓ Solventes: álcool etílico e água purificada ✓ Concentrações do inóculo: 4%; 6%; 8% ✓ Concentrações do AF: 0,5; 1,0; 2,0 µg/mL (Razão 2) e 0,75; 1,5; 3,0 µg/mL (Razão 2)
Staphylococcus aureus ATCC 6538 IAL 1851	✓ Meio de cultura: caldo BHI ✓ Solventes: álcool etílico e água purificada ✓ Concentrações do inóculo: 5%; 6%; 7%; 8% ✓ Concentrações do AF: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 µg/mL (Razão 2)
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 IAL 2150	✓ Meio de cultura: caldo casoy ✓ Solventes: álcool etílico e água purificada ✓ Concentrações do inóculo: 6%; 7%; 8% ✓ Concentrações do AF: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 µg/mL (Razão 2), 0,3; 0,9; 2,7 µg/mL (Razão 3), 0,4; 1,2; 3,6 µg/mL (Razão 3), 0,25; 0,75; 2,25 µg/mL (Razão 3)

Os ensaios foram realizados utilizando soluções do AF SQR. Para o preparo da solução estoque com concentração de 250,0 µg/mL, foram pesados 12,5 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com álcool etílico. Posteriormente, foram preparadas as soluções de trabalho, em balões volumétricos de 25 mL, completando o volume com água purificada.

11.1.3 Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado – Extração

Neste ensaio, quatro soluções com o produto acabado na concentração de 0,75 µg/mL foram preparadas: em béquer de 50 mL, foram pesados 625,0 mg do produto acabado (equivalem a 12,5 mg do AF), adicionados 47 mL de álcool etílico e colocado em banho ultrassônico nos tempos pré-estabelecidos (5, 10, 15 e 30 minutos). Após estes tempos, estas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e os volumes foram completados com álcool etílico, para obter solução com concentração de 250,0 µg/mL. Em seguida, procedeu-se às filtrações em frasco de vidro utilizando papel de filtro e alíquotas de 5 mL destas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, cujos volumes foram completados com álcool etílico, para obter soluções estoques com concentração de 25,0 µg/mL. Posteriormente, alíquotas de 0,75 mL destas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com água purificada, para obter soluções de trabalho na concentração de 0,75 µg/mL.

Estas soluções foram analisadas em triplicata, por meio de análise estatística (ANOVA) das absorvâncias do AF nos diferentes tempos, sendo que a extração total foi considerada quando as absorvâncias foram estatisticamente iguais, considerando um nível de significância de 5%.

11.1.4 Validação do método microbiológico por turbidimetria

Na validação do método foram verificados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez, conforme exigido pela ANVISA (2003a) e ICH (2005).

11.1.4.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da média de três curvas analíticas realizadas em dias diferentes e consecutivos. Para análise deste parâmetro, foram utilizados 20 tubos de ensaio, sendo três tubos para cada concentração das soluções do AF SQR e do produto acabado, um para o controle positivo (10,0 mL de caldo casoy, 600 µL de inóculo - *Staphylococcus epidermidis* a 6%) e um para o controle negativo (10,0 mL de caldo casoy).

Para o preparo das soluções do AF SQR, foram pesados 12,5 mg da SQR, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com álcool etílico, para obter solução estoque com concentração de 250,0 µg/mL. Alíquota de 5 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com álcool etílico, para obter solução estoque com concentração de 25,0 µg/mL. Posteriormente, alíquotas de 0,25; 0,75; 2,25 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com água purificada, para obter concentrações de trabalho de 0,25; 0,75; 2,25 µg/mL, respectivamente.

A solução estoque do produto acabado na concentração de 25,0 µg/mL foi preparada conforme descrito no item 11.1.3 (15 minutos de banho ultrassônico). Em seguida, alíquotas 0,25; 0,75; 2,25 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, cujos volumes foram completados com água purificada, para obter as concentrações de trabalho de 0,25; 0,75; 2,25 µg/mL, respectivamente.

O percentual médio do AF foi calculada por meio da equação de Hewitt (HEWITT, 2003), descrita na Equação 14.

$$\text{Percentual médio (\%)} = \text{Antilog } M \times 100 \qquad M = F/b \qquad b = E/I$$

Equação 14

Em que:

$F = 1/3\ [(\bar{A}_1+\bar{A}_2+\bar{A}_3) - (\bar{P}_1+\bar{P}_2+\bar{P}_3)]$

I = logaritmo da razão das doses

$E = 1/4\ [(\bar{A}_3+\bar{P}_3) - (\bar{A}_1+\bar{P}_1)]$

Os resultados foram analisados pelo método dos mínimos quadrados e o ensaio de delineamento de retas paralelas 3x3 foi verificado por teste estatístico (ANOVA). A equação da reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração do fármaco em função da média das absorvâncias de cada concentração utilizada.

11.1.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi verificada em triplicata, com intuito de confirmar se os adjuvantes presentes na formulação do creme teriam algum efeito inibitório que interferisse na análise. Este parâmetro foi avaliado por meio da análise estatística (ANOVA) entre as absorvâncias

da solução da matriz isenta do analito (placebo) e das absorvâncias do controle positivo (10,0 mL de caldo casoy e 600 µL inóculo - *Staphylococcus epidermidis* a 6%).

A solução estoque do placebo na concentração de 25,0 µg/mL foi preparada da mesma forma que a solução do produto acabado descrita no item 11.1.3 (15 minutos de banho ultrassônico). No entanto, a quantidade de AF que estaria presente na formulação (12,5 mg) foi descontada e a concentração de trabalho utilizada foi de 2,25 µg/mL, para simular a maior concentração da curva analítica. Dessa forma, alíquota de 2,25 mL da solução estoque foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água purificada.

11.1.4.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada em triplicata, em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Na precisão por repetibilidade foram analisadas nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, foram utilizadas três concentrações, concentração baixa (0,25 µg/mL), média (0,75 µg/mL) e alta (2,25 µg/mL) da solução do produto acabado (item 11.1.4.1). Estas amostras foram submetidas a análises sucessivas, realizadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, mesmo laboratório e mesmo analista, cujos resultados foram avaliados com base no DPR.

A precisão intermediária foi determinada por meio da análise do percentual médio do AF obtida em diferentes dias e por analistas diferentes. O preparo das soluções e o cálculo utilizado para determinar a quantidade do AF no produto acabado estão descritos no item 11.1.4.1. Os resultados foram avaliados com base no DPR, e também por meio da diferença entre os percentuais médios determinados por cada analista, conforme demonstrado na Equação 10.

11.1.4.4 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de adição e calculada pela quantidade recuperada, como demonstrado na Equação 11. Neste ensaio, foram preparados três níveis de recuperação, a partir da concentração do meio da curva (0,75 µg/mL = R_2 - 100%), sendo que o R_1 consiste em 80% (0,60 µg/mL) e R_3 em 120% (0,90 µg/mL) da concentração de 0,75 µg/mL.

As soluções estoques do AF SQR e do produto acabado, na concentração de 25,0 µg/mL foram preparadas conforme descrito nos itens 11.1.4.1 e 11.1.3 (15 minutos de banho ultrassônico), respectivamente. Posteriormente, foi preparada solução com concentração de 0,25 µg/mL, transferindo 0,25 mL da solução estoque do produto acabado para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água purificada. As soluções com concentrações de 0,25; 0,75;

2,25 µg/mL foram preparadas transferindo 0,25, 0,75 e 2,25 mL da solução estoque do AF SQR para balões volumétricos de 25 mL, cujos volumes foram completados com água purificada, correspondentes ao AF SQR_1, AF SQR_2 e AF SQR_3. Em outros balões volumétricos de 25 mL identificados como R_1, R_2, R_3, foram transferidas alíquotas de 0,25 mL da solução estoque do produto acabado e alíquotas de 0,35, 0,50 e 0,65 mL da solução estoque do AF SQR, respectivamente, e os volumes foram completados com água purificada, para obter soluções com concentrações de 0,60; 0,75; 0,90 µg/mL, conforme demonstrado na Tabela 32.

Tabela 32- Preparo das soluções para teste de recuperação do método microbiológico por turbidimetria

	Produto acabado (mL) [25,0 µg/mL]	**AF SQR (mL) [25,0 µg/mL]**	**Concentração teórica final (µg/mL)**
Produto acabado	0,25	----	0,25
R_1	0,25	0,35	0,60
R_2	0,25	0,50	0,75
R_3	0,25	0,65	0,90
AF SQR_1	----	0,25	0,25
AF SQR_2	----	0,75	0,75
AF SQR_3	----	2,25	2,25

AF SQR: ácido fusídico substância química de referência

11.1.4.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da alteração de quatro parâmetros: comprimento de onda (528; 530; 532 nm), volume do meio de cultura nos tubos de ensaio (9,9; 10,0; 10,1 mL), tempo de incubação do inóculo em banho de aquecimento sob agitação (3h55min; 4h00min; 4h05min) e marca do caldo casoy (Oxoid; Acumedia). Estes parâmetros foram analisados por meio da determinação do percentual médio do AF e os resultados finais foram avaliados com base no DPR das condições normais frente às condições alteradas. O preparo das soluções e o cálculo utilizado para determinar a quantidade do AF no produto acabado estão descritos no item 11.1.4.1.

11.1.5 Determinação do percentual médio do ácido fusídico no produto acabado

O percentual médio do AF no produto acabado foi determinado por meio do cálculo demonstrado na Equação 14. Este ensaio foi realizado em triplicata, conforme descrito no item 11.1.4.1.

11.2 Resultados

11.2.1 Desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria

Os parâmetros microbiológicos estabelecidos para o método turbidimétrico estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33- Parâmetros estabelecidos para a determinação do AF no produto acabado pelo método microbiológico por turbidimetria

Parâmetro	Descrição
Micro-organismo	*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228, IAL 2150)
Meio de cultura	caldo casoy
Solventes	álcool etílico (solução estoque) e água purificada (soluções de trabalho)
Concentração do inóculo	6%
Concentrações do AF	0,25; 0,75; 2,25 µg/mL

11.2.2 Desenvolvimento do método de preparo do produto acabado – Extração

Na Tabela 34 encontram-se os valores das absorvâncias do AF presente nas amostras do produto acabado, determinadas nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos. Os resultados obtidos na análise estatística (ANOVA) estão dispostos na Tabela 35.

Tabela 34- Absorvâncias do AF presente no produto acabado, em relação ao tempo de extração

	5 min	10 min	15 min	30 min
	0,361	0,349	0,333	0,335
	0,370	0,360	0,337	0,339
	0,359	0,340	0,325	0,323
Média	0,363	0,350	0,331	0,333
DPR (%)	1,65	2,86	1,86	2,50

DPR: desvio padrão relativo

Tabela 35- Análise estatística (ANOVA) dos valores de absorvância do AF obtidos no procedimento de extração nos tempos de 15 e 30 minutos, utilizando o método microbiológico por turbidimetria

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	2,24074E-06	1	2,24E-06	0,0418	0,8479	7,7086
Dentro dos grupos	0,000214296	4	5,36E-05			
Total	0,000216537	5				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

11.2.3 Validação do método microbiológico por turbidimetria

11.2.3.1 Linearidade

Os valores de absorvância obtidos durante avaliação da linearidade do método para as soluções em diferentes concentrações do AF SQR e produto acabado, estão demonstrados na Tabela 36. Os resultados do teste estatístico (ANOVA) para avaliar o delineamento de retas paralelas, encontram-se na Tabela 37.

Na Figura 32 estão representadas as curvas analíticas construídas a partir das médias das absorvâncias do AF SQR e do fármaco na forma farmacêutica de creme, nas concentrações de 0,25; 0,75; 2,25 µg/mL.

Tabela 36- Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica do AF, pelo método microbiológico por turbidimetria

	Absorvâncias (Média de três determinações)					
	AF SQR$_1$ (0,25 µg/mL)	**AF SQR$_2$ (0,75 µg/mL)**	**AF SQR$_3$ (2,25 µg/mL)**	**PA$_1$ (0,25 µg/mL)**	**PA$_2$ (0,75 µg/mL)**	**PA$_3$ (2,25 µg/mL)**
Análise 1	0,427	0,331	0,234	0,424	0,325	0,231
Análise 2	0,439	0,333	0,236	0,431	0,329	0,234
Análise 3	0,415	0,328	0,240	0,411	0,322	0,242
Médias	0,427	0,331	0,236	0,422	0,325	0,235
DPR (%)	2,73	0,81	1,37	2,46	1,03	2,40

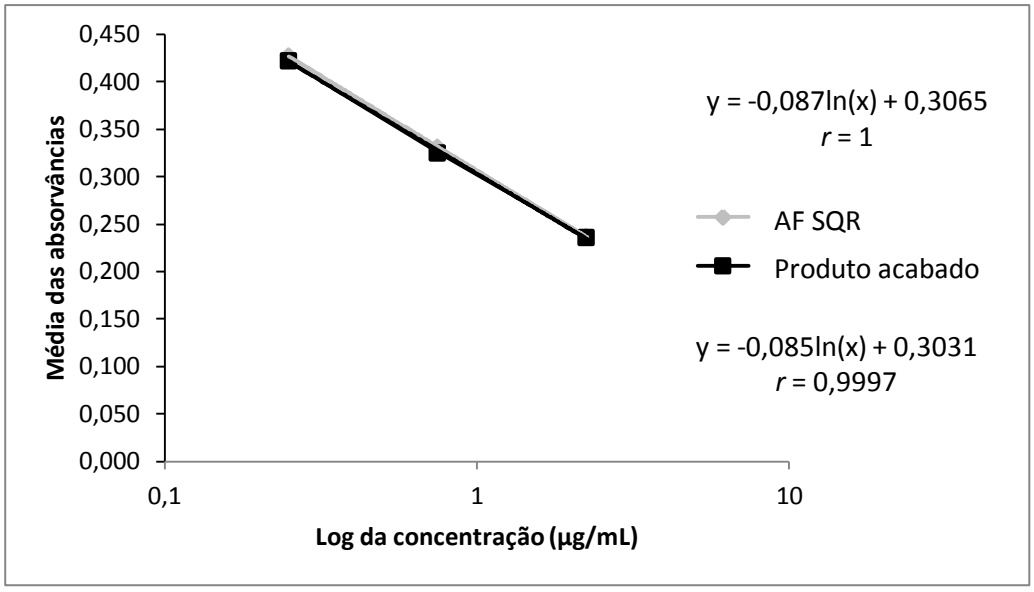
AF SQR: ácido fusídico substância química de referência; DPR: desvio padrão relativo; PA: produto acabado

Tabela 37- Análise estatística (ANOVA) dos valores médios das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica do AF, utilizando o método microbiológico por turbidimetria

Fontes de variação	*gl*	*SQ*	*MQ*	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Preparação	1	0,0001	0,0001	1,54	4,96
Regressão	1	0,1066	0,1066	2408,93*	4,96
Paralelismo	1	0,0000	0,0000	0,26	4,96
Quadrático	1	0,0000	0,0000	0,44	4,96
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,18	4,96
Entre doses	5	0,11	0,02	482,27*	3,33
Entre tubos	2	0,00	0,00	1,88	4,10
Dentro (erro)	10	0,00	0,00	.....	.....
Total	17	0,11	.....	.....	.....

*$p < 0,05$
gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

Figura 32- Curva analítica das soluções do AF SQR e produto acabado, obtidas pelo método microbiológico por turbidimetria



11.2.3.2 Seletividade

Os resultados do parâmetro de seletividade do método microbiológico por turbidimetria estão dispostos nas Tabelas 38 e 39.

Tabela 38- Seletividade do método microbiológico por turbidimetria

	Absorvâncias	
	Controle positivo	**Solução placebo**
	0,522	0,514
	0,528	0,506
	0,519	0,517
Média	0,523	0,512
DPR (%)	0,88	1,11

DPR: desvio padrão relativo

Tabela 39- Análise estatística (ANOVA) do parâmetro de seletividade do método microbiológico por turbidimetria

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	0,00017	1	0,000171	6,4	0,06468	7,70865
Dentro dos grupos	0,00011	4	2,67E-05			
Total	0,00028	5				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

11.2.3.3 Precisão

Os resultados da precisão do método por repetibilidade e da precisão intermediária, encontram-se nas Tabelas 40 e 41, respectivamente.

Tabela 40- Precisão por repetibilidade do método microbiológico por turbidimetria

Concentrações da solução do PA (µg/mL)	Absorvâncias	Absorvância média ± DP	DPR (%)	DPR médio total (%)
0,25	0,424 0,431 0,411	0,422 ± 0,010	2,46	
0,75	0,325 0,329 0,322	0,325 ± 0,003	1,03	1,09
2,25	0,231 0,234 0,242	0,235 ± 0,006	2,40	

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; PA: produto acabado

Tabela 41- Precisão intermediária do método microbiológico por turbidimetria

Analistas e dias diferentes	Percentual médio (%)
1	104,64
2	106,92
Média	105,78
DPR (%)	1,52
Dif (%)	2,13

Dif: diferença em porcentagem entre as análises;
DPR: desvio padrão relativo

11.2.3.4 Exatidão

Os resultados obtidos para cada nível de concentração analisada na avaliação da exatidão do método, estão apresentados na Tabela 42, cujo valor médio da recuperação foi de 101,95%.

Tabela 42- Exatidão do método microbiológico por turbidimetria

	Concentração final esperada (µg/mL)	Concentração final encontrada* (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R_1	0,60	0,63	102,54		
R_2	0,75	0,79	103,84	101,95	0,90
R_3	0,90	0,93	99,47		

*Média de três determinações. DPR: desvio padrão relativo

11.2.3.5 Robustez

Os valores médios calculados do percentual médio do AF durante a avaliação da robustez do método, bem como os DPR obtidos após as modificações dos parâmetros microbiológicos estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 43- Parâmetros da avaliação da robustez do método microbiológico por turbidimetria para análise do AF

Variável	Parâmetros avaliados	Percentual médio do ácido fusídico (%)	Média (%)	DPR (%)	DPR médio total (%)
Comprimento de onda (nm)	528	103,05	103,93	0,77	2,10
	530	104,13			
	532	104,61			
Volume do meio de cultura (mL)	9,9	99,73	103,78	3,54	
	10,0	104,74			
	10,1	106,88			
Tempo de incubação do *S. epidermidis*	3h55min	99,86	103,20	2,96	
	4h00min	103,84			
	4h05min	105,88			
Marca do caldo casoy	Oxoid	103,91	104,74	1,13	
	Acumedia	105,58			

DPR: desvio padrão relativo

11.2.4 Determinação do percentual médio do ácido fusídico no produto acabado

Na Tabela 44, encontram-se os resultados obtidos na determinação do percentual médio do AF na amostra de creme.

Tabela 44- Percentual médio do AF no produto acabado, calculado a partir do método microbiológico por turbidimetria

	Percentual médio (%)
	104,65
	105,26
	103,90
Média	104,60
DPR (%)	0,70

DPR: desvio padrão relativo

11.3 Discussão

O método microbiológico por turbidimetria é mais sensível e rápido em relação aos ensaios de difusão em ágar. A primeira vantagem se deve à utilização de meio de cultura líquido em que a solução em análise, por difundir-se mais facilmente, responde a concentrações menores do fármaco, e a outra vantagem está relacionada com o tempo incubação, uma vez que este método necessita de apenas 4 horas e no ensaio de difusão em ágar, são necessárias cerca de 21 horas de incubação do micro-organismo para obtenção do resultado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Nos ensaios microbiológicos, o fármaco deve apresentar resposta significativa frente ao micro-organismo teste (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Nesse sentido, diferentes micro-organismos foram testados em combinação com alterações das condições microbiológicas, a fim de encontrar uma faixa linear adequada para quantificação do AF no produto acabado.

Nos testes preliminares, foi observado que o AF não apresentou ação inibitória sobre o *Bacillus subtilis*, mesmo utilizando concentração alta do fármaco (64,0 µg/mL) e concentração baixa do inóculo (1%), cujas respostas foram praticamente iguais ao controle positivo. O micro-organismo *Kocuria rhizophila* não apresentou bom crescimento nos três meios de cultura testados, indicando controles positivos muito baixos, mesmo utilizando inóculo a 8%.

Cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram respostas lineares apropriadas entre as concentrações do AF e a sua ação inibitória sobre o micro-organismo teste. No entanto, optou-se pelo micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*, o qual mostrou alta sensibilidade frente ao fármaco, ótima reprodutibilidade e linearidade adequada, além de ser considerado micro-organismo de baixa patogenicidade. Em relação aos meios de cultura BHI e casoy, ambos promoveram crescimentos satisfatórios e semelhantes para o micro-organismo teste, sendo assim, optou-se pelo caldo casoy, por apresentar baixo custo em relação ao outro meio de cultura testado.

O método de preparo da amostra do produto acabado baseou-se no mesmo princípio proposto em CLAE, no entanto, o solvente extrator utilizado foi o álcool etílico e o tempo necessário para a extração do AF na matriz do creme foi de 15 minutos (Tabela 35), pois não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de 30 minutos (F calculado = 0,0418 foi menor que F tabelado = 7,7086).

Em relação aos parâmetros de validação do método, a linearidade foi comprovada, uma vez que nos ensaios de delineamento de retas paralelas, especificado na Farmacopeia Brasileira (2010), os parâmetros “quadrático”, “diferença de quadrático” e “paralelismo” não foram significativos, pois apresentaram F calculados menores que os F tabelados. Além disso, o método apresentou regressão

significativa (F calculado = 2408,93 foi maior que o F tabelado = 4,96), ao nível de significância de 5% e valores excelentes de *r* para AF SQR (1,0) e produto acabado (0,9997).

A seletividade do método também foi comprovada, já que os valores das absorvâncias médias da solução do controle positivo e da solução placebo não apresentaram diferença estatisticamente significativa (F calculado = 6,4 foi menor que F tabelado = 7,71), ao nível de significância de 5%, além de apresentarem DPR baixos. Sabe-se que os efeitos inibitórios do sorbato de potássio, conservante presente na matriz do creme e do álcool etílico, utilizado como um dos solventes durante o preparo das amostras, foram neutralizados por meio das diluições realizadas no ensaio (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO, KANEKO; PINTO, 2010).

Na análise do parâmetro de precisão, os resultados igualmente mostraram não haver diferenças significativas entre as análises realizadas no mesmo dia (precisão por repetibilidade) e em dias diferentes e por analistas diferentes (precisão intermediária), pois os DPR das absovâncias obtidas em todas as concentrações avaliadadas, assim como a diferença em porcentagem entre as análises realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes não foram superiores a 5%, indicando boa precisão do método.

O teste de adição demonstrou que o método apresenta exatidão satisfatória, sendo que a média recuperada foi de 101,95%, e este valor poderia variar entre 95-105%, considerando o erro analítico do ensaio microbiológico de ± 5% em relação ao valor verdadeiro.

Em relação à robustez do método, as modificações nos parâmetros (comprimento de onda, volume de meio de cultura, tempo de incubação do inóculo e a marca do meio de cultura) não promoveram efeitos significativos, uma vez que os DPR foram inferiores a 15%. No entanto, o volume do meio de cultura e o tempo de incubação do inóculo mostraram-se mais sensíveis por apresentarem DPR maiores comparados aos demais parâmetros avaliados. Nesse sentido, para obtenção de resultados precisos, estes dois parâmetros merecem maior atenção durante a execução deste ensaio microbiológico.

A porcentagem média do AF presente nas amostras do produto acabado foi de 104,60%, valor que se encontra dentro da faixa de 90-110%, especificada na Farmacopeia Britânica (2010).

De acordo com os resultados apresentados, o método proposto atendeu todas as exigências recomendadas pela ANVISA (2003a) e ICH (2005), mostrando ser linear, preciso, seletivo, exato e robusto, e portanto, pode ser utilizado para a quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico, em análises de rotina do CQ como alternativa ao método de difusão em ágar atualmente preconizado na literatura.

12 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

A análise comparativa entre métodos é uma ferramenta necessária para determinar se os procedimentos podem ser intercambiáveis. Nesse sentido, os resultados devem ser suficientes para comprovar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP 37, 2014).

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre a precisão analítica dos métodos propostos neste trabalho para a quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico, foi realizada análise estatística do teor médio do AF obtido no método por CLAE e do percentual médio do AF obtido no método microbiológico por turbidimetria, por meio da análise de variância (ANOVA) utilizando nível de significância de 5%.

12.1 Resultados

Os resultados obtidos na determinação quantitativa do AF pelos métodos propostos encontram-se na Tabela 45. A análise estatística (ANOVA) destes valores encontra-se na Tabela 46.

Tabela 45- Valores obtidos na determinação do teor do AF pelo método de CLAE e do percentual médio do AF pelo método turbidimétrico, em amostras do produto acabado

Métodos	CLAE	Turbidimétrico
	103,60	104,65
	104,64	105,26
	103,76	103,90
Média (%)	104,00	104,60
DPR (%)	0,54	0,65

DPR: desvio padrão relativo

Tabela 46- Análise estatística (ANOVA) dos resultados obtidos no doseamento do AF no produto acabado, pelo método de CLAE e turbidimétrico

ANOVA						
Fonte da variação	***SQ***	***gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	0,5501	1	0,5501	1,4183	0,2995	7,7086
Dentro dos grupos	1,5514	4	0,3879			
Total	2,1015	5				

gl: graus de liberdade; MQ: médias quadráticas; SQ: soma dos quadrados

12.2 Discussão

Os resultados obtidos no teste estatístico (Tabela 46) demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos no método por CLAE e no ensaio microbiológico por turbidimetria, já que o valor de F calculado (1,42) foi menor que o valor de F tabelado (7,71).

Apesar da análise estatística comprovar que os métodos propostos são equivalentes e adequados para a determinação quantitativa do AF na forma farmacêutica de creme, é necessário ressaltar que existem diferenças consideráveis entre estes dois métodos.

O método por CLAE é amplamente utilizado pelas indústrias farmacêuticas, por ser prático, muito preciso e apropriado para a determinação de princípios ativos, produtos de degradação e impurezas. No entanto, por se tratar de um método físico-químico, pode não ser capaz de indicar a verdadeira atividade biológica dos antibacterianos. Sabe-se que muitas vezes, ao correlacionar os valores obtidos em ensaios microbiológicos com aqueles obtidos em métodos físico-químicos, os resultados podem ser diferentes. Por este motivo, os ensaios microbiológicos, mesmo sendo menos precisos e mais demorados, são essenciais e indispensáveis para a determinação do percentual médio dos antimicrobianos nos processos de CQ e de fabricação (FIORENTINO et al., 2013; LOPES; SALGADO, 2010; MORENO, SALGADO, 2007; PEDROSO; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2013)

Dessa forma, na análise do AF, recomenda-se que o método físico-químico seja executado em paralelo com o ensaio microbiológico, a fim de assegurar resultados confiáveis em relação à sua eficácia terapêutica.

13 CONCLUSÕES

- ✓ O AF SQR e o produto acabado foram analisados quanto às suas características organolépticas e físico-químicas e demonstraram estar de acordo com as especificações;
- ✓ Foi desenvolvido um método confiável para a identificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico, por meio da espectrofotometria de absorção na região do Vis. Este método apresenta-se mais seguro comparado com o método existente na literatura para a determinação do fármaco;
- ✓ O AF presente na formulação de creme dermatológico também foi identificado pelo método de CCD, cujos adjuvantes não interferiram na análise;
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método simples, rápido, econômico e indicativo de estabilidade, para identificação e quantificação do AF em formulações de creme dermatológico por CLAE, utilizando coluna Zorbax Eclipse XBD C_{18} Agilent® (4,6 x 250 mm, 5 µm), pré-coluna Metaguard Polaris 4,6 mm 5U C_{18} PTC – Agilent®, FM: acetonitrila e água, na proporção de 72:28 (v/v), pH 3,5 ajustado com ácido acético, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20,0 µL e faixa de concentração de 5,0 a 95,0 µg/mL;
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método microbiológico por turbidimetria, capaz de determinar o percentual médio do AF em formulação de creme dermatológico, na faixa de 0,25 a 2,25 µg/mL, utilizando *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228, IAL 2150) a 6% como micro-organismo teste e caldo casoy;
- ✓ A análise comparativa entre os métodos por CLAE e o método microbiológico por turbidimetria demonstrou que ambos apresentam precisão equivalente para a quantificação do AF na forma farmacêutica de creme dermatológico;
- ✓ Os métodos mostraram-se apropriados para a identificação e/ou quantificação do AF em amostras de creme dermatológico, podendo ser utilizados como alternativas nas análises do CQ deste fármaco.

REFERÊNCIAS

ADENIS, J. P.; ARRATA, M.; GASTAUD, P.; LIMON, S.; MASSIN, M. A multicenter randomized study of fusidic acid ophthalmic gel and rifamycine eyedrops in acute conjunctivitis. **Journal Français D'Ophtalmologie,** v. 12, n. 4, p. 317-322, 1989.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8. ed. São Paulo: Artmed, 2007. 775p.

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, L.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 59, n. 1, p. 29–37, 2007.

AL-SHAALAN, N. H. Atomic absorption spectrometric determination of fusidic acid in bulk powder and in pharmaceutical dosage form. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,** v. 2, n. 6, p. 135-143, 2010.

ANDERSON, J. D. Fusidic acid: new opportunities with an old antibiotic. **Canadian Medical Association Journal,** v. 122, p. 765–769, 1980.

ANKAM, R.; MUKKANTI, K.; DURGAPRASAD, S.; NAIDU, P. V. L. Simultaneous determination of halobetasol propionate and fusidic acid related substances by reversed phase high performance liquid chromatographic method**. Asian Journal of Chemistry,** v. 22, n. 5, p. 3376-3380, 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do **"Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", Resolução RDC nº 899** de 29 de maio de 2003, publicada no Diário Oficial da União, Poder Executivo, em 02 de junho de 2003a.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do **Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos, Resolução RDC nº 210** de 04 de agosto de 2003, publicada no Diário Oficial da União, em 14 de agosto de 2003b, seção 1.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências**, Resolução RDC nº 44** de 26 de outubro de 2010, publicada no Diário Oficial da União, em 28 de outubro de 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gerência Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos – GGIMP**, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos.** 2. ed. Brasília, 2000.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis.** Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 18. ed. Gaithesburg: AOAC, Gaithersburg, MD, 2002.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **TRAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.

AUGUSTO, F.; DE ANDRADE, J. C.; CUSTODIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. **Chemkeys**, 2000.

AULTON, E. M. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.

BADDOUR, M. M.; ABUELKHEIR, M. A.; FATANI, A. J. Trends in antibiotic susceptibility patterns and epidemiology of MRSA isolates from several hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,** v. 5, n. 30, p. 1-11, 2006.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (Calibração univariada). **Química Nova,** v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Campinas: Unicamp, 2001. 2401p.

BARTOSHEVICH, I.; EGOROV, A. A.; GOL'DSHTEIN, V. L.; JONES, I. J.; LUNI, P. A. Utilization of automatic systems for determining the biological activity of antibiotics by the agar diffusion method. **Antibiotiki,** v. 21, n. 2, p. 122-127, 1976.

BENDICHO, C.; DE LA CALLE, I.; PENA, F.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 31, p. 50-60, 2012.

BERGEN, P. J.; LANDERSDORFER, C. B.; LEE, H. J.; LI, J.; NATION, R. L. 'Old' antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. **Current Opinion in Infectious Diseases,** v. 25, n. 6, p. 626-633, 2012.

BIEDENBACH, D. J.; RHOMBERGA, P. R.; MENDESA, R. E.; JONES, R. N. Spectrum of activity, mutation rates, synergistic interactions, and the effects of pH and serum proteins for fusidic acid (CEM-102). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 66, n. 3, p. 301–307, 2010.

BREAUX, J.; JONES, K.; BOULAS, P. Analytical methods development and validation. **Pharmaceutical Technology,** p. 6-13, 2003.

BRODERSEN, R. Fusidic acid binding to serum albumin and interaction with binding of bilirubin. **Acta Paediatrica Scandinavica,** v. 74, n. 6, p. 874-880, 1985.

BROWN, N. M.; REEVES, D. S.; MCMULLIN, C. M. The pharmacokinetics and protein binding of fusidic acid in patients with severe renal failure requiring either haemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 39, n. 6, p. 803–809, 1997.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta,** v. 128, p. 93-106, 1998.

BYARUGABA, D. K. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 24, n. 2, p. 105-110, 2004.

BYRNE, J.; VELASCO-TORRIJOSB, T.; REINHARDT, R. Development and validation of a novel stability-indicating HPLC method for the simultaneous assay of betamethasone-17-valerate, fusidic acid, potassium sorbate, methylparaben and propylparaben in a topical cream preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 5, n. 96, p. 111–117, 2014.

CAPELO, J. L.; MADURO, C. C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Ultrasound Sonochemistry,** v. 12, n. 3, p. 225–232, 2005.

CAPELO-MARTINEZ, J. L. **Ultrasound in chemistry: analytical applications.** Germany: Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 145p. Disponível em: < http://books.google.com.br/books?id=G9Ca5EkZIgEC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 17 jun. 2015.

CARLSTROM, A.; DORNBUSCH, K.; HAGELBERG, A. Use of electrophoresis in the identification and quantitation of antibiotics administered in combinations. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases,** v. 9, n. 1, p. 46-54, 1977.

CASTRO, L. M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Analytical applications of ultrasound,** Elsevier, 2007. 350p. Disponível em: < http://books.google.com.br/books?id=IQn1rlshrYMC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CHATER, E. H.; FLYNN, J.; WILSON, A. L. Fucidin levels in osteomyelitis. **Journal of the Irish Medical Association,** v. 65, n. 20, p. 506-508, 1972.

CHEN, H. J.; HUNG, W. C.; TSENG, S. P.; TSAI, J. C.; HSUEH, P. R.; TENG, L. J. Fusidic acid resistance determinants in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 54, n. 12, p. 4985-4991, 2010.

CHRISTIANSEN, K. Fusidic acid adverse drug reactions. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 12, n. 2, p. S3–S9, 1999.

COLE, R. J.; SCHWEIKERT, M. A. **Handbook of secondary fungal** m**etabolites**. New York: Academic Press, 2003. 492p.

COLLIGNON, P.; TURNIDGE, J. Fusidic acid *in vitro* activity. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 2, p. S45-S58, 1999.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Unicamp, 2006. 453p.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J.; DONATE, P. M.; **Fundamentos de Química Experimental.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2014. 278p.

COSTI, E. M.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S.; PEREZ-BENDITO, D. Quantitation of fusidane antibiotics in pharmaceuticals using the surfactant–dye binding degree method. **Analytica Chimica Acta,** v. 549, n. 1-2, p. 159–165, 2005.

CUNDLIFFE, E. The mode of action of fusidic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 46, p. 1794–1801, 1972.

CURRIE, L. A. International recommendations offered on analytical detection and quantification concepts and nomenclature. **Analytica Chimica Acta,** v. 391, p. 103-134, 1999.

CUSTODIO, R.; DE ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova,** v. 20, n. 2, p. 219-222, 1997.

DARLEY, E. S.; MACGOWAN, A. P. Antibiotic treatment of Gram-positive bone and joint infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 53, n. 6, p. 928–935, 2004.

DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus.* **Internal Medicine Journal,** v. 35, n. 2, p. 35 S79–S96, 2005.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola,** n. 7, p. 21-25, 1998.

DEODHAR, S. D.; RUSSELL, F.; DICK, W. C.; NUKI, G.; BUCHANAN, W. W. Penetration of sodium fusidate (fusidin) in the synovial cavity. **Scandinavian Journal of Rheumatology,** v. 1, n. 1, p. 33-39, 1972.

DIASSI, P. A.; KRAKOWER, G. W.; BACSO, I.; ANN VAN DINE, H. Transformations of fusidic acid-ioxygenated-4α,8,14-trimethyl-18-norandrostanes. **Tetrahedron,** v. 22, p. 3343-3458, 1966.

DUVOLD, T.; SORENSEN, M. D.; BJOERKLING, F.; HENRIKSEN, A. S.; RASTRUP-ANDERSEN, N. Synthesis and conformational analysis of fusidic acid side chain derivatives in relation to antibacterial activity. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 44, n. 19, p. 3125–3131, 2001.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; SCHELESKY, M. E. A microbiological assay for determining the potency of antimicrobials. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde,** v. 10, n. 1, p. 53-60, 2004.

ETTRE, L. S. Nomenclature for chromatography. **Pure and Applied Chemistry,** v. 65, n.4, p. 819-872, 1993.

EURACHEM. Working group. **The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.** 2. ed. Copyright LGC (Teddington), 2014. 61p.

EVANS, D. I. Granulocytopenia due to fusidic acid. **The Lancet,** v. 2, n. 8615, p. 851, 1988.

FALAGAS, M. E.; KOPTERIDES, P. Old antibiotics for infections in critically ill patients. **Current Opinion in Critical Care,** v. 13, p. 592–597, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. I, p. 261-269; v. II, p. 75-87.

FARMACOPEIA BRITÂNICA. London: The Stationary Office, v. I, p. 155-163; v. III, p.2373-2375, 2010.

FARMACOPEIA EUROPEIA. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010. v. 2, p. 1393-1399.

FDA - Food and Drug Administration. **Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.** Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2012.

FDA - Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods.** Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2004.

FERNANDES, P.; PEREIRA, D. Efforts to support the development of fusidic acid in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 7, p. S542–S546, 2011.

FIORENTINO, F. A. M.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 49, p. 351–358, 2013.

GEORGE, A.; RUBIN, G. A systematic review and metaanalysis of treatments for impetigo. **British Journal of General Practice,** v. 53, n. 491, p. 480–487, 2003.

GILCHRIST, S. E.; LETCHFORD, K.; BURT, H. M. The solid-state characterization of fusidic acid. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 422, n. 1-2, p. 245–253, 2012.

GODTFREDSEN, W. O.; JAHNSEN, S.; LORCK, H.; ROHOLT, K.; TYBRING, L. Fusidic acid, a new antibiotic. **Nature**, v. 10, p. 193-987, 1962.

GODTFREDSEN, W. O.; RASTRUP-ANDERSEN, N.; VANGEDAL, S.; OLLIS, W. D. Metabolites of *Fusidium coccineum*. **Tetrahedron,** v. 35, p. 35, 2419–2431. 1979.

GODTFREDSEN, W. O.; VANGEDAL, S. The structure of fusidic acid. **Tetrahedron,** v. 18, p. 1029–1048, 1962.

GODTFREDSEN, W. O.; VON DAEHNE, W.; VANGEDAL, S. The stereochemistry of fusidic acid. **Tetrahedron**, v. 21, p. 350-353, 1965.

GODTFREDSEN., W. O.; VON DAEHN. W.; TYBRING, L.; VANGEDAL, S. Fusidic acid derivatives relationship between structure and antibacterial activity. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 9, n. 1, p. 15-22, 1966.

GOLLEDGE, C. Fusidic acid in other infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 2, p. S11–S15, 1999.

GONTIJO, B.; PEREIRA, L. B.; SILVA, C. M. R. Antibióticos em dermatologia. **Sociedade de Brasileira de Pediatria**. Módulo B – Fascículo XIII, 2003.

GOSWAMI, N.; GUPTA, V. R. M.; JOGIA, A. H. Development and validation of a novel stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of halometasone, fusidic acid, methylparaben, and propylparaben in topical pharmaceutical formulation. **Scientia Pharmaceutica,** v. 81, n. 2, p. 505-518, 2013.

GRAYSON, M. L.; CROWE, S. M.; MCCARTHY, J. S.; MILLS, J.; MOUTON, J. W.; NORRBY, S. R.; PATERSON, D. L.; PFALLE, M. A. **Kucers' The use of antibiotics.** 6. ed. CRC Press, v. 1, 2010, 3223p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=2-nwinRKtBQC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 20 jun. 2015.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry,** v. 68, n. 9, p. 305–309, 1996.

GUARDIA, M.; ARMENT, S. **Green analytical chemistry: theory and practice.** Elsevier, v. 57, 2010. 268p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=NnTcJY2w2qMC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 23 jun. 2015.

GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Challenges in green analytical chemistry.** Royal Society of Chemistry, 2011. 316p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=2QfN2mR9umcC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 17 jun. 2015.

GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Handbook of green analytical chemistry.** John Wiley & Sons, 2012. 544p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=oMk5_GDppq0C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 25 jun. 2015.

GUENTHNER, S. H.; WENZEL, R. P. *In vitro* activities of teichomycin, fusidic acid, flucloxacillin, fosfomycin, and vancomycin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 26, p. 268–269, 1984.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova,** v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitaiva.** 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862p.

HASSAN, S. M.; AMER, S. M.; AMER, M. M. Determination of fusidic acid and sodium fusidate in pharmaceutical dosage forms by first-derivative ultraviolet spectrophotometry. **The Analyst,** v.112, n. 10, p. 1459-1461, 1987.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach.** Boca Raton, Interpharm/CRC, 2003. 97–11p.

HIERHOLZER, G.; KNOTHE, H. REHN, J. Penetration of fusidic acid into aseptic bone tissue. **Arzneimittelforschung,** v. 20, n. 10, p. 1473-1476, 1970.

HIKAL, A. H. Assay of fusidic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 13, n. 3, p. 297-301, 1983.

HIKAL, A. H.; SHIBL, A.; EL-HOOFY, S. Determinations of sodium fusidate and fusidic acid in dosage forms by high-performance liquid chromatography and a microbiological method. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 71, n. 11, p. 1297-1298, 1982.

HOGAN, D. J. Widespread dermatitis after topical treatment of chronic leg ulcers and stasis dermatitis. **Canadian Medical Association Journal,** v. 138, n. 4, p. 336-338, 1988.

HONG, C.; RONG, Z. Determination of dexamethasone acetate and fusidic acid in compound dexamethasone and fusidic acid cream. **Chinese Journal of Antibiotics,** v. 37, p. 924-926, 2012.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International,** v. 11, p. 96-105, 1998.

HUMBLE, M. W.; EYKYN, S.; PHILLIPS, I. Staphylococcal bacteraemia, fusidic acid, and jaundice. **British Medical Journal,** v. 280, n. 6230, p. 14795-1498, 1980.

ICH - International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedure: text and methodology Q2 (R1).** ICH Steering Committee, Switzerland, 2005. Disponível em: <http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf.>. Acesso em: 25 jun. 2015.

ICH - International Conference on Harmonization. **Validation of analytical procedures: Methodology, Q2A e Q2B** (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos,** DOQ-CGCRE-008, 2011.

IWARSON, S.; FASTH, S.; OLAISON, L.; HULTEN, L. Adverse reactions to intravenous administration of fusidic acid. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases,** v. 13, n. 1, p. 65-67, 1981.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science,** v. 42, n. 3, p. 203-214, 2006.

JEFFERY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel: Análise química quantitativa.** 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1992.

JONES, R. N.; MENDES, R. E.; SADER, H. S.; CASTANHEIRA, M. *In vitro* antimicrobial findings for fusidic acid tested against contemporary (2008–2009) Gram-positive organisms collected in the United States. **Clinical Infectious Diseases,** v. 52, n. 7, p. S477–S486, 2011.

KANAZAWA, Y.; KURAMATA, T. Fusidic acid. Assay for microbiologically active concentration in body fluids and sensitivity test by agar diffusion. **Journal of Antibiotics,** v. 17, n. 1, p. 7-11, 1964.

KEITH, L. H.; GRON, L. U.; YOUNG, J. L. Green analytical methodologies. **Chemical Reviews,** v. 107, n. 6, p. 2695–2708, 2007.

KLYUEV, N. A., SUCHKOVA, G. S.; LOKSHIN, G. B.; KUZOVKOV, A. D. Dissociative ionization of fusidic acid and the products of its thermolysis in the temperature range of 30-250°C. **Chemistry of Natural Compounds,** v. 17, p. 183-188, 1980.

KOK-KHIANG, P.; TZE-FUNG, T. Y. Simple high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of fusidic acid and betamethasone dipropionate in a cream formulation. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 4, n. 3, p. 229-231, 2000.

KOROLEVA, V. G. Agar-diffusion method for determination of fusidin in body fluids and tissues. **Antibiotiki,** v. 16, n. 8, p. 727-729, 1971.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara.** 17. ed. 2010/2011. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 105p.

KOTLUS, B. S.; WYMBS, R. A.; VELLOZZI, E. M.; UDELL, I. J. *In vitro* activity of fluoroquinolones, vancomycin, and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ocular isolates. **American Journal of Ophthalmology,** v. 142, n. 5, p. 726-729, 2006.

KRZEK, J.; HUBICKA, U.; SZCZEPANCZYK, J.; KWIECIEN, A.; RZESZUTKO, W. Simultaneous determination of fusidic acid, *m*- and *p*-hydroxybenzoates and butylhydroxyanisole by TLC with densitometric detection in UV. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** v. 29, p. 2129–2139, 2006.

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. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE.** Campinas: Átomo, 2009. 382p.

LEIBOWITZ, G.; GOLAN, D.; YESHURUN, D.; BREZIS, M. Leukopenia and thrombocytopenia due to fusidic acid. **Postgraduate Medical Journal,** v. 67, n. 788, p. 591–592, 1991.

LIVERMORE, D. M. The need for new antibiotics. **Clinical Microbiology and Infection,** v. 10, n. 4, p. 1–9, 2004.

LONG, B. H. Fusidic acid in skin and soft-tissue infections. **Acta Dermato Venereologica,** v. 216, n. 216, p. 14–20, 2008.

LOPES, C. C. G. O.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products.**Talanta**, v. 82, p. 918–922, 2010.

LOPES, H. V. Novos antimicrobianos: a pesquisa continua. **Revista Prática Hospitalar,** v. 62, p. 100-107, 2009.

LUQUE, J. I. P. Antimicrobianos tópicos en dermatología. **Actas Dermo-Sifiliográficas,** v. 98, n. 1, p. 29-39, 2007.

MAZUMDER, R. Sites of action of fusidic acid in eukaryotes; inhibition by fusidic acid of a ribosome-independent GTPase from artemia salina embryos. **European Journal of Biochemistry,** v. 58, p. 549–554, 1975.

MORENO, A. H.; SALGADO, H. R. N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **Journal of AOAC International,** v. 90, p. 1379–1382, 2007.

MORGAN, J.; JOYCE-MENEKSE, M. E.; ROWLANDS, R. T.; GILBERT, I. H.; LLOYD, D. Rapid and sensitive quantitation of antibiotics in fermentations by electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 15, n. 14, p. 1229-1238, 2001.

NATA - National Association of Testing Authorites Technical. Note 17. **Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods**, 1997.

NAWAZ, M.; ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; HAIDER, A.; HISAINDEE, S. Simultaneous determination of fusidic acid and steroids from bulk drugs and human plasma by reversed phase HPLC. **Acta Chromatographica,** v. 26, p. 57–66, 2014.

NIANFEN, C.; YANDONG, W.; MOOLING, C. Determination of fusidic acid ophthalmic emulsion by HPLC. **China Medical Herald,** v. 22, p. 72-73, 2009.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região oeste da cidade de São Paulo. **Revista Ciência & Saúde Coletiva,** v. 13, p. 689-696, 2008.

NOLASCO, F. R.; TAVARES, G. A.; BENDASSOLLI, J. A. Implantação de programas de gerenciamento de resíduos químicos laboratoriais em universidades: análise crítica e recomendações. **Engenharia Sanitária e Ambiental,** v. 11, p. 118-124, 2006.

NOTARI, R. E. Hydroxamic acids II: Kinetics and mechanisms of hydroxyaminolysis of succinimide. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 58, n. 9, p. 1064-1068, 1969.

O'NEIL, M. J. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.** 14. ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. 4318p.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova,** v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry.** 4. ed. New York, Oxford University, cap. 19, 2009. 752p.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia.** São Paulo: Cengage, 2010. 700p.

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological assay by turbidimetry to determine the potency of cefazolin sodium in the lyophilized powder form. **Analytical Methods,** v. 6, p. 1391–1396, 2014.

PERRY, M. J.; HENDRICKS-GITTINS, A.; STACEY, L. M.; ADLARD, M. W.; NOBLE, W. C. Fusidane antibiotics produced by dermatophytes. **The Journal of Antibiotics,** v. 36, n. 12, p. 1659–1663, 1983.

PESEZ, M.; BARTOS, J. **Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs.** New York: Marcel Dekker, 1974. 688p.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Evaluation of the activity of fusidic acid tested against contemporary Gram-positive clinical isolates from the USA and Canada. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 35, n. 3, p. 282–287, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 784p.

POOLE, C. F.; POOLE, S. K. **Chromatography today.** New York: Elsevier, 1991. 708p.

RAHMAN, A.; HOFFMAN, N. E. High-performance liquid chromatographic determination of fusidic acid in plasma. **Journal of Chromatography B,** v. 433, p. 159–166, 1988.

RAMBLA-ALEGRE, M.; MARTÍ-CENTELLES, R.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4972-4981, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829p.

REEVES, D. S. The pharmacokinetics of fusidic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 20, p. 467–476, 1987.

REVELL, P.; NICHOLSON, F.; PEARSON, T. C. Granulocytopenia due to fusidic acid. **The Lancet,** v. 2, n. 8608, p. 454–455, 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. **Química Nova,** v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIPPERE, R. A. Some principles of microbiological turbidimetric assay of antibiotics. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists,** v. 62, n. 4, p. 951-956, 1979.

ROMAGUERA, C.; GRIMALT, F. Contact dermatitis to fusidic acid. **Contact Dermatitis,** v. 12, p. 176-177, 1985.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients.** 6. ed. London: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2009. 888p.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial,** v. 43, n. 6, bp. 413-423, 2007.

SATAROVA, D. E.; KORCHAGIN, V. B.; STEPUSHKINA, V. V.; MAKAROVA, R. A. Spectrophotometric method for determination of fusidic acid. **Antibiotiki i Khimioterapiya,** v. 34, n. 8, p. 566-569, 1989.

SATTAR, M. A.; BARRETT, S. P.; CAWLEY, M. I. D. Concentrations of some antibiotics in synovial fluid after oral administration, with special reference to antistaphylococcal acitivity. **Annals of the Rheumatic Diseases,** v. 42, p. 67-74, 1983.

SCHLUTER, H. Reversed-phase chromatography. In: KASTNER, M. **Journal of Chromatography Library** (v.61) - Protein liquid chromatography. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1999. 147p.

SCHMITZ, F. J.; SADURSHI, R.; KRAY, A.; BOOS, M.; GEISEL, R.; KOHRER, K.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Prevalence of macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. **Journal Antimicrobial Chemotherapy,** v. 45, n. 6, p. 891–894, 2000.

SEWELL, G. J.; PALMER, A. J. The chemical and physical stability of three intravenous infusions subjected to frozen storage and microwave thawing. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 72, n. 1, p. 57-63, 1991.

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 and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A,** v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHAIKH, S.; MUNEERA, M. S.; THUSLEEM, O.A.; TAHIR, M.; KONDAGULI, A. V. A simple RP-HPLC method for the simultaneous quantitation of chlorocresol, mometasonefuroate, and fusidic acid in creams. **Journal of Chromatographic Science,** v. 47, n. 2, p. 178-183, 2009.

SHEARS, P. Antibiotic resistance in the tropics. Epidemiology and surveillance of antimicrobial resistance in the tropics. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine e Hygiene,** v. 95, n. 2, p. 127-130, 2001.

SILVA, F. **Resistência bacteriana a antibióticos: grave risco para a saúde!** Instituto do Delta, 2012. Disponível em: <http://www.institutododelta.com.br/?p=2470>. Acesso em: 19 jun. 2015.

SILVA, L. M.; SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay to potency evaluation of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Microbiological Methods,** v. 110, p. 49-53, 2015.

SILVA, N. N.; CHAHER, J. A.; BERNHARD, A. Fusidic acid against *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Medicina,** v. 22, p. 126, 1965.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. K.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490p.

SIMONSEN, L.; FULLERTON, A. Development of an *in vitro* skin permeation model simulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products. **Skin Pharmacology and Physiology,** v. 20, n, 5, p. 230–236, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis.** 5. ed. Austrália: Brooks/Cole Thomson Learning, 1998. 836p.

SMEENK, G.; SEBENS, F. W.; HOUWING, R. H. Use and adverse reactions of local antibiotics and disinfectants on the skin. **Ned Tijdschr Geneeskd,** v. 143, n. 22, p. 1140-1143, 1999.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography.** 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. 912p.

SORENSE, N. H. Liquid chromatographic determination of fusidic acid in serum. **Journal of Chromatography B,** v. 430, p. 400-405, 1988.

SPELMAN, D. Fusidic acid in skin and soft tissue infections. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 12, n. 2, p. S59-S66, 1999.

STRINGEL, G.; BAWDON, R.; SAVRICH, M.; GUERTIN, L.; HORTON, J. Topical and systemic antibiotics in the prevention of wound infection. **Journal of Pediatric Surgery,** v. 24, n. 10, p. 1003–1006, 1989.

STÜTTGEN, G.; BAUER, E. Penetration and permeation into human skin of fusidic acid in different galenical formulation. **Arzneimittelforschung,** v. 38, n. 5, p. 730-735, 1988.

TANAKA, N.; KINOSHITA, T.; MASUKAWA, H. Mechanism of protein synthesis inhibition by fusidic acid and related antibiotics. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 15, p. 278–283, 1968.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: Resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos.** São Paulo: Atheneu, 1999. 792p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry,** v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TOH, S. M.; XIONG, L.; ARIAS, C. A.; VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; QUINN, J.; MANKIN, A. S. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. **Molecular Microbiology,** v. 64, n. 6, p. 1506-1514, 2007.

TÓTOLI, E. G. ; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for solution for injection. **Analytical Methods,** v. 5, p. 5923-5928, 2013.

TRAISNEL, M.; GAYOT, A. T. Practice of validation. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v, 21, n. 1, p. 79-91, 1995.

TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. **Swiss Weekly, Medical**, v. 135, p. 243–251, 2005.

TURNIDGE, J. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 12, n. 2, p. S23–S34, 1999.

USP 37 - The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 32). 37. ed. Rockville: MD: United States Pharmacopoeia Convention, 2014.

VERBIST, L. The antimicrobial activity of fusidic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 25 (Suppl. B), p. 1–5, 1990.

VERUTEX: ácido fusídico. Farmacêutica responsável: Renata C. Conserva CRF-SP 29.036. São Paulo: LEO Pharma Ltda; 2011. **Bula.** Disponível em: <file:///C:/Users/Mariane/Downloads/BULA+VERUTEX+-+PROFISSIONAL%20(9).pdf>. Acesso em: 23 jun. 2015.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry,** v. 73, n. 8 p. 1381-1386, 2001.

VICKERS, C. F. H. Percutaneous absorption of sodium fusidate and fusidic acid. **British Journal of Dermatology,** v. 81, n. 12, p. 902–908, 1969.

VIEIRA, D.; FIUZA, T.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of cefuroxime sodium in powder for dissolution for injection. **Pathogens,** v. 3, n. 3, p. 656-666, 2014.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical,** v. 4, n. 1, p. 27-36, 2005.

VLADIMIROV, S.; FISER, Z.; AGBABA, D.; ZIVANOV-STAKIC, D. Spectrophotometric determination of fusidic acid and sodium fusidate in dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 13, n. 4/5, p. 675-678, 1995.

VOGEL, A. I. **Química orgânica: análise orgânica qualitativa.** 3. ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, v. 1, 1971. 433p.

VOSS, A.; MILATOVIC, D.; WALLRAUCH, S. C.; ROSDAHL, V. T.; BRAVENY, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,** v. 13, p. 50-55, 1994.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistence.** ASM Press: Washington, 2003. 335p.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature,** v. 406, n. 6797, p. 775-781, 2000.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.** London: Elsevier, 2005.

WEBB, J.; WILSON, H. G.; RAO, A. Staphylococcal endocarditis treated by intravenous administration of fusidic acid and penicillin. **Medical Journal of Australia,** v. 1, n. 4, p. 131-133, 1968.

WEINRICK, B.; DUNMAN, P. M.; MCALEESE, F.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; FANG, Y.; NOVICK, R. P. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology,** v. 186, n. 24, p. 8407–8423, 2004.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry.** Madri: Ediciones Díaz Santos, 1990.

WILKINSON, J. D. Fusidic acid in dermatology. **British Journal of Dermatology,** v. 139, n. 53, p. 37-40, 1998.

WISE, R.; PIDDOCK, L. The need for new antibiotics**. Lancet,** v. 375, n. 9715, p. 638, 2010.

WRIGHT, G. D. The antibiotics resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology,** v. 5, n. 3, p. 175-186, 2007.

YANG, S. J.; NAST, C. C.; MISHRA, N. N.; YEAMAN, M. R.; FEY, P. D.; BAYER, A. S. Cell wall thickening is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus aureus*: evidence for multiple resistance mechanisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 54, n. 8, p. 3079–3085, 2010.

YOUDEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical Manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1975. 88p.

ZHAO, M.; GÖDECKE, T.; GUNN, J.; DUAN, J. A.; CHE, C. T. Protostane and fusidane triterpenes: A Mini-Review. **Molecules,** v. 18, n. 4, p. 4054-4080, 2013.

ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A.; OCHSNER, P. E. N. Prosthetic-joint infections. **The New England Journal of Medicine,** v. 351, p. 1645–1654, 2004.

ZYGMUNT, B.; BANEL, A.; WASIELEWSKA, M. Increasingly green approaches to the determination of selected trace organics in complex matrices short chain carboxylic acids. **Ecological Chemistry and Engineering S,** v. 18, n. 3, p. 305-318, 2011.