

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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO
DE CIPROFLOXACINO EM SOLUÇÃO OFTÁLMICA**

EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY

ARARAQUARA – SP
2009

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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO
DE CIPROFLOXACINO EM SOLUÇÃO OFTÁLMICA**

EDITH CRISTINA LAIGNIER CAZEDEY

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. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

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

Cazedey, Edith Cristina Laignier

C386a Análise químico-farmacêutica de cloridrato de ciprofloxacino em solução
oftálmica / Edith Cristina Laignier Cazedey. – Araraquara, 2009.
179 f.

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

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1.Cloridrato de ciprofloxacino. 2.Fluorquinolona. 3.CLAE. I.
Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II.Título.

CAPES: 403000005

“Brilhe a vossa luz diante dos homens, para que eles possam ver as vossas boas obras e glorifiquem a Deus.”

Mateus 5-16

A Deus, por sua infinita generosidade.

“... pôs os meus pés sobre uma rocha e firmou os meus passos.”

Salmo 40-2

*À minha família, toda minha gratidão
pela imensurável dedicação, compreensão,
força, carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Finalizar esta dissertação de mestrado é um momento importante na minha vida e envolve a colaboração deliberada ou não de diversas pessoas, de muitas maneiras e em diversas ocasiões. Em razão disto, agradecer a todas estas pessoas torna-se um trabalho difícil e que talvez implique na exclusão de muitos colaboradores. A estes, peço sinceras desculpas, e agradeço o perdão pelas minhas omissões.

Sempre a Deus, primeiramente. Obrigada Senhor por ter me concedido saúde e força ao longo desta caminhada.

À minha família, meus avós José Maria e Nelzira, minha mãe Clarice, meus tios Clerismar, Miriam e Cleunice, minha irmã Thamara e meu cunhado Bruno, meus primos Dâmaris, Sophia, Lara, Fillipe e Miguel, sem eles nada seria possível. Agradeço o apoio incondicional, a confiança, a compreensão. Amo vocês...

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pela oportunidade de tê-la tido como minha orientadora, por sua exigência, por sua competência e por seu amor pelo que faz.

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas-MG (UNIFAL-MG) pela formação sólida e de qualidade.

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

Aos colegas e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade: Cristiani Lopes, Mariana Passoni, Daniela Vieira, Adam Oliveira, Marcelo Hiene, Andréia Moreno, Patrícia Ricarte e, especialmente à Flávia Fiorentino, por estar comigo sempre, sendo mais que uma amiga, neste árduo processo de amadurecimento.

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

Às estagiárias Débora Perez e Jaqueline Perez, não só pela contribuição dentro do laboratório, mas também pela sólida amizade construída.

Aos colegas do Laboratório de Farmacotécnica, especialmente ao Gustavo e Arnóbio, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio e paciência na utilização do espectrofotômetro e pelas discussões oferecidas no desenvolvimento do trabalho.

Ao Rodrigo Borba, por estar comigo neste tempo de crescimento, pelos momentos felizes, pelo abraço nos momentos de saudade e pelo incentivo à minha carreira. Também à família Pereira Borba: Itamir, Irene, Felipe, Flávia, Gustavo, avós, tios, primos, pela “adoção” e por serem a minha família por este período.

À Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo pela iniciação científica e por despertar em mim a paixão pela pesquisa.

Ao Núcleo Controle de Qualidade UNIFAL-MG, pela disponibilização do laboratório, equipamentos e materiais.

Ao aluno de pós-graduação do curso de mestrado da UNIFAL-MG, Rudy Bonfilio, pela valiosa ajuda na validação do método espectrofotométrico derivativo na região do visível.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh e à Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi pelas colaborações prestadas no exame de qualificação

À Profa. Dra. Greici Cristiani Gomes Tozo e ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh por aceitar participar da banca de defesa do mestrado e pelas observações pertinentes.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta jornada.

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

À secretaria de pós-graduação, em especial a Cláudia, Laura e Sônia.

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

Ao Grupo EMS Sigma Pharma pela doação do cloridrato de ciprofloxacino substância química de referência.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Pois merece a aprovação não àquele que se recomenda a si mesmo, mas aquele que o Senhor recomenda.

II Coríntios 10-18

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Quinolonas.....	5
3.1.1 História.....	5
3.1.2 Características gerais da estrutura das quinolonas.....	9
3.1.3 Mecanismo de ação.....	10
3.1.4 Mecanismo de resistência.....	11
3.1.5 Espectro de ação.....	11
3.1.6 Uso terapêutico do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	12
3.1.6.1 Úlcera de córnea.....	12
3.1.6.2 Conjuntivite bacteriana.....	13
3.1.6.3 O tratamento.....	13
3.1.7 Efeitos adversos.....	14
3.1.8 Interações medicamentosas.....	15
3.1.9 Contra-indicações.....	15
3.2 Validação de metodologia analítica.....	16
4 DESCRIÇÃO.....	20
4.1 Descrição geral.....	20
4.2 Substância Química de Referência (SQR).....	22
4.3 Amostra da forma farmacêutica solução oftálmica.....	22
5 ANÁLISE QUALITATIVA.....	23

5.1	Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	23
5.1.1	Material.....	23
5.1.2	Método.....	23
5.1.3	Resultados.....	23
5.1.3.1	Espectro em água.....	23
5.1.3.2	Espectro em metanol.....	24
5.1.3.3	Espectro em ácido clorídrico 0,1 M.....	24
5.1.3.4	Espectro em hidróxido de sódio 0,1 M.....	25
5.1.4	Discussão.....	25
5.2	Espectrofotometria de absorção na região do visível.....	26
5.2.1	Reação com cloreto férrico.....	27
5.2.1.1	Material.....	28
5.2.1.1.1	Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	28
5.2.1.1.2	Preparo do reagente cloreto férrico 1,0%.....	28
5.2.1.2	Método.....	28
5.2.1.3	Resultados.....	29
5.2.1.4	Discussão.....	29
5.2.2	Reação com azul de bromotimol.....	29
5.2.2.1	Material.....	30
5.2.2.1.1	Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	30
5.2.2.1.2	Preparo do reagente azul de bromotimol 0,1%.....	31
5.2.2.1.3	Ensaio preliminares.....	31
5.2.2.2	Método de extração.....	31
5.2.2.3	Resultados.....	31
5.2.2.4	Discussão.....	33
5.2.3	Reação com ácido cloranílico.....	33
5.2.3.1	Material.....	34
5.2.3.1.1	Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	34
5.2.3.1.2	Preparo do reagente ácido cloranílico 0,1%.....	34
5.2.3.2	Método.....	34
5.2.3.3	Resultados.....	35
5.2.3.4	Discussão.....	35

6 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	36
6.1 Ensaio microbiológico – método turbidimétrico.....	36
6.1.1 Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos.....	36
6.1.2 Material.....	38
6.1.2.1 Preparo do meio de cultura.....	38
6.1.2.2 Preparo do inóculo.....	38
6.1.2.3 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	38
6.1.2.4 Preparo das amostras de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	39
6.1.3 Método.....	39
6.1.3.1 Obtenção da curva analítica.....	39
6.1.3.2 Determinação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	40
6.1.4 Validação.....	40
6.1.4.1 Linearidade.....	40
6.1.4.2 Precisão.....	40
6.1.4.3 Exatidão.....	40
6.1.4.4 Especificidade e Seletividade.....	41
6.1.4.5 Robustez.....	41
6.1.5 Resultados.....	42
6.1.6 Discussão.....	46
6.2 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	48
6.2.1 Material.....	49
6.2.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	49
6.2.2 Método.....	49
6.2.2.1 Curva de Ringbom.....	49
6.2.2.2 Obtenção da curva analítica.....	50
6.2.2.3 Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	51
6.2.3 Validação.....	52
6.2.3.1 Linearidade.....	52
6.2.3.2 Precisão.....	52
6.2.3.3 Exatidão.....	52
6.2.3.4 Especificidade e Seletividade.....	53

6.2.3.5	Robustez.....	53
6.2.4	Resultados.....	53
6.2.5	Discussão.....	60
6.3	Espectrofotometria de absorção na região do visível pelo método da primeira derivada.....	62
6.3.1	Material.....	67
6.3.1.1	Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	67
6.3.1.2	Preparo do placebo.....	67
6.3.1.3	Preparo do reagente cloreto férrico 1,0%.....	67
6.3.2	Método.....	68
6.3.2.1	Curva de Ringbom.....	68
6.3.2.2	Obtenção da curva analítica.....	69
6.3.2.3	Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	70
6.3.3	Validação.....	71
6.3.3.1	Linearidade.....	71
6.3.3.2	Precisão.....	71
6.3.3.3	Exatidão.....	71
6.3.3.4	Especificidade e Seletividade.....	72
6.3.3.5	Robustez.....	72
6.3.4	Resultados.....	72
6.3.5	Discussão.....	81
6.4	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	83
6.4.1	Ensaio preliminar.....	95
6.4.2	Material.....	95
6.4.2.1	Preparo das fases móveis.....	95
6.4.2.2	Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	95
6.4.3	Método.....	96
6.4.3.1	Obtenção da curva analítica.....	98
6.4.3.2	Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	98
6.4.4	Validação.....	99
6.4.4.1	Linearidade.....	99
6.4.4.2	Precisão.....	99
6.4.4.3	Exatidão.....	99

6.4.4.4	Especificidade e Seletividade.....	100
6.4.4.5	Robustez.....	101
6.4.5	Resultados.....	101
6.4.5.1	Ensaio preliminar.....	101
6.4.5.1.1	Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Thermo.....	101
6.4.5.1.2	Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Waters.....	102
6.4.5.1.3	Ácido acético 2,5% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Waters.....	103
6.4.5.1.4	Ácido acético 5,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Waters.....	104
6.4.6	Discussão.....	109
6.5	Titulometria indireta.....	112
6.5.1	Material.....	112
6.5.1.1	Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR.....	113
6.5.1.2	Ácido clorídrico 5 M.....	113
6.5.1.3	Brometo de potássio 10%.....	113
6.5.1.4	Bromato de potássio 0,01 M.....	113
6.5.1.5	Iodeto de potássio 10%.....	113
6.5.1.6	Tiosulfato de sódio 0,06 M.....	113
6.5.1.7	Indicador amido 1%.....	114
6.5.2	Método.....	114
6.5.2.1	Obtenção da curva analítica.....	114
6.5.2.2	Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	115
6.5.3	Validação.....	116
6.5.3.1	Linearidade.....	116
6.5.3.2	Precisão.....	116
6.5.3.3	Exatidão.....	116
6.5.3.4	Especificidade e Seletividade.....	117
6.5.3.5	Robustez.....	117
6.5.4	Resultados.....	117
6.5.5	Discussão.....	121

6.6	Análise comparativa dos métodos desenvolvidos.....	123
7	DISCUSSÃO GERAL.....	126
8	CONCLUSÕES.....	129
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.1	Estrutura química do ácido nalidíxico.....	5
Figura 3.1.2	Evolução histórica das quinolonas.....	6
Figura 3.1.3	Quinolonas de primeira geração.....	7
Figura 3.1.4	Quinolonas de segunda geração.....	7
Figura 3.1.5	Quinolonas de terceira geração.....	8
Figura 3.1.6	Quinolonas de quarta geração.....	8
Figura 3.1.7	Núcleo quinolona e naftiridina: características da estrutura geral requerida para atividade antibacteriana.....	9
Figura 3.1.8	Substituintes comuns nas estruturas quinolônicas.....	10
Figura 4.1.1	Estrutura química do ciprofloxacino.....	20
Figura 5.1.1	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.....	24
Figura 5.1.2	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente.....	24
Figura 5.1.3	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente...	25
Figura 5.1.4	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.....	25
Figura 5.2.1	Reação do ferro (III) com ciprofloxacino.....	28
Figura 5.2.2	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando água como solvente e cloreto férrico 1,0% como reagente.....	29
Figura 5.2.3	Esquema da reação entre o ciprofloxacino e o azul de bromotimol.....	30

Figura 5.2.4	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando diclorometano como solvente e azul de bromotimol como reagente.....	32
Figura 5.2.5	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando clorofórmio como solvente e azul de bromotimol como reagente.....	32
Figura 5.2.6	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando éter etílico como solvente e azul de bromotimol como reagente.....	32
Figura 5.2.7	Complexo ciprofloxacino – ácido cloranílico.....	33
Figura 5.2.8	Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 60,0 µg/mL, na região do visível, utilizando acetonitrila como solvente e ácido cloranílico como reagente.....	35
Figura 6.1.1	Curvas analíticas de soluções de cloridrato de ciprofloxacino SQR e amostra, em concentrações de 14,0; 28,0 e 56,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.....	43
Figura 6.2.1	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 275 nm.....	55
Figura 6.2.2	Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 275 nm.....	57
Figura 6.2.3	Sobreposição dos espectros de cloridrato de ciprofloxacino SQR e solução oftálmica, nas mesmas concentrações (4 µg/mL), para determinação da especificidade do método espectrofotométrico na região do UV.....	59
Figura 6.3.1	Representação esquemática das derivadas.....	62

Figura 6.3.2	Espectro de ordem zero da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR (50,0 µg/mL) e da solução placebo da solução oftálmica reagindo com cloreto férrico 1,0%.....	73
Figura 6.3.3	Espectro de primeira ordem da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR (50,0 µg/mL) e da solução placebo da solução oftálmica reagindo com cloreto férrico 1,0%.....	74
Figura 6.3.4	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente no comprimento de onda de 386,4 nm.....	76
Figura 6.3.5	Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, obtida pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente, a 386,4 nm.....	78
Figura 6.4.1	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando água como solvente, ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Thermo.....	101
Figura 6.4.2	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Thermo.....	102
Figura 6.4.3	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando água como solvente, ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Waters.....	102
Figura 6.4.4	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Waters.....	103
Figura 6.4.5	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando água como solvente, ácido acético 2,5% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Waters.....	103

Figura 6.4.6	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando ácido acético 2,5% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Waters.....	103
Figura 6.4.7	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando água como solvente, ácido acético 5,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Waters.....	104
Figura 6.4.8	Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando ácido acético 5,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Waters.....	104
Figura 6.4.9	Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando água como solvente e como fase móvel ácido acético 2,5% v/v, acetonitrila e metanol (70:15:15, v/v/v) a 275 nm.....	107
Figura 6.4.10	Sobreposição de cromatogramas de cloridrato de ciprofloxacino SQR e solução oftálmica, nas mesmas concentrações (10 µg/mL), para comprovação da especificidade do método CLAE.	108
Figura 6.5.1	Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino obtida pelo método titulométrico.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.1	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	17
Tabela 4.1.1	Ciprofloxacino comercializado no Brasil.....	21
Tabela 6.1.1	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	37
Tabela 6.1.2	Parâmetros estabelecidos para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica pelo método turbidimétrico.	37
Tabela 6.1.3	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico.....	41
Tabela 6.1.4	Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino, pelo método turbidimétrico.....	42
Tabela 6.1.5	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método turbidimétrico.....	44
Tabela 6.1.6	Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método turbidimétrico	44
Tabela 6.1.7	Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico.....	45
Tabela 6.1.8	Valores da determinação da robustez do método turbidimétrico.	45
Tabela 6.2.1	Obtenção da curva de Ringbom para determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do UV para análise de cloridrato de ciprofloxacino a 275 nm.....	50
Tabela 6.2.2	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	52
Tabela 6.2.3	Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 275 nm.....	54

Tabela 6.2.4	Valores de absorvância determinados para a curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 275 nm.....	56
Tabela 6.2.5	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	57
Tabela 6.2.6	Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico na região de UV para quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.....	58
Tabela 6.2.7	Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	58
Tabela 6.2.8	Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	59
Tabela 6.2.9	Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV.....	60
Tabela 6.3.1	Sistemas espectrofotométricos derivativos referenciados na literatura para quantificação de quinolonas.....	65
Tabela 6.3.2	Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico derivativo na região do visível para análise de cloridrato de ciprofloxacino a 386,4 nm.....	69
Tabela 6.3.3	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico derivativo na região do visível.....	71
Tabela 6.3.4	Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente no comprimento de onda de 386,4 nm.....	75

Tabela 6.3.5	Valores de absorvância da primeira derivada determinados para a curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente, a 386,4 nm.....	77
Tabela 6.3.6	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico derivativo na região do visível.....	78
Tabela 6.3.7	Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico derivativo na região do visível para quantificação de cloridrato de ciprofloxacino.....	79
Tabela 6.3.8	Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível.....	79
Tabela 6.3.9	Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico derivativo na região do visível.....	80
Tabela 6.3.10	Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico derivativo na região do visível.....	80
Tabela 6.4.1	Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino.....	84
Tabela 6.4.2	Parâmetros estabelecidos para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino solução oftálmica pelo método CLAE.....	98
Tabela 6.4.3	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico.....	100
Tabela 6.4.4	Parâmetros cromatográficos dos sistemas testados para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino por CLAE.....	105
Tabela 6.4.5	Valores das áreas referentes ao pico de cloridrato de ciprofloxacino SQR na construção da curva analítica, utilizando como solvente água e como fase móvel ácido acético 2,5% v/v, acetonitrila e metanol (70:15:15, v/v/v) a 275 nm.....	106
Tabela 6.4.6	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método CLAE.....	107

Tabela 6.4.7	Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino solução oftálmica, pelo método CLAE.....	108
Tabela 6.4.8	Valores do teste de recuperação do método CLAE.....	108
Tabela 6.4.9	Valores da determinação da robustez do método CLAE.....	109
Tabela 6.5.1	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método titulométrico.....	116
Tabela 6.5.2	Valores das concentrações determinadas para a curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino pelo método titulométrico.....	118
Tabela 6.5.3	Análise de variância dos valores de concentração determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino, utilizando o método titulométrico.....	119
Tabela 6.5.4	Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método titulométrico...	120
Tabela 6.5.5	Valores do teste de recuperação do método titulométrico.....	120
Tabela 6.5.6	Valores da determinação da robustez do método titulométrico...	121
Tabela 6.6.1	Aplicabilidade, exatidão, precisão e robustez dos métodos propostos.....	123
Tabela 6.6.2	Valores obtidos na determinação do teor de cloridrato de ciprofloxacino solução oftálmica utilizando os métodos propostos.....	124
Tabela 6.6.3	Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de cloridrato de ciprofloxacino na forma farmacêutica solução oftálmica pelos métodos desenvolvidos.....	125

LISTA DE ABREVIações

A	Absorvância
ACN	Acetonitrila
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUFS	<i>Absorption Unit Full Scale</i> (unidades de absorvância em escala cheia)
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CBM	concentração bactericida mínima
CIM	concentração inibitória mínima
CIPRO	Ciprofloxacino
CIPRO HCl	cloridrato de ciprofloxacino
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	coeficiente de variação percentual
DANO	Danofloxacino
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DI	Difloxacino
e.p.m.	erro padrão da média
ENO	Enoxacino
ENRO	Enrofloxacino
ESPAR	Esparfloxacino
F _{calc}	valor de F calculado
FM	fase móvel
FQs	Fluorquinolonas
F _{tab}	valor de F tabelado
gL	graus de liberdade
HAc	ácido acético
LEVO	Levofloxacino
LOME	Lomefloxacino
MARBO	Marbofloxacino
MetOH	Metanol
NCM	Nomenclatura Comum do Mercosul

NOR	Norfloxacino
OFLO	Ofloxacino
PE	Pefloxacino
PRULI	Prulifloxacino
QM	soma dos quadrados médios
<i>r</i>	coeficiente de correlação ou de Pearson
SARA	Sarafloxacino
SDS	sulfato de dodecil sódio
SQ	soma dos quadrados
SQR	substância química de referência
TBAA	acetato de tetrabutílamônio
TF	tampão fosfato
THF	Tetrahidrofurano
ULI	Ulifloxacino
UV	Ultravioleta
v/v	volume em volume
Vis	Visível

RESUMO

O cloridrato de ciprofloxacino, um antibacteriano quinolônico, apresenta amplo espectro de ação e é eficaz *in vitro* contra praticamente todos os patógenos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Mostra-se também eficaz contra microrganismos Gram-positivos, como estafilococos e estreptococos. A importância de desenvolver e validar métodos analíticos para este fármaco é justificada por seu potencial terapêutico, grande emprego em terapias microbianas e baixo custo, assim como pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos está relacionada ao desenvolvimento de cepas resistentes, como consequência da administração de doses subterapêuticas. Por tal razão, é de enorme importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados. Neste trabalho foram desenvolvidos métodos de análise para o cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica. Os métodos desenvolvidos e validados foram: (i) doseamento microbiológico, método turbidimétrico na faixa de concentração de 14,0 a 56,0 µg/mL, utilizando *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, com exatidão de 99,71% e teor de 102,27%; (ii) método espectrofotométrico na região do UV a 275 nm com faixa de concentração de 2,0 a 7,0 µg/mL, utilizando água como solvente, com exatidão de 101,51% e teor de 99,79%; (iii) método espectrofotométrico derivativo na região do visível a 386,4 nm, na primeira derivada, com faixa de concentração de 50,0 a 100,0 µg/mL, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente, com exatidão de 99,83% e teor de 106,72%; (iv) método por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV a 275 nm, com fase móvel composta por ácido acético 2,5% v/v, metanol e acetonitrila (70:15:15, v/v/v) e faixa de concentração de 1,0 a 6,0 µg/mL, exatidão de 100,11%, teor de 103,25% e tempo de retenção médio de 2,6 minutos; (v) titulometria indireta, utilizando solução de brometo/bromato em meio ácido como reagente na faixa de concentração de 1,0 a 11,0 mg/mL, com exatidão de 100,28% e teor de 98,97%.

Palavras-chave: cloridrato de ciprofloxacino, validação, doseamento microbiológico, espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, titulometria.

ABSTRACT

Ciprofloxacin hydrochloride, a quinolone antibiotic, presents a wider spectrum of activity and is effective against practically all Gram-negative pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*. It is potent against Gram-positive microorganisms, as *Staphylococcus* and *Streptococcus*. Analytical methods for quantitative determination of ciprofloxacin hydrochloride is important due to its therapeutic potential, wide use in antimicrobial therapy and low cost. Moreover, it is known that the poor quality antibiotic product is direct related development of resistant strains, as consequence of subtherapeutic doses administration. Thus, it is important to develop efficient analytical methods for quality control commercialized products. In this work, analytical methods for determination of ciprofloxacin hydrochloride were validated: (i) microbiological assay, turbidimetric method at concentration range 14.0 to 56.0 µg/mL, using *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150 as indicator microorganism, accuracy 99.71% and quantitation of 102.27; (ii) UV spectrophotometry at 275 nm with concentration range of 2.0 to 7.0 µg/mL, using water as solvent, with accuracy of 101.51% and quantitation of 99.79%; (iii) Derivative visible spectrophotometric method at 386.4 nm, in first derivate, with concentration range of 50.0 a 100.0 µg/mL, using 1.0% ferric chloride as reagent, with accuracy of 99.83% and quantitation of 106.72%; (iv) HPLC method with UV detector at 275 nm using 2.5 M acetic acid (v/v), methanol and acetonitrile (70: 15: 15, v/v/v) as mobile phase and concentration range of 1.0 to 6.0 µg/mL, accuracy of 100.11%, quantitation 103.25% and mean retention time of 2.6 minutes; (v) Indirect titrimetric method using bromate/bromide solution in acid medium as reagent in concentration range of 1.0 to 11.0 mg/mL, with accuracy of 100.28% and quantitation of 98.97%.

Key-words: ciprofloxacin hydrochloride, validation, microbiological assay, spectrophotometry, High Performance Liquid Chromatography, indirect titrimetry.

A qualidade e a eficácia dos medicamentos são, cada vez mais, motivo de preocupação e de milhares de pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Nas últimas décadas, após inúmeros episódios desastrosos envolvendo o uso de medicamentos e com a consciência dos riscos inerentes ao seu uso, a segurança destes produtos passou a ser questionada com maior rigor. Por tais razões, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de rotinas de análises que, além de servirem para este propósito, favoreçam sua implantação em comparação aos métodos existentes (LA ROCA *et al.*, 2007).

A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões contraditórias e a prejuízos financeiros irrecuperáveis (RIBANI *et al.*, 2004). Assim, para se alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessário a implantação de um sistema de Garantia da Qualidade que incorpore as boas práticas de fabricação, que são constituídas por um conjunto de ações, as quais têm o propósito de manter o controle técnico dos procedimentos envolvidos na produção. Em geral, as ações envolvidas nas boas práticas de fabricação se referem à definição sistemática e clara dos processos utilizados na produção, às facilidades necessárias, tais como espaço físico, equipamento apropriado, armazenamento, distribuição, pessoal qualificado e ao controle de qualidade (WHO, 2003).

O Controle de Qualidade é a parte da Garantia de Qualidade encarregado de realizar amostragens, especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentações e procedimentos de liberação que assegurem que os ensaios necessários e relevantes sejam executados e que os materiais não sejam liberados para uso nem os produtos liberados para venda ou fornecimento antes que a sua qualidade seja julgada satisfatória (BRASIL, 2003b).

O aumento significativo no número de fármacos disponíveis, assim como o avanço e transformação das tecnologias utilizadas na produção têm aumentado o interesse de diferentes seções da sociedade ligadas à área da saúde (agências reguladoras, governos, profissionais farmacêuticos) pela busca de medidas que

garantam a integridade do produto disponível ao paciente, levando os conceitos do Controle de Qualidade fora da moldura simplesmente industrial e sim reguladora.

As Universidades têm executado um papel fundamental servindo como centros de pesquisas para o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, contribuindo às atividades de controle sanitário e ao enriquecimento científico na área (IFPMA, 1997).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2007). Para tanto, é extremamente necessário que se faça a validação dos métodos analíticos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em laboratório de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003a).

O desenvolvimento de novos métodos de análise ou mesmo a modificação de métodos existentes se faz necessário sempre que se perceba o uso desnecessário de materiais e solventes, desgaste de equipamento e geração excessiva de resíduos.

Nos últimos vinte anos, as tecnologias utilizadas nas análises físico-químicas têm sofrido grandes avanços. Isto se reflete no conteúdo da maioria dos códigos oficiais, onde as técnicas automatizadas são frequentes. Contudo, a utilização de métodos tradicionais (espectrofotométricos, titulométricos ou biológicos) é válida, desde que comprovadas a exatidão, precisão e especificidade. A validação de métodos analíticos mais simples ou suas modificações permitem que as atividades do controle de qualidade possam ser executadas ainda em lugares com estrutura tecnológica pouco desenvolvida.

As fluorquinolonas são um grupo de compostos quimioterápicos de origem sintética, caracterizadas pela eficácia terapêutica e farmacológica promissoras e foram aprovadas para o tratamento de infecções oculares em 1991 (STROMAN, 2005).

O ciprofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração, disponível nas formas farmacêuticas solução oftálmica, pomada oftálmica, comprimido e

comprimido revestido, solução para infusão e solução injetável (VADE-MÉCUM, 2007). Este fármaco é a fluorquinolona mais amplamente prescrita no mundo, seguida pelo ofloxacino (ANDREU *et al.*, 2007).

O ciprofloxacino apresenta amplo espectro de ação e é eficaz *in vitro* contra praticamente todos os patógenos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Mostra-se também eficaz contra microrganismos Gram-positivos, como estafilococos e estreptococos. Os anaeróbios são, em geral, menos sensíveis. Esta fluorquinolona apresenta rápida ação bactericida, não somente na fase proliferativa, mas também na fase vegetativa. Por tudo isto, é um fármaco considerado adequado ao combate de infecções bacterianas (SILVA, 2002).

A importância de desenvolver e validar metodologias analíticas para este fármaco é justificada por seu potencial terapêutico, grande emprego em terapias microbianas e baixo custo, assim como pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos está relacionada ao desenvolvimento de cepas resistentes, como consequência da administração de doses subterapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos gerais o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para o controle de qualidade do cloridrato de ciprofloxacino na forma farmacêutica solução oftálmica (colírio).

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver métodos que permitam a identificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, mediante a utilização de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível.

Determinar as condições analíticas adequadas para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica utilizando o ensaio microbiológico, método turbidimétrico.

Determinar as condições analíticas adequadas para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica através de método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Determinar as condições analíticas adequadas para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica através de método espectrofotométrico derivativo na região do visível.

Determinar as condições analíticas adequadas para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e analisar a utilização do tempo de retenção do fármaco como parâmetro de identificação.

Determinar as condições analíticas adequadas para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica através de método titulométrico.

Validar os métodos analíticos desenvolvidos, de tal forma que sejam satisfeitos os requisitos de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, exatidão e robustez.

Comparar estatisticamente os métodos propostos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quinolonas

3.1.1 História

Em 1962, um subproduto da síntese da cloroquina levou à síntese do ácido nalidíxico (Figura 3.1.1), a primeira quinolona utilizada comercialmente (LESHER, 1962).

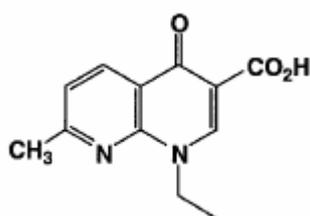


Figura 3.1.1: Estrutura química do ácido nalidíxico.

O ácido nalidíxico caracteriza-se por ter como estrutura central uma 1,8-naftiridina com uma função cetona no carbono 4 e pela modesta atividade contra microrganismos Gram-negativos, baixa contra Gram-positivos e nula contra *Pseudomonas aeruginosa*. Devido à sua baixa absorção oral e alta concentração na urina, seu uso terapêutico foi restringido ao tratamento de infecções urinárias (BARLOW, 1963).

O interesse em encontrar compostos com maior atividade levou à síntese de vários derivados, entre eles os ácidos oxolínico e piromídico e o cinoxacino, análogos estruturais do ácido nalidíxico, e que não apresentaram vantagem terapêutica com respeito ao precursor (TAVARES, 1996; APPELBAUM e HUNTER, 2000). Em 1974, foi sintetizado o ácido pipemídico, que contém no seu núcleo central um anel piperazínico na posição 7, sendo ativo contra enterobactérias e *P. aeruginosa*. No fim desta mesma década, foi descoberto o rosoxacino, com espectro de ação semelhante ao ácido nalidíxico (TAVARES, 1996).

Em 1980, foi apresentado o norfloxacino, por Ito e colaboradores (TAVARES, 1996), o qual se destacou por ser a primeira quinolona fluorada de uso humano e pela alta atividade contra bactérias Gram-negativas, ação contra *P. aeruginosa* e outros organismos Gram-positivos, mas com um perfil de baixa absorção via oral o qual limitou sua utilização ao tratamento de infecções urinárias e intestinais.

A partir de 1980 foram sintetizadas várias outras quinolonas fluoradas as quais variam nas substituições feitas no núcleo central, que lhes conferem características farmacocinéticas e de atividade antimicrobiana diferenciada entre si, permitindo a sua classificação por gerações, as quais são apresentadas nas Figuras de 3.1.2 a 3.1.6 (ANDRIOLE, 1999).

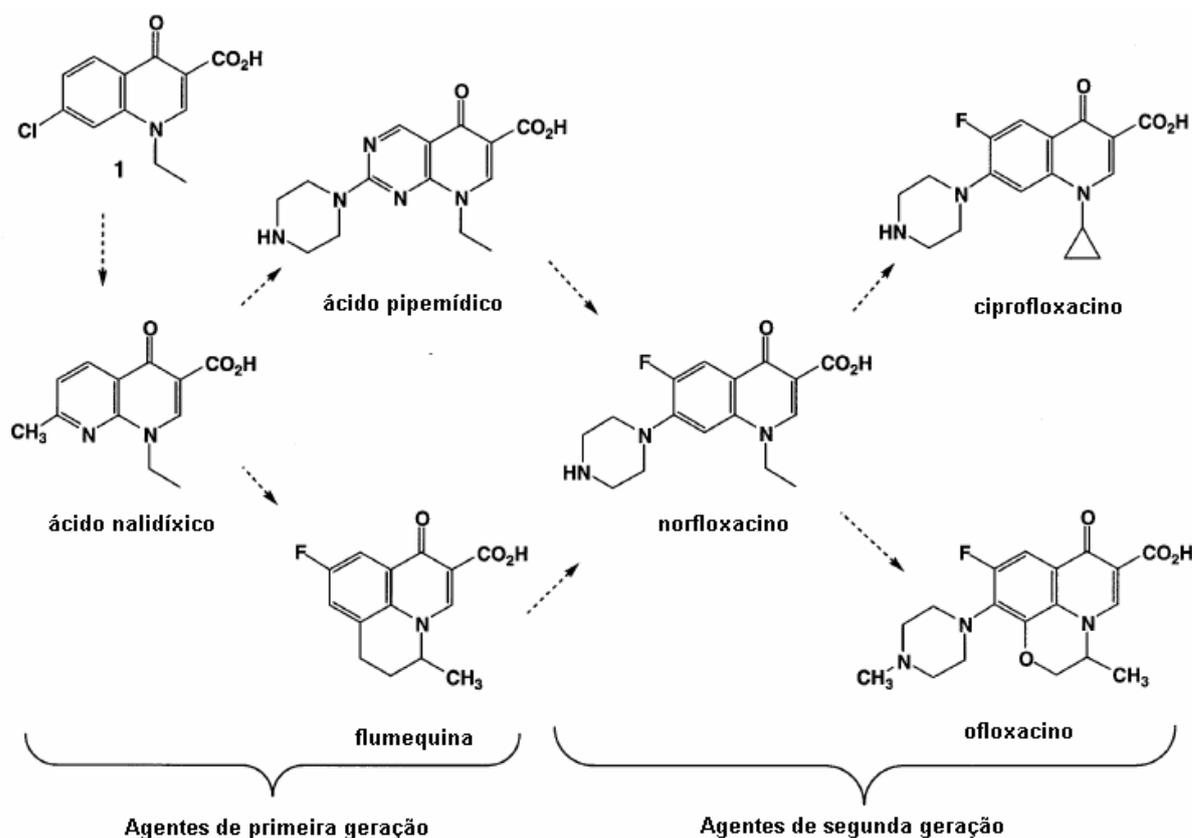
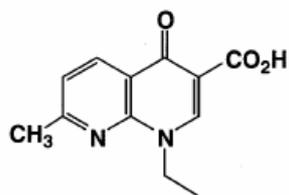


Figura 3.1.2: Evolução histórica das quinolonas.

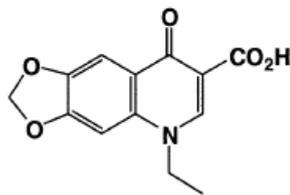
As quinolonas de primeira geração são ativas contra enterobactérias (Gram-negativas) e são utilizadas, principalmente, no tratamento de infecções urinárias. Já as bactérias de segunda geração, tiveram sua atividade incrementada contra patógenos Gram-negativos e limitada contra Gram-positivos (pneumococos e estafilococos resistentes à meticilina). São utilizadas no tratamento de infecções urinárias, pielonefrites, gonorréia e infecções por *P. aeruginosa* (ANDRIOLE, 1999).

Os antibacterianos quinolônicos de terceira geração apresentam espectro de atividade balanceado, potência incrementada contra pneumococos, mas são menos potentes contra *P. aeruginosa*. Estão indicados no tratamento de infecções respiratórias. A maior atividade contra patógenos Gram-negativos é

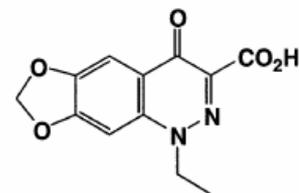
encontrada na quarta geração. Apresentam, ainda, atividade aumentada contra Gram-positivos e patógenos do trato respiratório (TAVARES, 1996; ANDRIOLE, 1999; BALL, 2000).



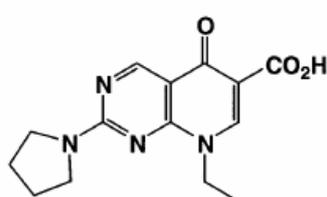
ácido nalidíxico



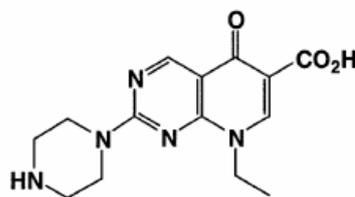
ácido oxolínico



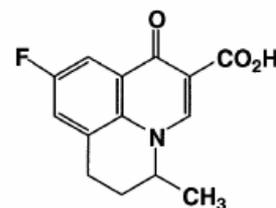
cinoxacino



ácido piromídico

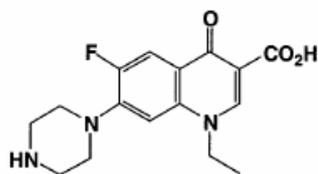


ácido pipemídico

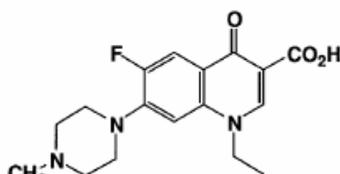


flumequina

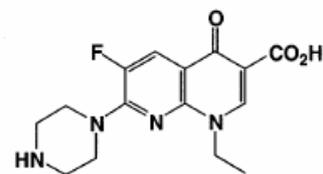
Figura 3.1.3: Quinolonas de primeira geração.



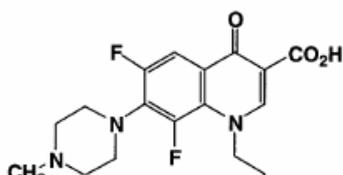
norfloxacino



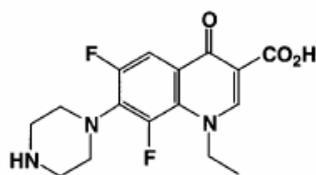
pefloxacino



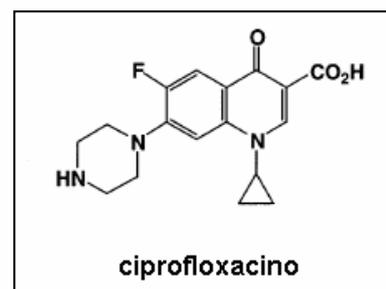
enoxacino



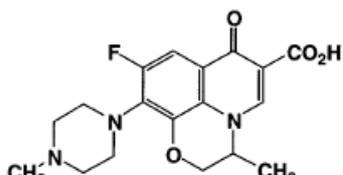
florexacino



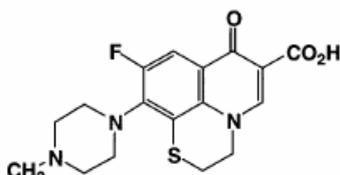
lomefloxacino



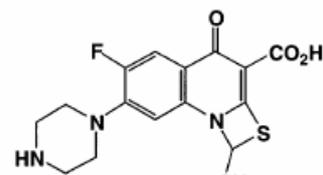
ciprofloxacino



ofloxacino



rufloxacino



NM394

Figura 3.1.4: Quinolonas de segunda geração.

3.1.2 Características gerais da estrutura das quinolonas

As quinolonas exibem um anel heteroaromático bicíclico, que pode conter um carbono na posição 8, caracterizando uma verdadeira quinolona, ou um nitrogênio, o qual provê um sistema anelar chamado naftiridina (Figura 3.1.7). Na prática, contudo, ambos os núcleos, quinolona e naftiridina, fazem parte da classe descrita como “agentes antibacterianos quinolônicos”. A atividade antibacteriana requer a presença do anel piridínico, como mostrado na Figura 3.1.7.

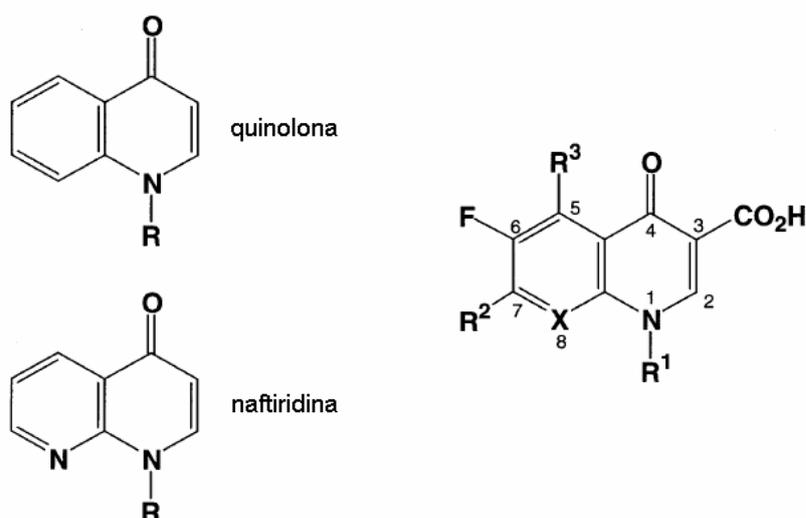


Figura 3.1.7: Núcleo quinolona e naftiridina: características da estrutura geral requerida para atividade antibacteriana.

O ácido carboxílico na posição 3 e a cetona em C-4 são essenciais para atividade antimicrobiana, tal como é a substituição R¹ no nitrogênio da posição 1. Compostos sem grupamentos ligados ao nitrogênio na posição 1 apresentam pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, possivelmente devido à formação de tautômeros (ZHANG e HAEMERS, 1991; ANDRIOLE, 1999). Derivados quinolônicos com substituinte ciclopropila nesta posição mostram alta atividade contra microrganismos Gram-negativos, sendo uma alternativa muito utilizada na síntese de novos compostos (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

A substituição em C-2 é geralmente deletéria, embora exceções tenham sido descritas, nas quais o substituinte C-2 forma um anel com R¹ (ex.: prulifloxacin). A adição de halogênios, principalmente o flúor, na posição 6 mostrou um aumento significativo na atividade contra Gram-positivos (TAVARES,

1996), podendo ser representado o aumento na potência como $F > Cl > Br$ (ZHANG e HAEMERS, 1991). O substituinte cíclico em R^2 é o mais frequentemente presente, ligado através de um de seus nitrogênios na posição 7. Estas estruturas são geralmente baseadas em anéis de 5 e 6 membros (Figura 3.1.8).

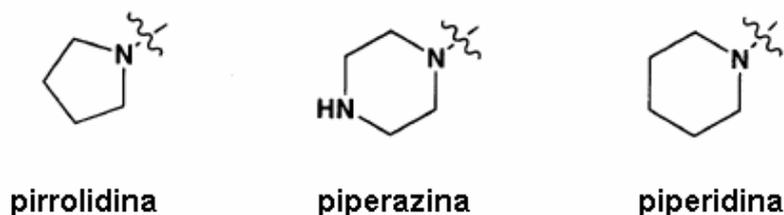


Figura 3.1.8: Substituintes comuns nas estruturas quinolônicas.

A presença destes heterocíclicos na posição C-7 confere notável atividade contra Gram-positivos e *P. aeruginosa*, acredita-se que seja por causa da melhor penetração na célula bacteriana (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

Algumas variações são permitidas na posição C-5 e 8. Entretanto, os antigos agentes quinolônicos foram geralmente substituídos em C-5 por uma molécula de hidrogênio ($R^3 = \text{hidrogênio}$), já os compostos mais recentes apresentam pequenos substituintes, tais como grupo amino ou metila. Em geral, observou-se que a presença de substituintes volumosos nesta posição diminui a atividade contra Gram-positivos, provavelmente devido à interferência com sítios de ligação enzimática da molécula nas posições 3 e 4. Na posição 8, quando X é um carbono, pequenos substituintes, tais como flúor, cloro e metoxila, têm sido responsáveis pela melhora da potência (ANDRIOLE, 1999). Modificações nesta posição afetam as propriedades antibacterianas contra organismos anaeróbios e a estabilidade frente à luz ultravioleta. Compostos de núcleo naftiridina com um grupo metoxila ligado ao nitrogênio apresentam baixa toxicidade e boa atividade contra aeróbios (APPELBAUM e HUNTER, 2000; CAZZOLA *et al.*, 2001).

3.1.3 Mecanismo de ação

As quinolonas antibacterianas agem por inibição da topoisomerase II bacteriana (DNA-girase) e topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação celular da bactéria. Estas enzimas são fundamentais no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano. Este efeito, provavelmente associado com a ligação das quinolonas ao complexo

DNA-girase, é rapidamente bactericida. A concentração bactericida mínima (CBM) é usualmente de duas a quatro vezes a concentração inibitória mínima (CIM), e um prolongado efeito pós-antibiótico é produzido com concentrações que excedem a CIM (ANDRIOLE, 1999; DRLICA, 1999; CAZZOLA *et al.*, 2001).

3.1.4 Mecanismos de resistência

O desenvolvimento de resistência ao ciprofloxacino ocorre gradualmente, em estágios múltiplos. Não se observou com este fármaco o desenvolvimento de resistência do tipo mediado por plasmídeo, que ocorre com os antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina. É de interesse clínico o fato de que as bactérias portadoras de plasmídeos sejam também totalmente sensíveis ao ciprofloxacino (DICIONÁRIO, 2007; ANVISA, 2008b).

Graças a seu modo de ação especial, o ciprofloxacino não se depara com a resistência paralela, geral a outros grupos importantes de substâncias ativas quimicamente diferentes, como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos ou peptídeos, sulfonamidas e derivados da trimetoprima ou do nitrofurano. Em decorrência da elevada sensibilidade primária ao ciprofloxacino que a maioria dos microrganismos apresenta, a resistência paralela é menos pronunciada com este fármaco. Em sua área de indicação, o ciprofloxacino permanece totalmente eficaz contra patógenos resistentes aos grupos de antibacterianos acima mencionados.

Em decorrência de sua estrutura química, o ciprofloxacino é completamente eficaz contra bactérias formadoras de beta-lactamases (ANDRIOLE, 1999; ANVISA, 2008b).

3.1.5 Espectro de ação

De acordo com estudos *in vitro*, os seguintes microrganismos podem ser considerados sensíveis ao ciprofloxacino: *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus* (indol-positivo e indol-negativo), *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium* e *Chlamydia*.

O ciprofloxacino demonstrou ser ativo contra o *Bacillus anthracis* tanto *in vitro* como pelo uso em níveis séricos como marcador de substituição. Os microrganismos a seguir têm sensibilidade variável ao ciprofloxacino: *Neisseria*, *Gardnerella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium fortuitum*. Os seguintes microrganismos habitualmente se mostram resistentes: *Enterococcus faecium*, *Ureaplasma urealyticum* e *Nocardia asteroides* (DICIONÁRIO, 2007; ANVISA, 2008b).

Com raras exceções, os anaeróbios variam de moderadamente sensíveis (ex. *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*) a resistentes (ex. *Bacteroides*). O ciprofloxacino é ineficaz contra o *Treponema pallidum* (DICIONÁRIO, 2007; ANVISA, 2008b).

3.1.6 Uso terapêutico do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

O cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica é indicado para tratamento de infecções oculares causadas por microrganismos susceptíveis.

3.1.6.1 Úlcera de córnea

A úlcera de córnea pode resultar da invasão ativa da córnea por bactérias proliferantes e constitui causa importante de déficit visual, associando-se frequentemente a situações em que ocorrem alterações nos mecanismos de defesa corneana. É uma infecção grave que, se não for tratada de forma eficaz, pode produzir opacificação corneana, perfuração desta e, até, perda do olho (ALVES e ANDRADE, 2000; SILVA, 2002).

Cerca de 90% dos casos de ceratite bacteriana são causados por organismos incluídos em um destes quatro grupos:

1. *Micrococcaceae* (*Staphylococcus*, *Micrococcus*)
2. *Streptococcus* sp
3. *Pseudomonas* sp
4. *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*)

Os agentes etiológicos mais comuns são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella* e *Pseudomonas*. Estudos mostram que o *Staphylococcus epidermidis* também pode estar envolvido como agente etiológico (SILVA, 2002).

Se há suspeita de etiologia bacteriana, é necessário realizar cultura e antibiograma. No entanto, devido à gravidade do quadro, tem-se que instituir uma terapêutica enquanto se aguardam os resultados. Diagnóstico e tratamento imediatos podem limitar a perda de tecido, minimizar a cicatrização e reduzir a necessidade de cirurgia futura (ALVES e ANDRADE, 2000; SILVA, 2002).

3.1.6.2 Conjuntivite bacteriana

Conjuntivite é uma inflamação da conjuntiva caracterizada por dilatação vascular, infiltração ocular e exsudação.

A maioria das conjuntivites é causada por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella lacunata* e *Proteus mirabilis*. Geralmente estes microrganismos são controlados com uma semana de antibioticoterapia tópica, que deve ser realizada instilando-se gotas com uma frequência que dependerá da intensidade do processo (SILVA, 2002).

3.1.6.3 O tratamento

Após a colheita de material para citologia e cultura, empregam-se antimicrobianos para o tratamento inicial de ceratites bacterianas que devem ser efetivos contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nos casos de úlceras superficiais, com menos de 3 mm de diâmetro e localizadas na periferia da córnea pode ser instituída monoterapia empregando-se uma das fluorquinolonas disponíveis comercialmente (ciprofloxacino 0,3% ou ofloxacino 0,3%) (ALVES e ANDRADE, 2000).

A antibioticoterapia repousa numa série de fundamentos básicos: diagnóstico, agente terapêutico, seleção de antibióticos, via de administração, dosagem, duração do tratamento e associações (ABRÃO e MACHADO, 2008).

Em oftalmologia, o uso tópico de antimicrobianos está indicado nas infecções superficiais dos tipos conjuntivites, ceratoconjuntivites e blefarites

bacterianas, visto que estes fármacos não penetram nas estruturas oculares por via tópica. Utilizam-se preferencialmente a polimixina B, neomicina e a soframicina, tirotricina e bacitracina, em geral associando-se antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas com ativos contra bactérias Gram-negativas. Por sua ação contra estafilococos e bacilos Gram-negativos, gentamicina, tobramicina e ciprofloxacino podem também ser usados em soluções e pomadas oftálmicas nas conjuntivites, blefarites e ceratites bacterianas (ABRÃO e MACHADO, 2008).

Os antimicrobianos tópicos oculares são utilizados sob a forma de pomadas e soluções. As soluções oftálmicas são mais empregadas por apresentarem a vantagem de sua fácil aplicação, não interferência com a visão e menor reação local. Têm como desvantagem o pequeno tempo de ação, por isso, habitualmente, os colírios contêm como veículo a metilcelulose e derivados, que aumentam o tempo de contato da substância ativa com a superfície do olho. Ainda assim, os colírios com agentes antimicrobianos devem ser instilados várias vezes ao dia. As pomadas têm como vantagem o maior tempo de contato e ação. Entretanto causam alteração da visão, podem provocar dermatite de contato e alteram a mitose da divisão celular do epitélio córneo (ABRÃO e MACHADO, 2008).

3.1.7 Efeitos adversos

Durante os estudos clínicos, os eventos adversos relatados para o tratamento com cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foram suaves, infrequentes e de caráter não sério, e não conduziram para a prematura descontinuação da terapia. Os mais frequentes efeitos adversos apresentados para o cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foram: desconforto transitório, isto é, dor aguda, ardência, irritação (8,6%), gosto perceptível do medicamento (4,5%), sensação de corpo estranho (1,8%) e prurido (1,2%). Os eventos clínicos relatados que ocorreram com 0,5 a 1% de incidência foram: formação de crosta na extremidade da pálpebra, cristais/escamas, eritema/vermelhidão, secura, mancha na córnea, ceratopatia/ceratite, hiperemia/congestão e lacrimejamento. Em triagem clínica, na qual 154 pacientes foram tratados de úlcera córnea bacteriana, o relato mais frequente de efeito

adverso para a terapia foi um precipitado cristalino branco visto em 29 pacientes (18,8%). O precipitado não necessitou terapia adjunta e desapareceu espontaneamente com a continuação do uso de ciprofloxacino (DICIONÁRIO, 2007; ANVISA, 2008a).

Outros relatos de efeitos adversos raramente relatados para tratamento com cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica incluem: congestão ocular, fotofobia, dor, visão turva, infiltrado corneano, inflamação, toxicidade corneana, alergia, intolerância, edema, sensação pesada, aumento de volume, reação conjuntival, sensação de paralisia, conjuntivite, erosão epitelial, infiltrado piorado e cefaléia (DICIONÁRIO, 2007; ANVISA, 2008a).

3.1.8 Interações medicamentosas

As fluorquinolonas raramente demonstram sinergismo ou antagonismo com outros agentes. Podem ser utilizadas combinações de terapias para melhorar a monoterapia e aditivos dos compostos ativos, exceto com imipenem em algumas infecções por *P. aeruginosa* e com rifampicina em doenças causadas por *Staphylococcus* (ANDRIOLE, 1999).

Não foram realizados estudos específicos com o cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica. Sabe-se, entretanto, que a administração sistêmica de algumas quinolonas pode provocar a elevação das concentrações plasmáticas de teofilina, interferir no metabolismo da cafeína, aumentar o efeito do anticoagulante oral warfarina e seus derivados e produzir elevação transitória da creatinina sérica em pacientes sob tratamento com ciclosporina (DICIONÁRIO, 2007; ANVISA, 2008b).

3.1.9 Contra-indicações

A solução oftálmica é contra-indicada para pacientes com hipersensibilidade aos componentes da fórmula, ou a outros derivados quinolônicos. O cloridrato de ciprofloxacino deve ser descontinuado ao primeiro sinal de “*rash*” cutâneo ou qualquer outra reação de hipersensibilidade. O produto somente deverá ser utilizado na gravidez ou no período de amamentação quando, a critério médico, o benefício para a mãe justificar o risco potencial para

o feto ou a criança. Nenhum evento sério foi relatado em pacientes com idade entre 1 e 12 anos (ANVISA, 2008a).

3.2 Validação de metodologia analítica

A validação de metodologia analítica tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003a).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003a).

Os métodos analíticos podem ser de quatro tipos (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP 31, 2008):

- Categoria I – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa 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.

Para cada tipo de metodologia analítica desenvolvida (categoria), um conjunto de testes é exigido (Tabela 3.1.1).

Tabela 3.1.1: 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	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003a.

A descrição dos parâmetros a serem ensaiados é apresentada a seguir:

- **Especificidade e Seletividade:** é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- **Linearidade:** é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
- **Intervalo:** é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico.
- **Precisão:** é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

- *Repetibilidade (precisão intradia)*: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.
- *Precisão intermediária (precisão interdias)*: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- *Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)*: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologias analíticas.

As Farmacopéias Americana (USP 31, 2008) e Brasileira (F. Bras. IV, 1988) estabelecem a repetibilidade como parâmetro a ser tomado em consideração para análise regular de dados, enquanto a reprodutibilidade e a precisão intermediária precisam ser demonstradas quando os métodos são avaliados para sua inclusão em compêndio oficial.

- **Limite de Detecção:** é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.
- **Limite de Quantificação:** é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.
- **Exatidão:** é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor verdadeiro. Pode ser determinada por diversas maneiras. No caso de estudo com o fármaco pode-se (a) aplicar o método analítico proposto na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), ou (b) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

No caso de forma farmacêutica, é possível determinar a exatidão pela análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão disponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição

de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

Na pesquisa de impurezas, a exatidão é realizada 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 (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

- **Robustez:** é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003a).

4.1 Descrição geral

O ciprofloxacino é uma fluorquinolona cujo nome químico é ácido 1-ciclopropil-6-flúor-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolona carboxílico, também conhecido pela sigla BAY-O-9867. Seu sal, cloridrato, tem registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS) com o número 86393-32-0, NCM 2933.5919, DCI 5446 e DCB 1463-02-0 (O'NEIL, 2006).

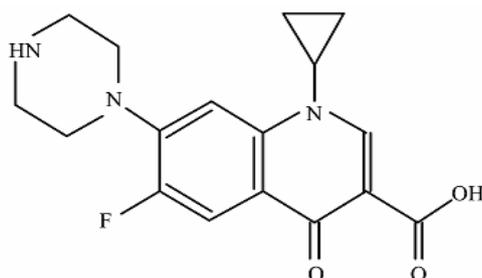


Figura 4.1.1: Estrutura química do ciprofloxacino.

O cloridrato de ciprofloxacino é descrito como um pó cristalino amarelo claro, ligeiramente higroscópico. Sua fórmula empírica é $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl \cdot H_2O$, sua massa molecular é de 385,82 g/mol. O cloridrato de ciprofloxacino é solúvel em água, levemente solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em acetona, diclorometano e em acetato de etila. Apresenta valores de pKa iguais a 6,09 e 8,74, log P igual a 1,32 e cLog P -1,46 (F. Bras. IV, 1988; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003; USP 31, 2008; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2005; REYNOLDS, 2007).

Este fármaco é comercializado no Brasil por vários laboratórios e formas farmacêuticas (Tabela 4.1.1).

Tabela 4.1.1: Ciprofloxacino comercializado no Brasil

Nome comercial	Laboratório	Forma farmacêutica
Biamotil [®]	Allergan	Solução oftálmica Pomada oftálmica
Cifloxtron [®]	Ariston	Solução para infusão Comprimido revestido
Ciloxan [®]	Alcon	Solução oftálmica Pomada oftálmica Solução otológica
Cinoflax [®]	Ativus	Comprimido revestido
Ciprix [®]	Geolab	Comprimido revestido
Cipro [®]	Bayer	Comprimido Solução para infusão
Cipro HC [®]	Bayer	Solução otológica
Cipro XR [®]	Bayer	Comprimido revestido
Ciprocilin [®]	Legrand	Comprimido revestido
Ciprodine [®]	Sanval	Comprimido
Ciprofar [®]	Elofar	Comprimido revestido
Ciprofloxacino ¹	Eurofarma	Solução injetável
Cipronon [®]	Genon	Solução oftálmica
Ciproxen [®]	Cifarma	Comprimido
Cloridrato de ciprofloxacino ¹	Ranbaxy	Comprimido
Cloridrato de ciprofloxacino ¹	Mepha-Ratiophar	Comprimido revestido
Cloridrato de ciprofloxacino ¹	Medley	Comprimido revestido
Cloridrato de ciprofloxacino ¹	Alcon	Solução oftálmica
Cloridrato de ciprofloxacino ¹	Neo química	Comprimido revestido
Ductocina [®]	Ducto	Comprimido
Floxan [®]	Prodoti	Comprimido
Maxiflox [®]	Latinofarma	Solução oftálmica Pomada oftálmica

Tabela 4.1.1: cont. Ciprofloxacino comercializado no Brasil

Nome comercial	Laboratório	Forma farmacêutica
Nixin [®]	Mepha	Comprimido revestido
Ofloxin [®]	Zambom	Solução otológica
Proflox [®]	Sigma Pharma	Comprimido revestido
Proxacin [®]	Neo química	Comprimido
Quiflox [®]	Teuto do Brasil	Comprimido revestido
Quinoflox [®]	Biolab Sanus	Comprimido revestido Solução injetável

¹Genérico

Fonte: VADE-MÉCUM, 2007

4.2 Substância Química de Referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi o cloridrato de ciprofloxacino, gentilmente cedido pelo Grupo EMS Sigma Pharma, identificada pelo lote BE1084, com teor declarado de 100,0%.

4.3 Amostra da forma farmacêutica solução oftálmica

Foram utilizadas amostras de solução oftálmica, contendo 3,5 mg/mL de ciprofloxacino, na forma de cloridrato (Biamotil[®]) do Laboratório Allergan, frasco plástico conta-gotas, contendo 5 mL de solução oftálmica estéril, lote F21821, fabricadas em 25/09/2007, válidas até 25/09/2009, adquiridas no comércio local.

Cada mL da solução oftálmica contém: 3,5 mg de cloridrato de ciprofloxacino (equivalente a 3 mg de ciprofloxacino). Veículos: ácido bórico, citrato de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio e água purificada q.s.p.

5.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

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

5.1.1 Material

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis KAYAK XA, modelo HP 8453, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Utilizaram-se como solventes água purificada (Milli-Q[®]), ácido clorídrico PA (Synth), hidróxido de sódio PA (Merck) e metanol PA (Synth).

A substância química de referência utilizada foi descrita no item 4.2.

5.1.2 Método

Foram preparadas soluções de cloridrato de ciprofloxacino SQR, em água, metanol, ácido clorídrico (HCl) 0,1 M e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, contendo 4,0 µg/mL. Os espectros de absorção da SQR foram registrados numa faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

5.1.3 Resultados

5.1.3.1 Espectro em água

Observou-se um máximo de absorção no comprimento de onda de 275 nm, com absorvância de 0,33593, para cloridrato de ciprofloxacino dissolvido em água a 4,0 µg/mL (Figura 5.1.1).

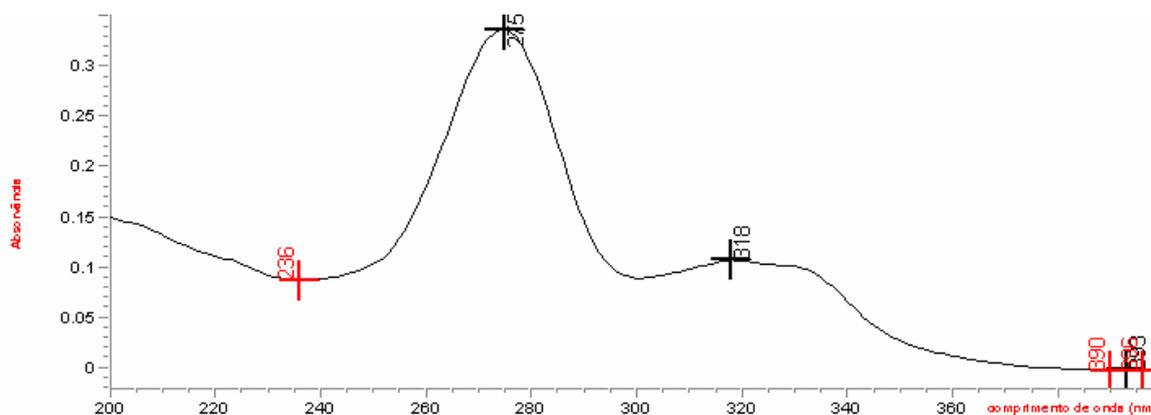


Figura 5.1.1: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 $\mu\text{g/mL}$, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.

5.1.3.2 Espectro em metanol

A banda de máxima absorção de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando metanol como solvente a 4,0 $\mu\text{g/mL}$, encontra-se em 281 nm, com absorvância de 0,41348 (Figura 5.1.2).

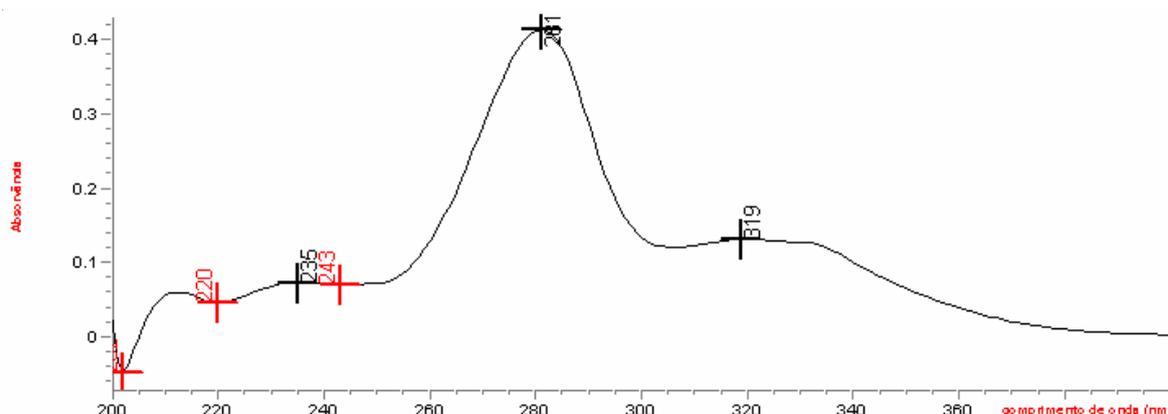


Figura 5.1.2: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 $\mu\text{g/mL}$, na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente.

5.1.3.3 Espectro em ácido clorídrico 0,1 M

O comprimento de onda máximo observado para cloridrato de ciprofloxacino em meio ácido a 4,0 $\mu\text{g/mL}$ foi de 277 nm e absorvância de 0,43363 (Figura 5.1.3).

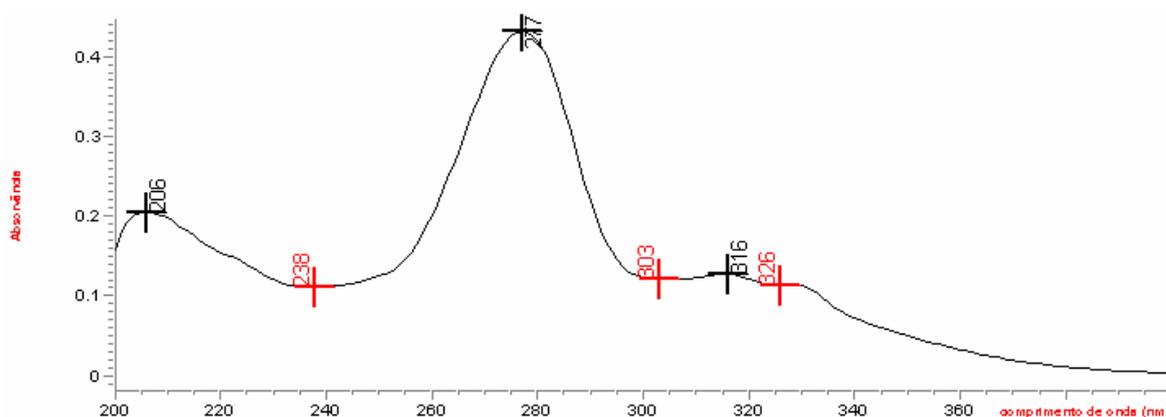


Figura 5.1.3: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

5.1.3.4 Espectro em hidróxido de sódio 0,1 M

Na Figura 5.1.4, observa-se o espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino a 4,0 µg/mL quando diluído em solução de hidróxido de sódio de 0,1 M com absorção máxima em 272 nm e absorvância de 0,36263.

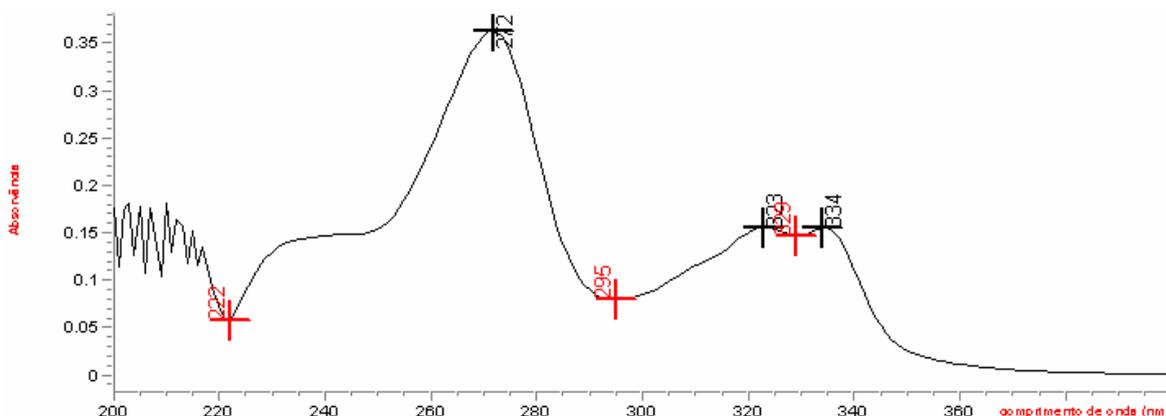


Figura 5.1.4: Espectro de absorção de solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 4,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.

5.1.4 Discussão

A absorção molecular na região do ultravioleta do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula, assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes no espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 2000). Neste trabalho, optou-se pela utilização

da água como solvente por possuir vantagens econômicas e ecológicas, tais como ser de fácil aquisição, baixo custo e fácil descarte.

5.2 Espectrofotometria de absorção na região do visível

A espectrofotometria no visível é recomendada pela 3ª edição da Farmacopéia Brasileira (1977) tanto para substâncias naturalmente coradas como para aquelas que podem sofrer reação química, em que se forma estequiometricamente uma substância corada.

A espectrofotometria na região visível, devido a simplicidade, baixo custo, sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão satisfatórias, permaneceu competitiva numa era de técnicas cromatográficas para análise de formas farmacêuticas.

A utilização da espectrofotometria na região do visível para a quantificação de quinolonas foi descrita anteriormente por diversos autores.

Vários métodos espectrofotométricos foram descritos para a determinação de quinolonas, inclusive para o ciprofloxacino, por *formação de complexos* com eosina e paládio (EL-WALILY *et al.*, 1996) e eosina e merbromina (EL-BRASHY *et al.*, 2004a) através de *formação de complexo por transferência de cargas* com tetraclorobenzoquinona, *p*-benzoquinona, *p*-nitrofenol, 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona, *p*-cloranil, tetracianoquinodimetano, ácido cloranílico, tetracianoetileno, Sudam III e fluorquinolonas como ciprofloxacino, enrofloxacino, pefloxacino, norfloxacino e fleroxacino (MATHUR *et al.*, 1990; SHANGBAG *et al.*, 1991; ABDEL-GAWAD e ABOU ATTIA, 1994; CHOWADRY e RAMA PRASAD, 1994; XUAN *et al.*, 1996, 1998; ABDEL-GAWAD *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 1998; EL SHERIF, 1999; AMIN, 2000; RIZK *et al.*, 2000; MOSTAFA *et al.*, 2002a; LIMING *et al.*, 2003; MING DU *et al.*, 2005), através de *formação de complexo por pareamento iônico* com violeta de bromocresol, azul de bromofenol, alaranjado de metila, azul de bromotimol, verde de bromocresol, *supracene violet 3B* (SV 3B), azul brilhante G, 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), tiocianato de cobalto, tetraiodeto de bismuto, reinecato de amônio, Sudan II, vermelho congo e violeta de genciana para ciprofloxacino, ofloxacino, enrofloxacino, pefloxacino, levofloxacino, esparfloxacino e norfloxacino entre outras quinolonas (BILGIC *et al.*, 1991; TOSUNOGLU e SAVCI, 1993; SASTRY

et al., 1995; EL SHERIF, 1999; AVADHANULU *et al.*, 1999; MARONA e SCHAPOVAL, 2001; MOSTAFA *et al.*, 2002b; SUSLU e TAMER, 2002, 2003; GOWDA e SEETHARAMAPPA, 2003; EL-BRASHY *et al.*, 2004b; EL-BRASHY *et al.*, 2005a, 2005b; ABDEL-HAY *et al.*, 2008; AMIN *et al.*, 2008) e por oxidação com sulfato cérico, cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona na presença de sulfato de amônio, vandato molibdato de amônio (BHARAT *et al.*, 1997; RIZK *et al.*, 2000; SALEM, 2005; BASAVAI AH *et al.*, 2006). Outros trabalhos descrevem ainda a *complexação/quelação* destes fármacos com sais de ferro em meio ácido, por tratamento com hidrazona 3-metilbenzotiazolin-2-ona e cério (III), reação com cobre, zircônio, molibdênio, vanádio ou tungstênio, térbio (III), alumínio (III) e ainda eritrosina formando quelatos fluorescentes (MATHUR *et al.*, 1990; RAMANA RAO *et al.*, 1990; BHOWAL e DAS, 1991; FROEHLICH, 1991; SULTAN e SULIMAN, 1992; CHOWADRY e RAMA PRASAD, 1994; SOUZA, 1995; FRATINI e SCHAPOVAL, 1996; SULIMAN e SULTAN, 1996; DRAKOPOULOS e IOANNOU, 1997; REDDY *et al.*, 1998; EL SHERIF, 1999; RIZK *et al.*, 2001a; NAGARALLI *et al.*, 2002; EL-KOMMOS *et al.*, 2003; BIAN *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2008; YAMAGUCHI *et al.*, 2009).

Foram encontrados relatos de que compostos poliaminados e aminoácidos são capazes de formar complexos com metais de transição, especialmente sais de cobre (MARONA e SCHAPOVAL, 2001).

Mais recentemente, Li e colaboradores (2008) descreveram a determinação de ciprofloxacino em soro humano pela reação com sulfato de cádmio nanoparticulado.

5.2.1 Reação com cloreto férrico

A reação entre o ferro (III) e o ciprofloxacino é uma reação rápida, na qual o Fe^{3+} entra em contato com o ácido carboxílico adjacente ao grupo ceto na posição 3 e 4, respectivamente, formando-se assim um anel de 6 membros, como apresentado na Figura 5.2.1 (SULTAN e SULIMAN, 1992).

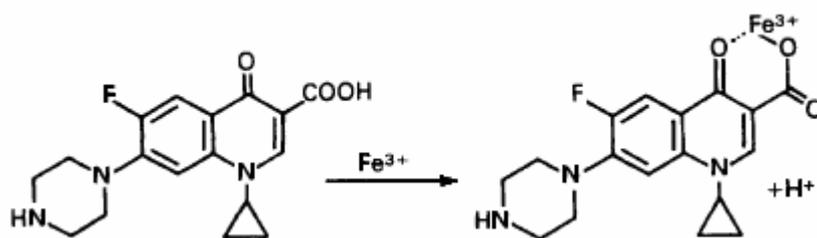


Figura 5.2.1: Reação do ferro (III) com ciprofloxacino.

Nesta reação, a coloração amarela alcança intensidade máxima imediatamente em temperatura ambiente, e permanece estável por, no mínimo, 60 minutos.

5.2.1.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis KAYAK XA, modelo HP 8453, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizou-se como solvente água purificada (Milli-Q[®]) e como reagente cloreto férrico 1,0% (Vetec).

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3.

5.2.1.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 100,0 mg de cloridrato de ciprofloxacino SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultra-som por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com água, obtendo-se a concentração de 1000,0 µg/mL.

5.2.1.1.2 Preparo do reagente cloreto férrico 1,0%

Pesou-se quantidade equivalente a 1,0 g de cloreto férrico e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultra-som por 10 minutos para solubilização e completou-se com água, obtendo-se reagente com concentração final de 1,0%.

5.2.1.2 Método

Em balão volumétrico de 10 mL adicionou-se alíquota de 0,2 mL da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR descrita no item 5.2.1.1.1 e 1,0 mL

de solução reagente de cloreto férrico 1,0%. O volume foi completado com água para obtenção de solução com concentração final de 20,0 µg/mL. As leituras foram efetuadas imediatamente, em espectrofotômetro contra um branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

5.2.1.3 Resultados

As características do espectro de absorção de cloridrato de ciprofloxacino em água utilizando como reagente cloreto férrico 1,0% são apresentadas na Figura 5.2.2.

Observou-se um máximo de absorção no comprimento de onda de 430 nm para cloridrato de ciprofloxacino dissolvido em água a 20,0 µg/mL, reagindo com 1,0 mL de cloreto férrico 1,0%.

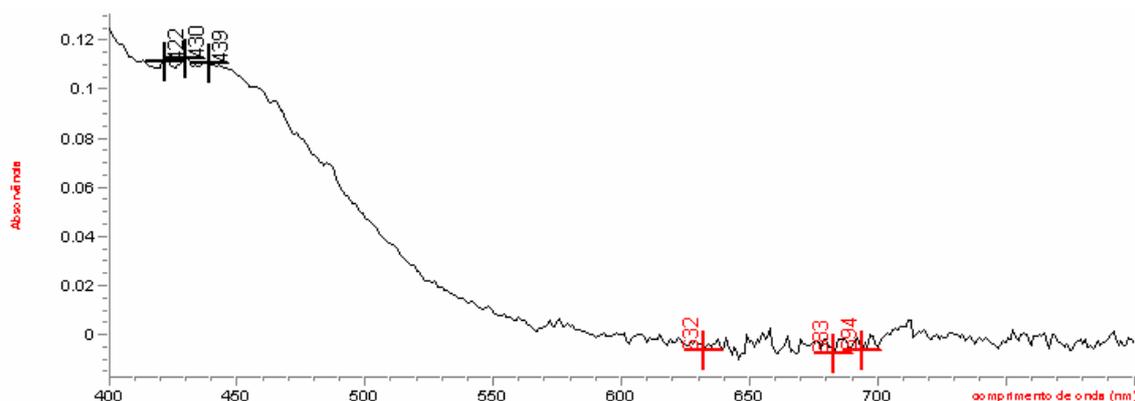


Figura 5.2.2: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando água como solvente e cloreto férrico 1,0% como reagente.

5.2.1.4 Discussão

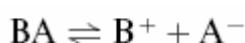
Uma vez que o ciprofloxacino forma complexo amarelado com o íon ferro, absorvendo na região do visível, é possível a utilização deste reagente para a análise qualitativa desta fluorquinolona, já que o produto formado absorve em comprimento de onda específico.

5.2.2 Reação com azul de bromotimol

A reação do ciprofloxacino com o azul de bromotimol se dá por pareamento iônico, em temperatura ambiente, formando um complexo altamente

corado, extraído com solvente adequado. A coloração produzida imediatamente pode ser determinada espectrofotometricamente em um comprimento de onda definido.

O ciprofloxacino é um composto que contém em sua estrutura química grupamentos aminados doadores de elétrons, sendo assim, provavelmente, reagem com as cargas negativas do corante. A base teórica deste método é o equilíbrio de dissociação do eletrólito tipo BA dissociando em meio aquoso, como na equação abaixo, que pode seguir para a esquerda (associação). O complexo (par-iônico) pode ser removido por extração por meio de solvente imiscível em água (RAHMAN e HEJAZ-AZMI, 2000; MOSTAFA *et al.*, 2002b):



onde B⁺ é amina protonada do fármaco e A⁻ é a forma aniônica do corante.

A Fig. 5.2.3 mostra o esquema da reação.

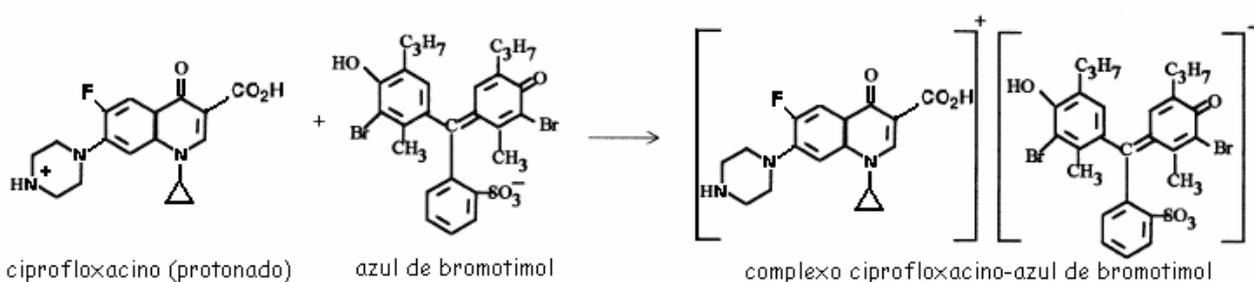


Figura 5.2.3: Esquema da reação entre o ciprofloxacino e o azul de bromotimol.

5.2.2.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis KAYAK XA, modelo HP 8453, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizaram-se como solventes diclorometano PA (Synth), clorofórmio PA (Synth) e éter etílico PA (Synth) e como reagente azul de bromotimol (Inlab).

A substância química de referência utilizada foi descrita no item 4.2.

5.2.2.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesou-se cloridrato de ciprofloxacino SQR em quantidade de 100,0 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Em seguida

o balão volumétrico foi levado ao ultra-som por 5 minutos e completado com água, a fim de obter-se concentração final de 1000,0 µg/mL.

5.2.2.1.2 Preparo do reagente azul de bromotimol 0,1%

Transferiram-se 100,0 mg de azul de bromotimol para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos em 40 mL de etanol, sob agitação. Após dissolução, completou-se o volume com água.

5.2.2.1.3 Ensaios preliminares

Realizaram-se ensaios preliminares para a escolha do solvente de extração apropriado para a remoção do complexo formado pela reação entre cloridrato de ciprofloxacino e azul de bromotimol.

5.2.2.2 Método de extração

Transferiram-se 0,5 mL da solução padrão de cloridrato de ciprofloxacino SQR (1000,0 µg/mL) e 4,0 mL da solução de azul de bromotimol 0,1% para um funil de separação. Adicionaram-se 15 mL do solvente de extração, dividido em três alíquotas de 5 mL, até que a solução permanecesse incolor. A fase orgânica foi separada e transferida para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com o solvente extrator para obtenção de soluções com concentração de 20,0 µg/mL. Leituras no espectrofotômetro foram realizadas para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima. A solução branco foi feita da mesma forma com exceção da adição do fármaco.

5.2.2.3 Resultados

As Figuras 5.2.4, 5.2.5 e 5.2.6 mostram as absorções obtidas para a solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando azul de bromotimol como reagente e diclorometano, clorofórmio e éter etílico como solvente. Os comprimentos de onda máximos obtidos com os diferentes solventes foram 413, 417 e 403 nm, respectivamente.

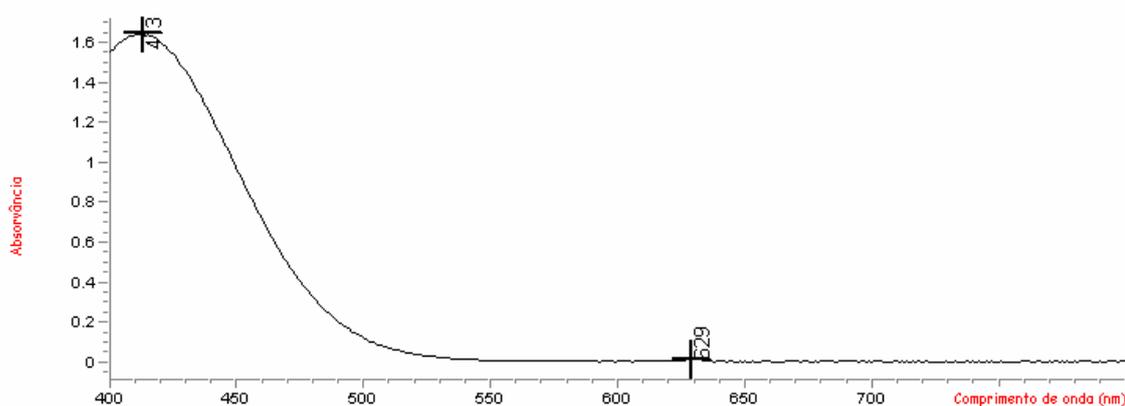


Figura 5.2.4: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando diclorometano como solvente e azul de bromotimol como reagente.

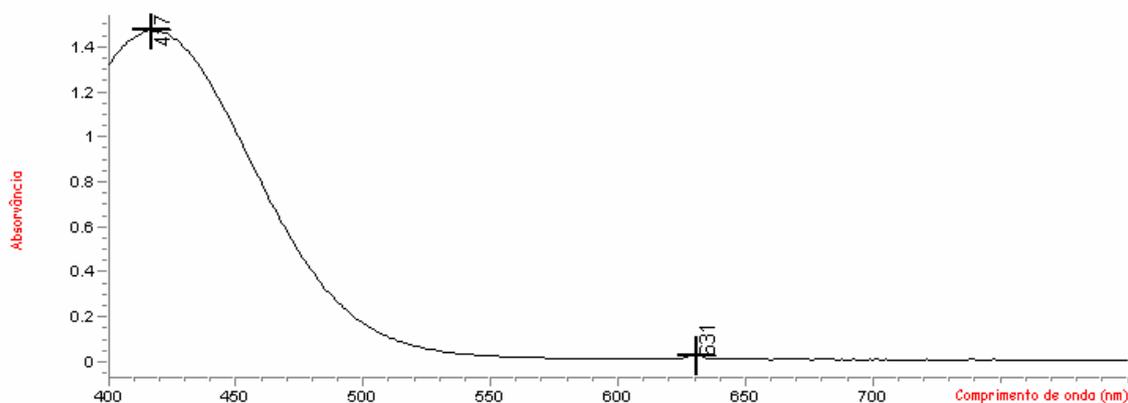


Figura 5.2.5: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando clorofórmio como solvente e azul de bromotimol como reagente.

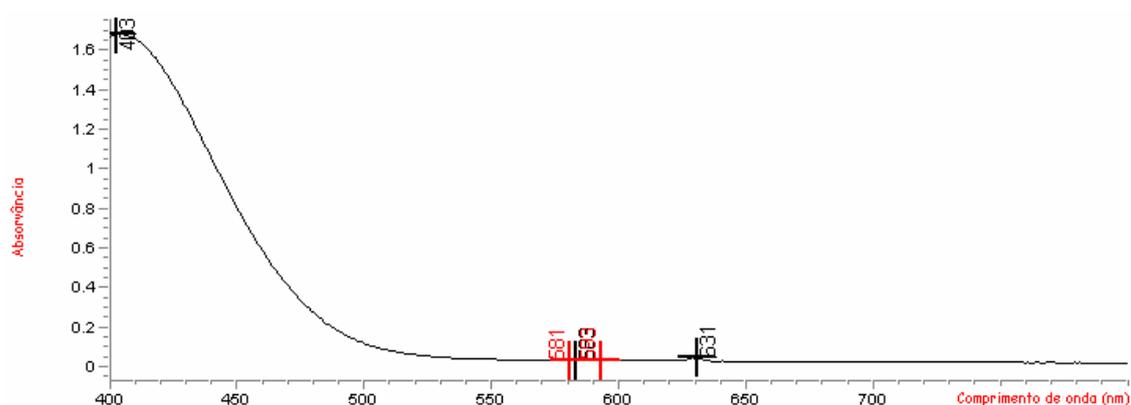


Figura 5.2.6: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 20,0 µg/mL, na região do visível, utilizando éter etílico como solvente e azul de bromotimol como reagente.

5.2.2.4 Discussão

Utilizando-se os três solventes obteve-se extração satisfatória do produto gerado pela reação das soluções de cloridrato de ciprofloxacino SQR com o reagente azul de bromotimol. É importante salientar que a exposição ao diclorometano e ao clorofórmio pode ser carcinogênica para humanos, enquanto o éter etílico não apresenta consequências tão drásticas (IPCS, 2008). Entretanto, a ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) relata que o clorofórmio e o diclorometano são, em doses elevadas, relativamente carcinogênicos para animais de experimentação por vias de administração, em sítios de ação, por mecanismos que podem não ser relevantes aos trabalhadores expostos. Estudos epidemiológicos não confirmam aumento de risco de câncer em humanos expostos (ACGIH, 2005). A ACGIH classifica estes solventes clorados na categoria A3 e o éter etílico não consta em nenhuma categoria de carcinogenicidade na ACGIH 2005. Assim sendo, todos os três solventes podem ser utilizados para a análise qualitativa deste fármaco.

5.2.3 Reação com ácido cloranílico

O ácido cloranílico forma com o ciprofloxacino um complexo por transferência de cargas (Figura 5.2.7) de cor púrpura que pode ser medido espectrofotometricamente (LIMING *et al.*, 2003).

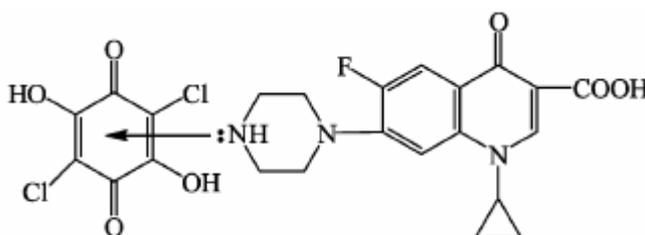


Figura 5.2.7: Complexo ciprofloxacino - ácido cloranílico.

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

Na reação entre ciprofloxacino e o ácido cloranílico, a cor púrpura alcança imediatamente a intensidade máxima em temperatura ambiente, e permanece estável por 30 minutos. Sob aquecimento a 50 °C por 15 minutos, não há

mudanças na intensidade da coloração, porém o aquecimento por longo tempo conduz à diminuição na intensidade (MOSTAFA *et al.*, 2002a).

5.2.3.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis KAYAK XA, modelo HP 8453, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Utilizou-se como solvente acetonitrila PA (ACN) (Merck) e como reagente ácido cloranílico 0,1% (Vetec).

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3.

5.2.3.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 100,0 mg de cloridrato de ciprofloxacino SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultra-som por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com água, obtendo-se a concentração de 1000,0 µg/mL.

5.2.3.1.2 Preparo do reagente ácido cloranílico 0,1%

Pesou-se quantidade equivalente a 100,0 mg de ácido cloranílico e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de acetonitrila. Levou-se ao ultra-som por 10 minutos para garantir a dissolução e completou-se com acetonitrila, obtendo-se o reagente com concentração final de 0,1%.

5.2.3.2 Método

Alíquota de 0,6 mL da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR, descrita no item 5.2.3.1.1, foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, 1,0 mL da solução de ácido cloranílico foi adicionada, agitou-se e completou-se o volume para 10 mL com acetonitrila obtendo-se concentração final de 60,0 µg/mL do fármaco. A cor púrpura formada foi imediatamente medida no intervalo de 400 a 800 nm contra a solução branco preparada da mesma maneira, exceto pela presença do fármaco.

5.2.3.3 Resultados

As características do espectro de absorção de cloridrato de ciprofloxacino em acetonitrila utilizando como reagente ácido cloranílico 0,1% são apresentadas na Figura 5.2.8.

Observou-se um máximo de absorção no comprimento de onda de 520 nm para o cloridrato de ciprofloxacino com concentração de 60,0 µg/mL.

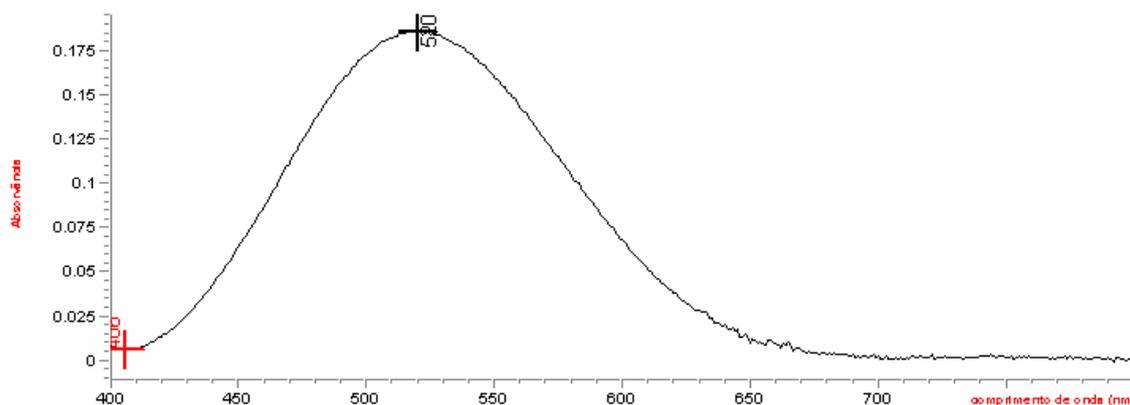


Figura 5.2.8: Espectro de absorção da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 60,0 µg/mL, na região do visível, utilizando acetonitrila como solvente e ácido cloranílico como reagente.

5.2.3.4 Discussão

A determinação de cloridrato de ciprofloxacino pode ser realizada através de seu pareamento iônico com o reagente ácido cloranílico, o qual origina com o fármaco um composto de coloração púrpura que apresenta absorção em comprimento de onda específico de 520 nm.

6.1 ENSAIO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Existem vários trabalhos que descrevem a quantificação de quinolonas, inclusive o ciprofloxacino, utilizando o ensaio microbiológico, método de difusão em ágar – cilindros em placas (FROEHLICH, 1991; FRATINI, 1993; SOUZA, 1995; MARONA e SCHAPOVAL, 1998; EV e SCHAPOVAL, 2002; BONILLA, 2004; GOMES e SALGADO, 2006; SALGADO e LOPES, 2006), entretanto, nenhum artigo utilizando o método turbidimétrico foi encontrado.

O método turbidimétrico está descrito na Farmacopéia Brasileira (F. Bras. IV, 1988) e uma de suas principais vantagens é o menor tempo de análise.

Este método baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (absorvância) da suspensão de microrganismos adequados/sensíveis ao agente antimicrobiano contido em um meio. A resposta do microrganismo é função direta da concentração da substância ativa.

6.1.1 Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas verificando parâmetros como microrganismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 6.1.1).

Tabela 6.1.1: Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 IAL 636
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Meios de cultura	Caldo BHI
	Caldo Casoy
	Caldo Müller-Hinton
Concentração do inóculo	4,0%
	8,0%
	10,0%
Solução diluente	água
	solução tampão fosfato pH 8,0
Concentrações das soluções padrão	1,75; 3,5; 7,0 µg/mL
	14,0; 28,0; 56,0 µg/mL

Realizados os testes preliminares, alguns parâmetros foram estabelecidos por apresentarem melhor desempenho na análise (Tabela 6.1.2).

Tabela 6.1.2: Parâmetros estabelecidos para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
Meio de cultura	Caldo BHI
Concentração do inóculo	10,0%
Diluente	água
Concentrações das soluções padrão	14,0; 28,0 e 56,0 µg/mL

6.1.2 Material

Além dos parâmetros estabelecidos, descritos na Tabela 6.1.2, foram utilizados cloridrato de ciprofloxacino SQR e solução oftálmica, descritos nos itens 4.2 e 4.3.

Para a incubação dos microrganismos utilizou-se aparelho incubador Shaker Marconi® modelo MA420 e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás®). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro Beckman modelo DU® 530.

6.1.2.1 Preparo do meio de cultura

Foram utilizados meio de cultura ágar Casoy (Difco), para a manutenção dos microrganismos-teste e o caldo BHI (Biobrás) para a execução dos ensaios.

Os meios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

6.1.2.2 Preparo do inóculo

As culturas de *S. epidermidis* foram repicadas com alça de platina para caldo BHI e mantidas, para seu desenvolvimento, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo à 530 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de 25,0% ± 2,0%. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (F. Bras. IV, 1988).

6.1.2.3 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Foram pesados 100,0 mg de cloridrato de ciprofloxacino SQR, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 1000,0 µg/mL. Alíquotas de 140; 280 e 560 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL que foram completados com água para gerar soluções com concentrações finais de 14,0; 28,0 e 56,0 µg/mL.

6.1.2.4 Preparo das amostras de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

O conteúdo de 20 frascos contendo cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica 0,35% foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras transferiram-se alíquotas de 40, 80 e 160 μL para balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com água, obtendo-se soluções com concentrações finais de 14,0, 28,0 e 56,0 $\mu\text{g/mL}$.

6.1.3 Método

Inicialmente procedeu-se o preparo do inóculo como descrito no item 6.1.2.2, em seguida, distribuiu-se em tubos idênticos contendo 10,0 mL de caldo BHI estéril, 200 μL de cada uma das soluções do padrão e da amostra descritas nos itens 6.1.2.3 e 6.1.2.4, respectivamente. Adicionou-se em cada tubo 1,0 mL de caldo nutriente inoculado. Foram usados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas 3 X 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de cloridrato de ciprofloxacino) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas 3 réplicas.

Incubou-se, em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de 35,0 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2,0 $^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos microrganismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

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

6.1.3.1 Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida como descrito item 6.1.3. Foram feitas três curvas em três dias diferentes.

6.1.3.2 Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

Para doseamento da forma farmacêutica, adicionaram-se 200 µL das soluções do padrão e da amostra, com concentração de 28,0 µg/mL, concentração de referência do ensaio (F. Bras. IV, 1988), em séries de seis tubos contendo 10,0 mL de caldo estéril cada. Adicionou-se para cada tubo 1,0 mL de caldo nutriente inoculado. Incubou-se, em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos microrganismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

Determinou-se a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm. Em todas as análises um controle positivo e negativo foram utilizados. O ensaio foi realizado em três dias.

6.1.4 Validação

6.1.4.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item 6.1.3.1, foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.1.4.2 Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios de doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, durante três dias seguidos (item 6.1.3.2). Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.1.4.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.1.3.

Tabela 6.1.3: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico

	<i>Volume adicionado de amostra (3500 µg/mL) (mL)</i>	<i>Volume adicionado de CIPRO HCl SQR (1000 µg/mL) (mL)</i>	<i>Concentração final (µg/mL)*</i>
Amostra	0,03	-	10,5
R1	0,03	0,045	15,0
R2	0,03	0,245	35,0
R3	0,03	0,445	55,0
Padrão	-	0,105	10,5

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água.

**Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

A percentagem de cloridrato de ciprofloxacino recuperado foi calculada pela equação da reta, seguido pela equação 6.1.1 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(C_r - C_a) / C_p] \times 100 \quad \text{Equação 6.1.1}$$

em que:

C_r = concentração da solução amostra adicionada da substância química de referência (µg/mL)

C_a = concentração da amostra (µg/mL)

C_p = concentração teórica da substância química de referência adicionada (µg/mL)

6.1.4.4 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação das respostas obtidas para a substância ativa na ausência dos excipientes (substância química de referência) e na presença dos excipientes (produto de referência).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e *t* (Student) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

6.1.4.5 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de parâmetros operacionais, como diferentes analistas.

6.1.5 Resultados

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino SQR e amostra são mostradas na Tabela 6.1.4.

Tabela 6.1.4: Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino, pelo método turbidimétrico

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância*		Absorvância média \pm e.p.m.		CV (%)	
	P	A	P	A	P	A
14,0	0,482	0,489	0,480 \pm 0,0012	0,476 \pm 0,0069	0,43	2,51
	0,478	0,472				
	0,481	0,466				
28,0	0,401	0,409	0,408 \pm 0,0044	0,402 \pm 0,0038	1,85	1,63
	0,407	0,401				
	0,416	0,396				
56,0	0,340	0,331	0,344 \pm 0,0021	0,338 \pm 0,0033	1,05	1,71
	0,347	0,341				
	0,345	0,341				

*Cada valor corresponde a média de três determinações.

P = padrão; A = amostra

As curvas analíticas de cloridrato de ciprofloxacino SQR e amostra (Figura 6.1.1) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,0983\text{Ln}(x) + 0,7385$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994, para o cloridrato de ciprofloxacino SQR e $y = -0,0995\text{Ln}(x) + 0,7368$, com r de 0,9992, para o fármaco em solução oftálmica.

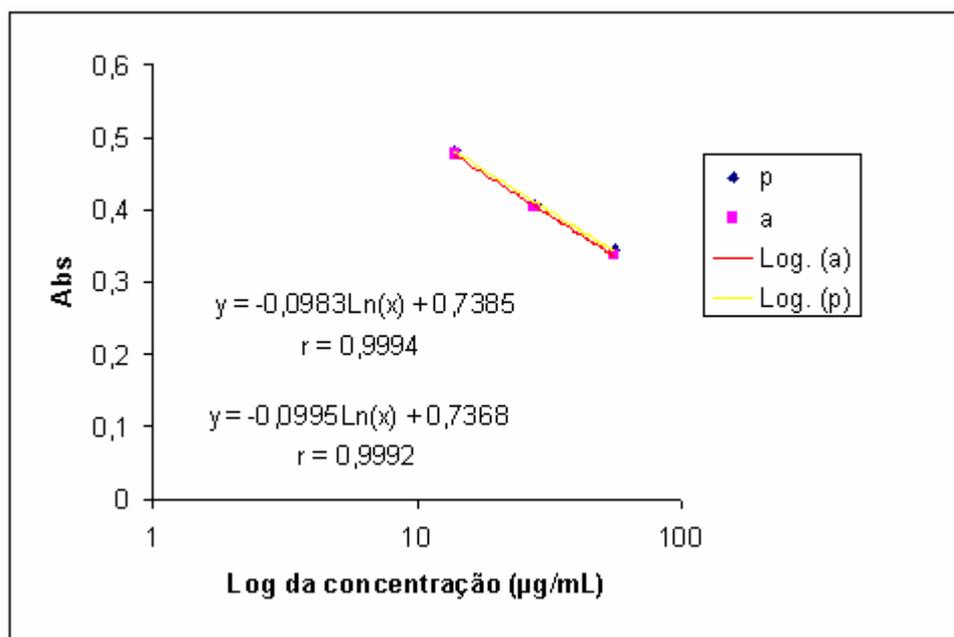


Figura 6.1.1: Curvas analíticas de soluções de cloridrato de ciprofloxacino SQR e amostra, em concentrações de 14,0; 28,0 e 56,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de cloridrato de ciprofloxacino é mostrada na Tabela 6.1.5.

Tabela 6.1.5: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método turbidimétrico

<i>Fontes de variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F_{cal}</i>	<i>F_{tab}</i>
Preparação	1	0,000289	0,000289	6,2154*	4,24
Regressão	1	0,112888	0,112888	2427,8185*	4,24
Desvio de paralelismo	1	0,000004	0,000004	0,0896	4,24
Quadrático	1	0,000156	0,000156	3,3562	4,24
Diferença de quadrático	1	0,000001	0,000001	0,0108	4,24
Desvio de Linearidade	2	0,000157	0,000078	1,6835	3,38
Entre doses	5	0,113338	0,022668	487,4981*	2,6
Entre tubos	5	0,000010	0,000002	0,0411	2,6
Dentro (erro)	25	0,001162	0,00046
Total	35	0,114510

*Significativo para $p < 5\%$

Os valores da potência de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, determinados durante o ensaio de precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.1.6.

Tabela 6.1.6: Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método turbidimétrico

<i>Dia</i>	<i>Teor de CIPRO HCl sol. oftálmica*</i>		<i>Teor médio ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
	<i>µg/mL</i>	<i>%</i>		
1	27,99	99,96		
2	29,74	106,22	102,27 ± 1,98	3,36
3	28,18	100,63		

*Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.1.7 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método turbidimétrico.

Tabela 6.1.7: Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico

	CIPRO HCl SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	CIPRO HCl SQR encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	4,5	4,49	99,72	
R2	24,5	24,06	98,19	99,71
R3	44,5	45,05	101,23	

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas. Os valores obtidos estão dentro do especificado (BRASIL, 2003a) (Tabela 6.1.8).

Tabela 6.1.8: Valores da determinação da robustez do método turbidimétrico

Analista	Absorvância	Absorvância média \pm e.p.m.	CV (%)
1	0,402	0,413 \pm 0,0039	1,64
	0,413		
	0,416		
	0,412		
	0,413		
	0,423		
	0,433		
2	0,420	0,421 \pm 0,0048	1,96
	0,421		
	0,418		
	0,425		
	0,408		

6.1.6 Discussão

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico permite a determinação da potência do fármaco, através da medida da turbidez (absorvância), causada pela inibição do microrganismo pelo antimicrobiano.

No desenvolvimento do método turbidimétrico para cloridrato de ciprofloxacino foram testadas concentrações da substância química de referência que variaram de 1,75 a 56,0 µg/mL. Finalmente, foram escolhidas as concentrações 14,0; 28,0 e 56,0 µg/mL, uma vez que apresentaram a melhor resposta frente ao microrganismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopéia Brasileira (1988). A utilização do microrganismo *S. epidermidis* baseia-se na sua sensibilidade frente ao cloridrato de ciprofloxacino e pela facilidade de crescimento e manutenção deste microrganismo.

A linearidade do método foi comprovada pelos componentes de paralelismo, coeficiente de correlação e análise de variância dos dados da curva analítica.

A análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de correlação são 0,9994 e 0,9992, para a substância química de referência e solução oftálmica, respectivamente, valores próximos da unidade, os quais são excelentes tratando-se de um ensaio biológico. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra.

O coeficiente de variação das absorvâncias obtidas pela inibição do crescimento bacteriano no doseamento da amostra foi, em média, de 3,36%, menor que o recomendado de 5% (BRASIL, 2003a).

A especificidade do método foi confirmada pela comparação das absorvâncias da substância química de referência e da amostra. A seletividade foi evidenciada pelo cálculo da homogeneidade de variâncias (F) e pela comparação das médias (t), estando as duas variáveis dentro do esperado, ou seja, valor calculado menor que valor tabelado. Com este resultado é possível garantir que os excipientes não têm efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração estudada (INMETRO, 2007). Isto pode ser confirmado ainda pelos valores obtidos para o teste de precisão intradia e interdia de 2,06 e 2,30%,

respectivamente, validando assim a precisão do método turbidimétrico para análise de cloridrato de ciprofloxacino.

A quantidade de cloridrato de ciprofloxacino presente nas amostras analisadas, 102,27%, está de acordo com os compêndios oficiais que é de 90,0 a 110,0% (F. Bras.IV, 1988; USP 31, 2008).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada a média de 99,71%.

Os parâmetros estudados para a validação do método turbidimétrico atenderam às especificações para a adequada quantificação do cloridrato de ciprofloxacino na forma farmacêutica solução oftálmica.

6.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

A espectrofotometria na região do UV/Vis do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função, da robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde **A** é a absorvância, **I₀** é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e **I** é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo **c** é a concentração (mol/L) da espécie absorvente e **b**, a distância (cm) percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

A absorção na região do ultravioleta e visível (UV/Vis) caracteriza-se por ser pronunciada, o que permite desenvolver métodos de alta sensibilidade. A absorção nesta região é característica de moléculas com capacidade de sofrer transições eletrônicas nos orbitais de baixa energia (SILVERSTEIN, 2000).

Alguns trabalhos são encontrados na literatura, utilizando a espectrofotometria com detecção ultravioleta para análise de ciprofloxacino na forma farmacêutica simples (LIU *et al.*, 1994) e em associações com outros fármacos (ZHANG *et al.*, 1997; BUNGALOWALA *et al.*, 1998). Mais recentemente, Pascual-Reguera e colaboradores (2004) descreveram dois métodos espectrofotométricos, um utilizando o sistema FIA (análise por injeção em fluxo) e o outro a espectrofotometria em fase sólida para a determinação de ciprofloxacino. Além destes trabalhos, a Farmacopéia Brasileira (1988) descreve um método espectrofotométrico utilizando lâmpada UV para quantificação da matéria-prima ciprofloxacino, mas não de seu sal, ou o fármaco na forma farmacêutica.

6.2.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis KAYAK XA, modelo HP 8453, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizou-se como solvente água purificada (Milli-Q®).

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3.

6.2.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 10,0 mg de cloridrato de ciprofloxacino SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultra-som por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração de 100,0 µg/mL de cloridrato de ciprofloxacino SQR.

6.2.2 Método

Alíquotas da solução padrão de cloridrato de ciprofloxacino, item 6.2.1.1, foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, o volume foi completado para 10 mL com água. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda máximo, 275 nm, como descrito anteriormente no item 5.1.3.1, utilizando o solvente puro para zerar o aparelho.

6.2.2.1 Curva de Ringbom

A faixa de linearidade do método foi determinada pela curva de Ringbom.

A partir da solução de trabalho preparada no item 6.2.1.1, foram preparadas diluições com auxílio de micropipeta, em balões volumétricos de 10 mL como apresentados na Tabela 6.2.1. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 275 nm.

Tabela 6.2.1: Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do UV para análise de cloridrato de ciprofloxacino a 275 nm

	Volume da solução de CIPRO HCl SQR (100 µg/mL) mL*	Concentração (µg/mL)
1	0,05	0,5
2	0,10	1,0
3	0,20	2,0
4	0,30	3,0
5	0,40	4,0
6	0,50	5,0
7	0,60	6,0
8	0,70	7,0
9	0,80	8,0
10	0,90	9,0
11	1,00	10,0
12	1,10	12,0
13	1,20	14,0
14	1,60	16,0
15	1,80	18,0
16	2,00	20,0
17	2,20	22,0
18	2,40	24,0

*diluída em balão volumétrico de 10 mL

6.2.2.2 Obtenção da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, transferiram-se alíquotas de 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 mL da solução descrita no item 6.2.1.1 para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com água, obtendo-se soluções com concentrações finais de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 275 nm, utilizando água como branco.

6.2.2.3 Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

O conteúdo de 20 frascos contendo cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica 0,35% foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras transferiu-se alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume. A partir desta solução, volumes de 1,0 mL foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL obtendo-se soluções com concentração final de 3,5 µg/mL. As leituras das soluções foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 275 nm. As soluções foram preparadas em seis réplicas.

O cálculo da concentração e do teor de cloridrato de ciprofloxacino nas soluções oftálmicas foi feito pelas equações 6.2.1 e 6.2.2.

Concentração

$$C_A = \mathcal{A}_A \cdot C_{SQR} / \mathcal{A}_{SQR} \quad \text{Equação 6.2.1}$$

em que:

C_A = concentração da amostra (µg/mL)

C_{SQR} = concentração da substância química de referência (µg/mL)

\mathcal{A}_A = absorvância da amostra

\mathcal{A}_{SQR} = absorvância da substância química de referência

Teor percentual

$$C_A \% = C_A \cdot 100 / C_t \quad \text{Equação 6.2.2}$$

em que:

C_A = concentração de cloridrato de ciprofloxacino encontrado na amostra (µg/mL)

C_t = concentração teórica de cloridrato de ciprofloxacino na amostra (µg/mL)

6.2.3 Validação

6.2.3.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item 6.2.2.2 foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

6.2.3.2 Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios da determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, durante três dias seguidos. Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.2.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.2.2.

Tabela 6.2.2: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	<i>Volume adicionado de amostra (35 µg/mL) (mL)</i>	<i>Volume adicionado de CIPRO HCl SQR (100 µg/mL) (mL)</i>	<i>Concentração final (µg/mL)*</i>
Amostra	0,5	-	1,75
R1	0,5	0,125	3,00
R2	0,5	0,225	4,00
R3	0,5	0,325	5,00
SQR	-	0,175	1,75

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água

**Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

A percentagem de cloridrato de ciprofloxacino recuperado foi calculada pela equação 6.2.3 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(Cr-Ca)/Cp] \times 100 \quad \text{Equação 6.2.3}$$

em que:

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

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

Cp = concentração teórica da substância química de referência adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

6.2.3.4 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência dos excipientes (substância química de referência) e na presença dos excipientes (produto de referência).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e t (Student) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

6.2.3.5 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas.

6.2.4 Resultados

As características do espectro de absorção de cloridrato de ciprofloxacino SQR em água (Figura 5.1.1) foram discutidas na seção 5.1.3.1 deste trabalho.

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, para cloridrato de ciprofloxacino são mostrados na Tabela 6.2.3 e Figura 6.2.1.

Tabela 6.2.3: Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 275 nm

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	Absorvância	100 - T%
1	0,5	0,05454	11,80174
2	1,0	0,17494	33,15637
3	2,0	0,22823	40,87516
4	3,0	0,34695	55,01684
5	4,0	0,46638	65,83197
6	5,0	0,58934	74,25695
7	6,0	0,66733	78,48853
8	7,0	0,82452	85,02110
9	8,0	0,91047	87,71062
10	9,0	1,04560	90,99674
11	10,0	1,18810	93,51515
12	12,0	1,43430	96,32125
13	14,0	1,66130	97,81878
14	16,0	1,89210	98,71796
15	18,0	2,10690	99,21819
16	20,0	2,31060	99,51090
17	22,0	2,52530	99,70167
18	24,0	2,71470	99,80711

*diluída em balão volumétrico de 10 mL

Na Figura 6.2.1 está representada a curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para cloridrato de ciprofloxacino SQR.

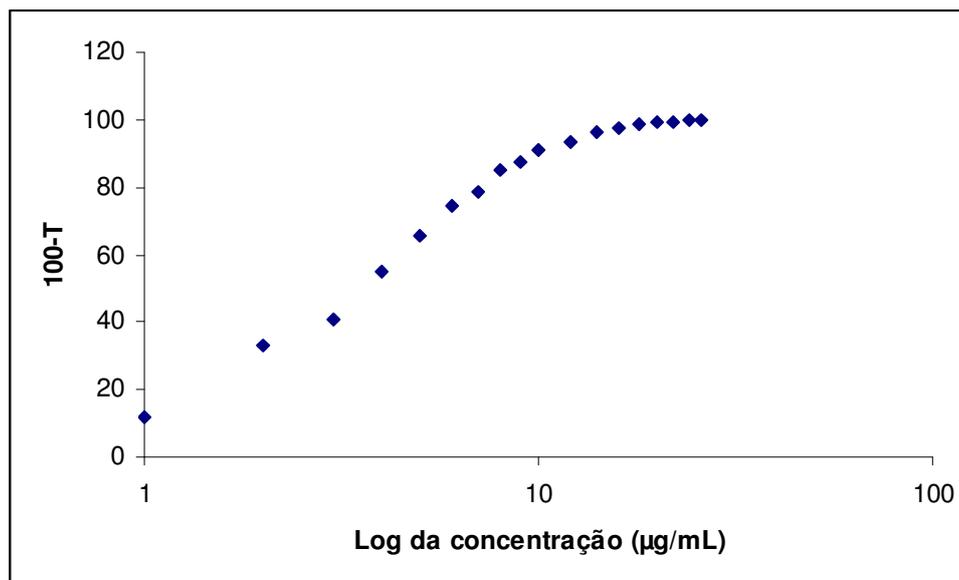


Figura 6.2.1: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 275 nm.

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino SQR, em água, para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 6.2.4.

Tabela 6.2.4: Valores de absorvância determinados para a curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 275 nm

Concentração (µg/mL)	Absorvância*	Absorvância média ± e.p.m.	CV (%)
	0,17739		
2,0	0,17267	0,17682 ± 0,0023	2,21
	0,18041		
	0,27821		
3,0	0,26190	0,27012 ± 0,0047	3,02
	0,27024		
	0,37247		
4,0	0,36059	0,37192 ± 0,0064	2,98
	0,38270		
	0,47831		
5,0	0,45723	0,47163 ± 0,0072	2,65
	0,47935		
	0,57765		
6,0	0,55842	0,56527 ± 0,0062	1,90
	0,55975		
	0,67652		
7,0	0,64811	0,66291 ± 0,0082	2,15
	0,66410		

*Cada valor corresponde à média de três determinações.

A curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR (Figura 6.2.2) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

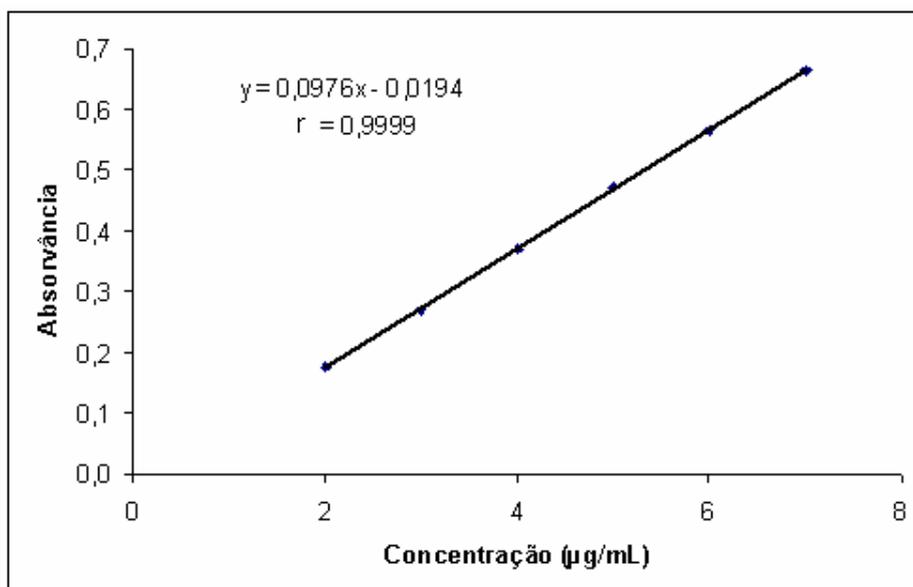


Figura 6.2.2: Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 275 nm.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino é mostrada na Tabela 6.2.5.

Tabela 6.2.5: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F_{calc}	F_{tab}
Entre	5	0,63164	0,12633	132,90*	3,11
Regressão linear	1	0,63150	0,63150	664,33*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00014	0,00004	0,04	3,26
Resíduo	12	0,00095	0,00008	-	-
Total	17	0,63259	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

A absorvidade molar (ϵ) foi calculada pela equação 6.2.4.

$$\epsilon = A/(c \cdot b) \quad \text{Equação 6.2.4}$$

em que:

\mathcal{A} = absorvância

c = concentração molar (mol/L)

b = caminho óptico da cubeta (cm)

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 6.2.6.

Tabela 6.2.6: Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV para quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	275
ϵ (L/mol.cm)	$5,0 \times 10^4$
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	2,0 – 7,0
Equação: $y = ax + b$	
a	0,0976
b	-0,0194
r (coeficiente de correlação)	0,9999
n	6

Os valores de teor de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, determinados durante a análise da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.2.7.

Tabela 6.2.7: Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método espectrofotométrico na região do UV

Dia	Teor de CIPRO HCl sol. oftálmica*		Teor médio \pm e.p.m.	CV (%)
	$\mu\text{g/mL}$	%		
1	3,55	101,34		
2	3,48	99,35	99,79 \pm 0,80	1,39
3	3,45	98,67		

*Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.2.8 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico, utilizando água como solvente, a 275 nm.

Tabela 6.2.8: Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	<i>CIPRO HCl SQR</i> <i>adicionada</i> <i>(µg/mL)</i>	<i>CIPRO HCl SQR</i> <i>encontrada</i> <i>(µg/mL)</i>	<i>Recuperação</i> <i>(%)</i>	<i>Recuperação</i> <i>média (%)</i>
R1	1,25	1,28	102,31	
R2	2,25	2,28	101,45	101,51
R3	3,25	3,28	100,77	

O espectro de absorção na faixa de 200 a 400 nm das soluções preparadas para o ensaio de especificidade é mostrado na Figura 6.2.3.

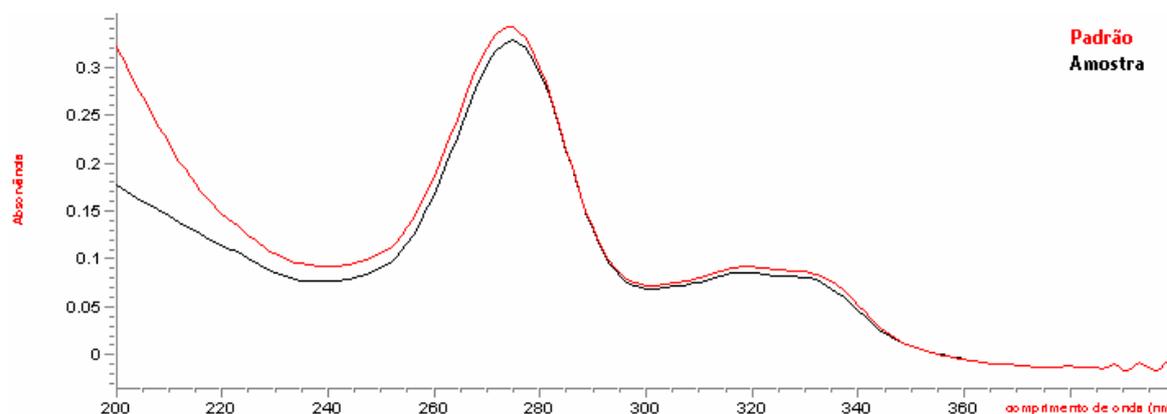


Figura 6.2.3: Sobreposição dos espectros de cloridrato de ciprofloxacino SQR e solução oftálmica, nas mesmas concentrações (4µg/mL), para determinação da especificidade do método espectrofotométrico na região do UV.

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas. Os valores obtidos estão dentro do especificado (BRASIL, 2003a) (Tabela 6.2.9).

Tabela 6.2.9: Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV

<i>Analista</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
1	0,33764	0,33048 ± 0,0046	2,42
	0,33606		
	0,31520		
	0,33201		
	0,32991		
	0,33204		
	0,34549		
	0,33170		
2	0,32415	0,32976 ± 0,0050	2,61
	0,32347		
	0,33077		
	0,32297		

6.2.5 Discussão

As medidas da absorção na região do ultravioleta são simples e sensíveis e, por este motivo, podem ser utilizadas na análise de grande variedade de substâncias. A elevada quantidade de fármacos, cujas estruturas apresentam grupos funcionais cromóforos, o baixo custo relativo dos equipamentos, assim como a fácil automatização da análise, facilitam a utilização deste tipo de método.

O desenvolvimento de métodos quantitativos empregando a espectrofotometria de absorção é baseado na suposição de que a capacidade de absorvidade de um sistema é diretamente proporcional à concentração de soluto (Lei de Lambert-Beer) (ROCHA e TEIXEIRA, 2004). A porção retilínea da curva de Ringbom indica a faixa de concentração ótima para o método espectrofotométrico, no caso do método proposto neste trabalho, situa-se entre 2,0 e 7,0 µg/mL, aproximadamente.

O método proposto para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foi desenvolvido utilizando água como solvente, baseado na boa intensidade de absorção do fármaco neste meio, assim como na simplicidade

que representa a utilização de solvente de baixo custo e na pequena geração de resíduos.

Pelos parâmetros apresentados na Tabela 6.2.4 e na Figura 6.2.2, é possível observar que a linearidade do método, obtida na faixa de concentração de 2,0 a 7,0 µg/mL, apresenta coeficiente de correlação de 0,9999, com coeficiente de variação entre as determinações inferior a 5%, demonstrando haver excelente correlação linear entre os dados analisados.

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intradia e interdia) realizada durante três dias diferentes, nos quais foram analisadas seis amostras preparadas individualmente. As médias das absorvâncias nas leituras estão próximas, com coeficiente de variação de 2,30 e 3,04% no ensaio intradia e interdia, respectivamente, estando os desvios dentro do permitido comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003a).

A robustez do método foi verificada pela comparação dos resultados obtidos pela mudança de analista, o coeficiente de variação deste teste também apresenta valores dentro do permitido, 2,40%.

O teor encontrado de cloridrato de ciprofloxacino nas soluções oftálmicas foi, em média, 99,79%.

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação obtendo-se a média de 101,51% para o medicamento de referência Biamotil®. Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL, 2003a).

A especificidade do método foi comprovada pelo percentual de resposta relacionando-se as concentrações obtidas para a SQR e amostra (Figura 6.2.3). A seletividade foi provada pelo cálculo da homogeneidade de variâncias (F) e pela comparação das médias (t), estando as duas variáveis dentro do esperado, ou seja, valor calculado menor que valor tabelado ($F_{\text{calc}} = 1,95$ e $t_{\text{calc}} = 1,32$; $F_{\text{tab}} = 4,28$ e $t_{\text{tab}} = 2,18$). Estes resultados reforçam que os excipientes não interferem na análise da substância ativa na formulação farmacêutica.

Por conseguinte, fica provado que o método espectrofotométrico na região do ultravioleta para quantificação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica é adequado.

6.3 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO VISÍVEL PELO MÉTODO DA PRIMEIRA DERIVADA

O método espectrofotométrico por derivadas tem sido amplamente empregado nas análises de controle de qualidade de preparações farmacêuticas devido à sua rapidez, simplicidade e custo relativamente baixo (FELL, 1978; TALSKY *et al.*, 1978; LEVILLAIN e FOMBEYDIE, 1986; HACKMANN *et al.*, 1990). Esta técnica é uma alternativa para a determinação de fármacos que sofrem interferência do placebo ou que apresentam valores baixos de absorvidade (MARTINS *et al.*, 2007).

A espectrofotometria derivada também tem sido utilizada para separar substâncias que apresentam espectros de absorção em comprimentos de onda próximos (sobrepostos/*overlapping*) quando estas apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta ou visível (PASCHOAL *et al.*, 2003).

A espectrofotometria derivativa consiste na representação das derivadas da absorvância em relação ao comprimento de onda ($dA/d\lambda$), em função do comprimento de onda. É positivo onde a absorção aumenta e negativo onde ela diminui. Assim, uma curva diferencial de ordem n se anula n vezes, apresentando $n + 1$ bandas (Figura 6.3.1) (PASCHOAL *et al.*, 2003; ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

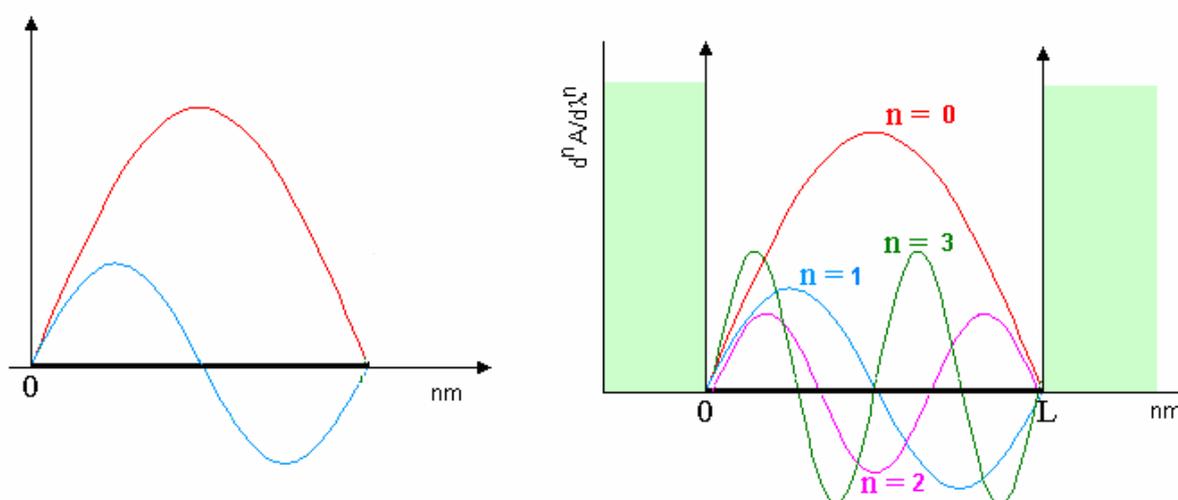


Figura 6.3.1: Representação esquemática das derivadas.

A diferenciação da lei Lambert-Beer permite obter as Equações 6.3.1, 6.3.2 e 6.3.3 que mostram que as derivadas $d^n A/d\lambda^n$ são sempre proporcionais às concentrações do analito (c), sendo as aplicações analíticas baseadas neste fato (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

$$dA/d\lambda = c b (d\epsilon/d\lambda) \quad \text{Equação 6.3.1}$$

$$d^2 A/d\lambda^2 = c b (d^2 \epsilon/d\lambda^2) \quad \text{Equação 6.3.2}$$

$$d^n A/d\lambda^n = c b (d^n \epsilon/d\lambda^n) \quad \text{Equação 6.3.3}$$

Em geral, a derivação espectral visa determinações simultâneas, bem como aumento de seletividade. Mas, acoplado a isto, frequentemente, observa-se aumento de sensibilidade e melhoria do limite de detecção. O aumento de sensibilidade observado na espectrometria derivativa é baseado na observação de que a amplitude da derivada n da absorvância em relação ao comprimento de onda ($D_n = d^n A/d\lambda^n$) é inversamente proporcional à largura de banda do espectro ordinário (W):

$$D_n \propto 1/W^n \quad \text{Equação 6.3.4}$$

Por esta razão, a sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos parâmetros instrumentais e da forma de medida do sinal (método da tangente, *zero-crossing* e *peak-peak/zero-peak*), como também das características do espectro de absorção ordinário. A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que usualmente verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem de derivação (SANCHEZ-ROJAS *et al.*, 1988; ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Alguns métodos utilizando a espectrofotometria derivada foram relatados na literatura para quantificação de quinolonas.

Em 1993, Stankov e colaboradores determinaram norfloxacinol por espectrofotometria derivativa de segunda ordem na região do UV, para análise de comprimidos. Djurdjevic e colaboradores (1997) utilizaram a espectrofotometria derivada de segunda ordem, na região do UV, para avaliar pefloxacinol em amostras de soro e formas farmacêuticas. Em 1998, Jelikic-Stankov e colaboradores também utilizaram esta técnica para determinar fleroxacinol em formas farmacêuticas e soro humano.

Hopkala e Kowalczyk (2000a,b) desenvolveram a espectrofotometria derivada por primeira, segunda, terceira e quarta ordem, usando o método *peak-peak* para determinação de enoxacino e ácido nalidíxico e ciprofloxacino, norfloxacino e ofloxacino em comprimidos. Estes mesmos pesquisadores em 2003 determinaram fleroxacino matéria-prima e comprimidos, por esta mesma técnica e os resultados se mostraram mais sensíveis que o método por espectrofotometria UV clássica.

Em 2001, Rizk e colaboradores utilizaram a espectrofotometria derivativa para analisar norfloxacino, ciprofloxacino e esparfloxacino em meio aquoso complexado com cobre (II). Na tentativa de aumentar a sensibilidade do processo e eliminar alguma interferência causada pela matriz eles investigaram diferentes ordens de derivada e concluíram que a derivada de terceira ordem era a mais adequada.

Mais recentemente, Cirić e colaboradores (2007) determinaram moxifloxacino em amostras de plasma humano por derivada de segunda ordem.

Uma comparação mais detalhada destes métodos pode ser encontrada na Tabela 6.3.1.

Outra aplicação desta técnica, envolvendo uma quinolona, foi exposta por Vega e Solá (2001) que determinaram metronidazol na presença de ciprofloxacino em mistura injetável por espectrofotometria de primeira derivada usando a técnica de *zero-crossing*.

Tabela 6.3.1: Sistemas espectrofotométricos derivados referenciados na literatura para a quantificação de quinolonas

Fármaco	Ordem da derivada	Velocidade de varredura (nm/min)	$\Delta\lambda$ (nm)	Abertura da fenda (nm)	Reagente	λ (nm)	Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aplicações	Referências
Ácido nalidixico	4	240	6	2,0	UV	336,4	2-12	Comprimidos	HOPKALA e KOWALCZUK, 2000a
Ciprofloxacino	3	2000	8	ND	Cu (II)	284	0,035-0,12	Matéria-prima e comprimidos	RIZK <i>et al.</i> , 2001
Enoxacino	4	240	6	2,0	UV	251,6	2-12	Comprimidos	HOPKALA e KOWALCZUK, 2000a
Esparfloxacino	3	2000	8	ND	Cu (II)	309	0,2-0,7	Matéria-prima, comprimidos, plasma e urina humanos	RIZK <i>et al.</i> , 2001
Fleroxacino	2	100	1	0,5	UV	337-347	0,47-19	Soro humano	JELIKIC-STANKOV <i>et al.</i> , 1998
Fleroxacino	2	100	1	0,5	UV	337-347	3,69-22,14	Comprimidos e pó para injetáveis	JELIKIC-STANKOV <i>et al.</i> , 1998
Fleroxacino	1, 2, 3 e 4	240	6	2,0	UV	290,8; 284,4; 289,6 e 285,2	2-12	Matéria-prima e comprimidos	KOWALCZUK e HOPKALA, 2003

Tabela 6.3.1: cont. Sistemas espectrofotométricos derivados referenciados na literatura para a quantificação de quinolonas

Fármaco	Ordem da derivada	Velocidade de varredura (nm/min)	$\Delta\lambda$ (nm)	Abertura da fenda (nm)	Reagente	λ (nm)	Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aplicações	Referências
Moxifloxacino	2	120	1 ou 2	0,5	UV	335-345	0.25-10.0	Plasma humano	CIRIĆ et al., 2007
Norfloxacino	2	200	ND	0,5	UV	337	3-30	Comprimidos	STANKOV et al., 1993
Norfloxacino	3	2000	8	ND	Cu (II)	285	15-80	Matéria-prima e comprimidos	RIZK et al., 2001
Pefloxacino	2	100	1	0,5	UV	337-347	0,5-20	Soro	DJURDJEVIC et al., 1997
Pefloxacino	2	100	1	0,5	UV	337-347	2-28	Comprimidos e pó para injetáveis	DJURDJEVIC et al., 1997

ND = não declarado

6.3.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu, modelo UV-1601 PC, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizou-se como solvente água purificada (Milli-Q®) e como reagente cloreto férrico 1,0%. As condições de derivação foram: velocidade de varredura média (aproximadamente 370nm/min), intervalo de leitura de 0,2 nm, delta λ de 8 nm e abertura da fenda de 2,0 nm.

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3.

6.3.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 100,0 mg de cloridrato de ciprofloxacino SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultra-som por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração de 1000,0 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de ciprofloxacino SQR.

6.3.1.2 Preparo do placebo

Partindo de concentrações usuais de excipientes em colírios (F. Bras. II, 1959; F. Bras. I, 1929; PRISTA, 1996) e das informações contidas na bula do Biamotil®, pesaram-se, 2 g de ácido bórico, 0,1 g de citrato de sódio, 0,1 g de EDTA, e 0,01 g de cloreto de benzalcônio e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água.

Uma alíquota desta solução foi feita reagir com 1,0 mL do reagente cloreto férrico 1,0%.

6.3.1.3 Preparo do reagente cloreto férrico 1,0%

Pesou-se quantidade equivalente a 1,0 g de cloreto férrico e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Completou-se o volume, obtendo-se reagente com concentração final de 1,0%.

6.3.2 Método

A balões volumétricos de 10 mL adicionaram-se alíquotas da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR e 1,0 mL de solução reagente de cloreto férrico 1,0%. O volume foi completado com água para obtenção de soluções com as concentrações finais requeridas. As leituras foram efetuadas imediatamente em espectrofotômetro contra um branco do reagente.

Os espectros da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR e placebo da solução oftálmica tratados com o reagente cloreto férrico 1,0% foram obtidos na faixa de 360 a 500 nm. Estes espectros foram tratados pelo programa UVPC v3.1 Personal Spectroscopy Software (Shimadzu) obtendo-se os espectros da primeira derivada. No ponto de inflexão para o placebo (método *zero-crossing*) foi determinado o comprimento de onda 386,4 nm (λ_1). O método *zero-peak* foi utilizado onde a primeira derivada do placebo encontrou a linha de base, medindo-se a amplitude do espectro do fármaco da linha de base até a crista da onda encontrou-se o comprimento de onda 479,2 nm (λ_2).

Foi observado que nos pontos designados (λ_1 e λ_2), a possível interferência do placebo é nula. Estes são, portanto, os comprimentos de onda mais apropriados para a determinação quantitativa deste fármaco. Entretanto, o ponto *zero-peak* é chamado de método gráfico, pois suas medidas são feitas empregando instrumentos de precisão, como réguas, e são expressas em milímetros, o que pode inserir erros as leituras, enquanto que no primeiro ponto, *zero-crossing*, a medida é obtida pelo valor absoluto da derivada no comprimento de onda determinado (O'HAVER e GREEN, 1976; O'HAVER, 1979). Desta forma, o comprimento de onda 386,4 nm provê, estatisticamente, resultados mais adequados e neste ponto, a determinação pode ser feita com melhor precisão.

6.3.2.1 Curva de Ringbom

A faixa de linearidade do método foi determinada através da curva de Ringbom.

A partir da solução de trabalho preparada no item 6.3.1.1, foram preparadas diluições com auxílio de micropipeta, em balões volumétricos de 10 mL como apresentados na Tabela 6.3.2. Adicionou-se em todos os balões 1,0 mL

de cloreto férrico 1,0%. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 386,4 nm.

Tabela 6.3.2: Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico derivativo na região do visível para análise de cloridrato de ciprofloxacino a 386,4 nm

	<i>Volume da solução de CIPRO HCl SQR (1000 µg/mL) mL*</i>	<i>Concentração (µg/mL)</i>
1	0,05	5
2	0,10	10
3	0,20	20
4	0,30	30
5	0,40	40
6	0,50	50
7	0,60	60
8	0,70	70
9	0,80	80
10	0,90	90
11	1,00	100
12	1,10	120
13	1,20	140
14	1,60	160
15	1,80	180
16	2,00	200
17	2,20	220
18	2,40	240

*diluída em balão volumétrico de 10 mL

6.3.2.2 Obtenção da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, transferiram-se alíquotas de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 mL da solução descrita no item 6.3.1.1 para balões volumétricos de 10 mL, adicionaram a todos os balões 1,0 mL da solução de cloreto férrico 1,0% e completou-se o volume com água,

obtendo-se soluções com concentrações finais de 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 386,4 nm. O aparelho foi calibrado com branco preparado simultaneamente as amostras, da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

6.3.2.3 Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

O conteúdo de 20 frascos contendo cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica 0,35% foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras transferiram-se alíquotas de 0,7 mL para balões volumétricos de 10 mL, adicionaram-se 1,0 mL da solução de cloreto férrico 1,0% e completaram-se os volumes. As soluções finais com concentração de 70,0 µg/mL foram lidas como descrito para a curva analítica. As soluções foram preparadas em seis réplicas.

O cálculo da concentração e do teor de cloridrato de ciprofloxacino nas soluções oftálmicas foi feito pelas equações 6.3.5 e 6.3.6.

Concentração

$$C_A = D_{1A} \cdot C_{SQR} / D_{1SQR} \quad \text{Equação 6.3.5}$$

em que:

C_A = concentração da amostra (µg/mL)

C_{SQR} = concentração da substância química de referência (µg/mL)

D_{1A} = absorvância da amostra na primeira derivada em 386,4 nm

D_{1SQR} = absorvância da substância química de referência na primeira derivada em 386,4nm

Teor percentual

$$C_A\% = C_A \cdot 100 / C_t \quad \text{Equação 6.3.6}$$

em que:

C_A = concentração de cloridrato de ciprofloxacino encontrado na amostra (µg/mL)

C_t = concentração teórica de cloridrato de ciprofloxacino na amostra (µg/mL)

6.3.3 Validação

6.3.3.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item 6.3.2.2, foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

6.3.3.2 Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios de determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, durante três dias seguidos. Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.3.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.3.3.

Tabela 6.3.3: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico derivativo na região do visível

	<i>Volume adicionado de amostra (3500 µg/mL)</i> (mL)	<i>Volume adicionado de CIPRO HCl SQR (1000 µg/mL)</i> (mL)	<i>Concentração final (µg/mL)*</i>
Amostra	0,2	-	70,0
R1	0,2	0,7	80,0
R2	0,2	0,1	90,0
R3	0,2	0,2	100,0
SQR	-	0,3	70,0

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água

**Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

A percentagem de cloridrato de ciprofloxacino recuperado foi calculada pela equação 6.3.7 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(Cr-Ca)/Cp] \times 100 \quad \text{Equação 6.3.7}$$

Em que:

C_r = concentração da solução amostra adicionada de substância química de referência (SQR) ($\mu\text{g/mL}$)

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

C_p = concentração teórica da substância química de referência adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

6.3.3.4 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência dos excipientes (substância química de referência) e na presença dos excipientes (produto de referência).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo próprio método (*zero-crossing*) e pelos testes F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e *t* (Student) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

6.3.3.5 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação dos analistas, utilizando concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.4 Resultados

Vários parâmetros foram avaliados para a determinação da substância ativa e as condições para a quantificação do fármaco sem a interferência dos excipientes foi otimizada.

As características dos espectros de absorção de ordem zero de cloridrato de ciprofloxacino SQR e do placebo reagindo com cloreto férrico 1,0% em água são apresentadas na Figura 6.3.2.

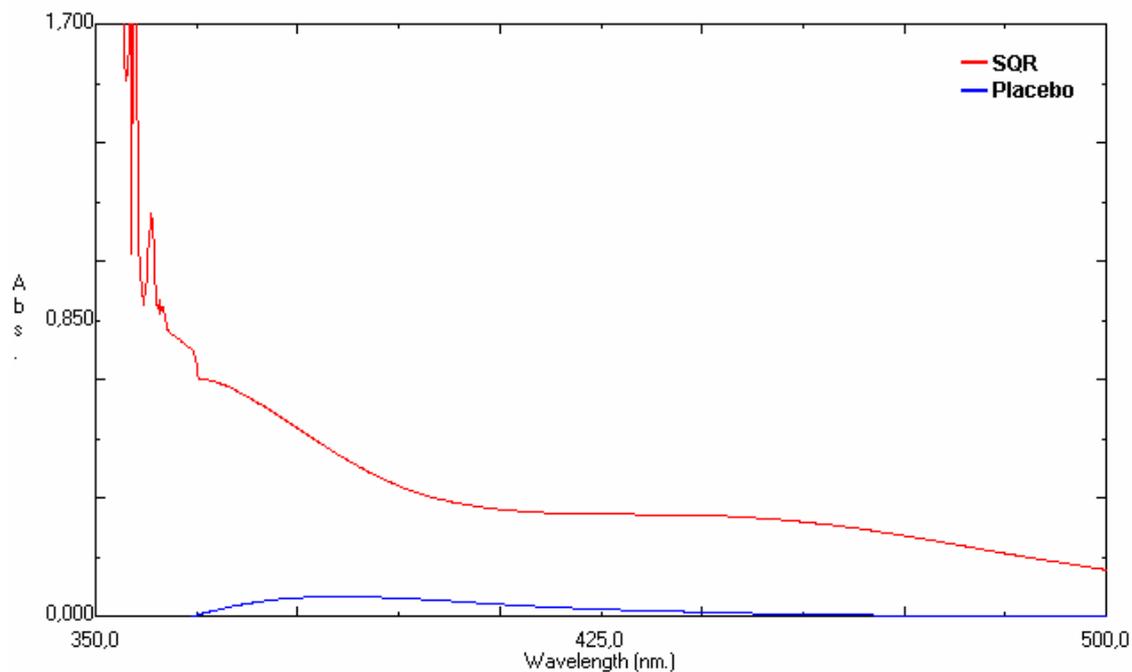


Figura 6.3.2: Espectro de ordem zero da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR (50,0 µg/mL) e da solução placebo da solução oftálmica reagindo com cloreto férrico 1,0%.

Pelo espectro de ordem zero podemos observar que no comprimento de onda de absorção máxima do cloridrato de ciprofloxacino SQR (430 nm) há interferência dos excipientes gerando resultado falso.

Como pode ser visto na Figura 6.3.3, a derivada de primeira ordem retira a interferência do placebo na quantificação do cloridrato de ciprofloxacino SQR em dois comprimentos de onda, entretanto, melhores resultados foram encontrados utilizando-se o comprimento de onda de 386,4 nm.

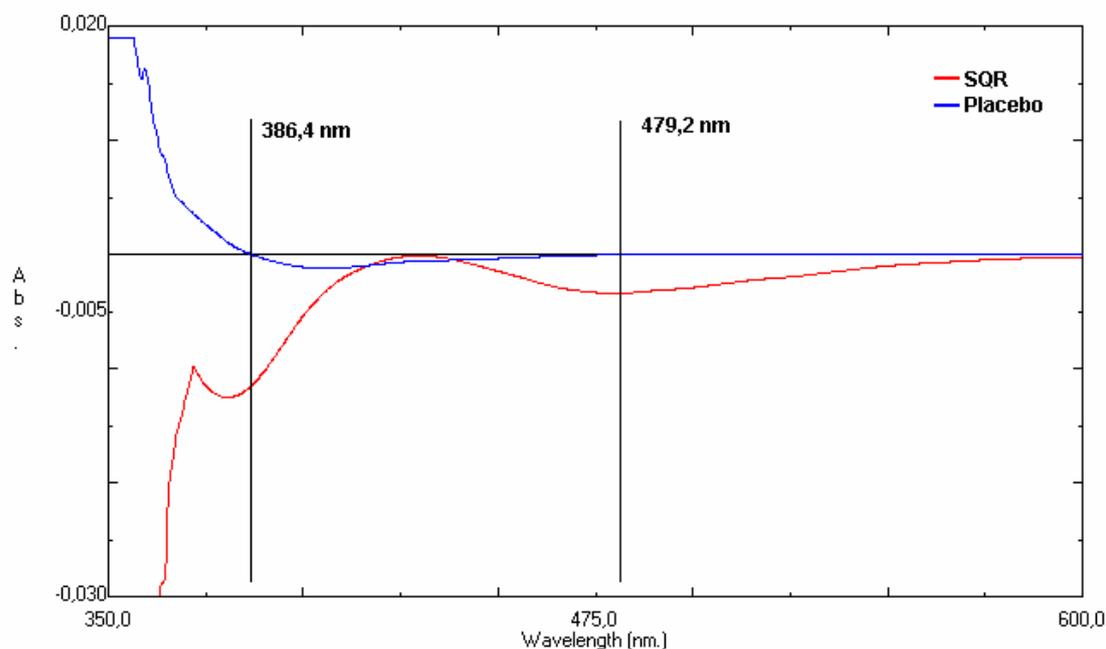


Figura 6.3.3: Espectro de primeira ordem da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR (50,0 µg/mL) e da solução placebo da solução oftálmica reagindo com cloreto férrico 1,0%.

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico derivativo na região do visível para cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, são mostrados na Tabela 6.3.4 e Figura 6.3.4.

Tabela 6.3.4: Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente no comprimento de onda de 386,4 nm, na primeira derivada

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	$dA/d\lambda (D_1)$	$ 100 - T\% $
1	5	-0,0009	0,20745
2	10	-0,0020	0,46158
3	20	-0,0042	0,97178
4	30	-0,0068	1,57808
5	40	-0,0089	2,07044
6	50	-0,0106	2,47077
7	60	-0,0129	3,01489
8	70	-0,0149	3,49038
9	80	-0,0174	4,08784
10	90	-0,0191	4,49608
11	100	-0,0207	4,88177
12	120	-0,0245	5,80349
13	140	-0,0277	6,58596
14	160	-0,0302	7,20129
15	180	-0,0313	7,47316
16	200	-0,0343	8,21812
17	220	-0,0359	8,61755
18	240	-0,0365	8,76771

*diluída em balão volumétrico de 10 mL

Na Figura 6.3.4 está representada a curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível para cloridrato de ciprofloxacino SQR.

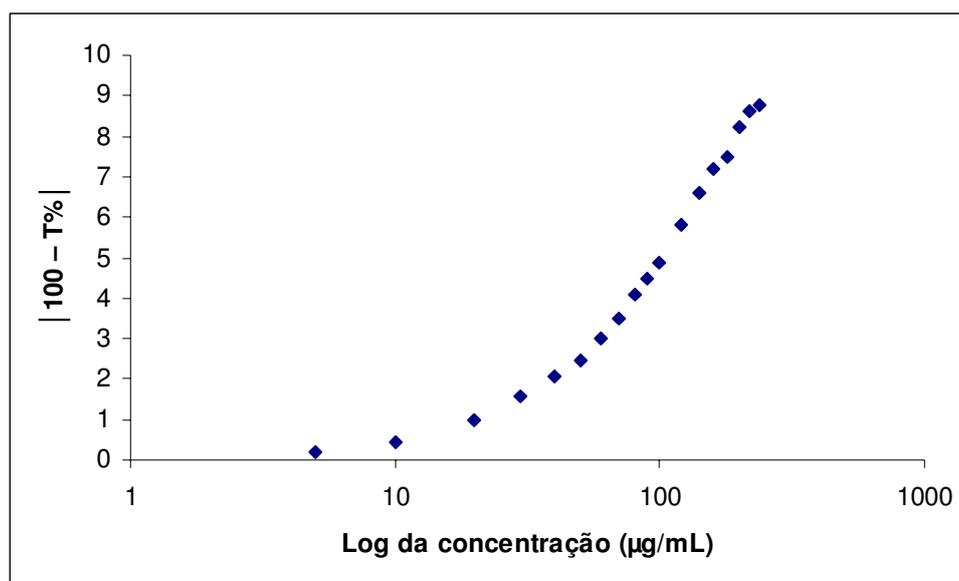


Figura 6.3.4: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível para cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente no comprimento de onda de 386,4 nm, na primeira derivada.

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino SQR reagindo com concentração fixa de cloreto férrico 1,0% para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 6.3.5.

Tabela 6.3.5: Valores de absorvância da primeira derivada determinados para a curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente, a 386,4 nm

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$dA/d\lambda (D_1)^*$	D_1 média \pm e.p.m.	CV (%)
50,0	-0,0117	-0,0117 \pm 0,00013	2,00
	-0,0113		
	-0,0117		
60,0	-0,0140	-0,0138 \pm 0,00013	1,67
	-0,0136		
	-0,0140		
70,0	-0,0160	-0,0160 \pm 0,00007	0,72
	-0,0158		
	-0,0160		
80,0	-0,0184	-0,0182 \pm 0,00003	0,31
	-0,0184		
	-0,0183		
90,0	-0,203	-0,0203 \pm 0,00007	0,57
	-0,0203		
	-0,0205		
100,0	-0,0223	-0,0225 \pm 0,00003	0,26
	-0,0224		
	-0,0224		

*Cada valor corresponde a média de três determinações.

A curva analítica foi construída plotando as médias das amplitudes do espectro de primeira derivada *versus* a concentração de cloridrato de ciprofloxacino reagindo com cloreto férrico 1,0% (Figura 6.3.5).

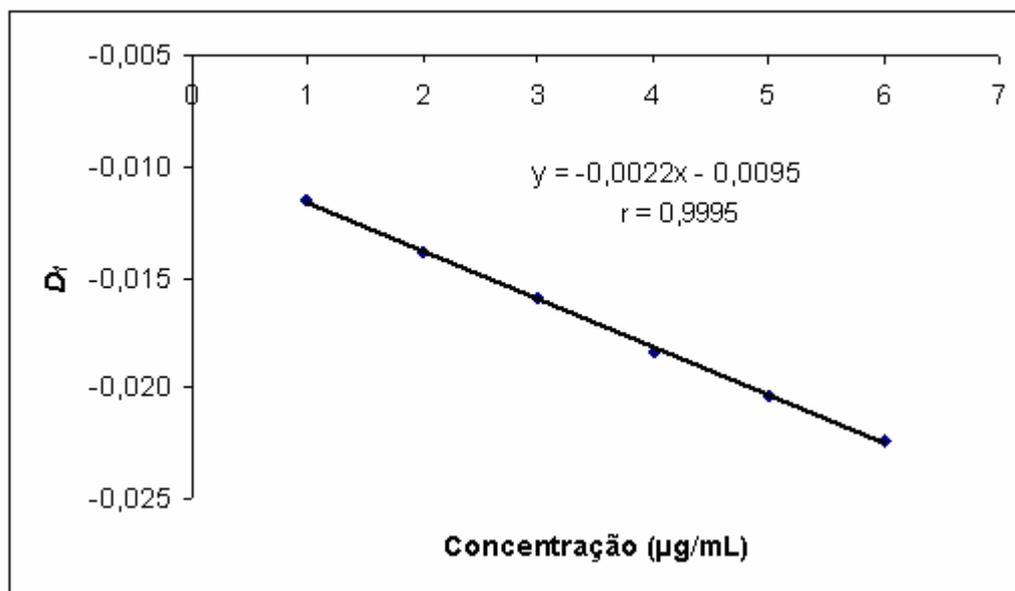


Figura 6.3.5: Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, obtida pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente a 386,4 nm, na primeira derivada.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino é mostrada na Tabela 6.3.6.

Tabela 6.3.6: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico derivativo na região do visível

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F_{calc}	F_{tab}
Entre	5	0,00024733	0,00004947	176,67*	3,11
Regressão linear	1	0,00024689	0,00024689	881,74*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00000044	0,00000011	0,40	3,26
Resíduo	12	0,00000028	0,00000002	-	-
Total	17	0,00024761	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 6.3.7.

Tabela 6.3.7: Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico derivativo na região do visível para quantificação de cloridrato de ciprofloxacino

Parâmetros	Resultados
Ordem da derivada	1 ^a
λ (nm)	386,4
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	50,0 – 100,0
Equação: $y = ax + b$	
a	-0,0022
b	-0,0095
r (coeficiente de correlação)	0,9995
n	6

Os valores de teor de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, determinados durante a análise da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.3.8.

Tabela 6.3.8: Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método espectrofotométrico derivativo na região do visível

Dia	Teor de CIPRO HCl sol. oftálmica*		Teor médio \pm e.p.m.	CV (%)
	$\mu\text{g/mL}$	%		
1	74,25	106,07		
2	75,10	107,29	106,72 \pm 0,35	0,57
3	74,75	106,79		

*Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.3.9 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico derivativo, utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente a 386,4 nm.

Tabela 6.3.9: Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico derivativo na região do visível

	CIPRO HCl SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	CIPRO HCl SQR encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	10,0	10,04	100,42	
R2	20,0	19,78	98,91	99,83
R3	30,0	30,05	100,17	

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas. Os valores obtidos estão dentro do especificado (BRASIL, 2003a) (Tabela 6.3.10).

Tabela 6.3.10: Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico derivativo na região do visível

Analista	Absorvância	Absorvância média \pm e.p.m.	CV (%)
1	-0,0159	-0,0160 \pm 0,0001	1,42
	-0,0162		
	-0,0157		
	-0,0157		
	-0,0160		
	-0,0162		
	-0,0164		
2	-0,0166	-0,0168 \pm 0,0001	1,34
	-0,0170		
	-0,0168		
	-0,0169		
	-0,0169		

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados matematicamente através da razão entre o desvio padrão de 10 leituras do branco e o coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Os

valores absolutos encontrados para LD e LQ foram 0,18 e 0,60 µg/mL, respectivamente.

6.3.5 Discussão

Infelizmente, as vantagens dos espectros derivados são até certo ponto prejudicadas por uma degradação na relação sinal-ruído que acompanha a sua obtenção. Em muitas partes das regiões ultravioleta e visível, no entanto, a relação sinal-ruído não é um fator limitante sério; são nestes pontos que os espectros são mais úteis, como no comprimento de onda de 386,4 nm.

Inicialmente foram determinados os pontos (*zero-crossing* e *zero-peak*) nos quais o placebo da solução oftálmica não interfere na análise do fármaco, ou seja, comprimentos de onda 386,4 e 479,2 nm, respectivamente. Nestes pontos a concentração do placebo não influencia no valor da derivada da absorvância do cloridrato de ciprofloxacino. Entretanto, como descrito anteriormente, o comprimento de onda de 386,4 nm é, estatisticamente, mais adequado para o desenvolvimento do método analítico.

A porção retilínea da curva de Ringbom indica a faixa de concentração ótima para o método espectrofotométrico derivativo de 50,0 a 100,0 µg/mL, aproximadamente.

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de variância, sendo que não houve desvio significativo da linearidade, assim como se comprovou que existe regressão significativa dos dados analisados.

A precisão do método foi determinada através de ensaios realizados durante três dias diferentes, nos quais foram analisadas seis soluções da substância química de referência preparadas individualmente, os coeficientes de variação intradia e interdias foram 1,15 e 1,34%, respectivamente. A robustez avaliada pela variação de analistas obteve coeficiente de variação de 2,92%. Estes valores comprovam a precisão e a robustez do método, uma vez que estão dentro do permitido pela legislação (BRASIL, 2003a). No ensaio de doseamento, o teor encontrado de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foi, em média, de 106,72% com coeficiente de variação entre os doseamentos de 0,57%.

A exatidão do método foi comprovada pela alta percentagem de recuperação alcançada, em média 99,81%.

Para comprovação adicional da seletividade do método, os valores de F e t foram calculados, 0,11 e 2,03, respectivamente, estando os dois valores abaixo do tabelado ($F=4,28$ e $t=2,18$, para limite de confiança de 95%). Estes resultados confirmam que os excipientes não interferem na determinação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica reagindo com cloreto férrico 1,0% (F. Bras. IV, 1988; INMETRO, 2007).

O método proposto para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foi desenvolvido utilizando cloreto férrico 1,0% como reagente, baseado na reação de complexação tanto do fármaco como de alguns excipientes do colírio com o ferro (III), assim como na simplicidade que representa a utilização de um solvente de baixo custo e da técnica de derivação, relativamente mais simples, para a exclusão dos interferentes.

O método espectrofotométrico derivativo na região do visível utilizando o método de *zero-crossing* proposto neste trabalho mostrou ser simples, rápido, sensível, preciso, exato e seletivo para a determinação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.

6.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Na literatura, existem numerosos métodos que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta ou fluorescência, nos quais são analisados misturas de ciprofloxacino, ciprofloxacino com outras quinolonas ou em combinação com outros fármacos, presentes em diferentes amostras, tais como fluidos biológicos, alimentos, amostras ambientais e formulações farmacêuticas (Tabela 6.4.1).

O ciprofloxacino e seu sal cloridrato são oficiais na Farmacopéia Brasileira (F. Bras. IV, 1988), Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003), USP (USP 31, 2008) e Farmacopéia Portuguesa (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005), sendo recomendado o método por CLAE para determinação do fármaco em matéria-prima e em formas farmacêuticas, inclusive na forma farmacêutica solução oftálmica.

Entretanto, com o intuito de aperfeiçoar o sistema (melhorar a constituição da fase móvel, diminuir o desgaste da coluna, o tempo de análise, o gasto de reagentes e, principalmente, minimizar a geração de resíduos) foi desenvolvido este novo método de análise para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.

É cada vez mais importante que métodos mais fáceis, rápidos e exatos sejam desenvolvidos para facilitar o controle de qualidade nos estabelecimentos produtores de medicamentos e garantir, assim, a segurança da saúde dos pacientes.

Tabela 6.4.1: Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

<i>Propósito do ensaio</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Coluna</i>	<i>Deteção</i>	λ (nm)	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>Tempo de retenção (min)</i>	<i>Observações</i>	<i>Referência</i>
Quantificar CIPRO em fluidos humanos	(A) MetOH 35%: TF 67 mM, pH 3,5	C ₁₈ μ Bondapak [®] (100X8 mm) (A)P317D01 (B)P2224D01	UV; Fluorescência	277; 277 _(exc) /445 _(em)	2,0	(A) \approx 6,4 (B) \approx 5,6	Modo isocrático	WEBER <i>et al.</i> , 1985
	(B) MetOH 32,5%: THF 0,8%: TF 67 mM, pH 3,0							
Separar e analisar 11 quinolonas	MetOH: TF 0,02 M, pH 2,8	Ultracarb [®] 5 ODS (30) (250X4,6 mm; 5 μ m)	UV	254	1,0	\approx 15	Modo isocrático Temperatura ambiente (27 °C)	BARBATO <i>et al.</i> , 1994
Determinar CIPRO e separar suas impurezas	Água: MetOH: HAC (84:15,9:0,1, v/v/v)	C ₁₈ -RP (300X3,5 mm; 10 μ m)	UV/Vis	254	1,0	2,25	Modo isocrático	HUSAIN <i>et al.</i> , 1995
Analisar CIPRO e 3 metabólitos em amostras de plasma, soro e urina	Ác. tetracloacético 0,02 M, pH 3,0: ACN: MetOH (74:22:4, v/v/v)	Poliestireno divinilbenzeno (PLRP-5) (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	277 _(exc) /418 _(em)	0,7	\approx 8	Modo isocrático Temperatura ambiente (30 °C)	KROL <i>et al.</i> , 1995
Determinar simultaneamente teofilina, ENO e CIPRO em plasma e saliva humanos	MetOH: solução salina	C ₁₈ μ Bondapak [®] (300X3,9 mm; 10 μ m)	UV	268	2,0	7,1	Modo isocrático Temperatura ambiente	ZHAI <i>et al.</i> , 1995
Determinar CIPRO em humor aquoso humano	MetOH: ACN: ác. cítrico 0,4 M (3:1:10, v/v/v)	Novapak [®] C ₁₈ (100X8 mm; 4 μ m)	UV/Vis; Fluorescência	275; 278 _(exc) /450 _(em)	1,0	7,52	Modo isocrático	BASCI <i>et al.</i> , 1996
Analisar cloridrato de CIPRO em material fresco (produtos-impurezas)	(A) THF: ACN: tampão (ác. 1-hexano-sulfônico sódico 0,005 M, pH 3,0) (10:5:85, v/v/v) (B) proporção: 25:15:60, v/v/v	Inertsil [®] ODS2 (150X4,6 mm; 5 μ m)	UV	254	1,0	\approx 15	Modo isocrático Temperatura ambiente	LACROIX <i>et al.</i> , 1996

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Determinar CIPRO em plasma e caldo Mueller-Hinton	FM ₁ : ác. fosfórico 173 mM FM ₂ : TF 20 mM, pH 3,5; MetOH (97:3, v/v) FM ₃ : TF 20 mM, pH 3,5; ACN (85:15, v/v)	Kromasil® C ₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	278 _(exc) /418 _(em)	1,0	Plasma: \approx 9,6 e Caldo: \approx 5,4	Modo isocrático	BA et al., 1998
Determinar e quantificar CIPRO em plasma e urina	HAc 50mL/L; ACN: MetOH (90:5:5, v/v/v)	YMC pack A-312 C ₁₈ (150X6 mm; 5 μ m)	UV	280	1,0	\approx 12	Modo isocrático Temperatura 50 °C	KAMBERI et al., 1998
Determinar CIPRO, OFLO e ESPAR em caldo Mueller-Hinton	TF 0,02 M; ACN (65:35, v/v), pH 3, contendo trietilamina 0,2% e SDS 0,2% como agente de pareamento iônico	HS C ₁₈ 7U Alltech Adsorbosphere® (150X4,6 mm; 7 μ m)	UV/Vis	280	1,75	\approx 4,6	Modo isocrático Temperatura 25 °C FM com íon-pareado	WRIGHT et al., 1998
Determinar simultaneamente ENRO e seu metabólito primário CIPRO em plasma	ACN: sol aquosa (potássio dihidrogenofosfato 0,02 M, ác. fosfórico 0,006 M, brometo de tetraetilamônio 0,012 M em água) (20:80), pH 3,0	Novapack® C ₁₈ (150X3,9 mm; 5 μ m)	Fluorescência	338 _(exc) /425 _(em)	1,0	2,28	Modo isocrático Temperatura ambiente (25 °C)	GARCIA et al., 1999
Determinar ENRO e CIPRO em fluido biológico de porco e coelho	(A) ác. ortofosfórico 0,02 M; trietilamina 0,008 M; (1:1, v/v) (B) ACN	LiChrospher® RP ₁₈ (125X4 mm; 5 μ m)	UV	277	1,0	8,9	Modo gradiente Temperatura 22 °C	MANCEAU et al., 1999
Determinar fqs em tecidos animal (músculos, fígado e rim)	Ác. fosfórico 0,025 M; ACN (70:30, v/v) no modo par-iónico, contendo ác. 1-heptano-sufônico 2,5 mM	LiChrospher® 100 RP ₁₈ (5 μ m)	UV/Vis; Fluorescência	280; 278 _(exc) /440 _(em)	1,0	\approx 4,8	Modo isocrático	POSYNIAK et al., 1999

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Quantificar CIPRO na presença de metronidazol administrados intravenosamente	ACN: TF 0,1 M, pH 3,3 (20:80, v/v)	Lichrosorb [®] (250X4 mm; 10 μ m)	UV/Vis	278	1,0	\approx 6,5	Modo isocrático	VEGA <i>et al.</i> , 1999
Determinar 5 quinolonas em amostras de rim e músculo bovino e ovos	Ác. ortofosfórico 0,1 M, pH 3,5: ACN (85:15, v/v)	Hypersyl [®] BDS C ₁₈ (250X4,6 mm; 5 μ m)	DAD	280	1,0	\approx 6,99	Modo isocrático	GIGOSOS <i>et al.</i> , 2000
Determinar NOR, CIPRO e SARA em ovos	ACN: ác. fosfórico 0,025 M, pH 2,8 ajustado com trietilamina	Luna [®] C ₁₈ (250X4 mm; 5 μ m)	Fluorescência	278 _(exc) /440 _(em)	1,0	\approx 10,5	Temperatura 30 °C	SCHNEIDER e DONOGHUE, 2000
Analisar simultaneamente 9 quinolonas em tecido de galinha	Ác. ortofosfórico 0,02 M: ACN (85:15, v/v)	PLRP-S (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /450 _(em)	0,8	6,12	Temperatura 50 °C	YORKE e FROC, 2000
Analisar CIPRO em plasma humano	HAc 5%: MetOH: ACN (90:5:5, v/v/v)	LiChrospher [®] 60 RP-select B (150X4,6 mm; 5 μ m)	UV/Vis	280	0,5	\approx 9	Temperatura 50 °C	MAYA <i>et al.</i> , 2001
Determinar FQs em tecidos de aves domésticas e comparar a eficiência de processos de extração expondo ENRO e seu metabólito, CIPRO, em músculos e fígado de aves domésticas	Ác. ortofosfórico 0,025 mM: ACN (70:30, v/v) contendo ác 1-heptanosulfônico 2,5 mM	LiChrospher [®] 100 RP-8 (250X4 mm)	Fluorescência	278 _(exc) /440 _(em)	1,0	ND	Modo isocrático	POSYNIAK <i>et al.</i> , 2001

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Separar 5 FQs e determinar LEVO em plasma humano	SDS 10 mM; TBAA 10 mM; ác. cítrico 25 mM; ACN (43%), pH 3,5	Adsorbosphere [®] HS C ₁₈ (250X4,6 mm; 5 μ m)	UV; fluorescência	293; 280 _(exc) /450 _(em)	1,0	\approx 8,2	Temperatura ambiente (\pm 23 °C)	LIANG <i>et al.</i> , 2002
Determinar LEVO e CIPRO em amostra de microdiálise e plasma	Sol. aquosa de ác. ortofosfórico 0,11%, pH 3,0; ACN (85:15, v/v)	Hypersil [®] C ₁₈ ODS (150X2,1 mm; 5 μ m)	Fluorescência	310 _(exc) /467 _(em)	0,4	\approx 7	Modo isocrático Temperatura 45 °C	NECKEL <i>et al.</i> , 2002
Determinar CIPRO, ENRO, SARA E DI em peixe-gato, camarão e salmão	ACN: HAc 2% (16:84, v/v)	PLRP-S (250X4,6 mm)	Fluorescência	278 _(exc) /450 _(em)	0,9	\approx 5,5	Modo isocrático Temperatura 60 °C	ROYBAL <i>et al.</i> , 2002
Separar e quantificar sulfonamidas e quinolonas (ác. pipemídico, ENO, DANO, LEVO, OFLO, LOME, PE, CIPRO, NOR)	MetOH: TF 0,005 M, pH 2,6 ajustado com brometo de tetrabutilamônio	<i>p</i> - <i>tert</i> -butyl-calix[6]arene-ligado a sílica gel (150X4,6 mm) (fabricação própria)	UV/Vis	254	0,5	\approx 11	Modo gradiente Temperatura ambiente (27 °C)	XIAO <i>et al.</i> , 2002
Determinar CIPRO em formas farmacêuticas (comprimidos, sol oftálmica) e fluidos biológicos (plasma e urina)	ACN: MetOH: tampão acetato 0,05 M, pH 3,6 (10:30:60, v/v/v) contendo 1% de ác. acético	Kromasil [®] 100, C ₁₈ (250X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	300 _(exc) /458 _(em)	0,8	\approx 5,1	Modo isocrático Temperatura ambiente	ZOTOU e MILTIADOU, 2002
Determinar ENRO e seu metabólito, CIPRO, em leite de cabra	Ác. ortofosfórico 0,05 M, pH 3,4; ACN (83:17, v/v)	Zorbax [®] C ₁₄ Bonus-RP (150X4,6 mm; 5 μ m)	DAD	277	1,0	\approx 7	Modo isocrático Temperatura ambiente	CINQUINA <i>et al.</i> , 2003

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Determinar CIPRO em plasma humano	ACN: TF 20 mM, pH 3	LiChrospher [®] RP ₁₈ (250X4 mm; 5 μ m)	Fluorescência	278 _(exo) /455 _(em)	1,5	4,7	Modo gradiente Temperatura 35 °C	IMRE <i>et al.</i> , 2003
Determinar simultaneamente 13 quinolonas em alimentos	(A) ACN: THF: KH ₂ PO ₄ 0,04M (50:1:19), pH 2,6 (B) ACN: THF: KH ₂ PO ₄ 0,12 M (10:1:89), pH 2,6	LUNA [®] C ₅ (150X4,6 mm, 5 μ m)	DAD; Fluorescência	278; 278 _(exo) /446 _(em)	1,0	≈ 10	Modo gradiente Temperatura 30 °C	PECORELLI <i>et al.</i> , 2003
Determinar 5 quinolonas em músculos de porco e peixe	ACN: TF 0,02 M, pH 3,0 (15:85, v/v)	Symmetry [®] C ₁₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exo) /450 _(em)	1,0	≈ 8,1	Modo isocrático	RAMOS <i>et al.</i> , 2003
Determinar ENO, NOR, OFLO e CIPRO em soro humano	ACN: MeOH: ác. cítrico 0,4 M (7: 15: 78, v/v/v)	Kromasil [®] 100 C8 (250X4 mm; 5 μ m)	UV	275	1,2	≈ 8,6	Modo isocrático Temperatura ambiente	SAMANIDOU <i>et al.</i> , 2003
Determinar quinolonas (CIPRO, ENRO, SARA, DI, ácido oxálico e flumequina)	ACN: tampão citrato, pH 4,5 (composição inicial ACN: H ₂ O (12:88, v/v))	Zorbax [®] eclipse XDB-C ₈ (150X4,6 mm)	DAD	280	1,5	≈ 5,5	Modo gradiente	BAILAC <i>et al.</i> , 2004
Determinar ENRO e seu metabólito, CIPRO, em pêlos da crina e cauda de equinos	(A) TF trietilamônio 25 mM, pH 3,0 (B) ACN	Genesis [®] C ₁₈ (150X2,1 mm; 4 μ m)	UV/DAD	280	0,35	≈ 11,1	Modo gradiente Temperatura 45 °C	DUNNETT <i>et al.</i> , 2004
Determinar 5 FQs (ENRO, CIPRO, SARA, ác. oxolínico e flumequina) em leite bovino.	Ác. fórmico 1% em água: ACN	Xterra [®] phenil (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exo) /450 _(em)	1,0	≈ 7	Modo gradiente Temperatura 30 °C	HO <i>et al.</i> , 2004

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Determinar simultaneamente ENRO e CIPRO em leite e plasma bovino	Solução aquosa de ác. fórmico 20%: MeOH: ACN (75:13:12, v/v/v)	PLRP-S polimérica (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /460 _(em)	1,0	\approx 3,7	Temperatura 35 °C	INDOWU e PEGGINS, 2004
Analisar FQs (NOR e CIPRO) em amostra de solo	(A) ACN 100% (B) ACN: MeOH (50:50, v/v) (C) ACN 100%	Ultrabase [®] C ₁₈ (250X4,6 mm; 5 μ m)	DAD	277	ND	\approx 12	Modo gradiente	MORALES-MUÑOZ <i>et al.</i> , 2004
Determinar ácido oxolínico, flumequina, ácido nalidíxico, SARA, NOR, DANO, MARBO, CIPRO E ENRO em amostra de água (do mar e do continente)	(A) Tampão ác. oxálico 10 mM, pH 4,0: ACN (89:11, v/v) (B) ACN	Inertisil [®] C ₈ (250X4,6,5 mm)	Fluorescência	280 _(exc) /450 _(em)	1,5	\approx 13	Modo gradiente Temperatura ambiente	PRAT <i>et al.</i> , 2004
Determinar a concentração de CIPRO em plasma e urina humanos	SDS 10 mM: TBAA 10 mM: ác. cítrico 25 mM com 43 % de ACN	Adsorbosphere [®] HS C ₁₈ (250X4,6 mm; 5 μ m)	UV; Fluorescência	280; 293 _(exc) /450 _(em)	1,0	\approx 9	Modo isocrático Temperatura ambiente (\pm 23 °C)	SOWINSK e KAYS, 2004
Determinar simultaneamente ENRO e CIPRO em fezes de suínos	Ác. ortofosfórico 0,16%, pH 3,0 ajustado com sol. de hidróxido de tetrabutilamônio: ACN (80:20, v/v)	Spherisorb [®] S5 C ₈ (100X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	310 _(exc) /445 _(em)	1,0	\approx 6	Modo isocrático Temperatura 50 °C	SUNDERLAND <i>et al.</i> , 2004
Determinar simultaneamente ENRO e CIPRO em tecido suíno	TF: ACN (80:20, v/v)	Novapack [®] C ₁₈ (150X3,9 mm; 5 μ m)	Fluorescência	276 _(exc) /442 _(em)	1,0	2,2	Modo isocrático Temperatura ambiente	GARCIA <i>et al.</i> , 2005

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

<i>Propósito do ensaio</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Coluna</i>	<i>Deteção</i>	λ (nm)	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>Tempo de retenção (min)</i>	<i>Observações</i>	<i>Referência</i>
Determinar NOR, CIPRO, SARA, DI, ENRO, DANO, MARBO, ácido oxolínico e flumequina em músculo suíno	Ác. cítrico 0,01 M: ACN (88:12, v/v), pH 4,5	Zorbax® Eclipse XDB-C ₈ (150X4,6 mm)	UV/DAD	280	1,5	≈ 7,5	Modo gradiente	HERMO <i>et al.</i> , 2005
Determinar CIPRO e NOR em preparações farmacêuticas (comprimidos e injetáveis)	Água: ACN: trietilamina (80:20:0,3, v/v/v), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico	LiChrospher® 100 RP ₁₈ (125X4 mm; 5 μm)	UV	279	1,0	≈ 2	Modo isocrático Temperatura ambiente (24 ± 2 °C)	KASSAB <i>et al.</i> , 2005
Determinar 5 FQs em tecido animal comestível (tecido muscular, fígado, rim e ovos) de galinha, bovinos e suínos	Ác. cítrico 0,4 M: MetOH: ACN (87:9:4, v/v/v)	Inertsil® C ₁₈ (250X4 mm; 5 μm)	UV/Vis	275	1,4	≈ 11,6	Modo isocrático Temperatura ambiente	SAMANIDOU <i>et al.</i> , 2005
Separar e quantificar 5 quinolonas (ác. nalidíxico, NOR, OFLO, CIPRO E LOME) em forma farmacêutica	ACN aquosa (35:65, v/v): TBAA 10 mM, SDS 10 mM e ác. cítrico 25 mM, pH 3,4	Phenomenex® ODS C ₁₈ (2) (150X4,6 mm; 5 μm)	DAD/UV	235/254/275/300	1,0 – 1,3	≈ 11,92	Temperatura ambiente (25 °C)	SHERVINGTON <i>et al.</i> , 2005
Monitorar a fotodegradação de CIPRO em soluções aquosas	ACN: ác fosfórico 20 mM, pH 2,3 (15:85, v/v): 1-heptanosulfonato de sódio 2,5 mM	Nova-Pak® C ₁₈ (150X3,9 mm; 4μm)	UV	278	1,5	6,98	Modo isocrático	TORNIAINEN e MÄKI, 2005

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Determinar CIPRO em amostras de plasma humano	Hidrogenofosfato de potássio 0,05 M, pH 3,0 (ajustado com H ₃ PO ₄): ACN	Discovery® HS F5 (250X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /446 _(em)	1,0	14,8	Modo gradiente	VYBIRALOVÁ <i>et al.</i> , 2005
Determinar simultaneamente NOR, OFLO, CIPRO, PE, LOME, DANO, ENRO, SARA, DI, ácido oxolínico e flumequina em leite	(A) ACN (B) ác. cítrico 50 mM e acetato de amônio 100 mM, pH 4,0–4,3 (ajustado com trietanolamina)	Hypersil® C ₁₈ BDS (250X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	278 _(exc) /465 _(em)	2,0	≈ 12,9	Modo gradiente Temperatura 50 °C	YANG <i>et al.</i> , 2005
Determinar CIPRO, PE, OFLO, NOR, ENO, SARA, LOME, DANO e DI	ACN aquosa (9:1, v/v): ác. cítrico 50 mM; acetato de amônio 100 mM, pH 4,0 ajustado com trietilamina	Hypersil® C ₁₈ BDS (250X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	278 _(exc) /465 _(em)	2,2	≈ 9	Temperatura 50 °C	ZENG <i>et al.</i> , 2005
Determinar CIPRO, DANO, ENRO, DI, flumequina e SARA e quantificar ENRO e seu principal metabólito, CIPRO, em músculo de peru	Ác. cítrico 10 mM; ACN (88:12, v/v), pH 4,5 ajustado com amônia	Zorbax® Eclipse XDB-C ₁₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	UV	280	1,5	≈ 8	Modo gradiente	CLEMENTE <i>et al.</i> , 2006
Determinar ENRO e CIPRO amostras de tecido endometrial e plasma de equinos	Plasma: 16% de ACN; MetOH (13:1, v/v): 84% água contendo 0,4% trietanolamina e 0,4% de ácido fosfórico 35% Tecido endometrial: 14% ACN; 86% água sem MetOH	Prodigy® C ₁₈ RP (250X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	294 _(exc) /500 _(em)	2,0	Plasma: ≈ 9; Tecido: ≈ 12	Temperatura 30 °C	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2006

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Determinar e quantificar NOR, CIPRO, SARA, DI, ENRO, DANO, MARBO, ác. oxolínico e flumequina em músculo suíno	Ác. cítrico 0,01 M; ACN, pH 4,5	Zorbax® Eclipse XDB-C ₈ (150X4,6 mm)	UV	280	1,5	≈ 7,5	Modo gradiente	HERMO <i>et al.</i> , 2006
Analisar quinina, quinidina, naproxeno, CIPRO, haloperidol, paxitaxel e nortriptilina extraídos por microextração em fase sólida	MeOH: água: ACN (58:25:17, v/v/v), pH 3,1	Supelco® C ₁₈ Discovery (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	300 _(exc) /460 _(em)	ND	ND	Modo isocrático	THEODORIDIS, 2006
Analisar simultaneamente quinolonas e FQs em amostras de solo	(A) Ác. fórmico diluído 3,16 mM, pH 2,5 (B) ACN	Atlantis™ dC ₁₈ (150X3,0 mm; 3 μ m)	UV	280	1,0	≈ 10	Modo gradiente	TURIEL <i>et al.</i> , 2006
Separar simultaneamente e determinar 15 quinolonas em urina e amostras farmacêuticas	MeOH: ACN: tampão citrato 10 mM, pH 3,5: tampão citrato 10 mM, pH 4,5	Zorbax® Eclipse XDB-C ₁₈ RP (150X4,6 mm)	DAD/UV/VIS/ Fluorescência	280; 280 _(exc) /450 _(em)	1,5	26	Modo gradiente	CANÁDA-CANÁDA <i>et al.</i> , 2007
Determinar 10 quinolonas em músculo de frango	Ác. trifluoracético 0,1%: ACN: MeOH	PerfectSil® Target ODS-3 (250X4 mm; 5 μ m)	DAD	275	1,2	3,2	Modo gradiente Temperatura 25 °C	CHRISTODOULOU <i>et al.</i> , 2007

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Determinar simultaneamente 7 quinolonas em amostras de ovos	ACN: tampão citrato 10 mM, pH 4,5	Zorbax® Eclipse XDB-C ₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /450 _(em)	1,5	≈ 7	Modo gradiente Temperatura 35 °C	HASSOUAN <i>et al.</i> , 2007a
Determinar simultaneamente 8 quinolonas em amostras de rim suíno	ACN: tampão citrato 10 mM, pH 4,8	Zorbax® Eclipse XDB-C ₁₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /450 _(em)	1,5	≈ 7	Modo gradiente Temperatura 25 °C	HASSOUAN <i>et al.</i> , 2007b
Determinar ENRO, CIPRO e SARA em amostras de ovo	(A) ác. ortofosfórico, pH 3,0 (ajustado com NaOH) (B) ACN	Aqua™ C ₁₈ (250X4,5 mm; 6 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /440 _(em)	1,0	≈ 9,8	Modo gradiente	HERRANZ <i>et al.</i> , 2007
Determinar FQs, incluindo OFLO, NOR e CIPRO, em amostras de esgoto municipal	ACN: MetOH: ác. fórmico: água (6:12:0,5:81,5, v/v)	Zorbax® SB-C ₁₈ (150X2,1 mm; 3,5 μ m)	Fluorescência	278 _(exc) /445 _(em)	0,2	≈ 16,5	Modo isocrático Temperatura 35 °C	LEE <i>et al.</i> , 2007
Determinar simultaneamente FQs e tetraciclina em aves	(A) malonato 0,1 M: Mg ⁺² 50 mM, pH 6,5 (B) MetOH	Zorbax® Eclipse XDB-PhenII (150X3,0 mm; 3,5 μ m)	Fluorescência	275 _(exc) /425 _(em)	0,5	≈ 7	Modo gradiente Temperatura 30 °C	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2007a
Determinar simultaneamente tetraciclina e FQs (CIPRO, SARA, DANO, ENRO, DI) em peixe	(A) tampão (oxalonato 0,1M; cloreto magnésio 50mM, pH 6,5 com NaOH) (B) MetOH	Zorbax® Eclipse XDB-Phenyl (150X3 mm; 3,5 μ m)	Fluorescência	275 _(exc) /425 _(em)	0,5	≈ 5,5	Modo gradiente Temperatura 30 °C	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2007b

Tabela 6.4.1: cont. Sistemas cromatográficos referenciados na literatura para a quantificação de ciprofloxacino

Propósito do ensaio	Fase móvel	Coluna	Deteção	λ (nm)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Observações	Referência
Analisar multiresíduos de 7 quinolonas em tecido muscular animal	(A) solução aquosa de ácido fórmico 0,02%, pH 2,8 (B) ACN	Symmetry® C ₁₈ (250X4,6 mm; 5 μ m)	Fluorescência	280 _(exc) /450 _(em)	ND	\approx 8	Modo gradiente Temperatura 30 °C	ZHAO <i>et al.</i> , 2007
Determinar CIPRO e ulifloxacino, metabólito ativo do prulifloxacino, em humor aquoso humano	ACN: ácido fosfórico 85% (15:85, v/v)	Zorbax® Eclipse XDB-C ₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	UV	278	0,5	\approx 5,7	Modo isocrático Temperatura ambiente	PELLEGRINO <i>et al.</i> , 2008
Determinar CIPRO em comprimidos e pó para injetáveis e em plasma humano	ACN: HAC 2% (16:84, v/v)	Alltima® C ₁₈ (150X4,6 mm; 5 μ m)	UV	280	1,0	\approx 6,5	Modo isocrático Temperatura ambiente	SHIHN-SHENG <i>et al.</i> , 2008

ND = não declarado

6.4.1 Ensaios preliminares

Vários sistemas cromatográficos foram testados com o objetivo de encontrar condições que permitam uma quantificação confiável do fármaco, a redução da assimetria do pico e de danos à coluna cromatográfica, bem como a geração de resíduos.

6.4.2 Material

Foram utilizados cloridrato de ciprofloxacino SQR e solução oftálmica, descritos nos itens 4.2 e 4.3.

Utilizaram-se como solventes: acetonitrila (Merck), metanol (MetOH) (Synth), ambos grau CLAE; água purificada (Milli-Q[®]); ácido acético (HAc) 1,0%, 2,5% e 5,0% v/v (Synth) grau analítico. Os solventes foram filtrados através de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm (Sartorius) e degaseificados em ultra-som (Unique) durante 30 minutos.

O sistema cromatográfico consiste em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters[®] 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters[®] 2487.

Foram utilizadas colunas Symmetry C₁₈ Waters[®] 5 µm (250 x 4,6 mm) e Thermo Electron[®] C₁₈ 5 µm (250 x 4,6 mm).

6.4.2.1 Preparo das fases móveis

Para o preparo das fases móveis, primeiramente, obteve-se a solução aquosa de ácido acético nas concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0% v/v. Em seguida, esta solução foi misturada a acetonitrila e metanol, na proporção 70:15:15, obtendo-se soluções com pHs de 3,62; 2,51 e 2,70, respectivamente. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultra-som para degaseificação antes do uso.

6.4.2.2 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesaram-se 10,0 mg de cloridrato de ciprofloxacino SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água, para a obtenção de solução com concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução

foram transferidas para balões volumétricos, que foram completados com solvente adequado para gerar soluções com a concentração final requerida.

6.4.3 Método

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

- I. Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15 v/v/v); coluna Thermo
- II. Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15 v/v/v); coluna Waters
- III. Ácido acético 2,5% v/v: ACN: MetOH (70:15:15 v/v/v); coluna Waters
- IV. Ácido acético 5,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15 v/v/v); coluna Waters

Além das fases móveis e colunas acima, testaram-se também água e a própria fase móvel como solvente.

Alguns parâmetros cromatográficos foram avaliados para o desenvolvimento e validação do método por CLAE proposto neste trabalho como número de pratos teóricos e assimetria. Outros parâmetros observados foram o fator de seletividade e a resolução, com propósitos de identificação e especificidade do sistema desenvolvido.

O número de **pratos teóricos** (\mathcal{N}) é definido como uma medida da eficiência da coluna cromatográfica e é calculado pela equação 6.4.1 (USP 31, 2008):

$$\mathcal{N} = 16 (t/\mathcal{W})^2 \quad \text{Equação 6.4.1}$$

em que, t é o tempo de retenção da substância analisada e \mathcal{W} é a largura do pico medido na sua base.

O **fator de capacidade** (k') é a medida da posição do pico de interesse relativo ao volume morto (composto não retido) (USP 31, 2008), e calcula-se pela equação 6.4.2.

$$k' = (t_r - t_o)/t_o \quad \text{Equação 6.4.2}$$

em que, t_r é o tempo de retenção do pico de interesse e t_o é o tempo do composto não retido (volume morto).

A **assimetria** (\mathcal{T}) é a medida da assimetria do pico cromatográfico, sendo calculado pela medida da largura do pico na base a 5% da altura do pico ($\mathcal{W}_{0,05}$) e pela distância entre o máximo do pico e a cauda (f) (Equação 6.4.3) (USP 31, 2008).

$$\mathcal{T} = \mathcal{W}_{0,05} / 2f \quad \text{Equação 6.4.3}$$

A **seletividade** ou **fator de separação** (\mathbf{A}) descreve a posição relativa de dois picos adjacentes e pode ser utilizada como parâmetro para a identificação de compostos (USP 31, 2008). Geralmente o valor deve ser >1 . Este fator é calculado pela equação 6.4.4.

$$\mathbf{A} = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M) \quad \text{Equação 6.4.4}$$

em que, t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção do primeiro e do segundo pico de interesse, respectivamente e t_M é o tempo do composto não retido (volume morto).

A **resolução** (\mathcal{R}) é a medida da separação de dois picos adjacentes e é expressa pelo quociente entre a distância dos máximos de dois picos (Δt) e o valor médio da largura da base dos picos (\mathcal{W}) (Equação 6.4.5) (USP 31, 2008).

$$\mathcal{R} = (2\Delta t / \mathcal{W}_1 + \mathcal{W}_2) \quad \text{Equação 6.4.5}$$

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica estão apresentadas na Tabela 6.4.2.

Tabela 6.4.2: Parâmetros estabelecidos para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica pelo método CLAE

Fase móvel	ácido acético 2,5%, v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v)
Coluna	Symmetry [®] C ₁₈ Waters 5 µm, 250 x 4,6 mm
Deteção	UV, λ = 275 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C ± 2 °C
Tempo de retenção	± 2,6 minutos

6.4.3.1 Obtenção da curva analítica

Para a preparação da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, transferiram-se alíquotas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mL da solução descrita no item 6.4.2.2 para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com água, obtendo-se soluções com concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata e filtrada antes das injeções. Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

6.4.3.2 Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

O conteúdo de 20 frascos contendo cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica 0,35% foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras transferiu-se alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 100 mL. Partindo desta solução, volumes de 1,0 mL foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL obtendo-se soluções com concentração final de 3,5 µg/mL. As leituras das soluções foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV no comprimento de onda de 275 nm. Foram preparadas seis soluções.

O cálculo da concentração e do teor de cloridrato de ciprofloxacino nas soluções oftálmicas foi feito pelas equações 6.4.6 e 6.4.7.

Concentração

$$C_A = A_A \cdot C_{SQR} / A_{SQR} \quad \text{Equação 6.4.6}$$

em que:

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

C_{SQR} = concentração da substância química de referência ($\mu\text{g/mL}$)

A_A = área absoluta da amostra

A_{SQR} = área absoluta da substância química de referência

Teor percentual

$$C_A \% = C_A \cdot 100 / C_t \quad \text{Equação 6.4.7}$$

em que:

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

C_t = concentração teórica de cloridrato de ciprofloxacino na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

6.4.4 Validação

6.4.4.1 Linearidade

A linearidade do método proposto foi verificada pela análise das áreas dos picos obtidos utilizando o método dos mínimos quadrados e a ANOVA.

6.4.4.2 Precisão

Segundo o procedimento anteriormente descrito no ponto 6.4.3.2, foram preparadas e analisadas seis amostras para a determinação do teor de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, durante três dias consecutivos. A precisão foi comprovada pelos coeficientes de variação dos resultados obtidos.

6.4.4.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão é adicionada à quantidade conhecida de amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.4.3.

Tabela 6.4.3: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico

	<i>Volume adicionado de amostra (350 µg/mL)</i> (mL)	<i>Volume adicionado de CIPRO HCl SQR (100 µg/mL)</i> (mL)	<i>Concentração final (µg/mL)*</i>
Amostra	0,05	-	1,75
R1	0,05	0,125	3,00
R2	0,05	0,225	4,00
R3	0,05	0,325	5,00
Padrão	-	0,175	1,75

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água.

**Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

A percentagem de cloridrato de ciprofloxacino recuperado foi calculada pela equação 6.4.8 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(Cr - Ca) / Cp] \times 100 \quad \text{Equação 6.4.8}$$

em que:

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

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Cp = concentração teórica da solução da substância química de referência adicionada (µg/mL)

6.4.4.4 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pelo percentual de resposta relacionando-se a área obtida para a substância ativa na ausência dos excipientes (substância química de referência) e a sua área na presença dos excipientes (produto de referência).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e t (Student) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

6.4.4.5 Robustez

Foram utilizadas soluções do fármaco nas mesmas concentrações do ensaio de precisão, variando-se os parâmetros analíticos: analista e temperatura da sala. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao coeficiente de variação dos valores das áreas.

6.4.5 Resultados

6.4.5.1 Ensaio preliminar

6.4.5.1.1 Ácido acético 1,0%, v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/vv); coluna Thermo

Nos cromatogramas obtidos utilizando-se fase móvel composta por ácido acético 1,0% v/v: ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) e coluna Thermo, observa-se que não há formação de pico, tanto quando o solvente utilizado foi a água ou a própria fase móvel (Figuras 6.4.1 e 6.4.2).

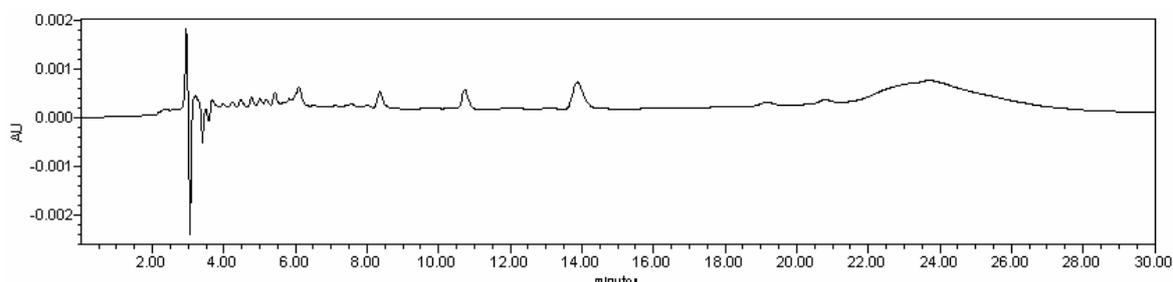


Figura 6.4.1: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando água como solvente, ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Thermo.

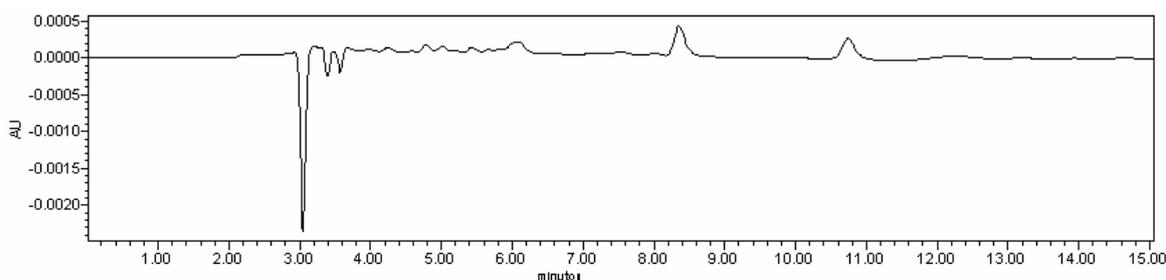


Figura 6.4.2: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Thermo.

6.4.5.1.2 Ácido acético 1,0%, v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Waters

Nos cromatogramas a seguir, obtidos com fase móvel composta por ácido acético 1,0% v/v: ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) e coluna Waters, observa-se que há formação de cauda utilizando ambos solventes, o que compromete a simetria do pico (Figuras 6.4.3 e 6.4.4).

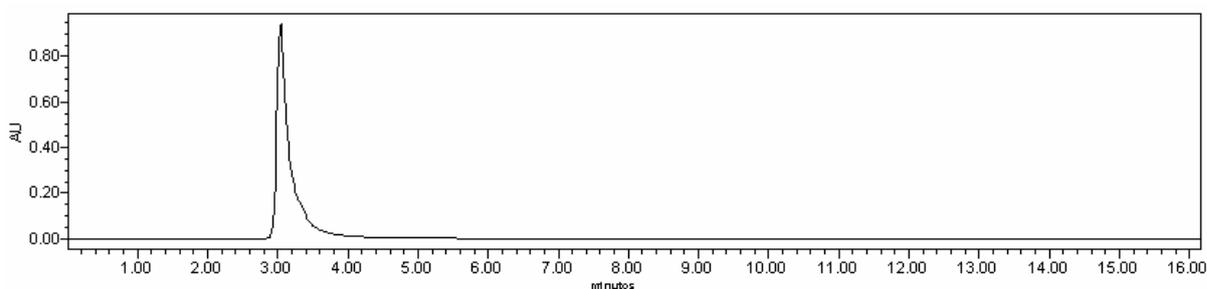


Figura 6.4.3: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 µg/mL, utilizando água como solvente, ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Waters.

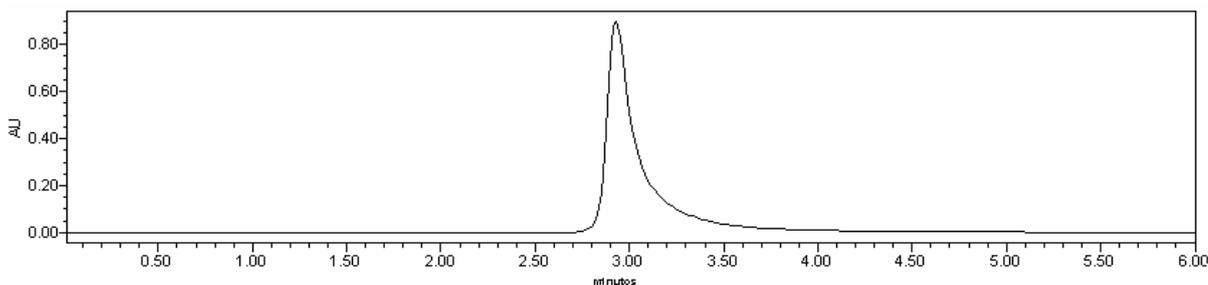


Figura 6.4.4: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando ácido acético 1,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Waters.

6.4.5.1.3 Ácido acético 2,5%, v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Waters

Nos cromatogramas das Figuras 6.4.5 e 6.4.6, é possível observar a formação de pico simétrico com tempo de retenção curto.

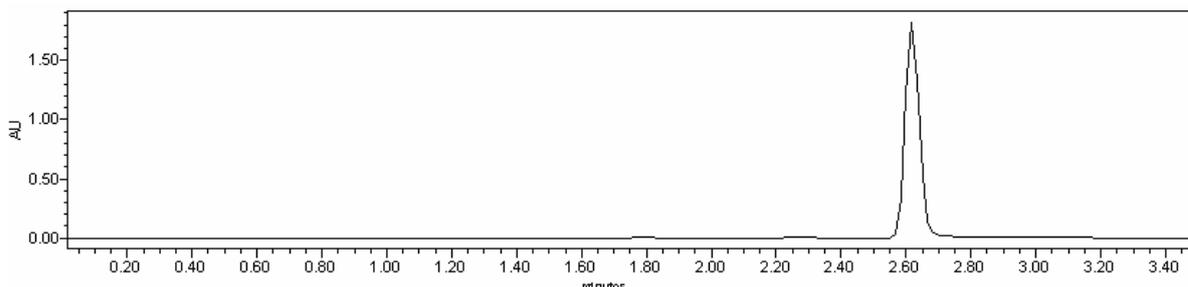


Figura 6.4.5: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando água como solvente, ácido acético 2,5% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Waters.

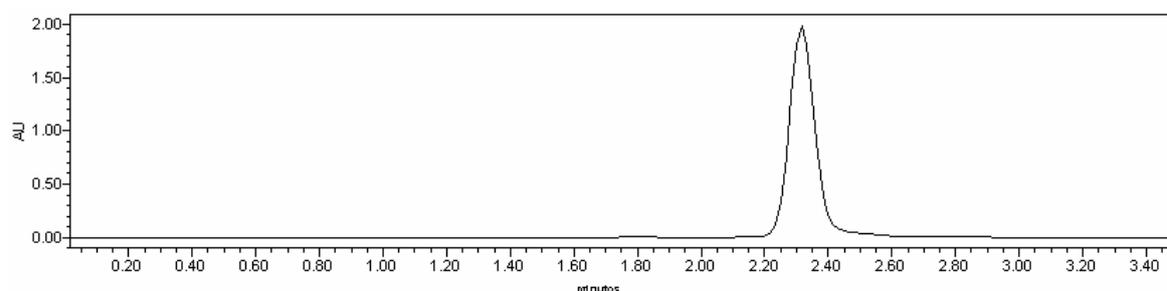


Figura 6.4.6: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando ácido acético 2,5% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Waters.

6.4.5.1.4 Ácido acético 5,0%, v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); coluna Waters

Aumentando-se a concentração de ácido acético na fase móvel, há formação de pico assimétrico utilizando a água como solvente e de pico ligeiramente alargado quando o solvente utilizado é a própria fase móvel (Figuras 6.4.7 e 6.4.8).

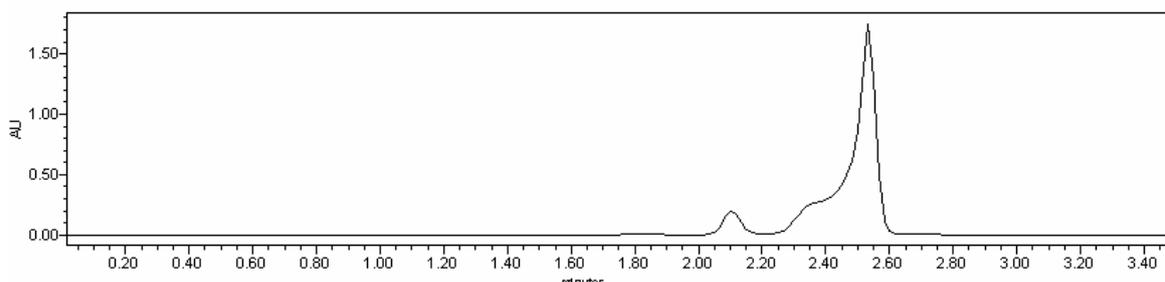


Figura 6.4.7: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando água como solvente, ácido acético 5,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e coluna Waters.

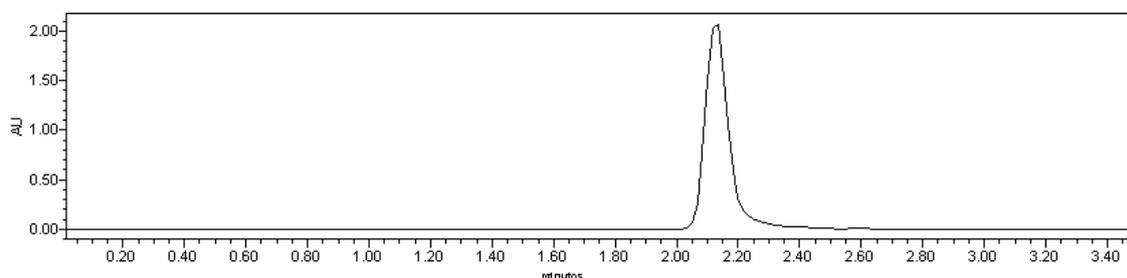


Figura 6.4.8: Cromatograma da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando ácido acético 5,0% v/v, ACN e MetOH (70:15:15, v/v/v) como fase móvel e solvente e coluna Waters.

A Tabela 6.4.4 mostra características de desempenho dos sistemas testados.

Tabela 6.4.4: Parâmetros cromatográficos dos sistemas testados para a determinação de cloridrato de ciprofloxacino por CLAE

Sistema	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos (N)	Assimetria (T)
I	3,02	-	-
II	3,00	-	-
III	3,05	857,32	7,0
IV	2,93	1406,55	6,4
V	2,62	8990,65	1,5
VI	2,32	2797,98	1,5
VII	2,53	4902,28	-
VIII	2,59	4350,55	1,75

I - Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente água; coluna Thermo.

II - Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente fase móvel; coluna Thermo.

III - Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente água; coluna Waters.

IV - Ácido acético 1,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente fase móvel; coluna Waters.

V - Ácido acético 2,5% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente água; coluna Waters.

VI - Ácido acético 2,5% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente fase móvel; coluna Waters.

VII - Ácido acético 5,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente água; coluna Waters.

VIII - Ácido acético 5,0% v/v: ACN: MetOH (70:15:15, v/v/v); solvente fase móvel; coluna Waters.

Na Tabela 6.4.5 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino SQR.

Tabela 6.4.5: Valores das áreas referentes ao pico de cloridrato de ciprofloxacino SQR para construção da curva analítica, utilizando como solvente água e como fase móvel ácido acético 2,5% v/v, acetonitrila e metanol (70:15:15, v/v/v) a 275 nm

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas*	Área média \pm e.p.m.	CV (%)
	163295,3		
1,0	164788,1 162632,3	163571,9 \pm 637,51	0,68
	266526,5		
2,0	267347,7 263276,6	265716,9 \pm 1242,98	0,81
	393154,2		
3,0	396991,0 391423,8	393856,3 \pm 1645,01	0,72
	525964,4		
4,0	524498,0 524630,9	525031,1 \pm 468,22	0,15
	628832,0		
5,0	635079,7 638151,0	634020,9 \pm 2741,76	0,75
	746278,3		
6,0	750966,3 752126,3	749790,3 \pm 1787,64	0,41

Cada valor corresponde a média de três determinações.

A curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR (Figura 6.4.9) foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 119062x + 38613$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994.

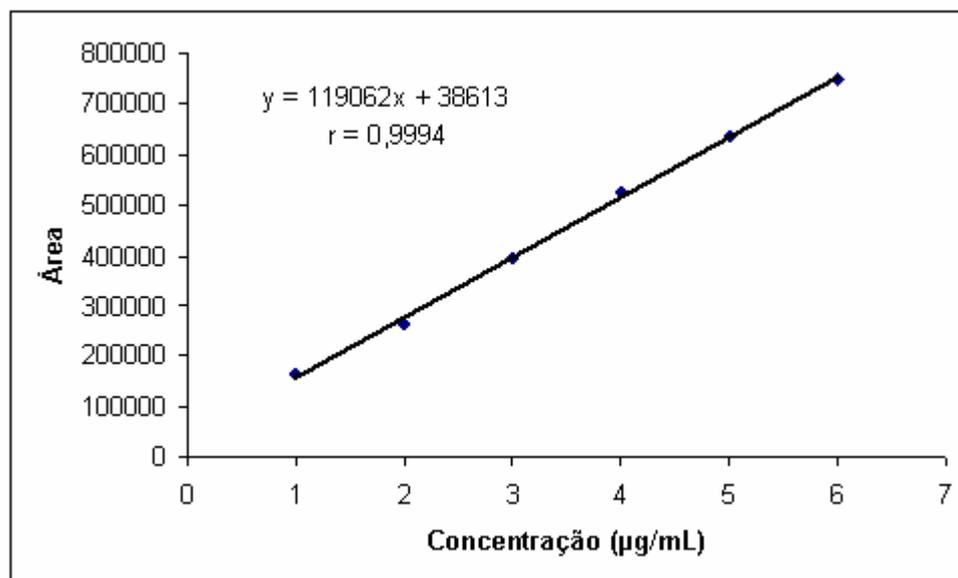


Figura 6.4.9: Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando água como solvente e como fase móvel ácido acético 2,5% v/v, acetonitrila e metanol (70:15:15, v/v/v) a 275 nm.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR é mostrada na Tabela 6.4.6.

Tabela 6.4.6: Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, utilizando o método CLAE

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F_{calc}	F_{tab}
Entre	5	745051395031,8	149010279006,4	1593,0*	5,06
Regressão	1	743409579818,6	743409579818,6	7947,7*	9,33
Desvio da linearidade	4	1641815213,2	410453803,3	4,4	5,41
Resíduo	12	93537755,0	7794812,9	-	-
Total	17	745144932786,8	-	-	-

*Significativo para $p < 1\%$

Os teores de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, determinados durante a análise da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.4.7.

Tabela 6.4.7: Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método CLAE

<i>Dia</i>	<i>Teor de CIPRO HCl sol. oftálmica*</i>		<i>Teor médio ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
	<i>µg/mL</i>	<i>%</i>		
1	3,75	107,09		
2	3,54	101,01	103,25 ± 1,93	3,24
3	3,56	101,64		

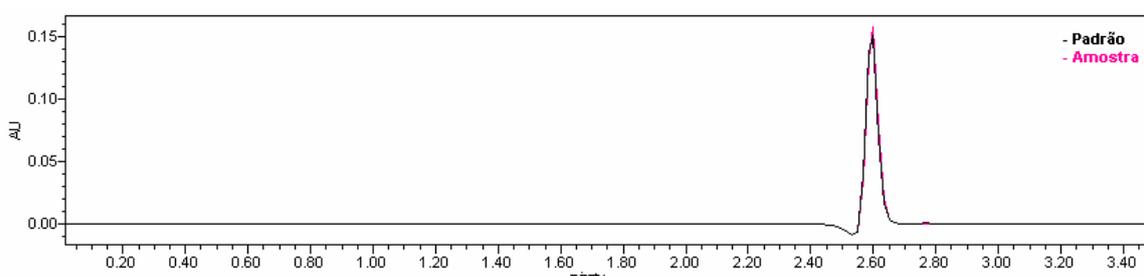
*Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.4.8 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método cromatográfico.

Tabela 6.4.8: Valores do teste de recuperação do método CLAE

	<i>CIPRO HCl SQR adicionada (µg/mL)</i>	<i>CIPRO HCl SQR encontrada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média (%)</i>
R1	1,25	1,23	99,93	
R2	2,25	2,23	99,33	100,11
R3	3,25	3,28	101,07	

Os cromatogramas das soluções preparadas para o ensaio de especificidade são mostrados na Figura 6.4.10.

**Figura 6.4.10:** Sobreposição de cromatogramas de cloridrato de ciprofloxacino SQR e solução oftálmica, nas mesmas concentrações (10 µg/mL), para comprovação da especificidade do método CLAE.

A robustez do método (Tabela 6.4.9) foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas e temperatura da sala.

Tabela 6.4.9: Valores da determinação da robustez do método CLAE

<i>Analista</i>	<i>Área</i>	<i>Área média ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
1	513157	523225,5 ± 4147,33	1,37
	518799		
	524133		
	520822		
	532357		
	530085		
	491563		
2	513157	515093,0 ± 14283,69	4,80
	484999		
	530085		
	518799		
	551955		

6.4.6 Discussão

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

A adequação do sistema (*system suitability*) visa verificar a validação do instrumento e da metodologia analítica simultaneamente e tem como objetivo mostrar que o método apresenta precisão e exatidão (LANÇAS, 2004). Neste trabalho consideramos os pratos teóricos e assimetria para a escolha dos

parâmetros apropriados para a determinação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.

O número de pratos teóricos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna. Embora a ICH não estabeleça um número para este parâmetro, em geral considera-se que o número de pratos teóricos deve ser ≥ 2000 (FDA, 1994).

O fator de assimetria do pico cromatográfico deve ser ≤ 2 (FDA, 1994). À medida que este valor aumenta, o procedimento de integração, e por conseguinte, a exatidão e precisão do método são menos confiáveis (FDA, 1994; USP 31, 2008).

Os sistemas V e VI incluíram a mesma fase móvel (ácido acético 2,5% v/v: ACN: MetOH (70: 15: 15, v/v/v)) e a mesma coluna, porém diferiram no solvente utilizado que foi água e a própria fase móvel, respectivamente. Os sistemas apresentaram-se igualmente eficientes para o desenvolvimento do método cromatográfico, apresentando valor de pratos teóricos de 8990,65 e 2797,89, respectivamente, e assimetria menor que 2, o que possibilita a obtenção de resultados confiáveis. Entretanto, tendo em vista o menor custo e a necessidade da diminuição da formação de resíduos, optou-se pela água como solvente.

Como relatado anteriormente, uma fase móvel diferente da que foi utilizada neste trabalho, está preconizada pela Farmacopéia Brasileira (1988) e USP 31 (2008). Entretanto, um dos objetivos deste projeto foi o desenvolvimento de um método cromatográfico que utiliza uma fase móvel menos agressiva ao equipamento e à coluna, além de outros fatores já relatados.

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 1,0 a 6,0 $\mu\text{g/mL}$. Os valores para o intercepto e a inclinação da curva analítica foram 38613 e 119062, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9994. A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, no limite de confiança de 1%.

O teor médio determinado de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foi de 103,25%, os limites de variação dentro dos dias de análise tiveram média de 3,39 e entre os dias de 3,77% para o ensaio de precisão.

A exatidão do método, expressa pela percentagem de recuperação, é de 100,11%.

A especificidade do método foi comprovada uma vez que os componentes da formulação não interferem na detecção do analito de interesse. A sobreposição dos cromatogramas da substância química de referência e da amostra solução oftálmica mostrou que os excipientes não interferem na quantificação do sinal principal. A seletividade apresentou valores de F e t calculados menores que os tabelados.

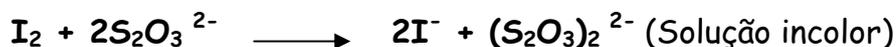
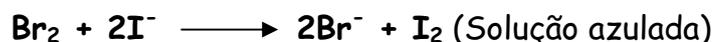
O método desenvolvido mostrou características de performance apropriadas, sendo adequado para a determinação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.

6.5 TITULOMETRIA INDIRETA

Na literatura existem apenas três métodos titulométricos propostos para o ensaio de ciprofloxacino em formas farmacêuticas. A titulação com ácido bifásico proposta por Zhang e colaboradores (1996) que é realizada em meio clorofórmio-aquoso, o método titulométrico não aquoso descrito por Kilic e colaboradores em 1994 e mais recentemente, a titulação utilizando reação de oxidação com sulfato cérico, descrita por Basavaiah e colaboradores (2006).

O método titulométrico indireto proposto neste trabalho é baseado na reação de oxidação entre o ciprofloxacino e o bromo gerado *in situ* pela solução acidificada de bromato/brometo.

Desde que a razão molar da reação seja 3:1 (CIPRO: BrO₃⁻), é provável que o fármaco sofra oxidação como na reação mostrada no esquema abaixo:



Quando uma concentração fixa de brometo/bromato é feita reagir com concentrações crescentes do fármaco em meio ácido, ocorre concomitante diminuição na concentração de bromo. Quando o oxidante não reagido oxida uma concentração fixa de iodeto do meio a iodo, haverá proporcional diminuição de tiosulfato necessário para reagir com o iodo. Isto é observado como uma proporcional diminuição do volume gasto de tiosulfato com o aumento da concentração do princípio ativo, o qual forma a base para a determinação do ciprofloxacino.

6.5.1 Material

As determinações foram realizadas com auxílio de bureta digital JENCONS[®] modelo DIGITRATE PRO de 50 mL.

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.2. e 4.3.

6.5.1.1 Preparo da solução de cloridrato de ciprofloxacino SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 1,0 g de cloridrato de ciprofloxacino SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultra-som por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com água, obtendo-se a concentração final de 10,0 mg/mL.

6.5.1.2 Ácido clorídrico 5 M

Transferiram-se 43 mL de ácido clorídrico (Synth) concentrado para balão volumétrico de 100 mL para obtenção de solução de ácido clorídrico 5 M. Utilizou-se água para a diluição.

6.5.1.3 Brometo de potássio 10%

Pesaram-se 10,0 g de brometo de potássio (Merck), previamente dessecado, e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com ajuda de água. Levou-se ao ultra-som por 10 minutos e completou-se o volume.

6.5.1.4 Bromato de potássio 0,01 M

Preparou-se uma solução 0,01 M de bromato de potássio (Merck) dissolvendo-se 1,67 g do sal em água e diluindo para 1000 mL em balão volumétrico.

6.5.1.5 Iodeto de potássio 10%

Pesaram-se 10,0 g de iodeto de potássio (Merck) e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Levou-se ao ultra-som por 10 minutos e completou-se o volume com água.

6.5.1.6 Tiosulfato de sódio 0,06 M

Pesaram-se, exatamente, 14,04 g de tiosulfato de sódio pentaidratado (Merck) e 0,12 g de carbonato de sódio anidro e dissolveu-se em balão volumétrico de 1000 mL com água previamente fervida. O volume foi completado até o menisco e a solução permaneceu em repouso por 24 horas. Esta solução foi devidamente padronizada segundo a Farmacopéia Brasileira (F. Bras. IV, 1988).

6.5.1.7 Indicador amido 1%

Pesou-se 1,0 g de amido (Synth) e transferiu-se para béquer de 250 mL, cerca de 15 mL de água foi adicionada ao béquer para formar uma pasta. Em seguida, acrescentou-se água fervente suficiente para completar 100 mL. Esta solução foi mantida em ebulição até resultar em uma solução transparente. Resfriou-se e armazenou-se em frasco conta-gotas.

6.5.2 Método

Alíquotas contendo de 1 a 11 mg de cloridrato de ciprofloxacino foram adicionadas a frascos Erlenmeyer de 125 mL. Adicionaram-se em cada frasco, ao seu tempo, 10 mL de água, 1 mL de ácido clorídrico 5 M e 5 mL de brometo de potássio 10%. Seguiu-se a adição de 10,0 mL da solução de bromato de potássio 0,01 M. Esta solução permaneceu em repouso por 5 minutos, exatamente, com ocasional agitação. Terminado o tempo de repouso, as paredes do frasco foram lavadas com 5 mL de água, e 5,0 mL de iodeto de potássio 10% foram adicionados. O iodo liberado foi titulado com tiosulfato de sódio 0,06 M padronizado usando amido como indicador.

O branco foi titulado sob condições idênticas.

As concentrações do fármaco nas alíquotas medidas foram calculadas segundo a Equação 6.4.1 (NAGEGOWDA e BASAVIAH, 2005):

$$\text{mg} = \frac{(B-S) M_w R}{x} \quad \text{Equação 6.4.1}$$

em que:

B = volume de tiosulfato de sódio consumido na titulação do branco (mL);

S = volume de tiosulfato de sódio consumido na titulação da amostra (mL);

M_w = peso molecular relativo do fármaco;

R = concentração de bromato de potássio na solução (mol/L);

x = número de moles de bromato de potássio que reagem com cada mol do fármaco.

6.5.2.1 Obtenção da curva analítica

Para a preparação da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, transferiram-se alíquotas de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,1 mL da solução descrita no

item 6.4.1.1 para os frascos e seguiu-se a metodologia descrita no item 6.4.2, obtendo-se as concentrações de 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0 mg/mL, respectivamente. Cada concentração foi titulada em triplicata, além da titulação do branco ser executada.

6.5.2.2 Determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica

O conteúdo de 20 frascos contendo cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica 0,35% foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras transferiram-se alíquotas de 0,5 mL para os frascos de titulação, obtendo-se concentrações finais de 1,75 mg/mL. As titulações foram feitas em seis soluções-amostra.

O cálculo da concentração e do teor de cloridrato de ciprofloxacino nas soluções oftálmicas foi feito utilizando-se as equações 6.4.2 e 6.4.3.

Concentração

$$C_A = C_{C_A} \cdot C_{SQR} / C_{C_{SQR}} \quad \text{Equação 6.4.2}$$

em que:

C_A = concentração da amostra (mg/mL)

C_{SQR} = concentração da substância química de referência (mg/mL)

C_{C_A} = concentração calculada para a amostra (mg/mL)

$C_{C_{SQR}}$ = concentração calculada para a substância química de referência (mg/mL)

Teor percentual

$$C_A\% = C_A \cdot 100 / C_t \quad \text{Equação 6.4.3}$$

em que:

C_A = concentração de cloridrato de ciprofloxacino encontrado na amostra (mg/mL)

C_t = concentração teórica de cloridrato de ciprofloxacino na amostra (mg/mL)

6.5.3 Validação

6.5.3.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item 6.4.2.1 foram analisados para obtenção da equação da reta pelo do método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela utilização da ANOVA.

6.5.3.2 Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios da determinação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, durante três dias diferentes. Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.5.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.5.1.

Tabela 6.5.1: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método titulométrico

	<i>Volume adicionado de amostra (3,5 mg/mL) (mL)</i>	<i>Volume adicionado de CIPRO HCl SQR (10 mg/mL) (mL)</i>	<i>Concentração final (mg/mL)*</i>
Amostra	0,5	-	1,75
R1	0,5	0,125	3,00
R2	0,5	0,425	6,00
R3	0,5	0,725	9,00
SQR	-	0,175	1,75

*Adicionados em frasco Erlenmeyer.

**Cada nível de concentração foi titulado em triplicata.

A percentagem de cloridrato de ciprofloxacino recuperado foi calculada através da equação 6.4.4 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(Cr-Ca)/Cp] \times 100 \quad \text{Equação 6.4.4}$$

em que:

Cr = concentração da solução amostra adicionada de substância química de referência (SQR) (mg/mL)

Ca = concentração da amostra (mg/mL)

Cp = concentração teórica da substância química de referência adicionada (mg/mL)

6.5.3.4 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência dos excipientes (substância química de referência) e na presença dos excipientes (produto de referência).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e t (Student) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

6.5.3.5 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do analista, na concentração de 1,75 mg/mL.

6.5.4 Resultados

Os valores das concentrações encontradas para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 6.5.2.

Tabela 6.5.2: Valores das concentrações determinadas para a curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino SQR, pelo método titulométrico

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração encontrada (mg/mL)*	Concentração média (mg/mL) ± e.p.m.	CV (%)
	1,26		
1,0	1,33	1,29 ± 0,02	2,72
	1,29		
	3,02		
3,0	3,15	3,02 ± 0,08	4,30
	2,89		
	5,17		
5,0	4,84	5,06 ± 0,11	3,77
	5,17		
	7,20		
7,0	6,70	7,04 ± 0,17	4,23
	7,23		
	9,78		
9,0	9,12	9,34 ± 0,18	3,33
	9,12		
	11,71		
11,0	10,85	11,38 ± 0,22	3,33
	11,58		

Cada valor corresponde à média de três determinações.

A curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino (Figura 6.5.1) foi construída com as médias das concentrações encontradas em três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 1,0197x + 0,0714$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9992.

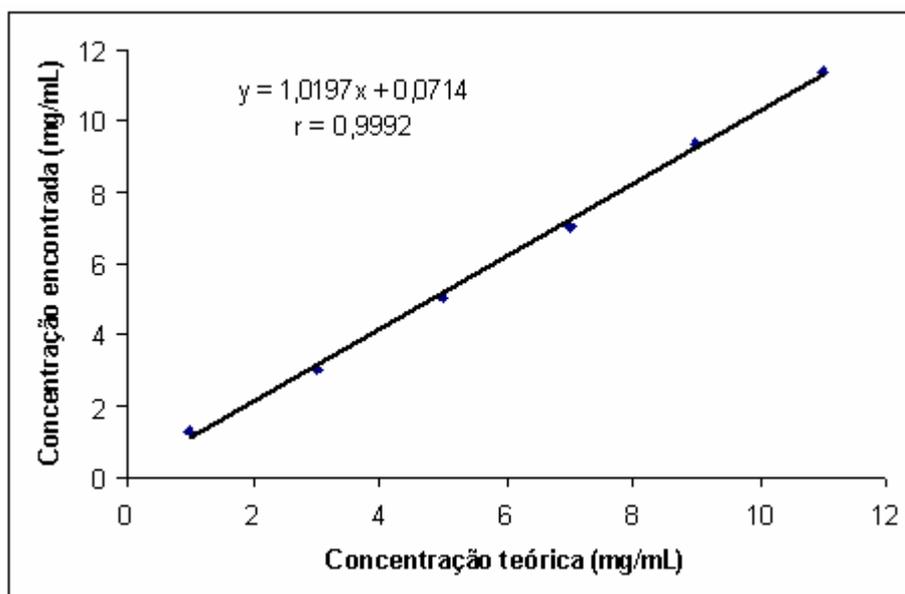


Figura 6.5.1: Curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino obtida pelo método titulométrico.

Os parâmetros do tratamento estatístico (ANOVA) sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 6.5.3.

Tabela 6.5.3: Análise de variância dos valores de concentração determinados na obtenção da curva analítica de cloridrato de ciprofloxacino, utilizando o método titulométrico

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F_{calc}	F_{tab}
Entre	5	221,69264	44,33853	46,83*	3,11
Regressão	1	220,75966	220,75966	233,16*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,93299	0,23325	0,25	3,26
Resíduo	12	0,94680	0,07890	-	-
Total	17	222,63944	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

Os valores de teor de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, determinados durante a análise da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.5.4.

Tabela 6.5.4: Valores determinados para o doseamento de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pelo método titulométrico

<i>Dia</i>	<i>Teor de CIPRO HCl sol. oftálmica*</i>		<i>Teor médio ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
	<i>mg/mL</i>	<i>%</i>		
1	1,73	98,77		
2	1,79	102,22	98,97 ± 1,82	3,18
3	1,68	95,93		

Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na Tabela 6.5.5 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método titulométrico.

Tabela 6.5.5: Valores do teste de recuperação do método titulométrico

	<i>CIPRO HCl SQR adicionada (mg/mL)</i>	<i>CIPRO HCl SQR encontrada (mg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média (%)</i>
R1	1,25	1,27	101,83	
R2	4,25	4,17	98,15	100,28
R3	7,25	7,31	100,86	

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do analista (Tabela 6.5.6).

Tabela 6.5.6: Valores da determinação da robustez do método titulométrico

<i>Analista</i>	<i>Concentração (mg/mL)</i>	<i>Concentração média (mg/mL) ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
1	1,59	1,61 ± 0,04	4,69
	1,69		
	1,49		
	1,59		
	1,69		
	1,59		
	1,59		
	1,49		
2	1,49	1,52 ± 0,03	3,39
	1,49		
	1,59		
	1,49		
	1,49		

6.5.5 Discussão

Para o intervalo investigado de 1 a 11 mg/mL de cloridrato de ciprofloxacino, a reação foi estequiométrica em 5 minutos, além do qual volumes ligeiramente maiores de bromato foram consumidos. Isto é possivelmente devido à bromatação da molécula do fármaco. Por esta razão, é necessário que a titulação do bromo que não reagiu seja completa imediatamente após os 5 minutos para gerar resultados exatos e precisos.

A utilização da mistura bromato/brometo justifica-se pelo fato de a solução aquosa de bromo ser altamente instável e explosiva, por causa da alta pressão de vapor do bromo. Uma mistura acidificada de bromato/brometo, de fato, comporta-se como uma solução equivalente de bromo, e tem sido extremamente utilizada para determinação de substâncias orgânicas e inorgânicas (BASAVIAH e NAGEGOWDA, 2004).

A precisão medida entre os dias e durante o dia de análise, bem como a robustez, encontram-se dentro do coeficiente de variação permitido, ou seja, menor que 5% (BRASIL, 2003a). A especificidade e seletividade estão

comprovadas, uma vez que os volumes gastos de tiosulfato de sódio para quantificar a substância química de referência e as amostras estão próximos e os valores de F e t calculados são menores que os valores tabelados.

O método proposto tem demonstrado ser superior aos métodos relatados com respectiva velocidade, simplicidade, sensibilidade, baixo custo e baixa geração de resíduos. Estas vantagens associadas a alta exatidão e precisão, tornam o método adequado para o uso rotineiro.

6.6 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

É frequentemente necessária a comparação de metodologias para determinar se a variabilidade dos métodos difere de forma significativa. Os ensaios de comparação devem prover dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP 31, 2008). Para comparação de métodos, a farmacopéia americana (USP 31, 2008) recomenda avaliar os parâmetros de precisão e exatidão. A Tabela 6.6.1 apresenta os diferentes parâmetros determinados para os cinco métodos validados neste trabalho.

Tabela 6.6.1: Aplicabilidade, exatidão, precisão, seletividade e robustez dos métodos propostos

Parâmetro	Métodos				
	MICRO ¹	UV ²	D ₁ ³	CLAE ⁴	TITUL. ⁵
λ (nm)	530	275	386,4	275	-
Faixa de concentração utilizada	14,0-56,0 µg/mL	2,0-7,0 µg/mL	50,0-100,0 µg/mL	1,0-6,0 µg/mL	1,0-11,0 mg/mL
Equação: y = ax + b					
a	0,0983Ln	0,0976	-0,0022	119062	1,0197
b	0,7385	-0,0194	-0,0095	38613	0,0714
r	0,9994	0,9999	0,9995	0,9994	0,9992
n	3	6	6	6	6
Exatidão (%)	99,71	101,51	99,83	100,11	100,28
Precisão intradia (CV%)	2,06	2,30	1,15	3,39	4,37
Precisão interdia (CV%)	2,30	3,04	1,34	3,77	4,80
F (<i>Snedecor</i>)	1,55	1,95	0,11	1,25	1,35
t (<i>Student</i>)	0,98	1,32	2,03	1,74	0,97
Robustez	1,97	2,40	2,92	3,44	4,82

¹MICRO: ensaio microbiológico – método turbidimétrico

²UV: método espectrofotométrico na região do ultravioleta

³D₁: método espectrofotométrico derivativo na região do visível

⁴CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência

⁵TITUL.: método titulométrico

A comparação entre os métodos em questão mostra que quanto aos parâmetros apresentados na validação todos os métodos são considerados

satisfatórios, pois a exatidão é próxima a 100%, e os valores de coeficiente de variação para precisão são menores que 5% (BRASIL, 2003a).

A comparação também pode ser feita através da análise dos dados de doseamento obtidos neste trabalho (Tabela 6.6.2), utilizando-se a análise de variância.

Tabela 6.6.2: Valores obtidos na determinação do teor de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica utilizando os métodos propostos

Parâmetro	Métodos				
	MICRO¹	UV²	D₁³	CLAE⁴	TITUL.⁵
	99,96	101,34	106,07	107,09	98,77
Teor (%)	106,22	99,35	107,29	101,01	102,22
	100,63	98,67	106,79	101,64	95,93
Teor médio (%)	102,27	99,79	106,72	103,25	98,97
CV (%)	3,36	1,39	0,57	3,24	3,18

¹MICRO: ensaio microbiológico – método turbidimétrico

²UV: método espectrofotométrico na região do ultravioleta

³D₁: método espectrofotométrico derivativo na região do visível

⁴CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência

⁵TITUL.: método titulométrico

A análise de variância simples foi utilizada, considerando-se como fator a variação entre os tratamentos. Foram utilizados os valores de teor de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica determinados durante os ensaios de doseamentos. Os dados do tratamento estatístico são apresentados na Tabela 6.6.3.

Tabela 6.6.3: Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de cloridrato de ciprofloxacino na forma farmacêutica solução oftálmica pelos métodos desenvolvidos

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F_{calc}	F_{tab}*
Entre	3	113,21	37,74	0,54	3,59
Dentro (erro)	11	70,43	6,40
Total	14	183,64

*Significativo para p<5%

Na comparação dos cinco métodos propostos através da análise de variância (ANOVA), também não foi observada diferença significativa na quantificação do cloridrato de ciprofloxacino.

A média dos valores experimentais obtidos pelos métodos microbiológico, espectrofotométrico na região do UV, espectrofotométrico derivativo na região do visível, CLAE e titulométrico, encontram-se dentro do intervalo permitido para o cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica que é de 90 a 110% (F. Bras. IV, 1988; USP 31, 2008).

Analisando os dados das Tabelas 6.6.1, 6.6.2 e 6.6.3, é possível observar que os métodos apresentam boa exatidão e precisão, entretanto, é necessário evidenciar que a principal diferença entre estes métodos está nas vantagens e desvantagens de um em relação ao outro. O método espectrofotométrico na região do UV apresenta menor tempo de análise em comparação a todos os outros, o método derivativo apresenta segurança adicional quanto aos excipientes ou outros interferentes, mas necessita de programa específico para a derivação, o método titulométrico oferece o menor custo por análise, devido aos solventes de baixo custo e aparelhagem não sofisticada. No método por CLAE há necessidade de pessoal especializado e equipamento de alto custo, além do uso de solventes também de custo elevado. O ensaio microbiológico apresenta técnica simples, porém a análise requer maior tempo de execução. Muito embora, o método microbiológico turbidimétrico desenvolvido neste trabalho necessite de um tempo muito menor, quando comparado com o método oficial, que descreve a difusão em ágar.

Atualmente, todos os caminhos levam à busca da qualidade total, e, acoplado a este conceito, a validação torna-se indispensável como ferramenta adequada para garantir a confiabilidade do método analítico.

Para a apresentação de um método analítico à comunidade científica, é necessário que este tenha sido devidamente validado. Neste trabalho, o cloridrato de ciprofloxacino foi a substância ativa escolhida para o estudo da validação. Preocupou-se em realizar cinco métodos com características de qualidade e custo diferentes para os laboratórios farmacêuticos.

Os métodos para análise qualitativa do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica propostos neste trabalho são métodos relativamente simples. A espectrofotometria na região do UV/Vis permitiu detectar algumas características de absorção específica deste fármaco, como a intensidade de absorção e as regiões de máxima absorção.

O ensaio microbiológico por turbidimetria é um método que não se restringe à quantificação de fármacos, mas que pode também ser empregado na observação de mudanças nas características de potência destas substâncias frente aos microrganismos-teste (USP 31, 2008). O método turbidimétrico é de manejo simples e utiliza reagentes de baixo custo. Este método apresenta alta precisão e exatidão. Além disto, é capaz de determinar a potência em concentrações baixas de analito. Métodos microbiológicos são os únicos capazes de determinar a potência de agentes antimicrobianos e, embora consumam maior tempo de análise, esta desvantagem foi praticamente eliminada com a validação de um ensaio turbidimétrico.

Os métodos titulométricos apresentam aparelhagem simples e são de rápida execução, porém sua reação deve ser simples e praticamente instantânea ou com grande velocidade. Apresentam como desvantagens o ponto final da titulação, que na maioria das vezes é realizada através de mudança de cor verificada pela visão humana. Um segundo aspecto negativo a ser dito, é o consumo de maior quantidade de amostra, comparada aos outros quatro métodos.

Os métodos espectrofotométricos são largamente utilizados nas análises quantitativas de fármacos por apresentarem bom nível de exatidão e precisão. Muitos autores admitem que estes métodos, quando bem conduzidos,

apresentam valores de exatidão e precisão compatíveis com os níveis de exigência adotados nos códigos oficiais. Em relação à sensibilidade, pode ser feita certa restrição devido à imensa diversificação das estruturas químicas encontradas entre os fármacos. Entretanto, aplicando-se a espectrofotometria derivativa este problema pode ser resolvido e a especificidade e seletividade podem aumentar grandemente. O uso de equipamentos relativamente simples e a utilização da água e/ou cloreto férrico como solvente/reagente para a determinação das análises espectrofotométricas, junto à facilidade de execução, constituem vantagens complementares, que justificam o largo emprego do método no controle de qualidade. A estes fatores, soma-se o custo relativamente baixo.

Entre os métodos modernos de análise e de utilização considerada indispensável por laboratórios, a cromatografia ocupa lugar de destaque, devido à sua facilidade em efetuar separação, identificação e quantificação das espécies químicas. Dentre os diversos tipos existentes, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais utilizadas, devido à sua característica mais importante, que é a elevada eficiência atingida. A CLAE utiliza equipamentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados e apresenta capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, mesmo em pequenas quantidades, em escala de tempo de poucos minutos, com alta exatidão, precisão e sensibilidade. As amostras podem ser líquidas ou sólidas; os gases são as únicas amostras que não podem ser determinadas por este tipo de cromatografia. Mesmo apresentando tantas vantagens, a CLAE também tem algumas restrições, como por exemplo, o alto custo na aquisição da instrumentação, na manutenção das fases móveis de alto grau de pureza e das colunas, além da geração de resíduos devido ao maior consumo de solventes.

Dentre as vantagens de cada um dos métodos desenvolvidos e validados, é possível destacar alguns aspectos importantes. O método microbiológico para análise do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica é um método de fácil execução e custo relativamente baixo. O ensaio analítico titulométrico para o produto acabado apresenta técnica que pode ser considerada simples, levando-se em consideração a utilização de reagentes fáceis de serem obtidos e não

havendo a necessidade de tratamento da amostra. A grande e simples utilização dos métodos espectrofotométricos, além das fáceis técnicas selecionadas justificam seus empregos. O método cromatográfico também apresenta execução de técnica simples e tem um diferencial: pode ser considerado o método com melhor sensibilidade, porém de custo elevado.

Com relação à exatidão dos métodos propostos, os resultados foram aceitos, uma vez que o atributo correspondeu em todos os procedimentos. Os valores encontrados para a precisão nos cinco métodos foram considerados adequados, pois todos apresentaram coeficiente de variação menor que 5%. Com os dados das curvas analíticas, foi possível observar que todos os métodos apresentam coeficiente de correlação (r) maior que 0,99, significando assim, que os métodos podem ser considerados lineares (BRASIL, 2003a). Em relação à especificidade, comprovou-se, em todos os métodos, que a resposta da substância ativa não foi alterada em nenhum momento pelos excipientes presentes na forma farmacêutica. No atributo da robustez, pôde-se verificar que, independente do método, não ocorreram grandes variações quando se substituiu o analista e/ou alterou a temperatura da sala.

Desta forma, nas condições do presente trabalho, pode-se avaliar que os métodos microbiológico, titulométrico, espectrofotométricos e cromatográfico para quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica forneceram resultados satisfatórios para todos os atributos da validação.

Assim sendo, este trabalho permitiu o desenvolvimento e a validação de cinco métodos analíticos para a quantificação de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.

As características qualitativas do cloridrato de ciprofloxacino foram determinadas satisfatoriamente pelos métodos espectrofotométricos. Os métodos desenvolvidos para a caracterização da substância ativa por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível permitiram observar aspectos que podem auxiliar na identificação do fármaco.

O tempo de retenção obtido no método por cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizado como parâmetro para a caracterização do cloridrato de ciprofloxacino.

Os métodos espectrofotométricos na região do visível, reação com cloreto férrico, azul de bromotimol e ácido cloranílico, não foram apropriados para a quantificação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica, pois os excipientes da formulação do colírio interagiram com os reagentes, o que impediu sua validação. Entretanto, como ensaios qualitativos deste fármaco tais métodos podem ser recomendados.

No estudo de validação, foram aplicados os parâmetros de linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, especificidade, exatidão e robustez.

Os métodos desenvolvidos e validados para a quantificação do cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica foram os seguintes:

- Ensaio microbiológico – método turbidimétrico na faixa de concentração de 14,0 a 56,0 µg/mL, utilizando o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150.

- Espectrofotometria na região do ultravioleta na faixa de concentração de 2,0 a 7,0 µg/mL, no comprimento de onda de 275 nm, utilizando água como solvente.

- Espectrofotometria derivativa na região do visível na faixa de concentração de 50,0 a 100,0 µg/mL, no comprimento de onda de 386,4 nm, na primeira derivada, utilizando cloreto férrico 1,0% como solvente.

- Cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 1,0 a 6,0 µg/mL, a 275 nm, empregando água como solvente e como fase móvel ácido acético 2,5%, v/v: acetonitrila: metanol (70:15:15, v/v/v).

- Titulometria indireta pela reação do fármaco com o bromo gerado *in situ* na solução acidificada de bromato/brometo, na faixa concentração de 1 a 11 mg/mL.

O estudo comparativo demonstrou estatisticamente que não houve diferença significativa entre os métodos desenvolvidos.

Pode-se concluir, enfim, que os métodos validados podem ser utilizados para identificar e quantificar o cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.

ABDEL-GAWAD, F.M.; ABOU ATTIA, F.M. Spectrophotometric determination of flumequine using iron (III) chloride as a color developer. **Microchem. J.**, v.50, n.1, p.106-110, 1994.

ABDEL-GAWAD, F.M.; ISSA, Y.M.; FAHMY, H.M.; HUSSEIN, H.M. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin in pure form and in tablets through charge-transfer complexation reactions. **Mikrochim. Acta**, v.130, p.35-40, 1998.

ABDEL-HAY, M.H.; HASSAN, E.M.; GAZY, A.A.; BELAL, T.S. Kinetic spectrophotometric analysis and spectrofluorimetric analysis of ciprofloxacin hydrochloride and norfloxacin in pharmaceutical preparations using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). **J. Chin. Chem. Soc.**, v.55, n.4, p.818-827, 2008.

ABRÃO, L.R.; MACHADO, C.R.A. **ANTIBIÓTICOS EM OFTALMOLOGIA**. Disponível em: www.medstudents.com.br. Acesso em: 25 maio 2008.

ACGIH. **American Conference of Governmental Industrial Hygienists**. Cincinnati, ACGIH, 2005. 210p.

ALVES, M.R.; ANDRADE, B.B.A. Úlcera de córnea bacteriana. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.63, n.6, p.495-498, 2000.

AMIN, A.S. Quantitation of some recently introduced antibacterial drugs using Sudam III as chromogenic reagent. **Mikrochim. Acta**, v.134, p.89-94, 2000.

AMIN, A.S.; MOUSTAFA, M.E.; EL-DOSOKY, R.M.S. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in dosage forms and biological fluids using ion-pair complex formation. **Anal. Lett.**, v.41, p.837-852, 2008.

ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICO, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Trends Anal. Chem.**, v.26, n.6, p.534-556, 2007.

ANDRIOLE, V. **The Quinolones**. New York: Academic Press, 1999.

ANVISA. Bulário Eletrônico. CILOXAN[®] Alcon Labs. Disponível em: www.anvisa.gov.br/medicamentos/bulas/index.htm. Acesso em: 13 jan 2008a.

ANVISA. Bulário Eletrônico. CIPRO[®] Bayer. Disponível em: <http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004050716542314372981000102&search=cafe%EDna>. Acesso em: 13 jan 2008b.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1, p.xx.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.16, p.5-15, 2000.

AVADHANULU, A.B.; MOHAN, Y.R.R.; SRINIVAS, J.S.; ANJANEYULU, Y. Spectrophotometric estimation of certain fluoroquinolone drugs in their pharmaceutical dosage forms using ammonium reineckate reagent. **Indian Drugs**, v.36, p.296-300, 1999.

BA, B.B.; DUCINT, D.; FOURTILLAN, M.; SAUX, M.-C. Fully automated high-performance liquid chromatography of ciprofloxacin with direct injection of plasma and Mueller-Hinton broth for pharmacokinetic/pharmacodynamic studies. **J. Chromatogr. B**, v.714, p.317-324, 1998.

BAILAC, S.; BALLESTEROS, O.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; BARRÓN, D.; SANZ-NEBOT, V.; NAVALÓN, A.; VOLCHEZ, J.L.; BARBOSA, J. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **J. Chromatogr. A**, v.1029, p.145-151, 2004.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **J. Antimicrob. Chemother.**, v.46, p.17-24, 2000.

BARBATO, F.; MORRICA, P.; SECCIA, S.; VENTRIGLIA, M. High performance liquid chromatographic analysis of quinolone antibacterial agents. **Il Farmaco**, v.49, n.6, p.407-410, 1994.

BARLOW, A.M. Nalidixic acid in infections of urinary tract. **Br. Med. J.**, v.2, p.1308-1310, 1963.

BASAVAIHAH, K.; NAGEGOWDA, P. Determination of ranitidine hydrochloride in pharmaceutical preparations by titrimetry and visible spectrophotometry using bromate and acid dyes. **Il Farmaco**, v.59, p.147-153, 2004.

BASAVAIHAH, K.; NAGEGOWDA, P.; SOMASHEKAR, B.C.; RAMAKRISHNA, V. Spectrophotometric and titrimetric determination of ciprofloxacin based on reaction with cerium (IV) sulphate. **Sci. Asia**, v.32, p.403-409, 2006.

BASCI, N.E.; BOZKURT, A.; KALAYCI, D.; KAYAALP, S.O. Rapid liquid chromatographic assay of ciprofloxacin in human aqueous humor. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.14, p.353-356, 1996.

BHARAT, P.V.; RAJANI, G.; VANITA, S. An oxidative spectrophotometric method for the determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations. **Indian Drugs**, v.34, p.497-500, 1997.

BHOWAL, S.K.; DAS, T.K. Spectrophotometric determination of some recently introduced antibacterial drugs using ferric chloride. **Anal. Lett.**, v.24, n.1, p.25-37, 1991.

BIAN, W.; WANG, Y.; ZHU, X.; JIANG, C. Spectrofluorimetric determination of trace amount of coenzyme II using ciprofloxacin–terbium complex as a fluorescent probe. **Luminescence**, v.118, p.186–192, 2006.

BILGIC, Z.; TOSUNOGLU, S.; BUYUKTIMKIN, N. Two new spectrophotometric methods for ciprofloxacin. **Acta Pharm. Turc.**, v.33, p.19-22, 1991.

BONILLA, F.L.G. **Validação de metodologia para análise de moxifloxacino em comprimidos**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

BRASIL(a). Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1.

BRASIL(b). Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 210 de 04 de agosto de 2003. Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, v.1, 2003.

BUNGALOWALA, A.; JAIN, D.K.; TRIVEDI, P. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tinidazole in tablet dosage forms. **Indian Drugs**, v.35, p.348-351, 1998.

CANADA-CANADA, F.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; MUNÓZ de la PEÑA, A. Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: Application to pharmaceutical and ofloxacin determination in urine. **J. Sep. Sci.**, v.30, p.1242-1249, 2007.

CAZZOLA, M.; BLASI, F.; CENTANNI, S.; DONNER, C.F.; ALLEGRA, L. Advances in the research and development of chemotherapeutic agents for respiratory tract bacterial infections. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v.14, p.367-381, 2001.

CHOWADRY, K.P.R.; RAMA PRASAD, Y.V. Spectrophotometric estimation of ciprofloxacin hydrochloride in dosage forms and in dissolution rate studies. **Indian Drugs**, v.31, p.277-279, 1994.

CHRISTODOULOU, E.A.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. **J. Chromatogr. B**, v.859, p.246-255, 2007.

CINQUINA, A.L.; ROBERTI, P.; GIANNETTI, L.; LONGO, F.; DRAISCI, R.; FAGIOLO, A.; BRIZIOLI, N.R. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Optimization and validation. **J. Chromatogr. A**, v.987, p.221-226, 2003.

CIRIĆ, A.; JELIĆ, R.; JOKSOVIĆ, L.; JELIKIĆ-STANKOV, M.; DJURDJEVIĆ, P. Determination of moxifloxacin in human plasma by derivative UV spectrophotometry in a micellar medium. **Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.**, v.52, n.6, p.343-350, 2007.

CLEMENTE, M.; HERMO, M.P.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography-UV, liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle. **J. Chromatogr. A**, v.1135, p.170-178, 2006.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas: DEF 2006/07. 34. ed. São Paulo: Publicações Científicas, 2007.

DJURDJEVIC, P.; JELIKIC-STANKOV, M.; MILICEVIC, Z. Determination of pefloxacin in serum and pharmaceutical forms by derivative spectrophotometry. **Mikrochim. Acta**, v.126, p.203-206, 1997.

DRAKOPOULOS, A.I.; IOANNOU, P.C. Spectrofluorimetric study of the acid-basic equilibrium and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution. **Anal. Chim. Acta**, v.354, p.197-204, 1997.

DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, p.504-508, 1999.

DUNNETT, M.; RICHARDSON, D.W.; LEES, P. Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair. **Res. Vet. Sci.**, v.77, p.143-151, 2004.

EL-SHERIF, Z.A. Spectrophotometric determination of enrofloxacin through the formation of a binary complex with iron III, ion-pair and charge-transfer complexation in pure and dosage forms. **Anal. Lett.**, v.32, p.65-78, 1999.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by ion-pair complex formation with cobalt (II) tetrathiocyanate. **J. Chin. Chem. Soc.**, v.52, p.77-84, 2005a.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric and atomic absorption spectroscopic determination of some fluoroquinolone antibacterials by ion-pair complex formation with bismuth (III) tetraiodide. **J. Chin. Chem. Soc.**, v.52, p.253-262, 2005b.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by binary complex formation with xanthene dyes. **Il Farmaco**, v.59, p.809-817, 2004a.

EL-BRASHY, A.M.; METWALLY, M.E.-S.; EL-SEPAI, F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v.25, n.3, p.365-372, 2004b.

EL-KOMMOS, M.E.; SALCH, G.A.; EL-GIZAWI, S.M.; ABOU-ELWAFI, M.A. Spectrofluorometric determination of certain quinolone antibacterials using metal chelation. **Talanta**, v.60, p.1033-1050, 2003.

EL-WALILY, A.F.M.; BELAL, S.F.; BAKRY, R.S. Spectrophotometric and spectrofluorimetric estimation of ciprofloxacin and norfloxacin by ternary complex formation with eosin and palladium (II). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.14, p.561-569, 1996.

EV, L.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.27, p.91-96, 2002.

FARMACOPÉIA brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 1. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA portuguesa. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005.

FELL, A.F. Analysis of pharmaceutical dosage forms by second derivative ultraviolet-visible spectrophotometry. **Proc. Anal. Div. Chem. Soc.**, v.15, p.260-267, 1978.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Validation of chromatographic methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1994.

FRATINI, L. **Estudo de métodos físico-químicos e microbiológicos para a análise de ciprofloxacino**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 1993. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

FRATINI, L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometry using iron (III) nitrate. **Int. J. Pharm.**, v.127, p.279-282, 1996.

FROEHLICH, P.E. **Doseamentos físico-químicos do norfloxacino**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 1991. Dissertação. (Mestrado em Farmácia).

GARCIA, M.A.; SOLANS, C.; ARAMAYONA, J.J.; RUEDA, S.; BREGANTE, M.A.; JONG, A. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in plasma by HPLC with fluorescence detection. **Biomed. Chromatogr.**, v.13, p.350-353, 1999.

GARCIA, M.A.; SOLANS, C.; CALVO, A.; HERNANDEZ, E.; REY, R.; BREGANTE, M.A.; PUIG, M. Determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in pig tissues. Application to residue studies. **Biomed. Chromatogr.**, v.19, p.27-31, 2005.

GIGOSOS, P.G.; REVESADO, P.R.; CADAHÍA, O.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A. Determination of quinolones in animal tissue and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **J. Chromatogr. A**, v.871, p.31-36, 2000.

GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for determination of lomefloxacin in coated tablets. **J. AOAC Int.**, v.89, n.4, p.1077-1079, 2006.

GONZÁLEZ, C.; MORENO, L.; SMALL, J.; JONES, D.G.; SÁNCHEZ BRUNI, S.F. A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. **Anal. Chim. Acta**, v.560, p.227-234, 2006.

GOWDA, B.G.; SEETHARAMAPPA, J. Extractive spectrophotometric determination of fluoroquinolones and antiallergic drugs in pure and pharmaceutical formulations. **Anal. Sci.**, v.19, p.461-464, 2003.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Rev. Port. Farm.**, v.51, p.7-12, 1990.

HASSOUAN, M.K.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; VÍLCHEZ, J.L.; CABRERA-AGUILERA, M.; NAVALÓN, A. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v.852, p.625-630, 2007a.

HASSOUAN, M.K.; BALLESTEROS, O.; ZAFRA, A.; VÍLCHEZ, J.L.; NAVALÓN, A. Multiresidue method for simultaneous determination of quinolone antibacterials in pig kidney samples by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v.859, p.282-288, 2007b.

HERMO, M.P.; BARRON, D.; BARBOSA, J. Determination of residues of quinolones in pig muscle comparative study of classical and microwave extraction techniques. **Anal. Chim. Acta**, v.539, p.77-82, 2005.

HERMO, M.P.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1104, p.132-139, 2006.

HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M.C.; MARAZUELA, M.D. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. **J. Chromatogr. A**, v.1140, p.63-70, 2007.

HEWITT, W. **Microbiological assay**. An introduction to quantitative principles and evaluation. New York: Academic Press, 1977. p.41-42.

HO, C.; SIN, D.W.M.; TANG, H.P.O.; CHUNG, L.P.K.; SIU, S.M.P. Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, v.1061, p.123-131, 2004.

HOPKALA, H.; KOWALCZUK, D. Application of derivative UV spectrophotometry for the determination of enoxacin and nalidixic acid in tablets. **Pharmazie**, v.55, n.6, p.432-435, 2000b.

HOPKALA, H.; KOWALCZUK, D. Application of derivative UV spectrophotometry for the determination of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin in tablets. **Acta Pol. Pharm.**, v.57, p.3-13, 2000a.

HOPKALA, H.; KOWALCZUK, D. Determination of fleroxacin in pure and tablet forms by liquid chromatography and derivative UV-spectrophotometry. **J. AOAC Int.**, v.86, n.2, p.229-235, 2003.

HUSAIN, S.; KHALID, S.; NAGARAJU, V.; NAGESWARA RAO, R. High-performance liquid chromatographic separation and determination of small amounts of process impurities of ciprofloxacin in bulk drugs and formulations. **J. Chromatogr. A**, v.705, p.380-384, 1995.

IFPMA. IFPA issue paper. **Quality assurance of medicines**. Suíça: International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations. 1997.

IMRE, S.; DOGARU, T.M.; VARI, C.E.; MUNTEAN, T.; KELEMEN, L. Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin en human plasma. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.33, p.125-130, 2003.

INDOWU, O.R.; PEGGINS, J.O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.35, p.143-153, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Geneva, 2005.

IPCS. **International Programme on Chemical Safety**. Disponível em: <http://www.inchem.org/>. Acesso em: 10 out 2008.

JELIKIC-STANKOV, M.; ODOVIC, J.; STANKOV, D.; DJURDJEVIC, P. Determination of fleroxacin in human serum and in dosage forms by derivative UV spectrophotometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.18, p.145-150, 1998.

KAMBERI, M.; TSUTSUMI, K.; KOTEGAWA, T.; NAKAMURA, K.; NAKANO, S. Determination of ciprofloxacin in plasma and urine by HPLC with ultraviolet detection. **Clin. Chem.**, v.44, n.6, p.1251-1255, 1998.

KASSAB, N.M.; SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMAM, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.41, n.4, p.507-513, 2005.

KILIC, E.; KOSEOGLU, F.; AKAY, M. A non-aqueous titrimetric assay of selected antibiotics using tetrabutylammonium hydroxide as titrant. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.12, p.3479-352, 1994.

KOWALCZUK, D.; HOPKALA, H. Determination of fleroxacin in pure and tablet forms by liquid chromatography and derivative UV-spectrophotometry. **J. AOAC Int.**, v.86, n.2, p.229-235, 2003.

KROL, G.J.; BECK, G.W.; BENHAM, T. HPLC analysis of ciprofloxacin and ciprofloxacin metabolites in body fluids. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.14, p.181-190, 1995.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LACROIX, P.M.; CURRAN, N.M.; SEARS, R.W. High-pressure liquid chromatographic methods for ciprofloxacin hydrochloride and related compounds in raw materials. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.14, p.641-654, 1996.

LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 3. ed. São Carlos: RiMa, 2004.

LEE, H.B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1139, p.43-52, 2007.

LESHER, G.Y.; FROELICH, D.E.; GRUET, M.D. 1-8-Naphtydyne derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. **J. Med. Pharm. Chem.**, v.5, p.1063-1068, 1962.

LEVILLAIN, P.; FOMBAYDIE, D. Derivative spectrometry. Principles, advantages and limitations, applications. **Analysis**, v.14, p.1-20, 1986.

LI, D.; YU YAN, Z.; QING CHENG, W. Determination of ciprofloxacin with functionalized cadmium sulfide nanoparticles as a fluorescence probe. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.71, n.4, p.1204-1211, 2008.

LIANG, H.; KAYS, M.B.; SOWINSKI, K.M. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. **J. Chromatogr. B**, v.772, p.53-63, 2002.

LIMING, D.; QINGQIN, X.; JIANMEI, Y. Fluorescence spectroscopy determination of fluoroquinolones by charge-transfer reaction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.33, p.693-698, 2003.

LIU, R.L.; XU, J.R.; LIU, Y.G.; YAO, Z. Studies on methods for determination of ciprofloxacin hydrochloride. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v.14, p.45-6, 1994.

MANÇEAU, J.; GICQUAEL, M.; LAURENTIE, M.; SANDERS, P. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography application on pharmacokinetic studies in pig and rabbits. **J. Chromatogr. B**, v.726, p.175-184, 1999.

MARONA, H.R.N. **Estudo químico-farmacêutico de esparfloxacino e caracterização bacteriana frente a quinolonas**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2000. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Desarrollo del análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino en polvo y en comprimidos. **Inf. Tecnol.**, v.9, n.5, p.251-254, 1998.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in pharmaceutical formulations using bromothymol blue. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.26, n.3, p.501-504, 2001.

MARTINS, J.D.; NERY, C.G.C.; PIANETTI, G.A.; VIANA-JÚNIOR, N.S.; VIANNA-SOARES, C.D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.43, n.1, p.63-70, 2007.

MATHUR, S.C.; LAL, S.; MURUGESAN, N.; RATHORE, Y.K.S.; SETHI, P.D. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. **Indian Drugs**, v.27, p.398-399, 1990.

MAYA, M.T.; GONÇALVES, N.J.; SILVA, N.B.; MORAIS, J.A. Simple high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ciprofloxacin in human plasma with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B**, v.755, p.305-309, 2001.

MING DU, L.; YAN YAO, H.; FU, M. Spectrofluorimetric study of the charge-transfer complexation of certain fluoroquinolones with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.61, p.281-286, 2005.

MORALES-MUÑOZ, S.; LUQUE-GARCIA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Continuous microwave-assisted extraction coupled with derivatization and fluorometric monitoring for the determination of fluoroquinolone antibacterial agents from soil samples. **J. Chromatogr. A**, v.1059, p.25-31, 2004.

MOSTAFA, S.; EL-SADEK, M.; ALLA, E.A. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and pefloxacin through charge transfer complex formation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.27, p.133-142, 2002a.

MOSTAFA, S.; EL-SADEK, M.; ALLA, E.A. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.28, p.173-180, 2002b.

NAGARALLI, B.S.; SEETHARAMAPPA, J.; MELWANKI, M.B. Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.29, p.859-864, 2002.

NAGEGOWDA, P.; BASAVAI AH, K. Simple and practicable methods for the determination of astemizole in pharmaceuticals using bromate-bromide and two dyes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.16, n.4, p.821-826, 2005.

NECKEL, U.; JOUKHADAR, C.; FROSSARD, M.; JÄGER, W.; MÜLLER, M.; MAYER, B.X. Simultaneous determination of levofloxacin and ciprofloxacin in microdialysates and plasma by high-performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v.463, p.199-206, 2002.

O'HAVER, T.C. Potential clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. **Clin. Chem.**, v. 25, n.9, p.1548-1553, 1979.

O'HAVER, T.C.; GREEN, G.L. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. **Anal. Chem.**, v.48, n.2, p.312-318, 1976.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14th. ed. Whitehouse Station, 2006.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.39, n.1, p.105-113, 2003.

PASCUAL-REGUERA, M.I.; PARRAS, G.P.; DÍAZ, A.M. A single spectroscopic flow-through sensing device for determination of ciprofloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.35, p.689-695, 2004a.

PASCUAL-REGUERA, M.I.; PARRAS, G.P.; DÍAZ, A.M. Solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ciprofloxacin. **Microchem. J.**, v.77, p.79-84, 2004b.

PECORELLI, I.; GALARINI, R.; BIBI, R.; FLORIDI, A.I.; CASCIARRI, E.; FLORIDI, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v.483, p.81-89, 2003.

PELLEGRINO, R.M.; SEGOLONI, F.; CAGINI, C. Simultaneous determination of ciprofloxacin and the active metabolite of prulifloxacin in aqueous human humor by high performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.47, p.567-574, 2008.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; SEMENIUK, S. Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues. **J. Chromatogr. A**, v.914, p.89-94, 2001.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; SEMENIUK, S.; NIEDZIELSKA, J.; ELLIS, R. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissue by liquid chromatography. **Biomed. Chromatogr.**, v.13, p.279-285, 1999.

PRAT, M.D.; BENITO, J.; COMPAÑÓ, R.; HERNÁNDEZ-ARTERSEROS, J.A.; GRANADOS, M. Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorometric detection. **J. Chromatogr. A**, v.1041, p.27-33, 2004.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

RAHMAN, N.; HEJAZ-AZMI, S.N. Extractive spectrophotometric methods for determination of diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.24, p.33-41, 2000.

RAMANA RAO, G.; AVADHANULU, A.B.; VASTA, D.K. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin in its dosage forms. **Indian Drugs**, v.27, p.532-535, 1990.

RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCIA, E.; REUVERS, T.; HOOGHUIS, H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by high chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v.789, p.373-381, 2003.

REDDY, M.N.; SWAPPA, M.; RAO, K.V.K.; SANKAR, D.G.; SRIDHAR, K. Spectrophotometric determination of pefloxacin. **Indian Drugs**, v.35, p.105-106, 1998.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed). **Martindale the extra pharmacopoeia**. 35.ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIZK, M.; BELAL, F.; IBRAHIM, F.; AHMED, S.; EL-ENANY, N.M. A simple kinetic spectrophotometric method for the determination of certain 4-quinolones in drugs formulations. **Sci. Pharm.**, v.68, p.173-188, 2000.

RIZK, M.; BELAL, F.; IBRAHIM, F.; AHMED, S.; SHERIBAH, Z.A. Derivative spectrophotometric analysis of 4-quinolone antibacterials in formulations and spiked biological fluids by their Cu (II) complexes. **J. AOAC Int.**, v.84, n.2, p.368-375, 2001.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.

ROYBAL, J.E.; WALKER, C.C.; PFENNING, A.P.; TURNIPSEED, S.B.; STOREY, J.M.; GONZALES, S.A.; HURLBUT, J.A. Concurrent determination of four fluoroquinolones in catfish, shrimp, and salmon by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. AOAC Int.**, v.85, n.6, p. 1293-1301, 2002.

SALEM, H. Spectrofluorimetric, atomic absorption spectrometric and spectrophotometric determination of some fluoroquinolones. **Am. J. Appl. Sci.**, v.2, p.719-729, 2005.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O. Microbiological assay of gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.40, p.443-446, 2006.

SAMANIDOU, V.F.; CHRISTODOUIOU, E.A.; PAPADOYANNIS, I.N. Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. **J. Sep. Sci.**, v.28, p.555-565, 2005.

SAMANIDOU, V.F.; DEMETRIOU, C.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.375, p.623-629, 2003.

SANCHEZ-ROJAS, F.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region spectrophotometry and its analytical applications. **Talanta**, v.35, n.10, p.753-761, 1988.

SASTRY, C.S.P.; RAO, K.R.; PRASAD, D.S. Extractive spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in pure and dosage forms. **Talanta**, v.42, n.3, p.311-316, 1995.

SCHNEIDER, M.J.; BRADEN, S.E; REYES-HERRERA, I.; DONOGHUE, D.J. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v.846, p.8-13, 2007a.

SCHNEIDER, M.J.; DARWISH, A.M.; FREEMAN, D.W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta**, v.586, p.269-274, 2007b.

SCHNEIDER, M.J.; DONOGHUE, D.J. Multiresidue determination of fluoroquinolones in eggs. **J. AOAC Int.**, v.83, n.6, p.1306-1312, 2000.

SHANGBAG, S.G.; THAMPI, P.P.; THAMPI, C.S. Simple spectrophotometric method for the estimation of ciprofloxacin hydrochloride and its dosage forms. **Indian Drugs**, v.28, p.279-280, 1991.

SHERVINGTON, L.A.; ABBA, M.; HUSSAIN, B.; DONNELLY, J. The simultaneous separation and determination of five quinolone antibiotics using isocratic reversed-phase HPLC: Application to stability studies on an ofloxacin tablet formulation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.39, p.769-775, 2005.

SHIH-SHENG, W.; CHIH-YUAN, C.; YEN-HSIA, W. Analysis of ciprofloxacin by a simple high-performance liquid chromatography method. **J. Chromatogr. Sci.**, v.46, p.490-495, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SOUZA, F.M.B. **Métodos físico-químicos e microbiológicos para controle de qualidade e estudo de estabilidade da pefloxacina**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 1995. Dissertação. (Mestrado em Farmácia).

SOWINSK, K.M.; KAYS, M.B. Determination of ciprofloxacin concentrations in human serum and urine by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.29, p.381-387, 2004.

STANKOV, M.; MILICEVIC, Z.; VESELINOVIC, D.; DJURDJEVIC, P. Fluorometric and derivative spectrophotometric determination of norfloxacin. **Spectrosc. Lett.**, v.26, n.9, p.1709-1714, 1993.

STROMAN, D.W.; DAJCS, J.J.; CUPP, G.A.; SCHLECH, B.A. In vitro and in vivo potency of moxifloxacin and moxifloxacin ophthalmic solution 0.5%. A new topical fluoroquinolone. **Surv. Ophthalmol.**, v.50, (suppl 1), p.S16–S31, 2005.

SULIMAN, F.E.O; SULTAN, S.M. Sequential injection technique employed for stoichiometric studies, optimization and quantitative determination of some fluoroquinolone antibiotics complexed with iron III in sulfuric acid media. **Talanta**, v.43, p.559-568, 1996.

SULTAN, S.M.; SULIMAN, F.E.O. Flow injection spectrophotometric determination of the antibiotic ciprofloxacin in drug formulations. **Analyst**, v.117, p.1523-1526, 1992.

SUNDERLAND, J.; LOVERING, A.M.; TOBIN, C.M.; MACGOWAN, A.P.; ROE, J.M.; DELSOL, A.A. A reverse-phase HPLC assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pigs faeces. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.23, p.390-393, 2004.

SUSLU, I.; TAMER, A. Application of bromophenol blue and bromocresol purple for the extractive spectrophotometric determination of ofloxacin. **Anal. Lett.**, v.36, n.6, p.1163-1181, 2003.

SUSLU, I.; TAMER, A. Spectrophotometric determination of enoxacin as ion-pairs with bromophenol blue and bromocresol purple in bulk and pharmaceutical dosage form. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.29, n.3, p.545-554, 2002.

TALSKY, G.; MAYRING, L.; KREUZER, H. High resolution, higher-order UV/VIS derivative spectrophotometry. **Angw. Chem. Int. Ed. English**, v.17, n.11, p.785-799, 1978.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

THEODORIDIS, G. Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals. **J. Chromatogr. B**, v.830, p.238-244, 2006.

TORNIAINEN, K.; MÄKI, E. Development of an isocratic high performance liquid chromatographic method for monitoring of ciprofloxacin photodegradation. **J. Chromatogr. A**, v.697, p.397-405, 2005.

TOSUNOGLU, S.; SAVCI, N. Two spectrophotometric methods for the determination of ciprofloxacin in pharmaceuticals with use of bromocresol purple and bromophenol blue. **Acta Pharm. Turc.**, v.35, p.1-5, 1993.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Anal. Chim. Acta**, v.562, p.30-35, 2006.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP). 31th ed. United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2008.

VADE-MÉCUM DE MEDICAMENTOS. 12. ed. São Paulo: Soriak, 2006/2007.

VEGA, E.; DABBENE, V.; NASSETA, M.; SOLÁ, N. Validation of a reversed-phase LC method for quantitative analysis of intravenous admixtures of ciprofloxacin and metronidazole. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.21, p.1003-1009, 1999.

VEGA, E; SOLÁ, N. Quantitative analysis of metronidazole in intravenous admixture with ciprofloxacin by first derivative spectrophotometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.25, p.523–530, 2001.

VYBIRALOVÁ, Z.; NOBILIS, M.; ZOULOVA, J.; KVĚTINA, J.; PETR, P. High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.37, p.851-858, 2005.

WEBER, A.; CHAFFIN, D.; SMITH, A.; OPHEIM, K.E. Quantification of ciprofloxacin in body fluids by high-pressure liquid chromatography. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.27, n.4, p.531-534, 1985.

WHO. Good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. 2003. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 01 fev 2008.

WRIGHT, D.H.; HERMAN, V.K.; KONSTANTINIDES, F.N.; ROTSCHAFFER, J.C. Determination of quinolone antibiotics in growth media by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.709, p.97-104, 1998.

XIAO, Y.X.; XIAO, X.Z.; FENG, Y.Q.; WANG, Z.H.; DA, S.L. High-performance liquid chromatography of sulfonamides and quinolones on p-tert-butyl-calix[6]arene-bonded silica gel stationary phase. **Talanta**, v.56, p.1141-1151, 2002.

XUAN, C.S.; REN, S.C.; SONG, J.L.; WANG, Z.Y. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin using tetrachlorobenzoquinone. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v.16, p.164-166, 1996.

XUAN, C.S.; WANG, Z.Y.; SONG, J.L. Spectrophotometric determination of some antibacterial drugs using p-nitrophenol. **Anal. Lett.**, v.31, p.1185-1195, 1998.

YAMAGUCHI, T.; NAKAO, M.; NAKAHARA, R.; NISHIOKA, Y.; IKEDA, C.; FUJITA, Y. Spectrophotometric determination of quinolone antibiotics na association complex formation with aluminum (III) and erythrosin. **Anal. Sci.**, v.25, p.125-128, 2009.

YANG, G.; LIN, B.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; HUANG, X. Multiresidue determination of eleven quinolones in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. AOAC Int.**, v.88, n.6, p.1688-1694, 2005.

YORKE, J.C.; FROC, P. Quantification of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, v.882, p.63-77, 2000.

ZENG, Z.; DONG, A.; YANG, G.; ZHANGLIU, C.; HUANG, X. Simultaneous determination of nine fluorquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v.821, p.202-209, 2005.

ZHAI, S.; KORRAPATI, M.R.; WEI, X.; MUPPALLA, S.; VESTAL, R.E. Simultaneous determination of theophylline, enoxacin and ciprofloxacin in human plasma and saliva by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.669, p.372-376, 1995.

ZHANG, L.T.; SUN, Z.X.; CHEN, R.H.; ZHOU, Z.X.; ZHOU, Y.M.; ZHANG, A.H.; LIU, W.N.; WHANG, Z.H. Determination of ciprofloxacin hydrochloride in tablets by differential spectrophotometry. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v.17, p.33-34, 1997.

ZHANG, M.Q.; HAEMERS, A. Quinolone antimicrobial agents: structure-activity relationships. **Pharmazie**, v.46, p.687-700, 1991.

ZHANG, S.F.; SUN, Z.X.; SUN, X.L. Determination of ciprofloxacin lactate in injections by acid dye biphasic titration. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v.16, p.402, 1996.

ZHAO, H.C.; DING, F.; WANG, X.; JU, H.; LI, A.; PEI JIN, L. A study on silver nanoparticles-sensitized fluorescence and second-order scattering of the complexes of Tb(III) with ciprofloxacin and its applications. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.7, n.2, p.332-6, 2008.

ZHAO, S.J.; LI, C.; JIANG, H.-Y.; LI, B.-Y.; SHEN, J.-Z. Simultaneous determination of 7 quinolones residues in animal muscle tissue by high performance liquid chromatography. **Chin. J. Anal. Chem.**, v.35, n.6, p.786-790, 2007.

ZOTOU, A.; MILTIADOU, N. Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.28, p.559-568, 2002.