

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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE E DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS
DE FLUCLOXACILINA SÓDICA**

Flávia Angélica Másquio Fiorentino

ARARAQUARA - SP

2012

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

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE E DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS DE FLUCLOXACILINA SÓDICA

Flávia Angélica Másquio Fiorentino

Tese 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA – SP

2012

Ficha Catalográfica

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

F518a Fiorentino, Flávia Angélica Másquio
Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade e de dissolução
de cápsulas de flucloxacilina sódica: controle de qualidade de cápsulas de
flucloxacilina sódica / Flávia Angélica Másquio Fiorentino. – Araraquara,
2012
283 f.

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

1. Flucloxacilina. 2. CLAE. 3. Controle de qualidade. 4. EC. 5. Ensaio
microbiológico. 6. Dissolução. 7. Métodos analíticos. 8. Penicilina. 9. UV.
10. Validação. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

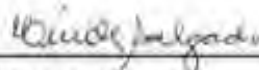
CAPES: 40300005

FLÁVIA ANGÉLICA MÁSKUO FIORENTINO

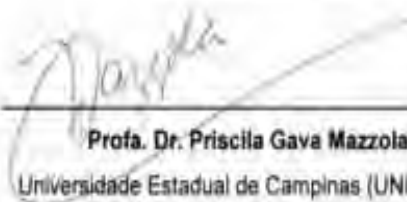
**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS DE
ESTABILIDADE E DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS DE FLUCLOXACILINA
SÓDICA**

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

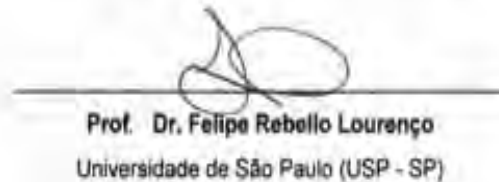
Araraquara, 8 de agosto de 2012.



Profa. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado
Presidente/orientadora



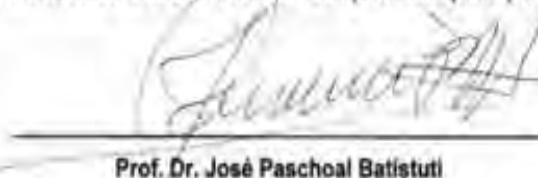
Profa. Dr. Priscila Gava Mazzola
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)



Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
Universidade de São Paulo (USP - SP)



Profa. Dr. Maria Virginia Costa Scarpa
Universidade de Estadual Paulista - Campus Araraquara (UNESP)



Prof. Dr. José Paschoal Batistuti
Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara (UNESP)

Dedicatória

A Deus, que sempre me amparou, cuidou e guiou através de seus ensinamentos e palavras. “Tu porém, és o escudo que me protege, és minha honra, aquele que me faz erguer a cabeça” (Salmo 3:3).

Aos meus pais, Celso e Célia, pelo apoio, inclusive financeiro, nos momentos em que estive sem bolsa de estudo, pela torcida para que este trabalho fosse concluído e pelo amor e carinho em todos os dias de minha vida.

Ao meu querido filho, Gabriel, que ao pensar nele para dar bons exemplos, me deu força e coragem para a concretização deste trabalho.

À minha irmã e parceira Camila, por compartilhar os momentos de alegria e dificuldade.

À minha exemplar orientadora Prof. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado, pelos ensinamentos e confiança.

Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado.

Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas.

De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou.

A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo.

Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:

- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com mãos tão frágeis!

Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:

- Eu sei como ele conseguiu.

Todos perguntaram:

- Pode nos dizer como?

- É simples: - respondeu o velho.

- Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.

"Albert Einstein"

Agradecimentos

A Deus, por estar comigo todos os dias me guiando, protegendo e fortalecendo, mas especialmente nos dias em que os momentos mais difíceis e complicados me davam vontade de desistir. Mas a fé, a esperança, o otimismo, a luz do Espírito Santo me iluminaram para que conseguisse dar mais este passo.

Aos meus queridos pais, Celso e Célia, que mesmo apesar da distância física em muitos e muitos dias, sempre foram presentes em vida. Obrigada pelo carinho, amor, preocupações e apoio principalmente nos momentos mais difíceis!

Ao meu querido filho Gabriel, por compreender e perdoar os momentos de ausência! Você é o melhor presente que Deus pode me dar, amo você demais!

À Camila, minha irmã querida, pelos incentivos e palavras ora doces, ora mais amarguinhas de encorajamento, para que eu terminasse mais esta jornada.

À Prof^a. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pela orientação, ensinamentos, compreensão, confiança e acima de tudo, pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelos ensinamentos compartilhados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCF (UNESP).

Ao Prof. Dr. Massao Ionashiro, professor do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, pela colaboração com os estudos de análise térmica.

Ao Prof. Dr. Martin Steppe, professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela colaboração com os estudos de eletroforese capilar.

À Profa. Dr. Cristiane Masetto de Gaitani e à Profa. Dr. Maria Virgínia Costa Scarpa por participarem da banca de qualificação e pelas observações pertinentes.

Aos professores Dr. Priscila Gava Mazzola, Dr. Felipe Rebello Lourenço, Dr. Maria Virgínia Costa Scarpa e Dr. José Paschoal Batistuti que participaram da banca de defesa desta tese e pelas sugestões e críticas para melhoria deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, por sempre terem me ajudado prontamente nos momentos de dúvida.

Às funcionárias da seção de Pós-graduação, pelos esclarecimentos necessários.

Aos amigos e colegas deste Curso de Pós-Graduação.

Ao colega Maximiliano Silva Sangoi pela ajuda nos estudos de eletroforese capilar.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, Daniela Vieira, Eliane Tótolli, Ana Carolina Kogawa, Tahisa Pedroso, Lucas

Chierentin, Josilene Corrêa, Rudy Bonfilio, Camila Tavares, Cristina Laignier, Lucélia Magalhães, Patrícia Alessio, Eliete Von Zuben, Flávia Carnavali pelas conversas, dicas, críticas, auxílios e momentos de descontração para que esta caminhada fosse menos difícil e para que eu tenha boas recordações. Que a amizade permaneça sempre!

À Maria de Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico e prontidão em nos ajudar e, acima disso pela amizade, companheirismo, conselhos, momentos de diversão e muitas vezes ter sido meu anjo da guarda. Você é uma amiga muito especial! Aproveito para estender meus agradecimentos à família Rodrigues que adotei como família araraquarense.

À minha querida amiga Cristina Laignier pela amizade desde o mestrado, por muitas vezes contribuir com ideias, sugestões e discussões. Cris, obrigada por sua amizade, incentivos, caminhadas e orações!

À minha amiga Lucélia Magalhães, pelas sugestões e ajuda nas interpretações dos resultados. Obrigada pelo companheirismo até altas horas no laboratório e fora dele também. Obrigada pelos momentos de descontração e diversão com seu “gauchês”!

À Juliana Severi por ter efetuado a compra no medicamento Floxapen na Suíça.

Aos meus tios Zilda e Gilberto, pelas orações, apoio, por sempre estarem junto de mim e principalmente ajudando a aconselhar meu filho.

A todos os outros tios, tias e primos que me fortaleceram com suas orações e apoio.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a bolsa de estudo concedida para realização deste trabalho.

” Ser amigo é:

Andar junto, mesmo que distante

É ser legal, jamais superficial

Dizer o que pensa, sem ofensa

Calar para ouvir, sem intervir

Falar sem rodeio, sem receio

Guardar o segredo, secar o pranto, dar o ombro

Estar para o que der e vier, e jamais abandonar

É ser alguém com quem sempre se pode contar

Ser amigo, afinal, é ser ESPECIAL!”

(Autor desconhecido)

RESUMO

A flucloxacilina (FLU) é uma isoxazolilpenicilina semissintética, classificada como penicilina resistente à penicilinase estafilocócica. É ativa contra bactérias Gram-positivas, mas não é ativa contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. A FLU é indicada para tratamento de infecções respiratórias, das articulações, síndrome do choque tóxico, pele, tecidos moles, endocardite e osteomielite, podendo ser administrada por via oral, intramuscular e endovenosa. A literatura apresenta alguns métodos de análise para FLU em fluidos biológicos, seus metabólitos e formas farmacêuticas. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para análise qualitativa e quantitativa de FLU sódica em cápsula, bem como estudos de estabilidade para este fármaco. Para análise qualitativa, foram realizados os métodos de análise térmica, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria nas regiões do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possibilitando a identificação da amostra. Para a quantificação do fármaco foram desenvolvidos e validados os métodos: (1) ensaios microbiológicos por métodos de difusão em ágar e turbidimétrico, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 25923 IAL 1606, com faixa linear de 1,5 a 6,0 µg/mL e 4,0 a 16,0 µg/mL, respectivamente; exatidão de 98,98 e 99,73% e potência de 94,32 e 96,25%, respectivamente; (2) método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente, com faixa linear em concentração de 50 a 100 µg/mL, exatidão de 100,09% e teor de 106,59%; (3) CLAE indicativo de estabilidade em comprimento de onda de 225 nm, fase móvel composta por ácido fosfórico (0,025 M), pH 5,5 e metanol (40:60 v/v) e o tempo de retenção médio foi de 4,5 minutos; a faixa linear foi de 20 a 80 µg/mL, exatidão de 100,06% e teor de 94,02%; (4) método de eletroforese capilar indicativo de estabilidade em comprimento de onda de 210 nm, eletrólito composto de solução tampão borato de sódio (50 mM) e SDS (80 mM), pH 8,5, obtendo-se tempo de migração médio de 4,6 minutos; a faixa linear foi de 20,0 a 100,0 µg/mL, exatidão de 99,45% e teor de 93,92%. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para nível de significância maior que 5%, com exceção do método por UV. Foram realizados estudos de estabilidade acelerada e de longa duração de amostras obtidas do *pool* do pó das cápsulas de FLU, aplicando-se os métodos de espectrofotometria na região de UV, CLAE e microbiológico por difusão em ágar para avaliação do teor de FLU nas amostras e foi verificado que a FLU degradou e perdeu atividade antimicrobiana. O ensaio de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando água como meio de dissolução e cesto a 50 rpm. O perfil de dissolução obtido foi discriminativo e apresentou ótima precisão e exatidão.

Palavras-chave: Flucloxacilina, CLAE, Controle de qualidade, EC, Ensaio microbiológico, Dissolução, Métodos analíticos, Penicilina, UV, Validação.

ABSTRACT

Flucloxacillin (FLU) is a semi-synthetic isoxazolilpenicillin, classified as resistant penicillin to penicillinase staphylococcal. It is active against Gram-positive, but not against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. FLU is indicated to treat respiratory infections, joints, toxic shock syndrome, skin, soft tissue, endocarditis and osteomyelitis and it can be administered by mouth, intramuscular and intravenous via. The literature describes some methods to analyse FLU in biologic fluids, its metabolites and pharmaceutical forms. In this work, methodologies were developed and validated to qualitative and quantitative analysis of FLU in capsules and also, stability studies were carried out. To qualitative analysis, thermal analysis, infrared, ultraviolet spectrophotometry, thin layer chromatography and high performance liquid chromatographic methods were studied, allowing the identification of sample. To drug quantification, the following methods were validated: (1) Microbiological assays by agar diffusion and turbidimetric methods, using *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and ATCC 25923 IAL 1606 organisms, with linear range from 1.5 to 6.0 µg/mL and 4.0 to 16.0 µg/mL, accuracy of 98.98 and 99.73% and potency of 94.32 and 96.25%, respectively; (2) ultraviolet spectrophotometric method at 274 nm, using water as solvent; with concentration linear range from 50 to 100 µg/mL, accuracy of 100.09% and quantitation of 106.59%; (3) HPLC stability-indicating, using detection wavelength at 225 nm, mobile phase consisted of fosforic acid (0.025 M) pH 5.5 methanol (40:60, v/v), with retention time of 4.5 minutes; linear range was from 20 to 80 µg/mL, with accuracy of 100.06% and quantitation of 94.07% were obtained; (4) capillary electrophoresis stability-indicating method at 210 nm, eletrolite consisted of borate buffer solution (50 mM) and SDS (80 mM), pH 8.5, with linear range from 20 to 100 µg/mL, accuracy of 99.45% and quantitation of 93.92%. The developed methods showed no statistical difference for a significance level greater than 5%, except UV-spectrophotometric method. Acelerated and long-term stability studies to powder obtained from pool of capsules were carried out applying the microbiological assay by agar diffusion, UV spectrophotometric and HPLC developed methods to assess the content of flucloxacillin in capsules and it was verified that FLU degraded and lost the biological activity. The dissolution test was developed and validated using 900 mL of water as dissolution medium and basket at 50 rpm. The dissolution profile obtained was discriminatory and it had high precision and accuracy.

Key-words: Flucloxacillin, Analytical methods, Bioassay, CE, Dissolution, HPLC, Penicillin, Quality control, Validation.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Estrutura química do núcleo penicilânico.....	27
Figura 1.2. Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico com o radical	28
Figura 3.1. Estrutura química da penicilina G	31
Figura 3.2. Esquema da descoberta de algumas penicilinas	33
Figura 3.3. Estrutura química da cadeia radical de algumas penicilinas	33
Figura 3.4. Estrutura química das isoxazolilpenicilinas	36
Figura 3.5. Estrutura da flucloxacilina sódica.....	36
Figura 4.1. Embalagem e cápsula de flucloxacilina sódica	65
Figura 4.2. Variação do peso de vinte cápsulas de flucloxacilina sódica	67
Figura 4.3. Curvas TG-DTA FLU-SQR sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 100 mL/min. Razão de aquecimento de 20 °C/min)	69
Figura 4.4. Curvas TG-DTA FLU-cápsula sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 100 mL/min. Razão de aquecimento de 20 °C/min)	69
Figura 4.5. Espectro de absorção no infravermelho de FLU- SQR	72
Figura 4.6. Espectro de absorção no infravermelho de FLU- cápsula	72
Figura 4.7. Sobreposição dos espectros de absorção no infravermelho de flucloxacilina sódica SQR e cápsula	73
Figura 4.8. Espectro de absorção de solução de flucloxacilina sódica SQR e cápsula, (30 µg/mL), na região do UV, utilizando metanol como solvente	75
Figura 4.9. Espectro de absorção de solução de flucloxacilina sódica SQR e cápsula (30 µg/mL), na região do UV, utilizando NaOH 0,1 M como solvente	75
Figura 4.10. Espectro de absorção de solução de flucloxacilina sódica SQR e cápsula (30 µg/mL), na região do UV, utilizando HCl 0,1 M como solvente	75
Figura 4.11. Espectro de absorção de solução de flucloxacilina sódica SQR e cápsula (30 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente	76
Figura 4.12. Cromatograma obtido por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL)	78
Figura 4.13. Cromatograma obtido por CLAE para solução de FLU-cápsula (50 µg/mL).	78
Figura 4.14. Eletroferograma de solução de FLU-SQR (50 µg/mL), obtido por eletroforese capilar	81
Figura 4.15. Eletroferograma de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), obtido por eletroforese capilar	81
Figura 4.16. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: butanol: água: etanol: ácido acético (5:2:1,5:1,5, v/v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	88
Figura 4.17. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: butanol:	

água: ácido acético (4:1:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	88
Figura 4.18. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: ácido acético (95:5, v/v). Agente revelador: vapor de iodo	89
Figura 4.19. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: clorofórmio: isopropanol: água (60:40:4, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	89
Figura 4.20. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (8:1:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	90
Figura 4.21. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (70:15:15, v/v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	90
Figura 4.22. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (7:2:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	91
Figura 4.23. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (3:1:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	91
Figura 4.24. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: clorofórmio: etanol: ácido acético (9:1:0,2, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	92
Figura 4.25. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: água: ácido acético: acetona: acetato de etila (1:2:2:5, v/v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo	92
Figura 4.26. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônia 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), imediatamente após adição de H ₂ O ₂ 3%. Agente revelador: vapor de iodo	93
Figura 4.27. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônia 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 30 minutos de aquecimento com H ₂ O ₂ 3%. Agente revelador: vapor de iodo	94
Figura 4.28. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônia 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 60 minutos de aquecimento com H ₂ O ₂ 3%. Agente revelador: vapor de iodo	94
Figura 4.29. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônia 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 120 minutos em temperatura ambiente com H ₂ O ₂ 3%. Agente revelador: vapor de iodo	95
Figura 4.30. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônia 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 120 minutos em aquecimento com H ₂ O ₂ 3%. Agente revelador: vapor de iodo	95
Figura 5.1. Esquema do delineamento 3 x 3 demonstrando a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P ₁ (1,5 µg/mL); P ₂ (3,0 µg/mL); P ₃ (6,0 µg/mL) e A ₁ (1,5 µg/mL); A ₂ (3,0 µg/mL) e A ₃ (6,0 µg/mL)	102

Figura 5.2. Halos de inibição obtidos no doseamento microbiológico de flucloxacilina sódica utilizando o delineamento 3 x 3, em que P ₁ (1,5 µg/mL); P ₂ (3,0 µg/mL); P ₃ (6,0 µg/mL) e A ₁ (1,5 µg/mL); A ₂ (3,0 µg/mL) e A ₃ (6,0 µg/mL)	105
Figura 5.3. Curva analítica de solução de FLU- SQR e FLU-cápsula, em concentrações de 1,5; 3,0; 6,0 µg/mL, no ensaio microbiológico, pelo método de difusão em ágar	107
Figura 5.4. Curva analítica de solução de FLU-SQR e FLU-cápsula, em concentrações de 4,0; 8,0; 16,0 µg/mL, no ensaio microbiológico, pelo método turbidimétrico	119
Figura 5.5. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica SQR e amostra (50 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente	128
Figura 5.6. Determinação da faixa linear para o método espectrofotométrico na região do UV para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), utilizando água como solvente	129
Figura 5.7. Curva analítica da solução de FLU-SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente	131
Figura 5.8. Espectro de absorção de solução de FLU-SQR, FLU-cápsula e placebo, na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente	133
Figura 5.9. Cromatograma de FLU-SQR (50 µg/mL), obtido por CLAE	149
Figura 5.10. Cromatograma de FLU-cápsula (50 µg/mL), obtido por CLAE	150
Figura 5.11. Cromatograma obtido por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em HCl 0,001 M, em temperatura ambiente por 180 minutos	150
Figura 5.12. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em NaOH 0,001 M, sob aquecimento a 70 °C por 30 minutos e em temperatura ambiente por 180 minutos	151
Figura 5.13. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR em água e mantida em banho aquecido a 70 °C por 24h, e diluída na FM para 50 µg/mL	151
Figura 5.14. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR em fase móvel e mantida em banho aquecido a 70 °C por 24h, e diluída na FM para 50 µg/mL ..	152
Figura 5.15. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em H ₂ O ₂ 3%, sob aquecimento a 70 °C por 30 minutos e 30 minutos em temperatura ambiente	152
Figura 5.16. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em luz UV por 3 dias	153
Figura 5.17. Curva analítica da solução de FLU-SQR pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel	155
Figura 5.18. Eletroferograma obtido por EC para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), utilizando como solvente o eletrólito	174
Figura 5.19. Eletroferograma obtido por EC para solução de FLU-cápsula (50 µg/mL),	

utilizando como solvente o eletrólito	175
Figura 5.20. Eletroferograma obtido por EC para a degradação de solução de FLU (50 µg/mL) em meio ácido (HCl 0,001 M) após 1,5 horas	175
Figura 5.21. Eletroferograma obtido por EC para a degradação de FLU (50 µg/mL) em meio básico (NaOH 0,001 M) após 1,5 horas	176
Figura 5.22. Eletroferograma obtido por EC para a degradação térmica a 60 °C de FLU-SQR (50 µg/mL) após 6,0 horas	176
Figura 5.23. Eletroferograma obtido por EC para a degradação oxidativa de FLU-SQR (50 µg/mL) após 30 minutos	177
Figura 5.24. Eletroferograma obtido por EC para a fotodegradação de FLU (50 µg/mL), após 1,0 hora	177
Figura 5.25. Eletroferograma obtido por EC para a solução placebo (50 µg/mL).....	178
Figura 5.26. Curva analítica da solução de FLU-SQR pelo método eletroforético, utilizando o eletrólito como solvente	181
Figura 5.27. Gráfico de Pareto demonstrando o ensaio de robustez sobre o efeito de teor (%) do método de EC para flucloxacilina sódica	183
Figura 5.28. Gráfico de Pareto demonstrando o ensaio de robustez sobre o efeito de teor tempo de migração (min) do método de EC para flucloxacilina sódica	183
Figura 7.1. Cromatogramas da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação em meio ácido (HCl 0,1 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C e 180 minutos em temperatura ambiente	200
Figura 7.2. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando degradação em meio ácido (HCl 0,01 M), por 180 minutos em temperatura ambiente	201
Figura 7.3. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando degradação em meio ácido (HCl 0,001 M), por 180 minutos em temperatura ambiente ..	201
Figura 7.4. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a degradação em meio alcalino (NaOH 0,1 M), por 30 minutos em em banho aquecido a 70 °C e 60 minutos em temperatura ambiente	202
Figura 7.5. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a degradação em meio alcalino (NaOH 0,01 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C e 90 minutos em temperatura ambiente	203
Figura 7.6. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a degradação em meio alcalino (NaOH 0,001 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C e 180 minutos em temperatura ambiente	203
Figura 7.7. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a degradação oxidativa (H ₂ O ₂ 3%), em temperatura ambiente	204

Figura 7.8. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a estabilidade em água por 24 horas em temperatura ambiente e 24 horas em refrigerador a 5 °C	205
Figura 7.9. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a estabilidade em fase móvel, por 24 horas em temperatura ambiente e 24 horas em refrigerador a 5 °C	205
Figura 7.10. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a estabilidade fotoquímica por 7 dias em luz UVC 254 nm	206
Figura 7.11. Pó das cápsulas de FLU sódica após armazenamento em câmara climática para estudos acelerados da estabilidade (40 ± 2 °C/ 75 ± 5% UR), por 6 meses	211
Figura 7.12. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo acelerado da estabilidade, por 3 meses	211
Figura 7.13. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo acelerado da estabilidade, por 6 meses	211
Figura 7.14. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo acelerado da estabilidade, por 3 meses	212
Figura 7.15. Cromatogramas da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, para o estudo acelerado da estabilidade, por 6 meses	213
Figura 7.16. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 3 meses	214
Figura 7.17. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 6 meses	214
Figura 7.18. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 9 meses	214
Figura 7.19. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 12 meses	215
Figura 7.20. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 18 meses	215
Figura 7.21. Espectro de absorção da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), na	

região do UV, utilizando água como solvente, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 24 meses	215
Figura 7.22. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 3 meses	216
Figura 7.23. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 6 meses	217
Figura 7.24. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 9 meses	217
Figura 7.25. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 12 meses	218
Figura 7.26. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 18 meses	218
Figura 7.27. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade, por 3 meses	219
Figura 7.28. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, submetida ao estudo de fotodegradação por 7 dias em câmara de luz UV	221
Figura 7.29. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, submetida ao estudo de fotodegradação por 28 dias em câmara de luz UV.....	222
Figura 7.30. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, submetida ao estudo de fotodegradação por 42 dias em câmara de luz UV	222
Figura 7.31. Cromatograma da solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), em fase móvel, submetida ao estudo de fotodegradação por 63 dias em câmara de luz UV	223
Figura 8.1. Especificidade do ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica	229
Figura 8.2. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	232
Figura 8.3. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	232
Figura 8.4. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 100 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	233
Figura 8.5. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de epotássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na	

região do UV	233
Figura 8.6. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	234
Figura 8.7. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 100 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	234
Figura 8.8. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	235
Figura 8.9. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	235
Figura 8.10. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	236
Figura 8.11. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	236
Figura 8.12. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás com sinker a 50 rpm por 30 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	237
Figura 8.13. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás com sinker a 50 rpm por 30 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	238
Figura 8.14. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 30 minutos, e solução de HCl 0,01 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	239
Figura 8.15. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 30 minutos, água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV	241
Figura 8.16. Curva nalítica de flucloxacilina sódica para a quantificação da dissolução por espectrofotometria na região do UV	245

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Concentração inibitória mínima da flucloxacilina, cloxacilina e benxilpenicilina	42
Tabela 3.2. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica	50
Tabela 3.3. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em fluidos biológicos	51
Tabela 3.4. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica e seus metabólitos em fluidos biológicos	53
Tabela 3.5. Métodos microbiológicos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica	54
Tabela 3.6. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em produtos farmacêuticos	55
Tabela 3.7. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica para após sua esterilização	59
Tabela 4.1. Peso individual das cápsulas de flucloxacilina sódica	66
Tabela 4.2. Absorção de FLU-SQR e FLU-cápsula em espectro de infravermelho em pastilhas de KBr	73
Tabela 4.3. Sistemas de fases móveis testados para solução de FLU-SQR e FLU-cápsula íntegras	84
Tabela 4.4. Valores de Rf obtidos com os diversos sistemas de fases móveis testados na análise de soluções íntegras de FLU-SQR e FLU-cápsula	86
Tabela 4.5. Rf obtidos para soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula íntegras e degradadas por peróxido de hidrogênio a 3%	93
Tabela 5.1. Parâmetros testados para avaliação de potência de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo método de difusão em ágar	99
Tabela 5.2. Parâmetros estabelecidos para determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo método de difusão em ágar	100
Tabela 5.3. Preparo das soluções para o teste de recuperação no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar	104
Tabela 5.4. Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos no ensaio microbiológico de flucloxacilina sódica pelo método de difusão em ágar	106
Tabela 5.5. Análise de variância dos valores dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico com a solução de flucloxacilina sódica, método de difusão em ágar	107
Tabela 5.6. Teste de recuperação do ensaio microbiológico, pelo método de difusão em ágar, para análise de flucloxacilina sódica	108

Tabela 5.7. Avaliação da robustez do ensaio microbiológico, pelo método de difusão em ágar, para análise de flucloxacilina sódica	109
Tabela 5.8. Potência de flucloxacilina sódica em cápsula, pelo método de difusão em ágar	109
Tabela 5.9. Parâmetros testados para avaliação de potência de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico	113
Tabela 5.10. Parâmetros estabelecidos para a determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico	113
Tabela 5.11. Preparo das soluções para o teste de recuperação do ensaio microbiológico, pelo turbidimétrico	117
Tabela 5.12. Valores das absorvâncias determinadas para obtenção da curva analítica de flucloxacilina sódica pelo método turbidimétrico	118
Tabela 5.13. Análise da variância dos valores das absorvâncias obtidas no ensaio microbiológico com a solução de flucloxacilina sódica pelo método turbidimétrico	119
Tabela 5.14. Teste de recuperação do ensaio microbiológico turbidimétrico para análise de flucloxacilina sódica	120
Tabela 5.15. Avaliação da robustez do ensaio microbiológico turbidimétrico para análise de flucloxacilina sódica	120
Tabela 5.16. Potência de flucloxacilina sódica em cápsula, pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico	121
Tabela 5.17. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do ultravioleta	126
Tabela 5.18. Valores obtidos na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para FLU-SQR, utilizando água como solvente e comprimento de onda de 274 nm	129
Tabela 5.19. Valores de absorvâncias determinados para a curva analítica de FLU-SQR por espectrofotometria na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente	130
Tabela 5.20. Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados na obtenção da curva analítica de FLU-SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente	131
Tabela 5.21. Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, para quantificação de flucloxacilina sódica em cápsulas	132
Tabela 5.22. Teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV ...	133
Tabela 5.23. Valores da inclinação das retas das curvas analíticas determinadas para FLU-SQR e FLU-cápsula, pelo método espectrofotométrico na região do UV	134
Tabela 5.24. Avaliação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV	

para análise de flucloxacilina sódica	134
Tabela 5.25. Determinação do teor interdias e entre-analistas das cápsulas de flucloxacilina sódica, por espectrofotometria na região de UV	135
Tabela 5.26. Condições testadas durante o desenvolvimento do método por CLAE indicativo de estabilidade para determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas	142
Tabela 5.27. Parâmetros estabelecidos para a determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas, pelo método CLAE indicativo de estabilidade	143
Tabela 5.28. Preparo das soluções de FLU para o teste de recuperação do método CLAE indicativo de estabilidade	145
Tabela 5.29. Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden e Steiner	146
Tabela 5.30. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no Teste 1 de Youden e Steiner	147
Tabela 5.31. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no Teste 2 de Youden e Steiner	147
Tabela 5.32. Perdas percentuais encontradas para solução de FLU-SQR na concentração de 50 µg/mL, obtidas pelo método de CLAE indicativo de estabilidade	153
Tabela 5.33. Valores das áreas referentes ao pico de FLU-SQR para obtenção da curva analítica do método cromatográfico, utilizando a fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v) a 225 nm	154
Tabela 5.34. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de FLU-SQR utilizando o método de CLAE indicativo de estabilidade .	155
Tabela 5.35. Teste de recuperação do método CLAE indicativo de estabilidade	156
Tabela 5.36. Resultados de cada variação obtidos nos Testes de Youden e Steiner 1 e 2	157
Tabela 5.37. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de flucloxacilina sódica	158
Tabela 5.38. Determinação do teor interdias e entre-analistas das cápsulas de flucloxacilina sódica pelo método cromatográfico	158
Tabela 5.39. Resultados obtidos durante o desenvolvimento do método por CLAE indicativo de estabilidade para análise quantitativa de flucloxacilina sódica cápsulas	159
Tabela 5.40. Parâmetros testados durante o desenvolvimento do método de eletroforese capilar indicativo de estabilidade para determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas	168
Tabela 5.41. Parâmetros estabelecidos para a determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo método EC indicativo de estabilidade	169
Tabela 5.42. Preparo das soluções de FLU para o teste de recuperação do método de EC indicativo de estabilidade	172
Tabela 5.43. Variáveis selecionadas para serem avaliadas pelo teste de robustez do	

método de EC indicativo de estabilidade	172
Tabela 5.44. Parâmetros analíticos e variações realizadas no teste de robustez do método de EC indicativo de estabilidade	173
Tabela 5.45. Perdas percentuais encontradas para solução de FLU-SQR na concentração de 50 µg/mL, obtidas pelo método de EC indicativo de estabilidade	178
Tabela 5.46. Valores das áreas referentes ao pico de FLU-SQR para obtenção da curva analítica do método eletroforético, utilizando como eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5 a 210 nm	180
Tabela 5.47. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de FLU-SQR utilizando o método de EC indicativo de estabilidade	181
Tabela 5.48. Teste de recuperação do método de EC indicativo de estabilidade	182
Tabela 5.49. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema eletroforético desenvolvido para análise de flucloxacilina sódica	184
Tabela 5.50. Estabilidade da solução de FLU-SQR submetida às diferentes condições de armazenamento e analisadas pelo método de EC indicativo de estabilidade	184
Tabela 5.51. Determinação do teor interdias e entre-analistas das cápsulas de flucloxacilina sódica pelo método de EC indicativo de estabilidade	185
Tabela 6.1. Aplicabilidade dos métodos propostos para análise da flucloxacilina sódica	189
Tabela 6.2. Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de flucloxacilina sódica em cápsula, pelos métodos propostos	189
Tabela 6.3. Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de flucloxacilina sódica em cápsula, pelos métodos microbiológicos por difusão em ágar e turbidimétrico, CLAE e EC	190
Tabela 6.4. Teste de Tukey para os resultados obtidos no doseamento de flucloxacilina sódica em cápsul, pelos cinco métodos propostos	191
Tabela 7.1. Degradações para solução de FLU-cápsulas na concentração de 50 µg/mL, obtidas pelo método de CLAE	207
Tabela 7.2. Valores de teor e concentração obtidos após estudo acelerado da estabilidade do pó das cápsulas de flucloxacilina sódica, por espectrofotometria na região do UV	212
Tabela 7.3. Valores de teor e concentração obtidos após estudo longa duração da estabilidade do pó das cápsulas de flucloxacilina sódica, por espectrofotometria na região do UV	216
Tabela 7.4. Valores de teor obtidos, por CLAE, após estudo de fotodegradação do pó das cápsulas de flucloxacilina sódica	223
Tabela 8.1. Teste de dissolução das cápsulas de flucloxacilina sódica e o valor de	

interferência da cápsula utilizando o método por espectrofotometria na região do UV ...	229
Tabela 8.2. Condições testadas durante o desenvolvimento do ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica	230
Tabela 8.3. Condições estabelecidas para o ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica	240
Tabela 8.4. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV	243
Tabela 8.5. Preparo do teste de recuperação do ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica	245
Tabela 8.6. Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de FLU-SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, para o ensaio de dissolução das cápsulas de flucloxacilina sódica	246
Tabela 8.7. Teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV para o ensaio de dissolução das cápsulas de flucloxacilina sódica	246
Tabela 8.8. Avaliação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV para o ensaio de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica	247
Tabela 8.9. Repetibilidade para o ensaio de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV	247
Tabela 8.10. Precisão intermediária (interdias) para o ensaio de dissolução de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV	248
Tabela 8.11. Precisão intermediária (entre-analistas) para o ensaio de dissolução de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV	248
Tabela 8.12. Teste de recuperação para o ensaio de dissolução de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV	248
Tabela 8.13. Teste de uniformidade de conteúdo para cápsulas de flucloxacilina sódica, 500 mg	251

Lista de Abreviaturas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI: *Brain Heart Infusion Broth*, caldo BHI
BP: *British Pharmacopoeia*, Farmacopeia Britânica
CCD: cromatografia em camada delgada
CIM: concentração inibitória mínima
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CMC: concentração micelar crítica
CV (%): coeficiente de variação percentual
CZE: *capillary zone electrophoresis*, eletroforese capilar de zona
DEG: produto de degradação
EC: eletroforese capilar
EOF: *electroosmotic flow*, fluxo eletrosmótico
EP: *European Pharmacopoeia*, Farmacopeia Europeia
FB: Farmacopeia Brasileira
FDA: Food and Drug Administration
FLU: flucloxacilina
FP: Farmacopeia Portuguesa
FSCE: *free solution capillary electrophoresis*, eletroforese capilar em solução livre
ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia
IV: infravermelho
JP: *Japanese Pharmacopoeia*, Farmacopeia Japonesa
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
MEKC: *micellar electrokinetic chromatography*, eletroforese capilar micelar
MRSA: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes
MSSA: *Methicillin sensitive Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilina sensível
PI: padrão interno
SDS: dodecil sulfato de sódio
SQR: substância química de referência
USP: *United States Pharmacopoeia*, Farmacopeia Americana
UV: ultravioleta

SUMÁRIO

Dedicatória	3
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	16
Lista de abreviaturas	21
1.INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	30
3. REVISÃO DA LITERATURA	31
4. ANÁLISE QUALITATIVA	63
4.1. DESCRIÇÃO	63
4.1.1. Descrição geral	63
4.1.2. Substância química de referência	64
4.1.3. Forma farmacêutica	65
4.2. ANÁLISE QUALITATIVA	65
4.2.1. Características físicas	65
4.2.1.1. Método	65
4.2.1.2. Resultados	65
4.2.1.3. Discussão	65
4.2.2. Determinação do peso médio das cápsulas de flucloxacilina	65
4.2.2.1. Material	65
4.2.2.2. Método	66
4.2.2.3. Resultados	66
4.2.2.4. Discussão	67
4.2.3. Determinação de umidade – método gravimétrico	67
4.2.3.1. Material	67
4.2.3.2. Método	67
4.2.3.3. Resultados	67
4.2.3.4. Discussão	68
4.2.4. Análise térmica	68
4.2.4.1. Material	68
4.2.4.2. Método	69
4.2.4.3. Resultados	69
4.2.4.4. Discussão	70

4.2.5. Determinação da faixa de fusão	70
4.2.5.1. Material	70
4.2.5.2. Método	71
4.2.5.3. Resultados	71
4.2.5.4. Discussão	71
4.2.6. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	71
4.2.6.1. Material	71
4.2.6.2. Método	71
4.2.6.3. Resultados	72
4.2.6.4. Discussão	73
4.2.7. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta	74
4.2.7.1. Material	74
4.2.7.2. Método	74
4.2.7.3. Resultados	75
4.2.7.4. Discussão	76
4.2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	76
4.2.8.1. Material	77
4.2.8.2. Método	77
4.2.8.3. Resultados	77
4.2.8.4. Discussão	78
4.2.9. Eletroforese capilar (EC)	79
4.2.9.1. Material	79
4.2.9.2. Método	79
4.2.9.3. Resultados	80
4.2.9.4. Discussão	81
4.2.10. Cromatografia em camada delgada (CCD)	82
4.2.10.1. Material	82
4.2.10.2. Método	82
4.2.10.3. Resultados	85
4.2.10.4. Discussão	96
4.3. Conclusão das análises qualitativas	97
5. ANÁLISE QUANTITATIVA	98
5.1. Doseamento microbiológico – método de difusão em ágar	98
5.1.1. Introdução	98
5.1.2. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos	98
5.1.3. Execução do ensaio	99

5.1.4. Material	100
5.1.5. Ensaio	102
5.1.6. Validação do método microbiológico	103
5.1.7. Resultados	105
5.1.8. Cálculo da potência de flucloxacilina sódica nas cápsulas	109
5.1.9. Discussão	109
5.2. Doseamento microbiológico – método turbidimétrico	112
5.2.1. Introdução	112
5.2.2. Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos	112
5.2.3. Execução do ensaio	113
5.2.4. Material	114
5.2.5. Ensaio	115
5.2.6. Validação do método microbiológico	116
5.2.7. Resultados	117
5.2.8. Cálculo da potência de flucloxacilina sódica nas cápsulas	121
5.2.9. Discussão	121
5.3. Espectrofotometria de absorção na região de ultravioleta	123
5.3.1. Introdução	123
5.3.2. Material	124
5.3.3. Método	124
5.3.4. Validação do método espectrofotométrico	125
5.3.5. Cálculo do teor de flucloxacilina sódica nas cápsulas	127
5.3.6. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica	128
5.3.7. Resultados	128
5.3.8. Discussão	135
5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência	138
5.4.1. Introdução	138
5.4.2. Ensaio preliminares.....	140
5.4.3. Material	140
5.4.4. Método	141
5.4.5. Validação do método cromatográfico	143
5.4.6. Cálculo do teor de flucloxacilina sódica nas cápsulas	149
5.4.7. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica	149
5.4.8. Resultados	149
5.4.9. Discussão	159
5.5. Eletroforese capilar	162

5.5.1. Introdução	162
5.5.2. Ensaios preliminares.....	166
5.5.3. Material	166
5.5.4. Método	168
5.5.5. Validação do método por eletroforético	169
5.5.6. Cálculo do teor de flucloxacilina sódica nas cápsulas	173
5.5.7. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica	174
5.5.8. Resultados	174
5.5.9. Discussão	185
6. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE ANÁLISE	189
6.1. Introdução	189
6.1. Resultados	189
6.2. Discussão	191
7. ESTUDO DE ESTABILIDADE	193
7.1. Introdução	193
7.2. Método	198
7.2.1. Estudo preliminar da estabilidade de flucloxacilina sódica	198
7.2.1.1. Condições do estudo	198
7.2.1.2. Resultados	200
7.2.1.3. Discussão	207
7.2.2. Estudo acelerado e de longa duração da estabilidade de flucloxacilina sódica	209
7.2.2.1. Condições do estudo	209
7.2.2.2. Resultados	210
7.2.2.2.1. Estudos acelerado da estabilidade	210
7.2.2.2.2. Estudos de longa duração da estabilidade	213
7.2.2.3. Discussão	219
7.2.3. Estudo de degradação fotoquímica	221
7.2.3.1. Condições de estudo	221
7.2.3.2. Resultados	221
7.2.3.3. Discussão	223
8. ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO	225
8.1. Introdução	225
8.2. Desenvolvimento analítico – método para quantificação	228
8.3. Desenvolvimento analítico – método para performance	230
8.4. Validação	241

8.5. Resultados	244
8.6. Discussão	249
8.7. Uniformidade de doses unitárias	250
8.7.1. Método	250
8.7.2. Resultados	251
8.7.3. Discussão	252
9. DISCUSSÃO GERAL	253
10. CONCLUSÕES	257
REFERÊNCIAS	258

1. INTRODUÇÃO

As penicilinas são antibióticos com largo espectro de ação, eficientes para um grande número de infecções, ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas. Estes fármacos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas desde que foram descobertas em 1928 por Fleming (AMIN, 2001). Classificadas como antibióticos β -lactâmicos devido à sua estrutura química, as penicilinas compreendem uma das classes de fármacos melhor conhecidas mundialmente e ainda hoje contribuem para a manutenção da saúde por tratarem doenças infecciosas em humanos e em animais (TAKADA et al., 2005).

As penicilinas possuem como núcleo formador, o ácido aminopenicilânico, que consiste de um anel tiazolidínico (A), ligado a um anel β -lactâmico (B), que é ligado à cadeia radical (R) (Figura 1.1). O núcleo penicilânico é responsável pela atividade biológica, transformação metabólica ou perda da atividade antibacteriana devido à alteração química nesta porção da molécula. A cadeia radical das penicilinas altera a suscetibilidade destes compostos à ação das enzimas inativadoras (β -lactamases ou penicilinasas), causam mudanças na atividade antibacteriana, nas propriedades farmacológicas, terapêuticas e físico-químicas da substância. Diversas penicilinas naturais, entre elas a penicilina G, podem ser produzidas, dependendo da composição do meio de fermentação usado para a cultura do *Penicillium* (KADURINA et al., 2003; PETRI Jr, 2006).

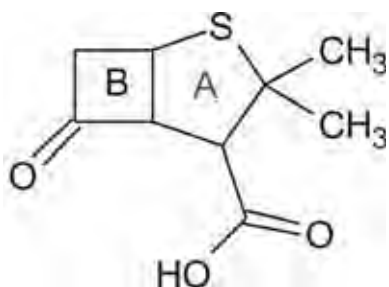


Figura 1.1. Estrutura química do núcleo penicilânico.

A descoberta do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) em 1957 (Figura 1.2), obtido de culturas de *Penicillium chrysogenum*, precursor reduzido da cadeia radical, conduziu ao desenvolvimento de penicilinas semissintéticas. O 6-APA é produzido em larga escala com a ajuda da amidase do *P. chrysogenum*. Esta enzima divide o peptídeo ligado à cadeia radical da penicilina que é associado ao ácido 6-APA (KADURINA et al., 2003; PETRI Jr, 2006).

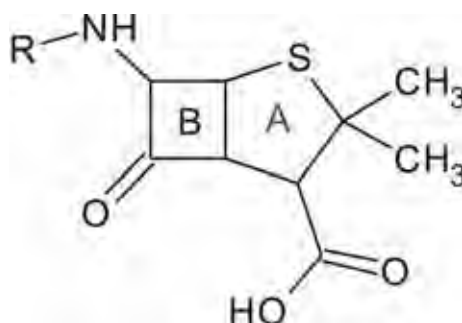


Figura 1.2. Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico com o radical.

Desde a descoberta da penicilina, primeiro antibiótico utilizado clinicamente em 1942, diversas pesquisas têm sido realizadas com objetivo de melhorar a ação e o espectro de atividade antibacteriana, originando um grande número de derivados antimicrobianos semissintéticos (KADURINA et al., 2003). Antes da descoberta do 6-APA, a família das penicilinas era formada por dois membros (penicilinas G e V) e após seu conhecimento, mais de 20 compostos já existiam na década de 1970. As modificações realizadas originaram compostos que podem ser classificados em:

Grupo 1: Penicilinas sensíveis à penicilinase, representadas pela benzilpenicilina ou penicilina G, fenoximetilpenicilina ou penicilina V, carbanicilina.

Grupo 2: Penicilinas resistentes à penicilinase, representadas pela meticilina, nafcilina, oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina, flucloxacilina.

Grupo 3: Penicilinas de espectro aumentado, representadas pela amoxicilina, ampicilina.

Grupo 4: Penicilinas antipseudomonas, representadas pela ticarcilina, azlocilina, piperacilina e carbenicilina (SILVA, 2006; ROLINSON, GEDDES, 2007).

A flucloxacilina (FLU), membro mais recente do grupo das isoxazolilpenicilinas, pertencente à classe das penicilinas semissintéticas, possui estreito espectro de ação, é ativa contra bactérias Gram-positivas, incluindo estafilococos produtores ou não de penicilinas e estreptococos como, por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*. Contra *Streptococcus pyogenes* é menos eficaz que a benzilpenicilina, mas é ativa o suficiente para ser utilizada quando este micro-organismo está presente junto com estafilococos penicilina-resistentes. A FLU não é ativa contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) e *Enterococcus faecalis* (FRANK et al., 1988; CHARLES et al., 1994; LANDERSDORFER et al., 2007; MARTINDALE, 2009).

A FLU é utilizada como antimicrobiano destinado ao uso infantil e adulto, disponível nas formas farmacêuticas cápsula, pó para preparo de solução oral e pó para preparo de solução aquosa injetável administrada por via intramuscular, endovenosa, infusão endovenosa, injeção intra-articular, intrapleural e inalação por nebulizador (MARTINDALE, 2009; BP, 2010c).

A FLU não faz parte do arsenal terapêutico no Brasil, mas é comercializada em diversos países europeus, latino-americanos, asiáticos e africanos.

A FLU é descrita nas Farmacopeias Portuguesa (FP, 2005) e Europeia (EP, 2011) como matéria-prima e na Farmacopeia Britânica (BP, 2010a; BP, 2010c) como matéria-prima e nas formas farmacêuticas de cápsulas, pó para preparo de solução oral e solução injetável. Na literatura são encontrados diversos trabalhos relacionados com a sua atividade farmacológica e avaliação de metabólitos, concentração inibitória mínima e tipos de administração que serão apresentados na seção 3.8. Existem trabalhos que descrevem a determinação deste fármaco em fluidos biológicos e em associação com outros fármacos, mas há poucos trabalhos relacionados à análise quantitativa da FLU na forma farmacêutica cápsulas, bem como estudos de estabilidade, os quais também serão apresentados na seção 3.8.

Embora a FLU sódica cápsula possua monografia na Farmacopeia Britânica (BP, 2010c), estudo de dissolução não está apresentado. Os estudos de dissolução são importantes para determinar a quantidade da substância ativa declarada no rótulo, liberada no meio de dissolução, quando o produto é submetido ao equipamento, nas condições experimentais estabelecidas, para verificar se tal produto atende às exigências descritas em sua monografia (FB 5, 2010). Os estudos de dissolução também são importantes para avaliar os efeitos combinados de diferentes formulações, avaliar as unidades dentro de um mesmo lote e entre lotes diferentes (GAFFNER, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologias analíticas para a determinação qualitativa e quantitativa, determinação da potência bem como estudos de estabilidade de FLU sódica em cápsulas.

2.1.1. Objetivos específicos

- ❖ Realizar análise qualitativa de FLU sódica substância química de referência (FLU-SQR) e nas cápsulas (FLU-cápsulas) por meio das características físicas, análise térmica, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região de infravermelho e ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC).
- ❖ Desenvolver e validar método de análise por espectrofotometria na região UV para determinação quantitativa de FLU sódica em cápsulas.
- ❖ Desenvolver e validar método de análise microbiológica de FLU sódica em cápsulas utilizando o método de difusão em ágar.
- ❖ Desenvolver e validar método de análise microbiológica de FLU sódica em cápsulas utilizando o método turbidimétrico.
- ❖ Desenvolver e validar método de análise por CLAE para determinação quantitativa de FLU sódica em cápsulas.
- ❖ Desenvolver e validar método de análise por eletroforese capilar (EC) para determinação quantitativa de FLU sódica em cápsulas.
- ❖ Comparar estatisticamente os métodos propostos.
- ❖ Avaliar a estabilidade de FLU sódica em cápsulas frente à degradação ácida, básica, oxidativa, térmica e fotolítica.
- ❖ Realizar estudos acelerados e de longa duração de estabilidade em câmara climática para cápsulas de FLU sódica.
- ❖ Aplicar os métodos validados de CLAE, espectrofotometria na região de UV e microbiológico, por difusão em ágar, nos estudos acelerados e de longa duração da estabilidade.
- ❖ Desenvolver e validar ensaio de dissolução para cápsulas de FLU sódica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Considerações gerais

As penicilinas são os mais antigos e mais importantes antibióticos utilizados. Estes fármacos fazem parte do maior grupo de antimicrobianos existentes, chamado de β -lactâmicos, e podem ser destruídas por enzimas como amidase e penicilinase (atualmente conhecida por β -lactamase). As penicilinas foram observadas por Abbess Hildegarde von Bingen, no século XV, que as descreveu como “coisas boas” que cresciam ao lado das árvores e que poderiam ser utilizadas em feridas (RANG et al., 2007; SAMANIDOU et al., 2006). Mais tarde, Fleming redescobriu-as e as denominou.

As penicilinas receberam este nome por serem obtidas a partir do fungo *Penicillium notatum* (KADURINA et al., 2003). O primeiro membro da família das penicilinas, benzilpenicilina (penicilina G) (Figura 3.1), foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming, ao observar a inibição do crescimento de *Staphylococcus* em placas contendo meio de cultura solidificado, contaminado com *Penicillium chrysogenum* (formalmente conhecido como *Penicillium notatum*). Entretanto, Fleming parou as pesquisas por acreditar que a penicilina não teria atividade suficiente no corpo humano. Em 1939, Florey e Chain conseguiram produzir a penicilina em grande quantidade, a partir do caldo nutritivo, no qual o fungo cresce e, começaram a utilizá-la clinicamente em 1942, no Hospital da Universidade de Yale e na *Mayo Clinic* (EUA). Após a Segunda Guerra Mundial, em 1946, a penicilina foi introduzida no mercado para tratamento de infecções causadas principalmente por estafilococos e estreptococos (KADURINA et al., 2003; SAMANIDOU et al., 2006).

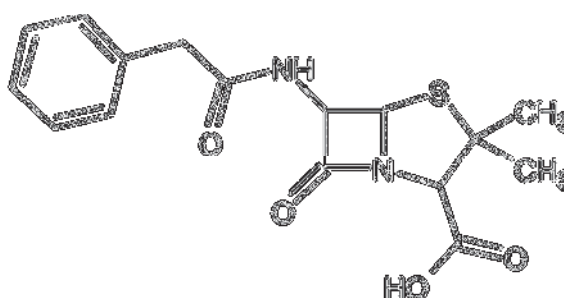


Figura 3.1. Estrutura química da penicilina G.

De acordo com Rolinson e Geddes (2007), o fungo *P. chrysogenum* produzia não apenas uma penicilina, mas uma família de penicilinas, designadas de X, G, F e K, diferindo apenas na cadeia radical ligada ao anel β -lactâmico tiazolidínico, que ficou conhecido como núcleo penicilínico (Figura 1.1). Também foi verificado que a adição do ácido fenilacético ao meio de fermentação do fungo *P. chrysogenum* resultou na obtenção da penicilina G, que

possui a maior atividade antibacteriana. Diante destes resultados, foi concluído que o ácido fenilacético era o precursor do radical presente na penicilina G (grupo benzil).

Outras pesquisas mostraram que diferentes tipos de penicilinas são produzidas se diferentes radicais são fornecidos ao meio de fermentação na forma de precursor. Foi desta maneira que se obteve a penicilina V, que possui melhor estabilidade ácida e absorção, permitindo administração por via oral. As demais penicilinas obtidas desta maneira não foram promissoras para uso clínico, demonstrando que a técnica de adição de precursor ao meio de fermentação é bem limitada (ROLINSON, 1988; ROLINSON, GEDDES, 2007).

Outro método para a obtenção de novos tipos de penicilinas foi a modificação química na penicilina obtida naturalmente (penicilina X). Estas modificações incluíam alterações do grupo *p*-hidróxi do anel benzênico, facilitando a substituição por halogênios e diversos azo- radicais, resultando em um grande número de penicilinas semissintéticas, mas também sem importância clínica (ROLINSON, 1988; ROLINSON, GEDDES, 2007).

Entretanto, em 1957 foi descoberto o 6-APA, que é o núcleo das penicilinas semissintéticas e, a partir dele muitos antibióticos foram introduzidos na prática clínica. O 6-APA foi descoberto quando o ácido *p*-aminofenil acético foi adicionado ao meio de fermentação do *P. chrysogenum* como um precursor do radical presente no 6-APA. Outras pesquisas foram realizadas e o 6-APA passou a ser produzido utilizando uma deacilase obtida do *Streptomyces lavendulae* sendo a penicilina V, o substrato (ROLINSON, GEDDES, 2007). Mais tarde, foi demonstrado que a cadeia radical da penicilina G também pode ser removida de maneira similar com uma deacilase bacteriana e, pouco tempo depois, um processo químico para deacilação foi desenvolvido (ROLINSON, 1988).

Diversas penicilinas derivadas do 6-APA surgiram. A feneticilina e propicilina são análogos próximos à penicilina V e possuem melhor absorção oral, mas apresentam menor importância que a ampicilina e a meticilina. A ampicilina possui amplo espectro de ação e pode ser administrada oralmente, enquanto que a meticilina é efetiva contra espécies de *S. aureus* resistentes à penicilina G, mas com o inconveniente de não ser absorvida pelo trato gastrointestinal, quando administrada oralmente (ROLINSON, 1988). A Figura 3.2 relaciona algumas penicilinas com o seu surgimento e a Figura 3.3 apresenta as estruturas da cadeia radical de algumas penicilinas.

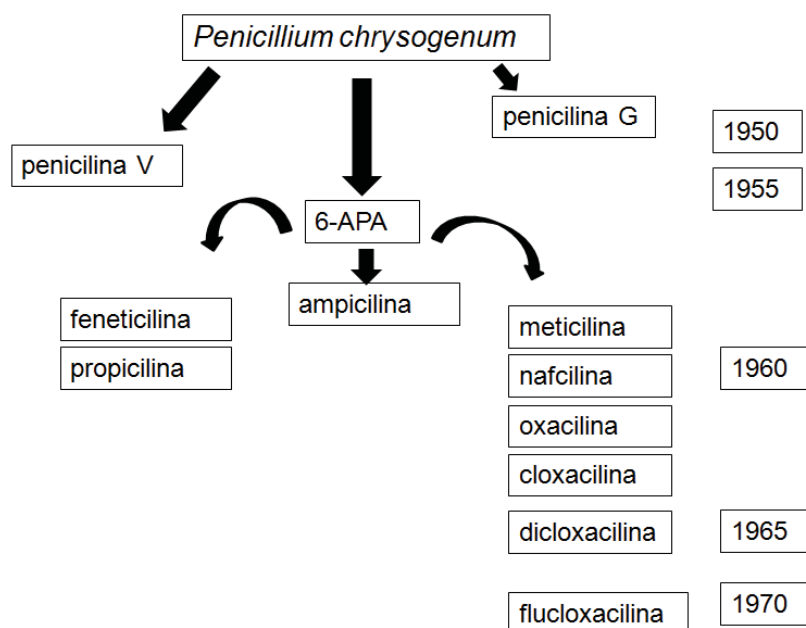


Figura 3.2. Esquema da descoberta de algumas penicilinas.

Fonte: Rolinson, 1988.

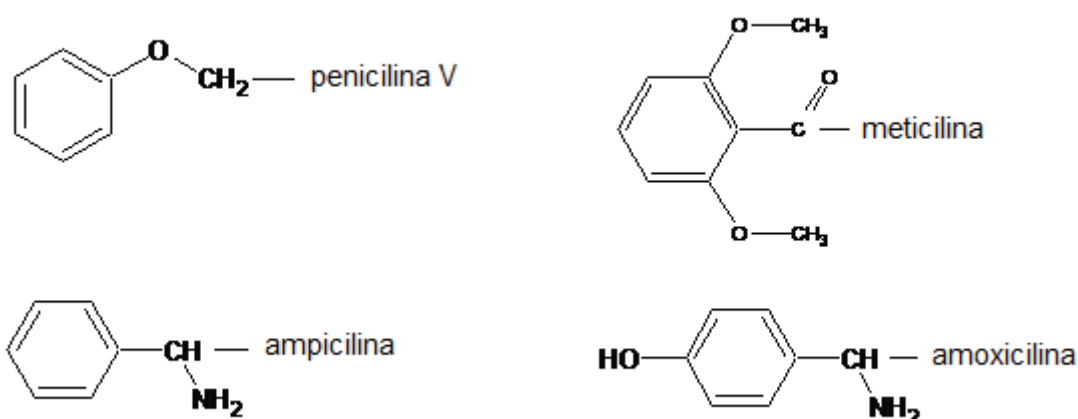


Figura 3.3. Estrutura química da cadeia radical de algumas penicilinas.

O núcleo das penicilinas é formado por um anel tiazolidínico ligado ao anel β -lactâmico (Figura 1.1). O núcleo penicilânico é responsável pela atividade biológica e a cadeia radical tem relação com as propriedades antibacterianas, farmacológicas e de estabilidade, além de controlar a suscetibilidade às penicilinases, que hidrolisam o anel β -lactâmico, acarretando a inativação das penicilinas (KADURINA et al., 2003).

A cadeia radical pode ser substituída por: (a) adição de um elétron retirado do grupo da cadeia lateral carbonila, o que aumenta a estabilidade ácida; (b) adição de um radical grande próximo ao anel β -lactâmico, aumentando a resistência à inativação pelas β -

lactamases e, (c) adição de um grupo polar que aumenta a meia-vida do fármaco e o espectro de ação incluindo as bactérias Gram-negativas (SAMANIDOU et al., 2006).

O espectro de atividade das penicilinas depende do radical que elas possuem, por exemplo, a penicilina G pode ser usada para bactérias Gram-positivas, entretanto, é instável no estômago, devido à acidez e é rapidamente inativada pela β -lactamase; a ampicilina foi a primeira penicilina desenvolvida com maior espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; amoxicilina melhorou o tempo de ação e a flucloxacilina, dicloxacilina e meticilina são ativas contra espécies de *Staphylococcus* produtoras de β -lactamases (SAMANIDOU et al., 2006).

As penicilinas podem conter uma variedade de estruturas químicas das cadeias radicais, as quais estão relacionadas com sua atividade antimicrobiana, estabilidade química, solubilidade e propriedades ácido-base. Os grupamentos químicos podem ter características fortemente ácidas (carboxílicos, sulfônicos) ou básicas (aminas, aminotiazóis) ligados a grupos com propriedades ácido-base fraca (fenóis, amidas). Portanto, de acordo com a combinação de seus grupos funcionais, estes antimicrobianos podem exibir propriedades de um composto ácido, básico ou anfotérico (ALEKSEEV, 2010).

A determinação exata das características de equilíbrio ácido-básico é de grande importância, pois permite a sua especificação em solução em diferentes valores de pH, por exemplo, em não dissociável, cátion, ânion ou íon *zwitterion*. As penicilinas podem ser divididas em antibióticos ácidos; anfotéricos com grupos carboxílicos e amina; anfotéricos com grupos carboxílicos, amina e fenol; anfotéricos com grupos carboxílicos e aminotiazol e básicos dependendo do tipo do envolvimento nas reações ácido-base (ALEKSEEV, 2010). Nuñez-Vergara e colaboradores (1988) relatam que as penicilinas são antibióticos ácidos fracos com ampla solubilidade lipídica, dependendo da natureza da cadeia radical.

Como pode ser notado, a partir do descobrimento do 6-APA muitas penicilinas semissintéticas foram produzidas sem a garantia de que teriam vantagens em relação às penicilinas G e V, mas em virtude da resistência estafilocócica às penicilinas, e das demais bactérias multirresistentes, a busca por novos produtos continuou e o desenvolvimento de antimicrobianos efetivos para tratar tais infecções tem sido motivo de intensas pesquisas na área farmacêutica (ROLINSON, GEDDES, 2007).

Silveira e colaboradores (2006) complementam que a resistência bacteriana a antibióticos e agentes quimioterápicos causa importantes restrições ao tratamento destas infecções pois, de acordo com Nicolaou e colaboradores (1999) e Walsh (2000), através da transferência genética, a resistência pode se disseminar rapidamente, atingindo enterococos, estafilococos e estreptococos, ameaçando a população.

De acordo com Varaldo (2002), um teste de resistência *in vitro* a um antimicrobiano, justifica o seu não uso frente a uma infecção, pois quando um teste de suscetibilidade *in vitro* indica que o isolado clínico é resistente ao antimicrobiano, muito provavelmente o tratamento não terá sucesso. Porém, se o teste de suscetibilidade *in vitro* indica que o isolado clínico é sensível e o antimicrobiano é utilizado, não há garantia de que a terapia será promissora, uma vez que os resultados clínicos dependem de outros fatores como, por exemplo, local da infecção, propriedades farmacológicas do antimicrobiano, doenças associadas entre outros). Portanto, testes de suscetibilidade *in vitro* são úteis, mas não decisivos para a prática clínica

Assim sendo, a busca de novos antibióticos e antimicrobianos mais seguros e eficazes representa um avanço para melhorar a qualidade de vida e a participação em um mercado em constante crescimento.

3.2. Síntese da flucloxacilina

Penicilinas semissintéticas são produzidas a partir da benzilpenicilina natural, via rompimento enzimático da cadeia radical, seguida da adição química de um grupo acil e, de maneira geral, possuem espectro de ação estendido em relação às penicilinas G e V (ROLLINSON, 1988; SAMANIDOU et al., 2006).

A primeira penicilina semissintética estável à penicilinase estafilocócica e efetiva clinicamente contra *Staphylococcus aureus* penicilina-resistente foi a meticilina, em 1960. Entretanto, a meticilina apesar de ser ativa contra *S. aureus* resistente, é menos ativa contra espécies de *S. aureus* sensíveis às penicilinas G ou V, em decorrência de sua estabilidade à penicilinase, ou seja, o fato de a meticilina ter pobre afinidade à enzima faz com que ela também possua menor afinidade ao alvo de ação na célula bacteriana. Este fato, associado à pouca absorção oral, conduziu a pesquisas de novos compostos, surgindo a nafcilina e o grupo isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina) (Figura 3.4) (ROLINSON, 1988; ROLINSON, GEDDES, 2007). O membro mais antigo da família das isoxazolilpenicilinas é a oxacilina, seguida da cloxacilina, dicloxacilina e FLU (SUTHERLAND et al., 1970).

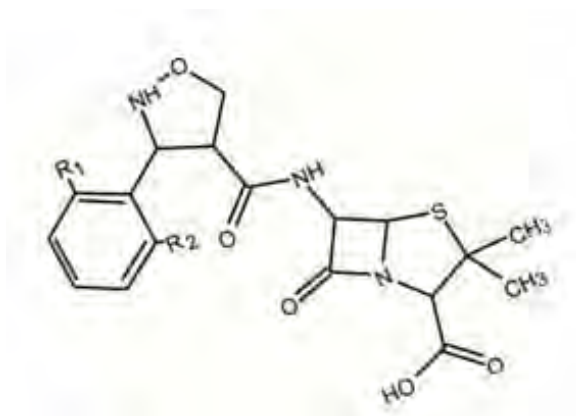


Figura 3.4. Estrutura química das isoxazolidilpenicilinas: $R_1 = R_2 = H$, oxacilina; $R_1 = Cl$, $R_2 = H$, cloxacilina; $R_1 = R_2 = Cl$, dicloxacilina; $R_1 = F$, $R_2 = Cl$, flucloxacilina.

Em 1962 a metilicina foi substituída pela cloxacilina que se mostrou mais ativa e com a possibilidade de administração oral e parenteral. Porém, a cloxacilina também não foi bem absorvida pelo trato gastrointestinal e em 1970 foi substituída pelo seu análogo, FLU, que produz níveis orais e livres maiores entre todas as isoxazolidilpenicilinas. A melhora na absorção oral das isoxazolidilpenicilinas é devido à introdução dos grupos halogênicos na cadeia radical (NUÑEZ-VERGARA et al., 1988; ROLINSON, 1988; ROLINSON, GEDDES, 2007).

A FLU (Figura 3.5) é uma penicilina semissintética classificada como penicilina resistente à penicilinase estafilocócica e possui estreito espectro de ação (CAREY, van PELT, 2005).

Embora a FLU não seja comercializada no Brasil, é prescrita em diversos países europeus, latino-americanos, asiáticos e africanos. Na Austrália e Reino Unido é o agente anti-estafilocócico mais utilizado. Porém, nos Estados Unidos, os agentes anti-estafilocócicos de escolha são nafcilina e oxacilina (CAREY, van PELT, 2005; LANDERSDORFER et al., 2007).

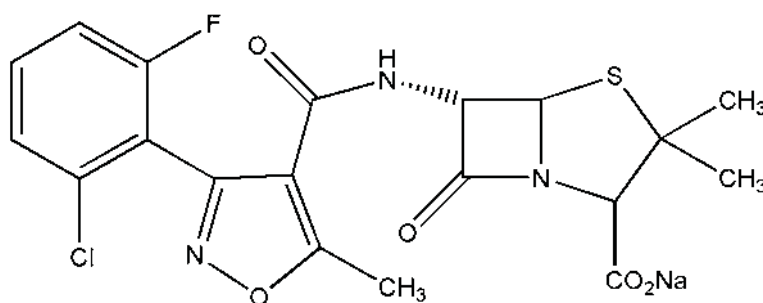


Figura 3.5. Estrutura química da flucloxacilina sódica.

3.3. Mecanismo de ação das penicilinas

As penicilinas possuem ação bactericida por inibir a biossíntese da parede celular bacteriana, interferindo na formação do peptidoglicano, através de um mecanismo que envolve: (a) ligação do anel β -lactâmico às proteínas receptoras das penicilinas (PBPs), uma vez que as penicilinas são parecidas com a alanina terminal do peptidoglicano e age como um substrato para PBPs; (b) inibição da síntese da parede celular, como resultado da ligação à PBPs, pois desta maneira, há inibição da enzima de transpeptidação que faz a ligação cruzada das cadeias peptídicas do peptidoglicano e o componente necessário para a integridade da parede celular não é produzido, uma vez que as PBPs não estão disponíveis para catalisar a ligação cruzada; (c) morte celular devido à lise bacteriana induzida pela inativação do inibidor da enzima autolítica presente na parede celular (PAGE et al., 1999; KADURINA et al., 2003; PETRI Jr, 2006; SILVA, 2006; SAMANIDOU et al., 2006; ALY, AMIN, 2007; RANG et al., 2007).

O peptidoglicano é um heteropolímero formado por grandes cadeias de polissacarídeos e peptídeos e é responsável pela rigidez e forma da parede celular bacteriana, além de fornecer proteção à osmólise quando em meio hipotônico, portanto, quando sua formação é inibida, a bactéria perde sua defesa natural (SILVEIRA et al., 2006).

3.4. Resistência e sensibilização às penicilinas

As penicilinas podem causar alergia e provocar multirresistência bacteriana e, por isso, seu uso é estritamente regulamentado por autoridades da indústria farmacêutica (TAKADA et al., 2005).

Os principais efeitos adversos das penicilinas são reações de hipersensibilidade causadas pelos seus produtos de degradação, que se combinam às proteínas plasmáticas e teciduais do hospedeiro e se tornam antigênicos (RANG et al., 2007). A instabilidade do anel β -lactâmico é responsável pela sua abertura permitindo que o grupo carbonil forme ligações amídicas com os resíduos de grupos amino da lisina em proteínas adjacentes e o determinante antigênico benzil peniciloil (determinante maior da penicilina) é formado. Também são formados componentes menores da penicilina que podem induzir respostas IgE-mediadas participando de reações anafiláticas. Os determinantes menores são: benzil penicilina, benzil peniciloato (hidrólise alcalina) e benzil peniloato (hidrólise ácida). Em virtude de a cadeia lateral das diferentes penicilinas também induzir a produção de anticorpos IgE, que são clinicamente significativos, as penicilinas podem apresentar reatividade cruzada, não somente devido aos seus anéis β -lactâmico e tiazolidínico, mas também pelos determinantes comuns ou semelhantes na estrutura química da cadeia lateral (GELLER et al., 2006).

As penicilinas eram efetivas contra todos os tipos de infecções causadas por bactérias Gram-positivas (estafilococos e estreptococos), porém, algumas espécies de estafilococos resistentes surgiram imediatamente após a introdução da penicilina em 1947 e, nos últimos anos mais de 80% das espécies de *S. aureus* são resistentes (SAMANIDOU et al., 2006), demonstrando a necessidade da busca constante por novos produtos antibacterianos.

As bactérias tornam-se resistentes às penicilinas através dos seguintes mecanismos, decorrentes do modo de ação destes antibióticos: (a) inativação enzimática pelas β -lactamases biossintetizadas pelas bactérias; (b) redução da permeabilidade da parede celular bacteriana às penicilinas, e dessa maneira, não conseguem chegar ao alvo de ligação, representados por proteínas específicas; (c) alterações conformacionais nas proteínas de ligação das penicilinas, bloqueando a ação antimicrobiana e (d) aparecimento da tolerância através do desenvolvimento de proteínas de ligação das penicilinas de alto peso molecular com afinidade diminuída pelo antimicrobiano. Estas proteínas são adquiridas por recombinação homóloga entre os genes das proteínas de ligação das penicilinas de diferentes espécies bacterianas (PETRI Jr, 2006; SILVA, 2006).

Midtvedt (2010) complementa que o mecanismo mais eficaz de resistência aos antibióticos β -lactâmicos é a expressão das β -lactamases. Estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico utilizando uma serina residual (como as classes A, C e D β -lactamases) ou uma molécula de zinco (classe B, também chamada de metalo- β -lactamases, MBLs).

Há diversos tipos de β -lactamases produzidas por diferentes micro-organismos, por exemplo, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Bacterioides*, além de *E. coli*, espécies de *Proteus*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* e *N. gonorrhoeae*. β -lactamases produzidas por estafilococos são exoenzimas com afinidade principalmente para as penicilinas, já as β -lactamases de espécies Gram-negativas são capazes de destruir penicilinas e/ou cefalosporinas (STERNBACH, VARON, 1992).

Em virtude do surgimento de bactérias resistentes, a necessidade de novas substâncias capazes de inibir, em concentrações baixas, o desenvolvimento bacteriano de uma ou mais espécies de micro-organismos resistentes, tem levado a uma intensa busca de agentes antimicrobianos de origem natural, semissintética ou sintética cada vez mais eficientes (SILVEIRA et al., 2006).

3.5. Mecanismo de ação e indicações da flucloxacilina

A FLU possui mecanismo de ação por interferir na biossíntese do peptidoglicano que é formado por cadeias dissacarídicas unidas por cadeias peptídicas. A FLU, assim como os demais β -lactâmicos, inibe as transpeptidases (enzimas responsáveis pela

clivagem da D-alanina terminal das cadeias peptídicas) impedindo as ligações cruzadas entre as cadeias vizinhas e então, o peptideoglicano não se forma e o resultado é a morte da bactéria (LIU et al., 2005; SILVA, 2006).

A presença do grupo isoxazolil na cadeia radical do núcleo penicilânico facilita a resistência à β -lactamase, porque as isoxazolilpenicilinas são relativamente intolerantes ao impedimento estérico da cadeia radical (SAMANIDOU et al., 2006).

A FLU é utilizada em infecções causadas por estafilococos resistentes à benzilpenicilina, ou seja, produtores de β -lactamase ou penicilinase, como *S. aureus*; contra estafilococos e estreptococos não produtores de penicilinas; contra *Streptococcus pyogenes* a FLU é menos ativa que a benzilpenicilina, mas é útil quando este micro-organismo está associado aos estafilococos penicilina-resistentes. Entretanto, a FLU não é ativa contra MRSA e *Enterococcus faecalis*, mas é ativa contra *S. aureus* sensível à meticilina (*Methicillin sensitive Staphylococcus aureus* - MSSA) (LANDERSDORFER et al., 2007; MARTINDALE, 2009). A FLU, de maneira geral, é inativa contra micro-organismos Gram-negativos (SUTHERLAND et al., 1970) como pode ser visto na Tabela 3.1.

A FLU é tipicamente prescrita para tratamento de infecções de articulações, pele, tecidos moles, trato respiratório, síndrome do choque tóxico, endocardite e osteomielite. O uso de FLU tem sido preferível ao uso de glicopeptídeos contra MSSA para controlar o desenvolvimento de resistência à vancomicina. Também pode ser administrada associada a outros antimicrobianos, como amoxicilina, para aumentar o espectro de atividade; ácido fusídico para infecções estafilocócicas graves causadas por micro-organismos resistentes à penicilina e em osteomielite, uma vez que se concentra nos ossos (LIU et al., 2005; LANDERSDORFER et al., 2007; MARTINDALE, 2009).

A bula de Floxapen[®], medicamento utilizado neste trabalho, salienta que a FLU cápsula é indicada para tratamento de infecções do trato respiratório, como garganta e nariz (amidalite, faringite, inflamações dos seios paranasais), infecções de ouvido, das vias urinárias, cutâneas e feridas infeccionadas (Floxapen, 2009).

Ball (1982) indica FLU para infecção pós-operatória, quando a infecção da ferida cirúrgica for causada por estafilococos, entretanto, se enterobactérias aeróbicas resistentes, como *Proteus* spp. e bactérias anaeróbicas como *B. fragilis*, estiverem presentes, será necessário incluir outro antimicrobiano à terapia. Este autor também indica FLU para tratamento de septicemia causada por estafilococos penicilinas-resistentes e para endocardite causada por *S. aureus* ou *S. epidermidis*. O início do tratamento deve incluir FLU juntamente com o ácido fusídico. Esta associação é muito utilizada no Reino Unido.

O uso de FLU resulta em morte bacteriana mais rápida contra MSSA. Este antimicrobiano possui toxicidade menor que a vancomicina, portanto, é a opção preferida

para o tratamento de infecções severas causadas por bactérias não resistentes. Geralmente, não há necessidade de monitoração dos níveis deste fármaco em fluidos corpóreos durante seu uso. Além desta vantagem, a FLU apresenta custo inferior de administração de infusão contínua em relação ao mesmo modo de administração da vancomicina (LEDER et al., 1999; ULLDEMOLINS et al., 2010).

3.6. Farmacocinética e farmacodinâmica da flucloxacilina

Enquanto a farmacocinética descreve a absorção, distribuição, metabolismo e excreção, a farmacodinâmica se relaciona com a concentração-efeito bactericida, efeitos causados após a administração e estudos em animais, *in vitro* e em humanos (WISE, 2003).

A FLU pode ser administrada por via oral, intramuscular, endovenosa, intrapleural, intra-articular e por nebulização para adultos, crianças e recém-nascidos e a dose difere dependendo do patógeno, do tipo de infecção e do paciente (RANG et al., 2007; KADURINA et al., 2003; PULLEN et al., 2007; MARTINDALE, 2009).

A FLU é classificada como antibiótico ácido, uma vez que contém um grupo carboxílico em sua estrutura. O valor de pKa é 2,76, determinado a 37 °C em KCl 0,15 M, por titulação potenciométrica. Este tipo de composto comporta-se como ácido orgânico em solução aquosa (ALEKSEEV, 2010).

Embora a biodisponibilidade de β -lactâmicos não seja 100% uma vez que sua absorção é parcial devido ao metabolismo hepático de primeira ordem (BERGMAN et al., 2007), a absorção da FLU por via gastrintestinal é adequada e melhor que para cloxacilina, porém é reduzida pela presença de alimentos no estômago. A concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) no plasma ocorre cerca de 1 hora após a administração oral ou 30 minutos após administração intramuscular (IM) e é aumentada na presença de probenecida. A meia-vida plasmática deste fármaco é de aproximadamente 1 hora e em recém-nascidos é maior. A FLU é distribuída pelos tecidos, sendo encontrada nos ossos, leite materno, líquido pleural e sinovial; atravessa a placenta e possui pouca difusão no líquido cérebro-espinhal, exceto quando as meninges estão inflamadas (MARTINDALE, 2009).

Apesar de existirem outros parâmetros relevantes para estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, há três que são utilizados com maior frequência, pois podem ser influenciados pela escolha do composto ou pelo regime de dose: a proporção da concentração máxima do antimicrobiano no soro e a concentração inibitória mínima (CIM) ($C_{\text{máx}}/\text{CIM}$); a área sob a curva tempo-concentração do antimicrobiano no soro por 24 horas (AuC/C_{24}) e o tempo em que a concentração do antimicrobiano no soro permanece maior que a CIM ($T > \text{CIM}$) (FRIMODT-MØLLER, 2002; WISE, 2003). Para estes parâmetros, a

relação com a CIM do patógeno é a chave do efeito, mas é importante lembrar que a CIM não é capaz de prever o efeito em todos os casos (FRIMODT-MØLLER, 2002).

Wise (2003), ressalta que para o estudo da CIM frente ao micro-organismo, o antimicrobiano está em concentração constante enquanto que, *in vivo* a concentração do antimicrobiano varia de acordo com suas características farmacocinéticas. Além disso, a CIM não representa a real atividade farmacodinâmica.

A atividade farmacológica da FLU está relacionada com a concentração que excede a CIM do patógeno. Assim sendo, o comportamento farmacocinético-farmacodinâmico é tempo dependente, ou seja, a eficácia da FLU depende do tempo em que a sua concentração livre no plasma (não ligada às proteínas e, portanto, farmacologicamente ativa) excede a CIM ($T > CIM$), e este tempo é o ponto final do efeito farmacodinâmico. Em geral, para medicamentos com este comportamento, a concentração deve ser 4 ou 5 vezes o valor da CIM (LEDER et al., 1999; PULLEN et al., 2006; ZHOU et al., 2007; BERGMAN et al., 2007; McWHINNEY et al., 2010; ULLDEMOLINS et al., 2010).

Para ótima atividade antibacteriana das penicilinas, $T > CIM$ tem sido demonstrado ser 50-60% dos modelos *in vitro* e animais *in vivo*, ou seja, para ótima atividade é necessário que a concentração da penicilina livre no plasma exceda a CIM em pelo menos 50%. Em recém-nascidos, $T > CIM$ deve ser pelo menos 40% (PULLEN et al., 2006; ULLDEMOLINS et al., 2010). Pacifici e colaboradores (2009) complementam que $T > CIM$ para penicilinas deve ser de 30-40% em adultos e 40-50% em recém-nascidos.

Tipicamente, a CIM_{90} de FLU é $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* meticilina sensível (LEDER et al., 1999; LANDERSDORFER et al., 2007) e para *S. aureus* meticilina sensível tipo selvagem, a CIM deve ser 2 mg/L, dados relatados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (ULLDEMOLINS et al., 2010). De acordo com Frank e colaboradores (1988), a CIM para *S. aureus* produtor de penicilinase varia de 0,25-5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Sutherland e colaboradores (1970) apresentam um trabalho comparando a CIM da FLU, cloxacilina e benzilpenicilina para alguns micro-organismos, como pode ser visto na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Concentração inibitória mínima da flucloxacilina, cloxacilina e benzilpenicilina

<i>Micro-organismo</i>	CIM (µg/mL)		
	FLU	CLO	BENZ
<i>Staphylococcus aureus</i> *	0,1 - 0,25	0,1 - 0,25	0,02
<i>Staphylococcus aureus</i> **	0,25 – 0,5	0,25 – 0,5	> 50
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,25	0,25 – 0,5	0,01
<i>Streptococcus faecalis</i>	25,0	25,0	5,0
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5	0,5	0,1
<i>Bacillus anthracis</i>	0,5	0,5	0,05
<i>Sarcina lutea</i>	0,25	0,25	0,005
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,25	1,25	0,05
<i>Clostridium tetani</i>	0,25	0,5	0,02
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,25	0,1	0,02
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	0,1	0,1	0,01
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> **	2,5	2,5	0,1
<i>Neisseria meningitidis</i>	0,1	0,1	0,01
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,0 – 12,5	12,5 – 25,0	0,5
<i>Pastorella séptica</i>	12,5	12,5	0,1
<i>Brucella abortus</i>	5,0	5,0	0,1
<i>Escherichia coli</i>	> 500	> 500	50,0
<i>Salmonella typhi</i>	> 500	500	5,0
<i>Shigella sonnei</i>	> 500	500	12,5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	> 500	> 500	> 500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 500	> 500	> 500
<i>Vibrio cholerae</i>	500	250	1,25

FLU = flucloxacilina; CLO = cloxacilina; BENZ = benzilpenicilina; CIM = concentração inibitória mínima; * sensível à penicilina; ** resistente à penicilina.

A FLU possui alta ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 95%) e quando comparada com a oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina, a relação dos níveis séricos decorrentes de uma dose oral, foi 4:1:2:4, respectivamente, e quando a ligação às proteínas plasmáticas foi levada em consideração, a relação foi 4:1:2:2, respectivamente (SUTHERLAND et al., 1970). Este fato pode estar associado à eliminação renal e extra renal mais lenta da FLU (MURAI et al., 1983).

Em relação à administração por via IM, os níveis séricos e os níveis de FLU não ligada às proteínas, foram superiores quando comparado com oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina (SUTHERLAND et al., 1970).

De acordo com Bodey e colaboradores (1972), a FLU apresenta-se em torno de 93% ligada às proteínas plasmáticas e a sua excreção urinária após dose oral de 500 mg é de 40% e, após dose intramuscular de 250 mg, é de 61%.

Bergan e colaboradores (1986), preocupados com a ligação da FLU às proteínas plasmáticas, avaliaram sua penetração em bolhas de sucção na pele e na linfa periperal, e constataram que, apesar de a FLU ter em torno de apenas 4-5% na forma livre para atravessar o tecido vascular, este produto teve uma penetração tecidual muito boa, refletido na sua concentração nos locais avaliados. Concentração esta, que pode ser comparada àquela demonstrada por outras penicilinas que possuem baixa ligação às proteínas plasmáticas como meticilina (5%), ampicilina (15 %) e amoxicilina (15%).

As penicilinas são ligadas apenas à albumina e mostram um ritmo de eliminação do espaço extravascular mais rápido que a eritromicina, por exemplo. A ligação da FLU à albumina extravascular balanceia a sua alta ligação às proteínas plasmáticas, pois, uma vez que a molécula está livre, é possível atravessar o revestimento vascular e se ligar à proteína extravascular, albumina, e então penetrar o conjunto extravascular de moléculas que agem como ligantes, explicando porque os antibióticos com alta ligação às proteínas plasmáticas podem alcançar altos níveis extravasculares e um ritmo de penetração que excede a maioria dos antibióticos não ligados ao soro (BERGAN et al., 1986).

Embora as penicilinas tenham largo espectro de ação, a ocorrência de espécies bacterianas clinicamente importantes produtoras de β -lactamases, tem limitado o uso destes antibióticos, fazendo muitas vezes ser necessária a associação entre penicilinas ou outros compostos como ácido clavulânico. A FLU pode ser administrada em combinação com a amoxicilina e ácido fusídico, por exemplo, a fim de aumentar seu espectro de ação (LIU et al., 2005).

A dose recomendada para FLU é bastante variável. Herngren e colaboradores (1987) sugerem que para o tratamento de septicemia neonatal causada por *S. aureus*, pode ser administrada uma dose de 50 mg/kg na forma injetável, mas após estudos farmacocinéticos, foi observado que para este tipo de infecção, dose de 50 mg/kg administrados oralmente pode ser uma alternativa à via parenteral. Vargas e colaboradores (2004) sugerem que para cirurgia de revascularização cardiopulmonar em recém-nascidos, uma dose de 30 mg/kg de FLU associada à amoxicilina deve ser administrada no momento da indução da anestesia e em seguida, 30 mg/kg a cada 8 horas, durante as 48 horas que seguem a cirurgia.

Pullen e colaboradores (2006) sugerem que, para recém-nascidos, a dose de FLU deve ser maior e mais frequente no início do tratamento e a infusão contínua seria uma alternativa à administração intermitente pelo fato da FLU ser estável em temperatura ambiente por 24 horas. A dose inicial sugerida pelos autores é de 25 mg/kg/4h e seria reduzida para 10 mg/kg/6h quando estafilococos coagulase negativo são isolados. Zhou e colaboradores (2007) sugerem uma dose oral de FLU de 250 mg/6h para adultos. Landersdorfer e colaboradores (2007) sugerem, para infecções sérias, dose de 8 g/dia, sendo 2 g administrados 3 ou 4 vezes/dia, dose esta recomendada no Reino Unido e Alemanha.

Em 2009, Pacifici e colaboradores apresentaram uma revisão sobre estudos farmacocinéticos realizados em recém-nascidos e recém-nascidos prematuros. Estes autores descrevem que encontraram apenas três estudos farmacocinéticos (HERNGREN et al., 1987; VARGAS et al., 2004; PULLEN et al., 2006), e verificaram que há concordância entre eles em relação à dose de FLU administrada (25-50 mg/kg a cada 8 ou 12 horas). Porém, um grupo holandês discorda argumentando que a dose citada não resulta em concentração plasmática eficaz para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e sugere uma dose inicial de 25 mg/kg a cada 4 horas. Esse tempo de administração também é diferente daquele recomendado pelo Formulário Nacional Britânico para Crianças, para tratamento de recém-nascidos na primeira semana, que é de 12 horas (PACIFICI et al., 2009).

De acordo com o laboratório Actavis Group, a dose de FLU depende da idade, peso, função renal do paciente e da severidade da infecção. Para adultos e jovens é recomendado 250 mg a cada 6 horas. Nos casos de osteomielite e endocardite, a dose recomendada é acima de 8 g/dia, divididos em doses administradas a cada 6 ou 8 horas. Para profilaxia cirúrgica, a dose é 1-2 g por via intravenosa (iv) durante a indução da anestesia, seguida por 500 mg a cada 6 horas por via iv, im ou oral, durante 72 horas. Para crianças abaixo de 2 anos, é indicado ¼ da dose de adultos e, para crianças de 2-10 anos, ½ dose de adulto é recomendada (<http://www.medicines.org.uk>).

Martindale (2009) recomenda dose de FLU por via oral ou im de 250 mg/6h; dose iv de 0,25-1,0 g/6h, por infusão lenta (3-4 minutos), mas toda dose pode ser dobrada em caso de infecções severas, alcançando até 8 g/dia divididos em 3 ou 4 doses em caso de osteomielite. Para endocardite podem ser administrados 8 g/dia, divididos em 4 doses para pacientes com peso de até 85 kg ou 12 g/dia, divididos em 6 doses, caso o paciente tenha mais de 85 kg. Ball (1982) recomenda que celulite causada por *S. aureus* deve ser tratada inicialmente por forma farmacêutica injetável e, depois por via oral e a dose de FLU seria, pelo menos, 500 mg/6h. Para outros tipos de infecções bacterianas, é indicado uma combinação com ácido fusídico em dose de 500 mg/8h.

Leder e colaboradores (1999) adotam como rotina, dose de FLU de 2 g IV a cada 4-6 horas em caso de infecção estafilocócica séria, em adultos. Ritchie e colaboradores (2007) relatam que dose de 8-12 g/dia de FLU administrados por iv em pacientes adultos é efetivo para o tratamento de meningite causada por MSSA.

Outras maneiras de administração da FLU em combinação com a terapia sistêmica são: injeção intra-articular em dose de 250 a 500 mg diariamente, injeção intrapleural em dose diária de 250 mg e inalação por nebulização 4 vezes ao dia em dose de 125 a 250 mg (MARTINDALE, 2009).

Em estudo de farmacocinética realizado por Herngren e colaboradores (1987) que utilizou o método microbiológico por difusão em ágar para avaliar a concentração de FLU no sangue e urina, foi verificado que a meia vida de eliminação da FLU em neonatos, após administração IV, foi maior que em adultos saudáveis e idosos, ou seja, 278, 46-53 e 91 minutos, respectivamente. O *clearance* corporal total por kg foi menor que para adultos saudáveis, ou seja, 0,744 mL/min/kg contra 1,3-1,74 mL/min/kg. Estes resultados podem ser devido à diminuição do *clearance* renal. Entretanto, o *clearance* não renal de recém-nascidos, adultos e idosos foi muito próximo, 0,563, 0,49 e 0,535 mL/min/kg, respectivamente, demonstrando que o fígado dos recém-nascidos tem capacidade similar ao dos adultos. A fração de FLU excretada na urina foi menor que 30%. A distribuição do volume de FLU livre em neonatos foi muito próximo ao de idoso, 1,74 e 1,90 L/kg, respectivamente. Em relação à administração oral, a biodisponibilidade de FLU foi menor que em adultos, mas teve uma boa correlação entre o ritmo de eliminação para administração oral e intravenosa e a meia vida de eliminação foi significativamente menor.

Vargas e colaboradores (2004) realizaram estudo farmacocinético da FLU, por cromatografia líquida de alta eficiência, em bebês com peso inferior a 5 kg durante cirurgia de revascularização cardiopulmonar e verificaram que a meia vida da FLU e o volume de distribuição são aumentados e o *clearance* é diminuído, mas apesar disso a concentração de FLU encontrada no soro e no músculo foi acima da CIM (2 mg/L no soro e 1 mg/kg no músculo, ambos para *S. aureus* meticilina sensível), e, portanto, uma dose de 30 mg/kg administrada por via iv antes da cirurgia é suficiente para assegurar a atividade da FLU.

A FLU é metabolizada pela enzima CYP3A4 e produz três metabólitos conhecidos por ácido peniciloico de flucloxacilina, 5-hidroximetil flucloxacilina e ácido peniciloico de 5-hidroximetil flucloxacilina (sendo que os dois últimos são ativos), encontrados no soro, urina e bile, indicando que são relativamente estáveis e podem atingir locais diferentes de sua produção (THIJSEN, 1980; EVERETT et al., 1989; CAREY, van PELT, 2005).

Os metabólitos ativos das isoxazolilpenicilinas, inclusive da FLU, são formados pela hidroxilação do grupo 5-metil do sistema do anel isoxazol e esta reação provavelmente é

catalisada pela monooxigenase presente principalmente no fígado (THIJSSSEN, 1979). O ácido peniciloico derivado da FLU também pode ser formado por outras maneiras, como por exemplo, ser enzima mediado, ou por causa das condições micro-ambientais no local de sua geração (CAREY, van PELT, 2005).

A FLU e seus metabólitos são eliminados na urina por filtração glomerular e secreção tubular renal (MARTINDALE, 2009), lembrando que a filtração glomerular pode ser baixa devido à alta ligação às proteínas (PULLEN et al., 2006). Aproximadamente 66% da dose oral e 76% da dose parenteral são excretadas na urina em 8 horas e pequenas quantidades são excretadas na bile. A FLU não é removida por hemodiálise ou diálise peritoneal (MARTINDALE, 2009).

Huwyler e colaboradores (2006) complementam que a FLU é excretada na urina predominantemente como substância parente (65% da dose administrada) ou como metabólitos (15% da dose adminstrada).

Pullen e colaboradores (2006) realizaram um estudo para avaliar a farmacocinética e a dose de FLU, e verificaram que a FLU é também eliminada por uma via não renal, ou seja, por via metabólica, corroborando com Huwyler e colaboradores (2006). Cerca de 30-40% do *clearance* plasmático em adultos sadios é por via não renal, sendo que a formação do ácido peniciloico inativo parece ser a principal rota pela qual as penicilinas são metabolizadas, mas outras rotas também existem e metabólitos ativos são formados, porém, em pequenas quantidades (cerca de 10% em adultos).

Os metabólitos ativos da FLU possuem atividade antimicrobiana não muito diferente daquela do composto aparentado, portanto, não é esperado que os metabólitos tenham influência positiva ou negativa no resultado da terapia e, também é improvável que a presença destes metabólitos permitiria uma estimativa incorreta da concentração de FLU no soro ou urina. Além disso, sua formação independe do modo de administração (oral ou endovenosa) (PULLEN et al., 2006; THIJSSSEN, MATTIE, 1976).

3.7. Reações adversas da flucloxacilina

A toxicidade da FLU é baixa. Efeitos adversos incluem diarreia, náusea, brotoeja, urticária, dor e inflamação no local de injeção, superinfecção (incluindo candidíase), alergia, aumento transitório das enzimas hepáticas e bilirrubina (HUWYLER et al., 2006; GUJRAL et al., 2009).

A FLU frequentemente causa injúria hepática severa, caracterizada pela hepatite colestática atrasada, com recuperação lenta, e é associada à formação de dutos no fígado. Os metabólitos ácido peniciloico de FLU e ácido peniciloico de 5-hidroximetil flucloxacilina, são provavelmente os responsáveis pela formação dos dutos no fígado através da

conjugação às proteínas, via abertura do anel β -lactâmico que ocorre facilmente em pH alcalino, mas é muito mais lenta em condições fisiológicas. As diferentes localizações subcelulares dos dutos de FLU sugerem que a ativação ocorre em um local na célula e que o metabólito migra deste local ou, que a ativação ocorre em diversos locais na célula. A conjugação das penicilinas às proteínas através da abertura do anel β -lactâmico ocorre predominantemente no grupo lisina presente nas proteínas (CAREY, van PELT, 2005).

A hepatite colestática parece ser mais comum em mulheres e a incidência aumenta de acordo com a idade do paciente e com o tempo do tratamento. A incidência de injúria no fígado induzida pela FLU tem sido estimada em 8,5 por 100000 novos usuários nos primeiros 45 dias de tratamento, podendo ser severa com mortalidade em torno de 1 em 20 e, em alguns casos pode ser necessário transplante. O mecanismo pelo qual ocorre a injúria hepática não é claro, mas há evidências de fatores imunológicos e metabólicos. Estudos *in vitro* utilizando cultura de hepatócito humano e célula epitelial biliar demonstraram que o metabólito 5-hidroximetil de flucloxacilina, gerado no citocromo P450 3A4 é tóxico à célula epitelial biliar, mas não é tóxico aos hepatócitos, e o composto aparentado não é tóxico até mesmo em altas concentrações para qualquer tipo de célula (ANDREWS et al., 2010).

Em revisão apresentada por Midtvedt (2010), o efeito hepático causado pela FLU está relacionado com genótipo específico HLA-B*5701, porém Daly (2010) complementa que embora haja uma associação entre o dano hepático e o gene HLA-B*5701, ainda não se sabe como em indivíduos com este genótipo podem iniciar a reação de hepatotoxicidade.

Melzer e colaboradores (2000) notificaram o primeiro caso de reação pseudolinfomatosa de pele após o início de tratamento com FLU. Este caso foi bem resolvido após suspensão do medicamento. Hoorn e Zietse (2008) relataram que uma mulher de 67 anos apresentou hipocalcemia após tratamento com FLU e lembra que este efeito adverso tem sido relatado para pacientes que utilizam penicilinas de amplo espectro de ação.

Em 2006, Huwyler e colaboradores relatam a interação entre FLU administrada por via intravenosa e ciclosporina administrada por via oral. Como resultado desta interação, os níveis de ciclosporina caíram para 55% após 3 dias do início da terapia com FLU e retornou ao normal 2 dias após cessar o uso de FLU.

Em estudo para avaliar flebite causada por administração iv de FLU utilizando água estéril para injeção ou solução salina estéril como diluentes, e para comparar a flebite causada por FLU ou cloxacilina, foi verificado que a flebite pode ocorrer independentemente do diluente utilizado e não há diferença estatística entre a flebite causada por FLU ou cloxacilina. Porém, é necessário lembrar que a flebite pode ocorrer quando o tratamento por ambos medicamentos é superior a 2 dias e, é dependente do tamanho da veia utilizada para infusão e do material e do comprimento do cateter utilizado (SVEDHEM et al., 1980).

3.8. Métodos de análise da flucloxacilina

A Farmacopeia Britânica (BP, 1993) descreve a quantificação de FLU sódica matéria-prima e formas farmacêuticas por espectrofotometria em 346 nm utilizando mercúrio-imidazol como reagente. Para FLU sódica (matéria prima), as Farmacopeias Portuguesa (2005) e Europeia (EP, 2011) descrevem análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase móvel acetonitrila: solução tampão fosfato de potássio (25:75), pH 5,0, mas não descrevem metodologia para forma farmacêutica de cápsula. A Farmacopeia Britânica (BP, 2010a; BP, 2010c) descreve esta mesma metodologia para matéria-prima e produtos farmacêuticos, inclusive cápsula.

As Farmacopeias Britânica (BP, 2010a) e Europeia (EP, 2011) apresentam cinco impurezas para a FLU sódica, codificadas por A, B, C, D e E, denominadas de ácido (4S-2-carboxi[3-(2-cloro-6-fluorofenil)-5-metilisoxazolil-4] carbonilamino metil-5,5-dimetiltiazolidino-4-carboxílico; ácido (2RS,4S)-2(3-2-cloro-6-fluorofenil)-5-metilisoxazolil-4 carbonilaminometil-5,5 dimetiltiazolidino-4-carboxílico (ácido peniloico da flucloxacilina); ácido (2S,5R,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0] heptano-2-carboxílico (ácido 6-aminopenicilânico); ácido 3-(2-cloro-6-fluorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxílico; ácido (2S,5R,6R)- 6[[[(2S,5R,6R)-6-[[[3-(2-cloro-6-fluorofenil)-5-metilisoxazolil-4] carbonilamino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0] hepta-2-il] carbonil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2- arboxílico, respectivamente. Entretanto, não foi encontrado na literatura método de análise de impurezas para cápsulas de FLU sódica.

Na literatura há trabalhos utilizando CLAE para detecção de FLU em amostras de fluidos biológicos humanos (BERGAN et al., 1986; HUNG et al., 1988; CHARLES et al., 1994; PULLEN et al., 2006; LANDERSDORFER et al., 2007; ZHOU et al., 2007; PULLEN et al., 2007; McWHINNEY et al., 2010; ULLDEMOLINS et al., 2010). Espectrofotometria também tem sido utilizada para análise de FLU em urina humana (GUJRAL et al., 2009).

Métodos utilizando CLAE para detecção de FLU e seus metabólitos em plasma e urina de humanos (THIJSEN, 1980; MURAI et al., 1983) e urina de ratos foram descritos (EVERETT et al., 1989). Thijssen (1979) identificou os metabólitos ativos das isoxazolilpenicilinas, por espectrofotometria de massas em urina de ratos.

Métodos microbiológicos foram descritos para quantificação de FLU em soro humano (BODEY et al., 1972; LEDER et al., 1999), soro de rato (ENTENZA et al., 1997), soro, tecido cardíaco, subcutâneo e muscular (FRANK et al., 1988) e método microbiológico e cromatografia em camada delgada para avaliar a atividade da FLU e seus metabólitos em soro e urina humanos (THIJSEN, MATTIE, 1976).

Para análise de FLU matéria-prima, Yasuda e Shimada (1971) descrevem um método espectrofotométrico semelhante àquele descrito na Farmacopeia Britânica (BP,

1968), porém os autores relataram que o método apresentado possui tempo de aquecimento para reação química menor e sensibilidade maior do que aquele apresentado pelo compêndio. Squella e colaboradores (1981) analisaram a FLU por polarografia e obtiveram boa seletividade, reprodutibilidade e facilidade na preparação das amostras, porém, o tempo de preparo foi longo, pois as amostras foram degradadas por três horas.

Métodos analíticos espectrofotométricos na região do visível para determinação de FLU em preparações farmacêuticas foram encontrados (AMIN, 2001; MOHAMED, 2001; AL-GHANNAM, 2002; EL-MAMMLI, 2003; EL DIEN et al., 2006; REFAT, EL-DIDAMONY, 2006; MOHAMED et al., 2006; ALY, AMIN, 2007), entretanto, de modo geral, estes métodos são trabalhosos e lentos pois, necessitam de tempo para ocorrer a reação e extração do complexo formado, além de serem dispendiosos e fornecerem grande volume de resíduo. Van Opstal e colaboradores (1990) analisaram cápsulas de FLU por injeção de fluxo.

Métodos analíticos cromatográficos também são encontrados na literatura para análise de FLU em preparações farmacêuticas, nos quais ou a FLU está sozinha (GROVER et al., 1998) ou associada a outra penicilina (LIU et al., 2005; NIKAM et al., 2009). A CLAE associada à segunda derivada também é apresentada para analisar FLU associada à amoxicilina (EL-GINDY et al., 2004). A CLAE com espectrofotometria de massas é apresentada para avaliar FLU como contaminante de medicamento antifúngico (TAKADA et al., 2005). Estes métodos utilizam acetonitrila e solução tampão em suas fases móveis.

Para verificar a estabilidade de FLU após radiação, Jacobs (1979) utilizou ponto de fusão, ensaio microbiológico, teste de esterilidade, rotação óptica, titulação, ensaio espectrofotométrico e RMN e, observou que não houve alteração da FLU em nenhum dos ensaios realizados. Jacobs e colaboradores (1986) também analisaram FLU por CLAE após radiação γ para sua esterilização e verificaram que ela se mantém estável. Estes autores relatam que o método apresentado é mais exato que métodos microbiológicos e ensaios químicos (iodométrico ou hidrólise), uma vez que estes métodos refletem apenas alguma modificação ocorrida no anel β -lactâmico e não são sensíveis às mudanças em outro local da molécula, tal como, a remoção do substituinte 6-amino. Além disso, a rotação óptica ou espectrofotometria no UV indicariam apenas uma mudança muito específica no produto, enquanto que a CLAE seria mais adequada por separar os produtos irradiados do composto aparentado antes da detecção por UV e então, qualquer razoável mudança estrutural acima do limiar de sensibilidade do detector seria discernida.

Existem diversos trabalhos descritos na literatura para análise de FLU sódica como pode ser observado e estão apresentados nas Tabelas 3.2 a 3.7, porém poucos deles são destinados à análise de FLU sódica na forma farmacêutica cápsulas, apesar da Farmacopeia Britânica (BP, 2010c) apresentar metodologia para esta finalidade.

Tabela 3.2. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica

Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Condição	Faixa	Referência
VIS	400	Sulfato de cobre	-	5,0-30 $\mu\text{g/mL}$	Yasuda, Shimada (1971)
Polarografia	-	Água	Eletrodo de mercúrio, fios de platina contra o eletrodo	10^{-4} - 10^{-2} M	Squella et al. (1981)
VIS	346	Mercurio-imidazol	-	-	BP (1993)
CLAE-FR	225	ACN:sol. TF 2,7 g/L, pH 5,0 (25:75)	Gel de sílica C ₁₈ , 5 μm	-	Farm. Portuguesa (2005)
CLAE-FR	225	ACN:sol. TF 2,7 g/L, pH 5,0 (25:75)	Gel de sílica C ₁₈ , 5 μm	-	BP (2010a)
CLAE-FR	225	ACN:sol. TF 2,7 g/L, pH 5,0 (25:75)	Gel de sílica C ₁₈ , 5 μm	-	EP (2011)

VIS = espectrofotometria na região do visível; CLAE-FR = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa; sol. TF = solução tampão fosfato.

Tabela 3.3. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em fluidos biológicos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Referência
Soro, linfa, bolha na pele e urina	CLAE- FR	220	Metanol:sol. TF 0,04 M, pH 7,0 (45:55)	Spheriosorb C ₁₈ , (250 mm), 5 μ m, com pré coluna Spheriosorb C ₁₈ (75 mm), 5 μ m	Bergan et al. (1986)
Plasma	CLAE- FR	220	ACN:água (40:60), com sol. TF 10 mM, pH 2,0	Hypersil ODS (100 x 2 mm), 5 μ m	Hung et al. (1988)
Plasma	CLAE- FR	220	ACN:sol. TF 0,01 M pH 7,0 (18:82)	Brownlee RP ₁₈ VeloSep (400 x 3,2 mm), 3,0 μ m	Charles et al. (1994)
Soro	CLAE	230	ND	ND	Leder et al. (1999)
Plasma de recém-nascido	CLAE- FR	220	Perclorato de sódio 0,02 M: ACN (750:250)	C ₈ (250 x 4,6 mm), 5 μ m, combinada	Pullen et al. (2006)
Plasma de recém-nascido	CLAE- FR	220	Perclorato de sódio 0,02 M: ACN (750:250)	C ₈ (250 x 4,6 mm), 5 μ m	Pullen et al. (2007)
Plasma	CLAE- FR	220	ACN:sol. TF 10 mM (64,5:35,5)	Alltima ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm), 5 μ m, com pré- coluna ODS C ₁₈ (4 x 3 mm)	Zhou et al. (2007)
Plasma e urina	CLAE- FR	220	sol. TF pH 6,2: ACN	Coluna de fase reversa	Landersdorfer et al. (2007)
Urina humana	VIS	362	iodo	-	Gujral et al. (2009)

Tabela 3.3. cont. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em fluidos biológicos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Referência
Plasma	CLAE-FR	210	ACN: sol. TF 100 mM pH 3,0 (75: 25)	Waters X-Bridge C ₁₈ (300 x 4,6 mm), 2,5 μ m	McWhinney et al. (2010)
Plasma e urina	CLAE-FR	220	ACN: sol. TF pH 3,0 (25:75)	Waters X Bridge C ₁₈ (300 x 4,6 mm), 2,5 μ m	Ulldemolins et al. (2010)

VIS = espectrofotometria na região do visível; CLAE-FR = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa; ND = não definida; sol. TF = solução tampão fosfato; ACN = acetonitrila.

Tabela 3.4. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica e seus metabólitos em fluidos biológicos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Referência
Urina de rato	Massas (corrente de 50 μ A)		ND	ND	Thijssen (1979)
Plasma, soro e urina	CLAE-FR	220	Acetato de amônio 0,02 M, pH 6,6: ACN (100 : 34)	LiChrosorb RP-8 (250 x 4,6 mm), 5 μ m, combinada com ODS (500 x 2,1 mm)	Thijssen (1980)
Urina	CLAE-FR	254	Solução aquosa de TBAB 5 mM + 1/120 M Na_2HPO_4 + 1/120 M KH_2PO_4 : ACN (3:1), pH 7,48 gás hélio	LiChrosorb RP-18 (250 x 4,6 mm)	Murai et al. (1983)
	GC-MS			GC: 1,5% OV-17% revestido em Chromosorb W (100 – 120 mesh) (100 x 2 mm)	
Urina de rato	RMN COSY		Frequência da ressonância: H NMR: 13 - 400 MHz F NMR: 50 - 376 MHz	-	Everett et al. (1989)

CLAE-FR = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa; RMN = ressonância magnética nuclear; ND = não definida; GC – MS = cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas.

Tabela 3.5. Métodos microbiológicos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica

Amostra	Método	Micro-organismo	Concentração encontrada/ativa	Referência
Soro	Difusão em ágar	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	após 250 mg: 5,7 µg/mL após 500 mg: 11,4 µg/mL	Bodey et al. (1972)
Metabólito da FLU em urina e soro de rato	Difusão em ágar	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	1,0 µg/mL (<i>S. lutea</i> foi suscetível)	Thijssen, Mattie (1976)
Soro (a), tecido subcutâneo (b), músculo (c) e tecido da válvula do coração (d), coletadas no tempo 0-12h	Difusão em ágar	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	(a) 125,2 - 4,4 µg/mL (b) 14,7 - ≤ 0,2 µg/mL (c) 14,2 - ≤ 0,2 µg/mL (d) 15,4 - 3,7 µg/mL	Frank et al. (1988)
Soro de rato	Difusão em ágar	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	123,6 mg/L após 1h de administração 17,4 mg/L após 6h de administração	Entenza et al. (1997)
Soro	Difusão em ágar	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	27 mg/L, após dose de 12 g/dia	Leder et al. (1999)

Tabela 3.6. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em produtos farmacêuticos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Faixa	Referência
Cápsula	Injeção de fluxo	590	Iodo/amido/carreador (sol. TF 0,2 M, pH 6,5 (1:1:3))	ND	0,1-0,5 mM	Van Opstal et al. (1990)
Matéria prima	CLAE-FR	220 e 240	ACN: Na ₂ HPO ₄ mM e (CH ₃) ₄ NCI 10 mM (em água), pH 5,0	Phenomenex	5,0–150 µg/mL	Grover et al. (1998)
				Resolve C ₁₈ (300 x 3,9 mm), 5 µm		
Cápsula	VIS	467	tiocianato de molibidênio (complexo binário)	-	4,0-75 µg/mL	Mohamed (2001)
Cápsula, xarope e associação amoxicilina	VIS	641	Violeta de pirocatecol		0,2-44 µg/mL	Amin (2001)
Cápsula	VIS	460 (DDQ) e 840 (TCNQ)	DDQ	-	10-80 µg/mL (DDQ) e 5-35 µg/mL (TCNQ)	AL-Ghannam (2002)
			TCNQ			
Pó para injetável, xarope e cápsula	VIS	446 (I), 435 (II), 442 (III), 473 (IV), 439 (V)	p-nitrofenol (I), 2,4 dinitrofenol (II), 3,5 ácido dinitrosalicílico (III), ácido picrâmico (IV), ácido pícrico (V)	-	2,0-28 (I); 2,0-24 (II); 2,0-26 (III); 2,0-30 (IV) 2,0-40 (V) µg/mL	El-Mammli (2003)

Tabela 3.6. cont. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em produtos farmacêuticos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Faixa	Referência
Flucamox (cápsula com 250 mg de amox e 250 mg de FLU	CLAE 2ª derivada	232 210-300	ACN: solução aquosa 5 mM do sal sódico do ácido heptano sulfônico pH 4,2 (35:65) Hidróxido de sódio 0,1 M	TSK-Gel ODS- 80 TM (150 x 4,6 mm), 5 µm	8,0 – 20 µg/mL 8,0 – 20 µg/mL	EL-Gindy et al. (2004)
Medicamento antifúngico contaminado com FLU	CLAE MS/MS (triplo quadrupolo)	 ND	A: água: ACN: TFA (1000:20:1) B: ACN: água: TFA (800:200:1) Zero ar como nebulizador de gás e nitrogênio como cortina de gás	YMC Pack NH2 (100 x 5 mm), 5 µm YMC Pack ODS AM (150 x 2 mm), 5 µm	0,03 – 0,09 ng/mL	Takada et al. (2005)
FLU associada à amox em preparação injetável	CLAE trocador de íons	225	Diidrogênio fosfato de amônio 0,025 M (pH 2,6): ACN (95:5)	Zorbax 300 SCX (250 x 4,6 mm), 5 µm	50-150 µg/mL	Liu et al. (2005)
Cápsula	VIS	520 (I); 450 (II); 455 (III); 842 (IV)	Ácido cloranílico (I); dicloroquinona 4 cloroimida (II); 2,3 dicloro 5,6 diciano- p-benzoquinona (III); TCNQ (IV)	-	0,12-0,4 (I); 0,24-0,8 (II); 0,04-0,4 (III); 0,016-0,064 (IV) mg/mL	Refat, El- Didamony (2006)

Tabela 3.6. cont. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em produtos farmacêuticos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Faixa	Referência
Cápsula	VIS	842 (I) 415(II)	TCNQ (I) e tetracianoetileno (II)	ND	4,0-180 (I) 4,0-70 (II) µg/mL	EL Dien et al. (2006)
Cápsula	VIS	460 (I) 522 (II)	2,3 dicloro 5,6 diciano- <i>p</i> benzoquinona (I) e iodato de potássio (II)	ND	2,0-450 (I) e 50- 550 (II) µg/mL	Mohamed et al. (2006)
Cápsula, xarope, pó para injetável e associação com amox	VIS	566	Sudan III	Tamanho de partícula de 0,1 mm, Sn(IV) Sb (separar os fármacos)	0,4-25 µg/mL	Aly, Amin (2007)
Cápsula com FLU e amox	CLAE-FR	225	NA ₂ HPO ₄ 0,020 M: ACN (75:25)	Kromasil C ₁₈ (250 x 4,6 mm), 5 µm	2,5-20 µg/mL	Nikam et al. (2009)
Cápsula, solução injetável	VIS	346	Mercurio-imidazol	ND	ND	BP (1993)

Tabela 3.6. cont. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica em produtos farmacêuticos

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Coluna	Faixa	Referência
Cápsula, solução injetável	CLAE	225	ACN: sol. TF (0,27%), pH 5,0 (25:75)	Hypersil ODS (250 x 4,6 mm), 5 μ m	ND	BP (2010 c)

Amox = amoxicilina; VIS = espectrofotometria na região do visível; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; CLAE-FR = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa; Na_2HPO_4 = diidrogênio fosfato de potássio; $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ = cloreto de tetrametilamonio; DDQ = 2,2-8,8 dicloro-5,5-diciano-*p*-benzoquinona; TCNQ = 7,7,8,8- tetracianoquinodimetano; ND = não definida; sol. TF = solução tampão fosfato; ACN = acetonitrila

Tabela 3.7. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica para após sua esterilização

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Fase estacionária	Referência
Pó submetido à radiação γ	Ponto de fusão	-	-	-	Jacobs
	UV	-	Água	-	(1979)
	Rotação óptica específica	-	-	-	
	Titulação de retorno do excesso de álcali	-	-	-	
	VIS	-	-	-	
	CCD	-	-	-	
	RMN	Luz UV	Mercapto mercúrio	Placa de sílica gel Polygram	
		254	Metanol: acetona (50:50)	Sil N-HR/UV ²⁵⁴	
			D ₂ O (solvente) com 3-trimetil-silil-ácido propiônico		
	Ensaio microbiológico		-	-	
	Teste de esterilidade		-		

Tabela 3.7. cont. Métodos descritos na literatura para análise de flucloxacilina sódica para após sua esterilização

Amostra	Método	λ (nm)	Fase móvel ou solvente	Fase estacionária	Referência
Pó submetido à radiação γ a 18,8 °C	CLAE-FR	220	Solução aquosa de metanol a 42, 35 ou 28% contendo 0,01% de bicarbonato de sódio	Partisil PXS 10/25 C ₁₈	Jacobs et al. (1986)

UV = espectrofotometria na região do ultravioleta; VIS = espectrofotometria na região do visível; CCD = cromatografia em camada delgada; RMN = ressonância magnética nuclear; CLAE-FR = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

3.9. Controle de qualidade para medicamentos

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos requer identificação e quantificação da substância ativa e suas impurezas para segurança e eficácias destes produtos. As impurezas e os produtos de degradação provavelmente presentes nos medicamentos podem causar alterações químicas, farmacológicas e toxicológicas. Desse modo, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos é de extrema importância (LA ROCA et al., 2007; CAZEDEY et al., 2011).

A validação dos métodos analíticos demonstra que o método é adequado para a proposta pretendida e é seguro ao ser executado (ICH, 2005), sendo os procedimentos incluídos nas normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, e aplicadas nas indústrias farmacêuticas, devendo ocorrer conforme as boas práticas de laboratório (BPL) (SHABIR, 2003). Silva e colaboradores (2009) complementam que estudos de estresse e o desenvolvimento de método analítico para identificação e quantificação dos produtos de degradação são de extrema importância para as indústrias farmacêuticas, pois, no momento do registro, pós-registro e renovação, o estudo de estresse acompanhado de sua análise crítica deverá ser levado em consideração.

É reconhecido internacionalmente que um laboratório de análise deve originar dados apropriados de medidas e deve ser capaz de fornecer dados de qualidade requeridos. Tais medidas incluem rastreabilidade das análises, uso de métodos validados, uso de procedimentos de controle de qualidade definidos internamente e ser acreditado por padrões internacionais, normalmente ISO/IEC 17025 (SOUZA, JUNQUEIRA, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, na qual apresenta aspectos relacionados à validação de métodos analíticos. Especificidade, linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez e limites de quantificação e de detecção são ensaios necessários para validação de um método analítico (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2011). Além disto, a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional devem também ser considerados (LA ROCA et al., 2007).

Os atributos do método analítico ou parâmetros de validação estão descritos em diversas publicações e requerem análises estatísticas para garantir que o método atenda às exigências desejadas (BRUCE et al., 1998; ERMER, 2000; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; LA ROCA et al., 2007).

O desenvolvimento de métodos que permitem quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é essencial para o controle de qualidade destes produtos, tanto

no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional quanto em farmácias magistrais públicas e privadas.

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para determinação do teor de substância ativa, estudo das características físicas e químicas do fármaco, estudos de estabilidade e de dissolução, é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final, e, conseqüentemente, confirmar a qualidade do medicamento comercializado. Apesar da comprovada eficácia e segurança no seu uso, a FLU, até o momento, possui apenas uma metodologia de análise padronizada em compêndio oficial. Este fato justifica novas pesquisas para nova padronização de métodos analíticos e validação dos métodos desenvolvidos, bem como a análise químico-farmacêutica de cápsulas de FLU sódica, estudos de estabilidade e de dissolução.

3.10. Justificativa

A fim de otimizar a metodologia por CLAE descrita na Farmacopeia Britânica (BP, 2010c) para este medicamento e nas Farmacopeias Portuguesa (2005), Britânica (BP, 2010a) e Europeia (EP, 2011) para o fármaco, e também por terem sido encontrados poucos artigos para determinação quantitativa da FLU em cápsulas, este trabalho preocupou-se com o desenvolvimento e validação de diversos métodos de análise de FLU sódica no medicamento, entre eles, o método cromatográfico e eletroforético indicativos de estabilidade.

Além disso, em virtude de não ter sido encontrado na literatura artigos para doseamento microbiológico para determinação da potência da FLU sódica nas cápsulas e, artigos para ensaio de dissolução, este trabalho também teve como finalidade desenvolver e validar ensaios de doseamento microbiológico e ensaio de dissolução para cápsulas de FLU sódica.

Poucos artigos relacionados com a estabilidade da FLU foram encontrados na literatura, portanto, estudos de estabilidade também foram realizados a fim de se conhecer produtos de degradação originados em diferentes condições às quais a FLU foi submetida.

4. ANÁLISE QUALITATIVA

4.1. Descrição

4.1.1. Descrição geral

Nomes: Flucloxacillin (Denominação Comum Internacional - DCI), Flucloxacilina (Denominação Comum Brasileira).

Nomes genéricos: Flucloxacillin sodium, Flucloxacilina sódica.

Nome químico da flucloxacilina sódica: (2S,5R,6R)-6-[3-(2-cloro-6-fluorofenil)- 5-metilisoxazol-4-carbonilamino]- 3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1- azabicyclo (3.2.0) heptano-2-carboxilato sódico.

Nomes: Flucloxacilina sódica, Flucloxacilline sodique, Flucloxacillinum natricum, Flucloxacillinum natricum monohydricum, Flukloksacilino natrio druska, Flukloksasilin sodyum, Flukloksasillinatrium, Flukloxacin sodná sul monohydrát, Flukloxacillinnatrium, Flukloxacillin-nátrium, Natrii Flucloxacillinum (MARTINDALE, 2009).

Nomes comerciais:

- ✓ África do Sul: Floxapen[®].
- ✓ Alemanha: Fluclox[®], Flucloxtat[®], Staphylex[®].
- ✓ Austrália: Floxapen[®], Flopen[®], Floxsig[®], Flubiclox[®], Flucil[®], Staphylex[®].
- ✓ Áustria: Floxapen[®].
- ✓ Bélgica: Floxapen[®], Staphycid[®].
- ✓ Chile: Fluxacina[®], Vitalpen[®].
- ✓ Dinamarca: Heracillin[®].
- ✓ Filipinas: Stafloxin[®].
- ✓ Holanda: Floxapen[®], Stafoxil[®].
- ✓ Hong Kong: Flucloxil[®].
- ✓ Índia: Floxapen[®].
- ✓ Indonésia: Floxapen[®].
- ✓ Irlanda: Floxapen[®], Flucillin[®], Fluclon[®], Geriflox[®].
- ✓ Itália: Betabiotic[®], Cloxillin[®], Evercid[®], Faifloc[®], Fareclox[®], Flucacid[®], Flucef[®], Flucinal[®], Fluclox[®], Fluxacil[®], Fluzerit[®], Liderclox[®], Nepenic[®], Pantaflux[®], Recaflux[®].
- ✓ Malásia: Staplex[®].
- ✓ México: Floxapen[®].
- ✓ Nova Zelândia: Floxapen[®], Flucloxin[®], Staplex[®].
- ✓ Portugal: Floxapen[®], Floxil[®].
- ✓ Reino Unido: Floxapen[®], Fluclomix[®], Ladropen[®].
- ✓ Singapura: Staphlex[®].
- ✓ Suécia: Heracillin[®].

- ✓ Suíça: Floxapen®.
- ✓ Tailândia: Staphycid®.
- ✓ Turquia: Flix®, Floksin®.
- ✓ Venezuela: Floxapen® (MARTINDALE, 2009).

Nomes comerciais de medicamentos associados contendo flucloxacilina sódica:

- ✓ África do Sul: Macropen®, Megapen® (flucloxacilina associada à amoxicilina).
- ✓ Alemanha: Flanamox® (flucloxacilina associada à amoxicilina).
- ✓ Reino Unido: Magnapen®, Co-fluampicil® (flucloxacilina associada à ampicilina) (MARTINDALE, 2009).

Chemical Abstracts Service (CAS): 1847-24-1

Denominação Comum Brasileira (DCB): 04108

Código ATC (Anatomical Therapeutic Chemical Code): J01CF05

Código ATC Vet: QJ01CF05

Categoria: antimicrobiano da classe das penicilinas semissintéticas (derivada de um produto de fermentação), pertencente ao grupo das isoxazolilpenicilinas.

Fórmula química: $C_{19}H_{16}ClFN_3NaO_5S \cdot H_2O$.

Massa molecular: 493,9.

Composição percentual de flucloxacilina: C 50,28%; H 3,78%; Cl 7,81%; F 4,19%; N 9,26%; O 17,63%; S 7,06% (O'NEIL, 2006).

Valor de pKa da FLU sódica: 2,76.

Titular da autorização de introdução no mercado: Actavis Group PTC.

Número da autorização de introdução no mercado: 8378703 (registro de blíster com 16 cápsulas de 500 mg) e 466688 (registro blíster com 24 cápsulas de 500 mg).

Data da autorização para entrada no mercado: 16-11-1975.

Data de revisão: 16-03-2000.

Data da última renovação: 16-03-2005.

Descrição física: pó branco ou quase branco, inodoro, cristalino, livremente solúvel em água e metanol, solúvel em etanol (96%), solução a 10% em água possui pH de 5,0 a 7,0 (SUTHERLAND et al., 1970; MARTINDALE, 2009; BP, 2010a; EP, 2011).

4.1.2. Substância química de referência

Foi utilizado flucloxacilina sódica substância química de referência (FLU-SQR), com teor assegurado de 90% e identificado pelo lote BN 20. Este produto foi gentilmente doado pelo laboratório GlaxoSmithKline® (Inglaterra).

4.1.3. Forma farmacêutica

As amostras desta pesquisa foram cápsulas com teor rotulado de 500 mg de flucloxacilina sódica, com nome comercial de FloxapenTM, identificado pelos lotes 344186 e L2248110, produzidas pelo laboratório Actavis GroupTM e adquiridas no comércio suíço e britânico, respectivamente, diante da apresentação de prescrição médica.

A forma farmacêutica cápsula possui estearato de magnésio como excipiente.

4.2. ANÁLISE QUALITATIVA

4.2.1. Características físicas

4.2.1.1. Método

A FLU-SQR e as cápsulas de FLU sódica foram observadas quanto ao aspecto, cor e odor.

4.2.1.2. Resultados

A FLU-SQR apresentou-se como pó branco e inodoro.

As cápsulas de FLU sódica apresentaram-se íntegras, com coloração preta e salmão e marcações bem visíveis (SB 2039 500 mg); o conteúdo mostrou-se como pó branco e inodoro e solúvel em água.



Figura 4.1. Embalagem, cápsula e pó de flucloxacilina sódica.

4.2.1.3. Discussão

A FLU-SQR e as cápsulas de FLU sódica apresentaram-se de acordo com a literatura que preconiza que o pó seja branco, inodoro e solúvel em água (BP, 2010a; EP, 2011).

4.2.2. Determinação do peso médio das cápsulas de flucloxacilina sódica

4.2.2.1. Material

Para esta análise foram utilizadas cápsulas de FLU sódica (Floxapen[®]) e balança analítica Mettler[®] H51.

4.2.2.2. Método

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010). Foram pesadas, individualmente, 20 cápsulas cheias e, em seguida seu conteúdo foi retirado e as cápsulas foram pesadas novamente.

4.2.2.3. Resultados

A Tabela 4.1 apresenta o peso individual de vinte cápsulas com o coeficiente de variação percentual (CV%). A Figura 4.2 apresenta o desvio encontrado para as cápsulas de FLU sódica.

Tabela 4.1. Peso individual das cápsulas de flucloxacilina sódica

Cápsula	Cápsula cheia (mg)	Cápsula vazia (mg)	Peso final (mg)	Peso médio (mg)	CV (%)*
1	655,5	110,4	545,1		
2	645,0	105,4	539,6		
3	671,1	109,8	561,3		
4	681,3	109,1	572,2		
5	664,9	107,4	557,5		
6	683,2	108,4	574,8		
7	649,4	108,4	541,0		
8	691,5	106,1	585,4		
9	690,2	109,5	580,7		
10	666,3	108,5	557,8	561,2	2,30
11	666,2	108,0	558,2		
12	665,9	107,2	558,7		
13	657,6	106,6	541,2		
14	677,4	106,7	570,7		
15	666,0	110,0	556,0		
16	667,1	106,6	560,5		
17	676,8	105,7	571,1		
18	672,3	107,2	565,1		
19	668,3	111,1	557,3		
20	677,9	108,2	569,7		

*CV (%) = coeficiente de variação percentual.

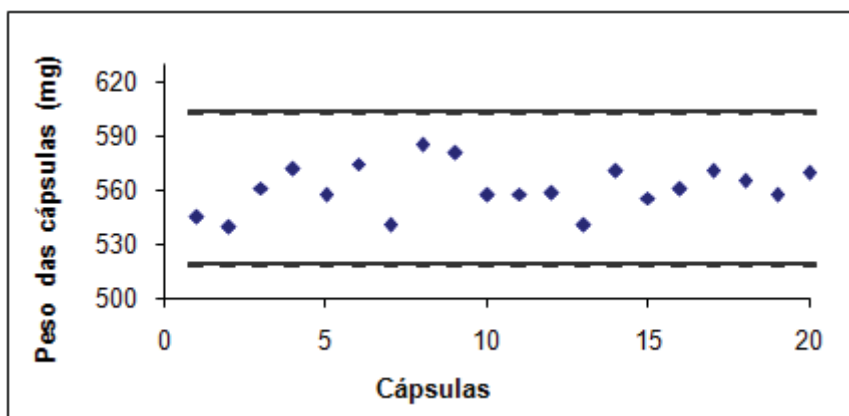


Figura 4.2. Variações de peso de vinte cápsulas de flucloxacilina sódica.

4.2.2.4. Discussão

As variações de peso das cápsulas de FLU sódica encontram-se dentro dos limites permitidos pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010). A variação de peso permitida para cápsulas duras contendo peso médio acima de 300 mg, é $\pm 7,5\%$, portanto, peso máximo 603,3 mg e peso mínimo 519,1 mg. O coeficiente de variação percentual (CV%) foi satisfatório. O peso médio foi realizado para verificar se as cápsulas encontravam-se dentro dos parâmetros farmacopeicos e para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios qualitativos e quantitativos.

4.2.3. Determinação de umidade – método gravimétrico

4.2.3.1. Material

A determinação da umidade foi realizada para FLU-SQR, descrita na seção 4.1.2, em aparelho analisador de umidade por infravermelho Gehaka®, modelo IV2000.

4.2.3.2. Método

O método gravimétrico consiste em secar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada (normalmente 105 °C) por um determinado período de tempo (normalmente 1 minuto) (FB 5, 2010). FLU-SQR foi pesada e adicionada ao coletor da balança. Após 1 minuto a 105 °C foi verificado o valor da umidade em percentagem (FB 5, 2010).

4.2.3.3. Resultados

Foi verificado que houve perda de 5,6% de água e este valor se refere à água de hidratação.

4.2.3.4. Discussão

O resultado encontrado concorda com o resultado obtido na análise térmica, em que foi verificada também a presença de água de hidratação na FLU-SQR. Estes resultados corroboram com a literatura que diz que a FLU sódica possui água de hidratação em sua constituição química (BP, 2010a; EP, 2011).

4.2.4. Análise térmica

A análise térmica pode ser definida como “um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura”. Esta definição é aceita pela Confederação Internacional de Análise Térmica (MACKENZIE, 1979; CAVALHEIRO et al., 1995; GIRON, 2002).

As técnicas termoanalíticas estão sendo amplamente utilizadas tanto na pesquisa, desenvolvimento e caracterização de produtos quanto no controle de qualidade em diversos setores produtivos, inclusive o setor farmacêutico, pois permitem caracterizar matéria prima e produto acabado baseado em informações sobre estudos de pré-formulação, estabilidade térmica, pureza, ponto de fusão e ebulição, cinética de reação, polimorfismos, estudos do perfil de dissolução, etc (SCHNITZLER et al., 2001; GANDHI et al., 2002; IKEDA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; MAMEDE et al., 2006; MURAKAMI et al., 2009).

A termogravimetria (TG) verifica a mudança da massa de uma determinada substância em função da temperatura ou do tempo (com temperatura constante), sendo que a substância é mantida sob programação controlada. Portanto, seus resultados são de ordem quantitativa (DANIELS, 1973; CAVALHEIRO et al., 1995; IONASHIRO, 2004).

Na análise térmica diferencial (DTA) é medida a diferença de temperatura entre a substância analisada e o material de referência termicamente inerte, quando submetidos a controle de temperatura programado (IONASHIRO, 2004).

O objetivo deste estudo foi determinar a estabilidade de FLU sódica frente à temperatura.

4.2.4.1. Material

Foram utilizadas FLU-SQR e FLU-cápsulas de 500 mg descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente.

As curvas de Termogravimetria (TG) e de Análise Térmica Diferencial (DTA) foram obtidas no equipamento de análise térmica SDT 2960 TA Instruments®, no Laboratório de Análise Térmica Ivo Giolito, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP), Araraquara, SP, com a colaboração do Prof. Dr. Massao Ionashiro.

4.2.4.2. Método

A faixa de temperatura utilizada foi de 30 a 1000 °C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 100 mL/min), razão de aquecimento de 20 °C/min e massa de amostra de 4,0334 mg para FLU-cápsula e 4,2090 mg para FLU-SQR.

As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina.

4.2.4.3. Resultados

As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam as curvas TG-DTA de FLU-SQR e FLU-cápsula sob atmosfera dinâmica de ar.

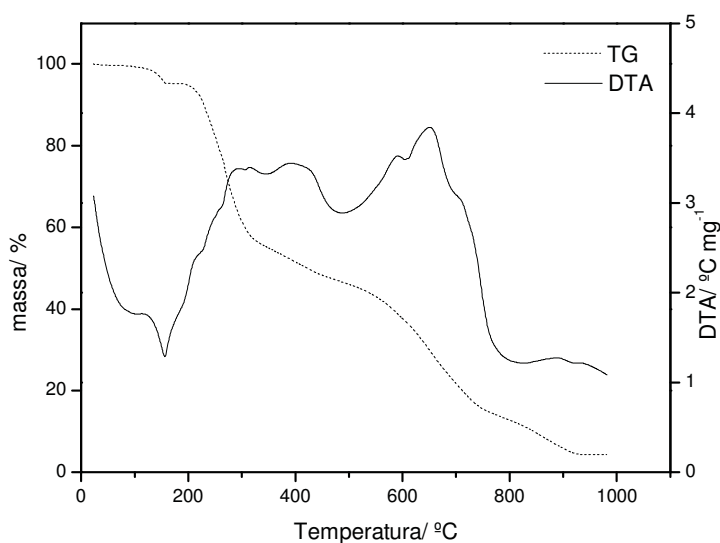


Figura 4.3. Curvas TG-DTA FLU-SQR sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 100 mL/min). Razão de aquecimento de 20 °C/min.

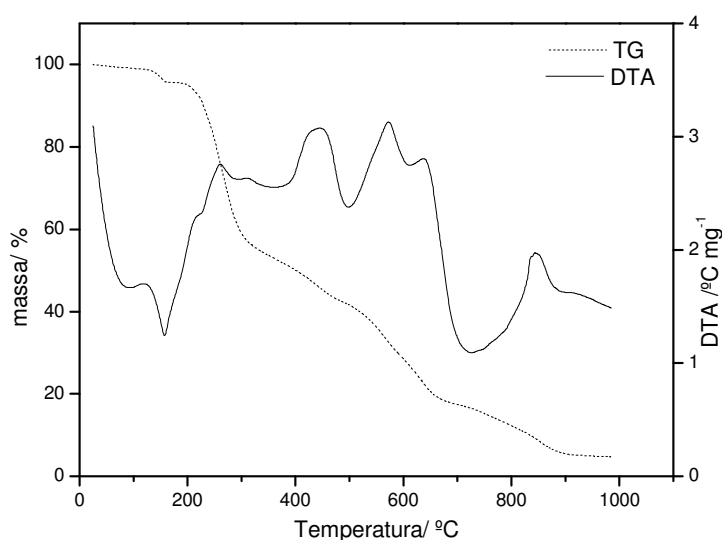


Figura 4.4. Curvas TG-DTA FLU-cápsula sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 100 mL/min). Razão de aquecimento de 20 °C/min.

4.2.4.4. Discussão

As curvas TG-DTA para FLU-SQR e FLU-cápsula demonstraram que os produtos apresentam perda de massas em cinco e seis etapas, respectivamente, sendo que na primeira, há perda de água adsorvida (1,052% para FLU-SQR e 0,6% para FLU-cápsula) e de hidratação (3,64% para FLU-SQR e 3,64% para FLU-cápsula) em torno de 100-150 °C. Estes dados corroboram com os resultados da determinação de umidade, pelo método gravimétrico (seção 4.2.3), no qual também foi encontrado perda de água de hidratação. Em seguida, há decomposição destes compostos em três e quatro etapas, respectivamente, com oxidação da matéria orgânica demonstrada pelos picos exotérmicos.

As decomposições de FLU-SQR observadas na curva TG ocorrem em torno de 320 °C (com perda de 37,78% de massa); 750 °C (com perda de 42,21% de massa) e 890 °C (com perda de 11,03% de massa). Há formação de resíduo a partir da última decomposição. De acordo com a curva DTA, a FLU-SQR apresenta picos exotérmicos em 400; 590; 640 °C indicando oxidação da matéria orgânica.

As decomposições de FLU-cápsula ocorrem em torno de 320 °C (com perda de 40,19% de massa); 450 °C (com perda de 12,13% de massa); 640 °C (com perda de 24,72% de massa); 850 °C (com perda de 13,97% de massa). De acordo com a curva DTA, há picos exotérmicos em 320, 450, 570, 640 e 850 °C indicando oxidação da matéria orgânica e confirmando os picos observados na curva TG. Há formação de resíduo a partir da última decomposição. Em 450, 570 e 850 °C há decomposição do excipiente junto com a FLU, pois, como foi observado comparando as curvas de TG-DTA de FLU-SQR e FLU-cápsula, os picos apresentados nas curvas TG-DTA de FLU-cápsulas são mais pronunciados.

Essas curvas também mostraram que a FLU não funde e a decomposição térmica ocorre sem a formação de composto intermediário estável. O teste qualitativo também mostrou que a FLU não apresenta ponto de fusão.

Desse modo, foi possível verificar a presença de FLU nas cápsulas, devido às semelhanças encontradas com a FLU-SQR, demonstrando que esta técnica foi bastante útil para a caracterização das substâncias em estudo.

4.2.5. Determinação da faixa de fusão

O objetivo deste estudo foi determinar o ponto ou a faixa em que ocorre a fusão da FLU sódica.

4.2.5.1. Material

A faixa de fusão foi determinada para FLU-SQR e FLU-cápsula descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente, utilizando o equipamento LS Logen Scientific®, LS III Basic.

4.2.5.2. Método

As substâncias (FLU-SQR e FLU-cápsulas) foram previamente dessecadas e em seguida uma pequena porção foi introduzida em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram introduzidos no equipamento. A análise foi realizada em triplicata para ambas as substâncias.

4.2.5.3. Resultados

Não foi possível determinar a faixa de fusão, pois as substâncias carbonizaram antes de fundir.

4.2.5.4. Discussão

Estes resultados corroboram os resultados obtidos na análise térmica (seção 4.2.4), a qual também não permitiu determinar o ponto ou faixa de fusão. Na literatura também não foram encontrados dados em relação ao ponto ou faixa de fusão para FLU sódica.

4.2.6. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

A espectrofotometria na região do infravermelho situa-se entre as regiões do visível e das micro-ondas. Neste espectro, a correlação pico a pico é uma ótima evidência para a identificação da amostra. O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos de átomos originam picos de absorção que ocorrem em frequência próxima independente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN et al., 2006). Este método tem fundamental importância para ensaios de identificação.

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar a FLU sódica presente nas cápsulas.

4.2.6.1. Material

Foram utilizadas FLU-SQR e FLU-cápsula, descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente, espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu® IR Prestige-21 e brometo de potássio (KBr) (Synth®, Diadema, Brasil).

4.2.6.2. Método

O brometo de potássio foi dessecado a 105 °C por 2 horas e armazenado em dessecador juntamente com a FLU-SQR e FLU-cápsula. Em seguida foram feitas pastilhas utilizando KBr como diluente. Para tanto, foram pesados 100,0 mg de KBr e 1,0 mg de pó da FLU-SQR ou cápsula.

4.2.6.3. Resultados

Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6. A Figura 4.7 apresenta a sobreposição de ambos os espectros.

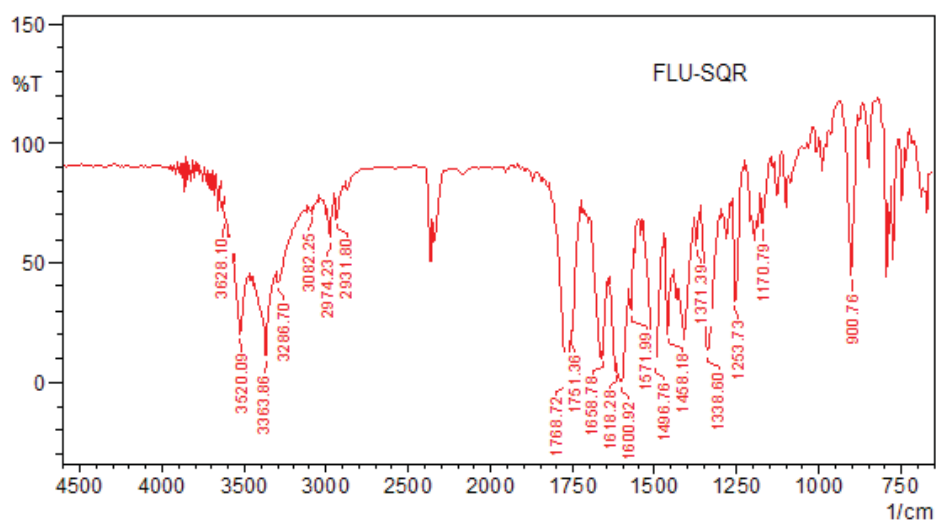


Figura 4.5. Espectro de absorção no infravermelho de FLU-SQR.

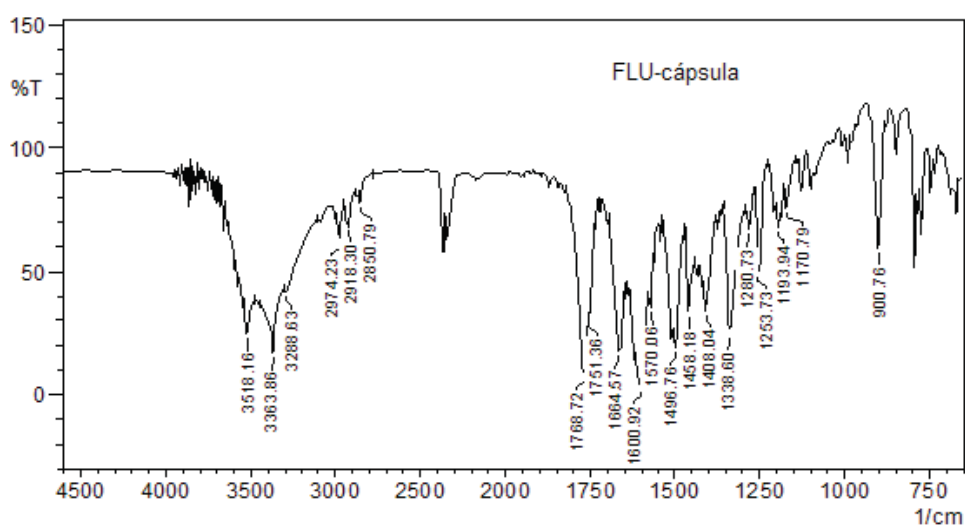


Figura 4.6. Espectro de absorção no infravermelho de FLU-cápsula.

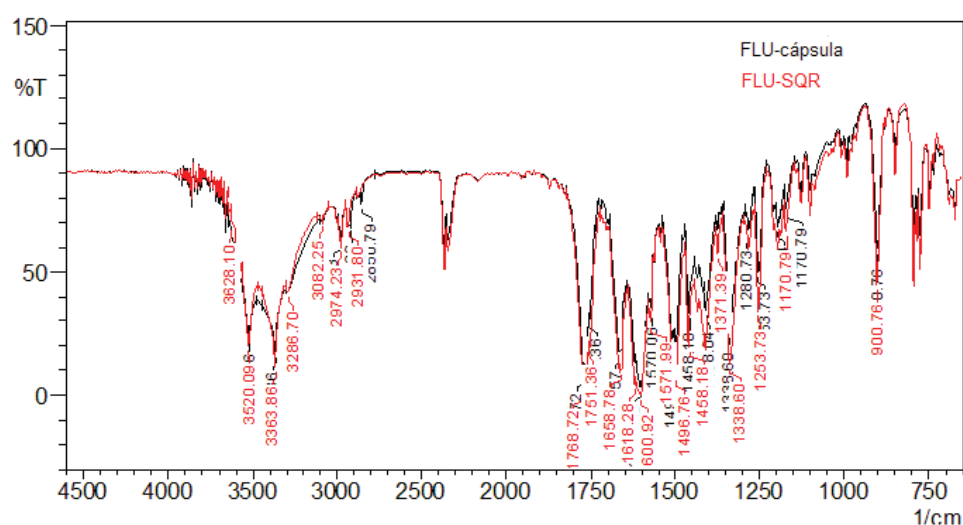


Figura 4.7. Sobreposição dos espectros de absorção no infravermelho de FLU-SQR (vermelho) e cápsula (preto).

4.2.6.4. Discussão

A substância em análise refere-se à FLU sódica, pois os picos obtidos no espectro do infravermelho são característicos dos grupamentos químicos presentes na molécula da FLU sódica, como apresentado na Tabela 4.2, e não demonstra a presença de impurezas nas cápsulas (Figura 4.7).

Tabela 4.2. Absorção de FLU-SQR e FLU-cápsula na região do infravermelho

cm^{-1}	grupo responsável
3520 - 3363	Deformação axial dos grupamentos N-H
3082 - 2931	Deformação axial do grupo $\text{sp}^3 \text{CH}$
1658 - 1550	Deformação axial do grupo amida
1658	Deformação axial do grupo C=O
1618, 1600, 1571, 1458	Deformação axial do anel benzênico
1253 - 1170	Deformação axial do grupo C-O
800, 750, 600	Deformação axial do anel benzênico metassubstituído
1750, 1253	Deformação axial do grupo do ácido carboxílico

Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentam picos de absorção característicos como: absorção em $3520 - 3363 \text{ cm}^{-1}$ característicos de presença de N-H; absorção em $3082 - 2931 \text{ cm}^{-1}$ característico de presença de CH_3 ; absorção em $1658 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ característico de grupo amida; absorção em 1658 cm^{-1} característico do

grupamento R-N-C(=O)-R; absorção em 1600 – 1540 – 1480 cm^{-1} característico de anel benzênico; absorção em 1253 - 1170 cm^{-1} característico de C-O; absorção em 800 - 750 – 600 cm^{-1} característicos de presença de anel benzênico metassubstituído; absorção em 1750 – 1253 cm^{-1} característicos de presença de ácido carboxílico, sendo todos condizentes com a estrutura da flucloxacilina sódica como mostrado na Figura 3.5.

4.2.7. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

A espectrofotometria na região do UV é uma técnica simples, rápida e de fácil execução, é menos dispendiosa que a técnica de CLAE, possibilita a identificação e quantificação de fármacos e medicamentos e, por isso, pode ser utilizada nas análises durante a produção e na rotina do controle de qualidade das indústrias farmacêuticas (CARDOSO et al., 2006; AMIN et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar a FLU sódica presente nas cápsulas, pois a identificação de um fármaco pode ser feita através da análise do seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200-400 nm).

4.2.7.1. Material

Foram utilizadas FLU-SQR e FLU-cápsula, descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente. Os solventes utilizados foram de grau analítico.

Os espectros na região do UV foram obtidos utilizando-se equipamento de espectrofotômetro KAYAK[®] XA, modelo HP 8453, com *software* Chemstation UV-VIS e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As leituras foram realizadas entre 200-400 nm.

4.2.7.2. Método

Os espectros de absorção no UV de FLU-SQR e FLU-cápsula foram obtidos nos solventes: água ultrapura (obtida por sistema de purificação Milli-Q[®] (Malsheim, França), metanol (Synth[®], Diadema, Brasil), ácido clorídrico (Qhemis[®], Florianópolis, Brasil) 0,1 M e hidróxido de sódio (Synth[®], Diadema, Brasil) 0,1 M, na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$.

A identificação de FLU em cápsulas foi realizada comparando os espectros obtidos (SQR e cápsulas) quanto ao perfil característico e comprimento de onda de absorção máxima.

Foram pesados 10 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, obtendo solução com concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$ (solução A). Uma alíquota de 3 mL da solução A foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com os diferentes solventes, obtendo solução com concentração final de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Para as cápsulas, foi pesado o equivalente a 10 mg de flucloxacilina sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas e seguiu o preparo como descrito para FLU-SQR.

4.2.7.3. Resultados

Os espectros de absorção na região do UV de FLU-SQR e FLU-cápsula com concentração de 30 µg/mL em água, metanol, ácido clorídrico e hidróxido de sódio estão apresentados nas Figuras 4.8 a 4.11.

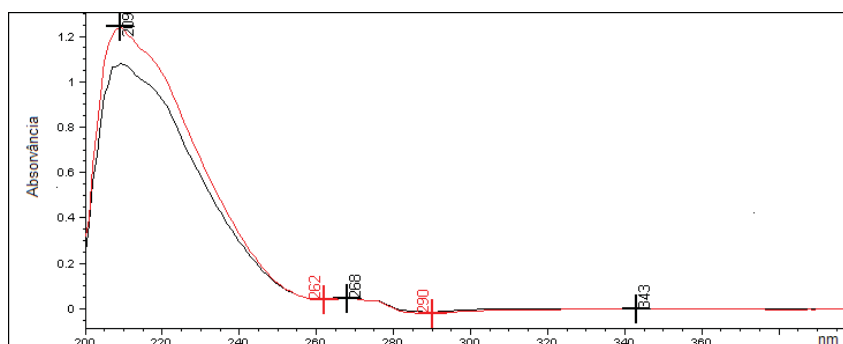


Figura 4.8. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de flucloxacilina sódica SQR (preto) e amostra (vermelho), utilizando metanol como solvente.

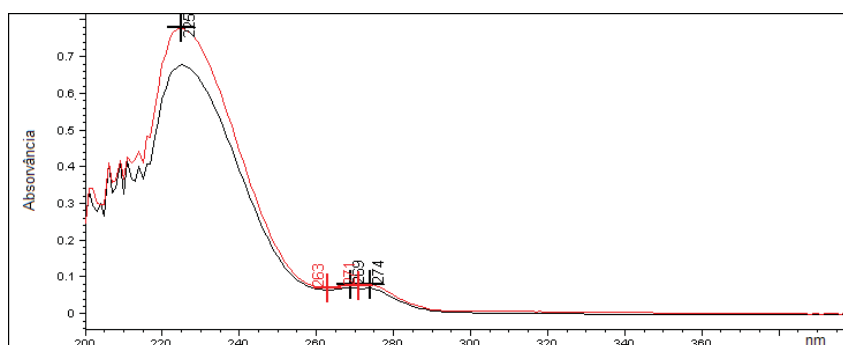


Figura 4.9. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de flucloxacilina sódica SQR (preto) e amostra (vermelho), utilizando NaOH 0,1 M como solvente.

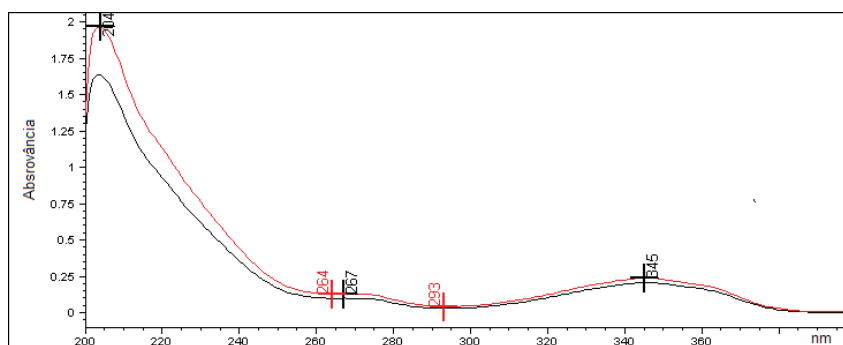


Figura 4.10. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de flucloxacilina sódica SQR (preto) e amostra (vermelho), utilizando HCl 0,1 M como solvente.

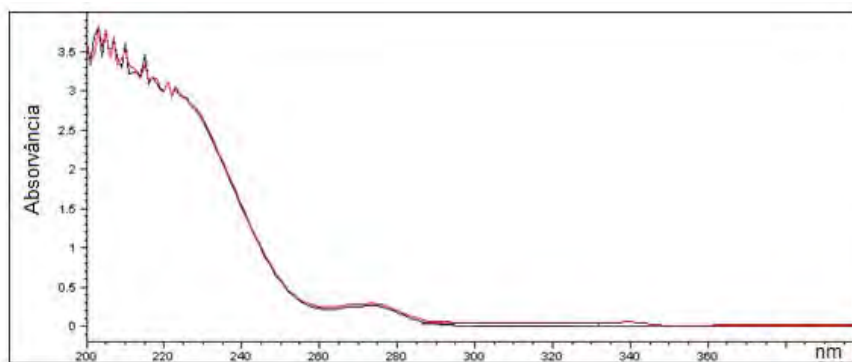


Figura 4.11. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de flucloxacilina sódica SQR (preto) e amostra (vermelho), utilizando água como solvente.

4.2.7.4. Discussão

A FLU foi solúvel em todos os solventes utilizados uma vez que não houve precipitação nos balões volumétricos após o preparo das soluções e estas mantiveram-se límpidas, com exceção da solução em hidróxido de sódio que foi de coloração amarelada, indicando a presença de degradação. Os espectros de absorção obtidos na análise de FLU-SQR e FLU-cápsula mostraram-se similares em todos os solventes utilizados, confirmando a identidade da amostra, portanto, pode-se dizer que as amostras continham FLU sódica.

A FLU sofre degradação em meio básico como pode ser observado no capítulo 5 (seção 5.4.6.1.1) e embora seja mais estável em meio ácido, também houve uma pequena degradação quando utilizado este solvente (capítulo 5, seção 5.4.6.1.1). Embora todos os espectros tenham mostrado absorção na região entre 260 e 274 nm, a água foi o solvente escolhido para a realização das análises qualitativas e quantitativas por espectrofotometria na região do UV devido à degradação apresentada pelos outros solvente, além do custo e menor geração de resíduos. O comprimento de onda 274 foi o escolhido porque em comprimentos de onda inferiores há interferências como pode ser observado na Figura 4.11.

4.2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE tem grande importância para análise de produtos farmacêuticos devido à sua especificidade e seletividade, além de ser exata e precisa. Entretanto, possui como limitação o alto custo das análises devido à instrumentação e utilização de solventes orgânicos com alto grau de pureza.

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar a FLU sódica presente nas cápsulas. Embora a CLAE seja utilizada mais frequentemente para a análise quantitativa, o método por cromatografia líquida pode ser muito útil na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da respectiva SQR.

4.2.8.1. Material

Foram utilizadas FLU-SQR e FLU-cápsula, descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente. A fase móvel foi composta por metanol (J.T. Baker®, Xelostoc, México) e solução aquosa de ácido fosfórico (Berzog®, Alemanha) na concentração de 0,025 M, pH 5,5. Foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius®, Gettinge, Alemanha) para filtrar a fase móvel e, membrana com poro de 0,45 µm e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nazel®, Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula. As soluções constituintes da fase móvel foram desgaseificadas em ultrassom (Unique®, Indaiatuba, Brasil).

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters®, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze® 7725i e detector UV-VIS Waters® 2487, equipado com *software* Empower e coluna Zorbax C₁₈ Agilent® (4,6 x 250 mm), 5 µm.

A água ultrapura utilizada para preparo das soluções-mãe de FLU-SQR e FLU-cápsula, foi obtida de sistema de purificação de água Milli-Q® (Malsheim, França).

4.2.8.2. Método

A fase móvel foi constituída por metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). A solução de ácido fosfórico foi filtrada sob vácuo e desgaseificada em ultrassom durante 30 minutos.

Foram pesados 10 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração final de 100 µg/mL (solução-mãe). Uma alíquota de 5 mL da solução-mãe foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração final de 50 µg/mL. Para as cápsulas, foi pesado o equivalente a 10 mg de FLU a partir do *pool* obtido das cápsulas e seguiu o preparo como descrito para FLU-SQR. Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro.

Após estabilização do sistema cromatográfico, 20 µL das soluções foram injetados no cromatógrafo, e analisadas no comprimento de onda de 225 nm. A identificação das cápsulas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e o perfil cromatográfico obtido na análise desta solução com aquela preparada com FLU-SQR.

4.2.8.3. Resultados

Os cromatogramas de FLU-SQR e FLU-cápsulas são representados nas Figuras 4.12 e 4.13, respectivamente.

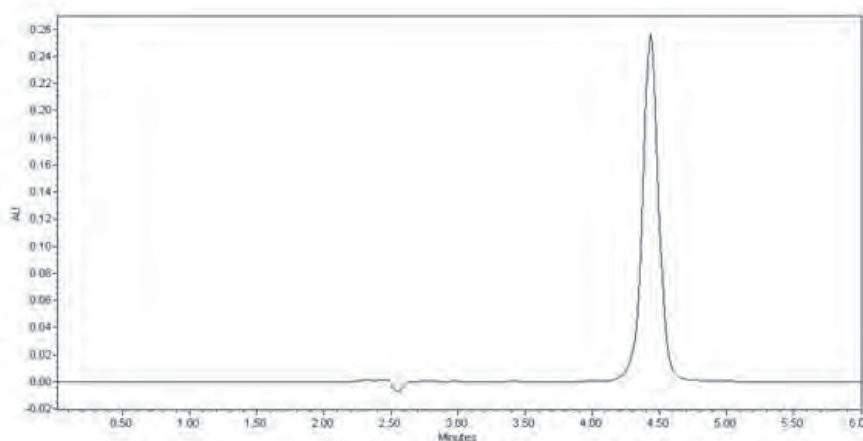


Figura 4.12. Cromatograma obtido por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40 v/v). Fase estacionária: Zorbax Agilent® C₁₈ (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda de 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos.

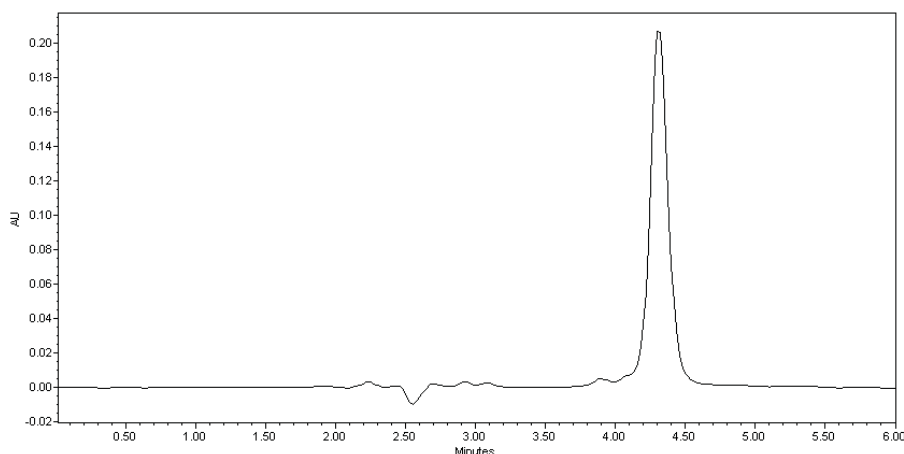


Figura 4.13. Cromatograma obtido por CLAE para solução de FLU-cápsula (50 µg/mL). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40 v/v). Fase estacionária: Zorbax Agilent® C₁₈ (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda de 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos.

4.2.8.4. Discussão

Com o objetivo de desenvolver e validar metodologia por CLAE, diversos sistemas eluentes foram testados, compostos por água, solução tampão fosfato, metanol, acetonitrila e ácido acético, em diversas proporções e valores de pH. O sistema eluente que demonstrou pico de retenção adequado e tempo de eluição satisfatório foi o sistema definido para identificação e posterior validação do método analítico (metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5).

Depois de estabelecidos os parâmetros analíticos, pode-se afirmar que a comparação dos tempos de retenção da solução de FLU-SQR e FLU-cápsulas indica que a FLU está presente nas amostras.

4.2.9. Eletroforese capilar (EC)

A eletroforese capilar vem ganhando cada vez mais importância para análise de fármacos e medicamentos e pode ser uma técnica analítica complementar à CLAE (MALESUIK et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar a FLU sódica presente nas cápsulas. Assim como CLAE, a eletroforese capilar é mais frequentemente utilizada para a análise quantitativa, mas este método pode ser muito útil na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de migração e perfil eletroforético da amostra e da SQR.

4.2.9.1. Material

Foram utilizados FLU-SQR e FLU-cápsulas, descritos nas seções 4.1.2. e 4.1.3, respectivamente.

Os reagentes de grau analítico utilizados para preparo do eletrólito foram: ácido bórico (Spetrum[®], Gardena, EUA), dodecilsulfato de sódio (SDS) (Synth[®], Diadema, Brasil). A água ultrapura foi obtido por sistema de purificação Milli-Q[®] (Malsheim, França). A solução utilizada como padrão interno foi preparada com nimesulida (Farmacopeia Brasileira) e metanol grau CLAE (Tedia[®], Ohio, USA). Estearato de magnésio (Audaz Farmacopeia Fina[®], São Paulo, Brasil), grau farmacêutico foi utilizado para preparo do placebo. Hidróxido de sódio (Synth[®], Diadema, Brasil) foi utilizado para o condicionamento do capilar.

As soluções tampão borato de sódio, FLU-SQR, FLU-cápsula e hidróxido de sódio foram filtradas através de membrana de *nylon* 0,45 µm de diâmetro de poro (Vertical[®], Bangkok, Tailândia). Para verificar o pH do eletrólito foi utilizado o potenciômetro modelo DM-20 Digimed[®] (Santo Amaro, Brasil).

O equipamento de eletroforese capilar utilizado foi o modelo Agilent[®] 3DCE (Agilent[®] Technologies, Waldbronn, Alemanha), acoplado com detector de arranjo de diodos (PDA), injetor automático, com controle de temperatura e tensão de 30 kV, instalado no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O *software* ChemStation foi utilizado para controle do equipamento e aquisição de dados. O capilar de sílica fundida, utilizado para as análises, apresenta 50 µm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total (comprimento efetivo de 40 cm) (Agilent[®] Technologies, Waldbronn, Alemanha).

4.2.9.2. Método

O eletrólito foi preparado a partir da mistura de solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. A tensão empregada foi 20 kV. A temperatura do capilar foi 27,5 °C. O solvente das soluções foi o eletrólito. Nimesulida foi utilizada como padrão interno. As

análises foram realizadas com injeção hidrodinâmica e o comprimento de onda das análises foi 210 nm.

O condicionamento inicial do capilar foi realizado com lavagem de solução de hidróxido de sódio 1,0 M durante 1 hora e água por 15 minutos. O condicionamento diário do capilar consistiu em lavagens de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, água e eletrólito por 15 minutos com cada solução. Para as demais corridas, o capilar foi submetido ao pré-condicionamento por meio de lavagens de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, água e eletrólito por 2, 1 e 3 minutos, respectivamente. Após a migração de cada amostra, o capilar foi submetido ao pós-condicionamento por meio de lavagens com água durante 3 minutos.

Foram pesados 6,7 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 300 µg/mL. Uma alíquota 250 µL de desta solução foi transferida para tubo de *ependorf* e foram adicionados de solução de padrão interno nimesulida e o volume foi completado com eletrólito para obter soluções com concentrações final de 50 µg/mL. Para as cápsulas, foi pesado o equivalente a 6,0 mg de FLU sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas e seguiu o preparo como descrito para FLU-SQR. Em seguida, as amostras foram filtradas e analisadas. A solução de nimesulida utilizada como padrão interno foi preparada pesando 100 mg de nimesulida e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução com concentração de 1000 µg/mL. Alíquotas de 75 µL foram transferidas para os tubos de *ependorf* contendo as soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula.

A identificação da FLU presente nas cápsulas utilizando a técnica de EC foi realizada através da comparação entre o tempo de migração e o perfil eletroforético observados na solução de FLU-SQR e FLU-cápsulas.

4.2.9.3. Resultados

As Figuras 4.14 e 4.15 apresentam os eletroferogramas de FLU-SQR e FLU-cápsulas, respectivamente.

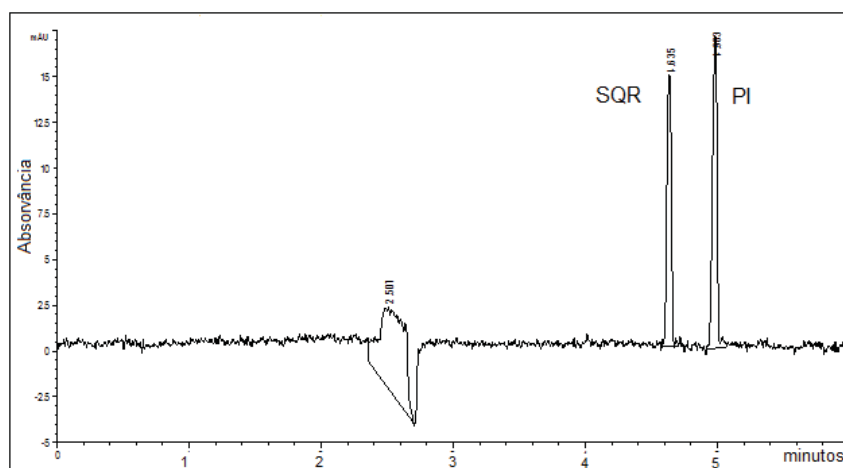


Figura 4.14. Eletroferograma de solução de FLU-SQR (50 µg/mL), obtido por eletroforese capilar. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno; (SQR) substância química de referência.

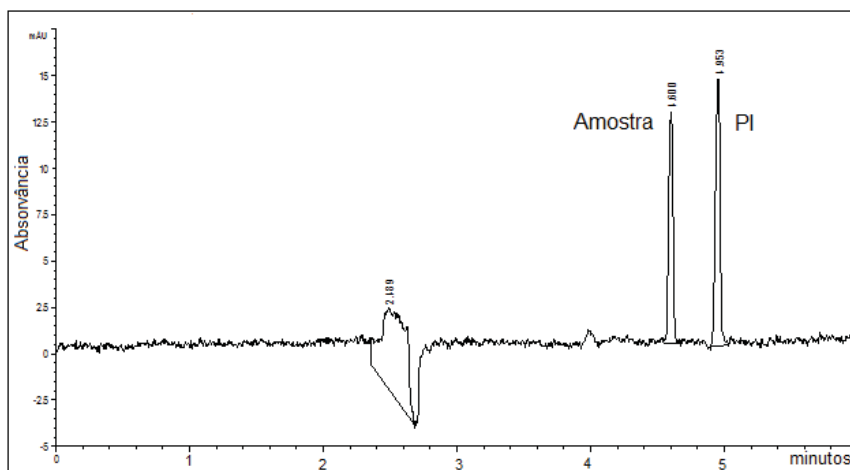


Figura 4.15. Eletroferograma de solução de FLU-cápsula (50 µg/mL), obtido por eletroforese capilar. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno.

4.2.9.4. Discussão

Com o objetivo de desenvolver e validar metodologia por eletroforese capilar, diversos eletrólitos foram testados, sendo compostos por solução tampão borato de sódio, solução tampão fosfato de sódio e dodecilsulfato de sódio, em diversas concentrações, proporções e valores de pH. O eletrólito que apresentou pico com tempo de migração satisfatório foi o eletrólito definido para identificação e posterior validação do método analítico (solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5).

Após estabelecer os parâmetros analíticos, pode-se afirmar que a comparação dos tempos de migração da solução de FLU-SQR e FLU-cápsulas indica que as amostras possuem a mesma identidade.

4.2.10. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica flexível, permitindo a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores, os quais são determinados de acordo com as características do produto em análise. Além disso, a CCD é uma técnica de fácil execução e com baixo custo, se comparada às outras técnicas analíticas utilizadas para identificação de produtos. Este método permite identificar o fármaco quando cromatografado junto com a SQR comparando os valores de R_f da SQR e amostra, obtidos sob as mesmas condições. Permite ainda, a determinação de impurezas e a monitoração das reações nos produtos em análise (DEGANI et al., 1998; COLLINS et al., 2006; JOSHI et al., 2009).

4.2.10.1. Material

Foram utilizadas placas de sílica gel F₂₅₄ (20 x 20 cm), com espessura de 0,25 mm (Kieselgel 60, Merck®, Alemanha); solução de FLU-SQR e FLU-cápsula, descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente, íntegras e degradadas com ácido clorídrico 0,1 M; hidróxido de sódio 0,001 M e peróxido de hidrogênio 3%.

Foram utilizados os solventes de grau analítico: acetato de amônia (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil), 154 g/L pH 5,0, acetato de etila (Synth®, Diadema, Brasil), acetona (Synth®, Diadema, Brasil), acetonitrila (J.T. Baker®, México), ácido acético glacial (Qhemis®, Florianópolis, Brasil), ácido fórmico (Synth®, Diadema, Brasil), ácido fosfórico (Berzog®, Alemanha), ácido oxálico 0,5 M (Synth®, Diadema, Brasil), butanol (Synth®, Diadema, Brasil), clorofórmio (Synth®, Diadema, Brasil), diclorometano (Synth®, Diadema, Brasil), etanol (Nuclear®, Diadema, Brasil), hidróxido de amônio (Merck®, Rio de Janeiro, Brasil), iodo (Synth®, Diadema, Brasil), isopropanol (Quimex®, Lima, Peru) e metanol (Synth®, Diadema, Brasil).

4.2.10.2. Método

Foram pesados 500 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 20,0 mg/mL (solução A). Uma alíquota de 2,5 mL da solução A foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com

concentração final de 5,0 mg/mL. Para FLU-cápsulas, foi pesado o equivalente a 500 mg do *pool* obtido das cápsulas de FLU sódica e seguiu o procedimento realizado para FLU-SQR.

Para a degradação da SQR e amostra foi transferida uma alíquota de 5,0 mL da solução A para balão volumétrico de 10,0 mL, e o volume foi completado com ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,001 M ou peróxido de hidrogênio a 3%, obtendo-se uma solução com concentração de 10 mg/mL (solução B). A solução B foi dividida em duas porções, sendo uma porção mantida à temperatura ambiente e, a outra porção mantida em banho aquecido a 70 °C. Após 60 minutos da adição de HCl, 30 minutos da adição de NaOH ou H₂O₂ foram coletadas alíquotas de 5,0 mL de cada porção da solução B e transferidas para balão volumétrico de 10 mL e foi adicionado ácido clorídrico ou hidróxido de sódio para neutralização da solução degradada com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, respectivamente, e o volume foi completado com água para obtenção de solução com concentração final de 5,0 mg/mL. Estas soluções foram aplicadas na placa cromatográfica. Para a solução degradada com peróxido de hidrogênio, alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 5,0 mg/mL e aplicada na placa cromatográfica.

Os sistemas eluentes testados com as soluções íntegras de SQR e amostra foram utilizados baseado na literatura (VANDAME, VOETS, 1972; MANNI et al., 1973; SAESMAA, 1989; FB, 1998; USP, 2008; BP, 2010a; BP, 2010b; EP, 2011) e estão descritos na Tabela 4.3. Os sistemas que apresentaram melhores resultados em relação à posição, forma e fator de retenção (*R_f*) das manchas foram testados para as soluções degradadas, em cada condição, conforme descritas acima. As soluções degradadas foram analisadas a fim de verificar se a(s) fase(s) móvel(is) é(são) capaz(es) de distinguir o produto íntegro do(s) produto(s) de degradação, se estiver(em) presente(s), para melhor caracterização da FLU.

Tabela 4.3. Sistemas de fases móveis testados na CCD para solução de FLU-SQR e FLU-cápsulas íntegras

Sistema de FM	
1	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (30:70, v/v)
2	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (50:50, v/v)
3	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (70:30, v/v)
4	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (80:20, v/v)
5	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (90:10, v/v)
6	metanol: clorofórmio : água : acetona (9:8:3:1, v/v/v)
7	clorofórmio: metanol: água (35:10:5, v/v/v)
8	diclorometano: metanol: água (57:35:8, v/v/v)
9	butanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v)
10	butanol: metanol (35:15, v/v)
11	butanol: ácido acético: água (10:1:5, v/v/v)
12	butanol: ácido acético (10:5, v/v)
13	butanol: metanol: água (50:25:5, v/v/v)
14	acetona: ácido acético (15:5, v/v)
15	acetonitrila: metanol: ácido oxálico 0,5 M pH 2,0 (20:20:60, v/v/v)
16	acetona: acetato de amônia (10:90, v/v)
17	etanol: ácido acético: água (10:6:6, v/v)
18	acetona: hidróxido de amônio (70:30, v/v)
19	acetona: metanol (70:30, v/v)
20	acetona: metanol: água (60:30:10, v/v/v)
21	acetona: hidróxido de amônio: água (30:10:10, v/v/v)
22	acetato de etila: metanol (7:3, v/v)
23	acetato de etila: ácido acético (30:20, v/v)
24	acetato de etila: ácido acético: água (30:20:10, v/v/v)
25	acetato de etila : metanol : água (10:3:2, v/v/v)
26	ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5: metanol (60:40, v/v)
27	butanol: água: etanol: ácido acético (5:2:1,5:1,5, v/v/v/v)
28	butanol: água: ácido acético (4:1:1, v/v/v/v)
29	acetona: ácido acético (95:5, v/v)
30	clorofórmio: isopropanol: água (60:40:4 v/v/v)
31	acetato de etila: ácido acético: água (8:1:1, v/v/v)
32	acetato de etila: ácido acético: água (70:15:15, v/v/v)

Tabela 4.3. cont. Sistemas de fases móveis testados na CCD para solução de FLU-SQR e FLU-cápsula íntegras

Sistema de FM	
33	acetato de etila: ácido acético: água (7:2:1, v/v/v)
34	acetato de etila: ácido acético: água (3:1:1, v/v/v)
35	butanol: ácido fórmico: água (80:3:1, v/v/v)
36	clorofórmio: etanol: ácido acético (9:1:0,2, v/v/v)
37	água: ácido acético: acetona: acetato de etila (1:2:2:5, v/v/v/v)

Para o ensaio, inicialmente a cuba de vidro foi saturada com sistema de fase móvel. Com auxílio de seringa de 20 µL foram transferidas as soluções íntegras de FLU-SQR e amostras para as placas e procedeu-se a cromatografia. Após a migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba, deixando-se o solvente evaporar. As placas foram reveladas com exposição ao vapor de iodo, para comparação das manchas quanto à forma, tamanho e posição. Foi determinado o R_f de cada solução, em todas as análises.

4.2.10.3. Resultados

A Tabela 4.4 apresenta os R_fs obtidos com os diversos sistemas solventes empregados na análise de soluções íntegras de FLU-SQR e amostras.

Tabela 4.4. Valores de Rf obtidos com os diversos sistemas de fases móveis testados na CCD para análise de soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula íntegras

	Sistema de FM	Rf SQR	Rf amostra
1	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (30:70, v/v)	0,99	0,99
2	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (50:50, v/v)	0,95	0,98
3	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (70:30, v/v)	0,80	0,79
4	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (80:20, v/v)	0,4; 0,8; 0,98	0,43; 0,8; 1,0
5	acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (90:10, v/v)	0,25; 0,64; 0,82	0,24; 0,65; 0,83
6	metanol: clorofórmio: água : acetona (9:8:3:1, v/v/v/v)	0,87	0,86
7	clorofórmio: metanol: água (35:10:5, v/v/v)	0,88	0,87
8	diclorometano: metanol: água (57:35:8, v/v/v)	0,9	0,89
9	butanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v)	0,57; 0,77	0,57; 0,78
10	butanol: metanol (35:15, v/v)	0,67	0,71
11	butanol: ácido acético: água (10:1:5, v/v/v)	0,1; 0,6	0,12; 0,6
12	butanol: ácido acético (10:5, v/v)	0,75; 0,82	0,75; 0,83
13	butanol: metanol: água (50:25:5, v/v/v)	0,75	0,74
14	acetona: ácido acético (15:5, v/v)	*	*
15	acetonitrila: metanol: ácido oxálico 0,5 M pH 2,0 (20:20:60, v/v/v)	0,91	0,92
16	acetona: acetato de amônia (10:90, v/v/v)	*	*
17	etanol: ácido acético: água (10:6:6, v/v/v)	0,75	0,76
18	acetona: hidróxido de amônio (70:30, v/v)	**	**
19	acetona: metanol (70:30 v/v)	*	*
20	acetona: metanol: água (60:30:10, v/v/v)	*	*
21	acetona: hidróxido de amônio: água (30:10:10, v/v/v)	**	**
22	acetato de etila: metanol (7:3, v/v)	*	*
23	acetato de etila: ácido acético (30:20, v/v)	0,67; 0,91	0,65; 0,91
24	acetato de etila: ácido acético: água (30:20:10, v/v/v)	0,75; 0,95	0,76; 0,96
25	acetato de etila: metanol: água (10:3:2, v/v/v)	**	**
26	ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5: metanol (60:40, v/v)	0,93	0,94
27	butanol: água: etanol: ácido acético (5:2:1,5:1,5, v/v/v/v)	0,27; 0,37; 0,52; 0,73	0,27; 0,37; 0,52; 0,73
28	butanol: água: ácido acético (4:1:1, v/v/v)	0,25; 0,54	0,25; 0,54
29	acetona: ácido acético (95:5, v/v)	*	*
30	clorofórmio: isopropanol: água (60:40:4, v/v/v)	0,70; 0,31	0,70; 0,31
31	acetato de etila: ácido acético: água (8:1:1, v/v/v)	0,15; 0,22; 0,72	0,15; 0,22; 0,72

Tabela 4.4. cont. Valores de Rf obtidos com os diversos sistemas de fases móveis testados na CCD para análise de soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula íntegras

	Sistema de FM	Rf SQR	Rf amostra
32	acetato de etila: ácido acético: água (70:15:15, v/v/v)	0,27; 0,37; 0,80	0,28; 0,37; 0,81
33	acetato de etila: ácido acético: água (7:2:1, v/v/v)	**	**
34	acetato de etila: ácido acético: água (3:1:1, v/v/v)	0,21; 0,5; 0,71; 0,85	0,20; 0,51; 0,71; 0,86
35	butanol: ácido fórmico: água (80:3:1, v/v/v)	**	**
36	clorofórmio: etanol: ácido acético (9:1:0,2, v/v/v)	0,31; 0,48; 0,73; 0,88	0,3; 0,47; 0,72; 0,87
37	água: ácido acético: acetona: acetato de etila (1:2:2:5, v/v/v/v)	*	*

*não foi possível determinar o Rf, pois as manchas eram amorfas; **não exibiram manchas após a exposição da placa ao vapor de iodo.

De acordo com os resultados obtidos, levando-se em consideração o tamanho, forma e Rf das manchas, os sistemas de fases móveis escolhidos para análise das soluções degradadas de FLU-SQR e amostra utilizando H₂O₂ 3% com e sem aquecimento, HCl 0,1 M com aquecimento e NaOH 0,001 M com aquecimento foram os sistemas de número 3, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, e 37.

Estes sistemas de fases móveis foram apropriados para identificação da FLU na forma farmacêutica estudada, demonstrando que o fármaco não está alterado, uma vez que as manchas das soluções íntegras de FLU-SQR e amostras foram semelhantes em posição, tamanho e intensidade. Entretanto, para as soluções degradadas da amostra sob aquecimento e em temperatura ambiente não houve manchas diferentes daquelas obtidas com as soluções íntegras. As Figuras 4.16 a 4.25 mostram os perfis cromatográficos após revelação com vapor de iodo para as soluções de íntegras FLU-SQR e amostras e degradadas com HCl 0,1 M sob aquecimento por 60 minutos, NaOH 0,001 M sob aquecimento por 30 minutos e H₂O₂ 3% sob aquecimento por 30 minutos.

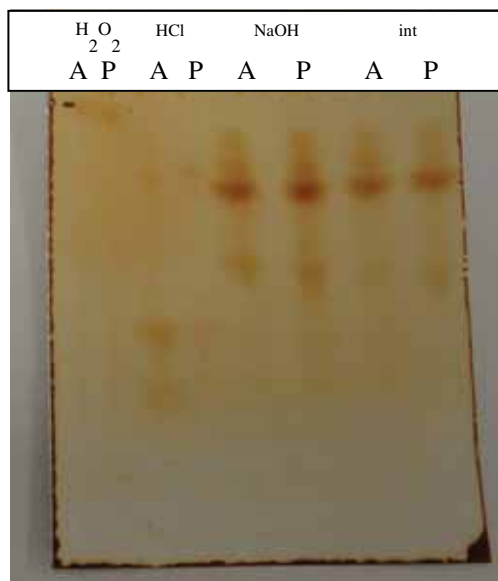


Figura 4.16. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: butanol: água: etanol: ácido acético (5:2:1,5:1,5, v/v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

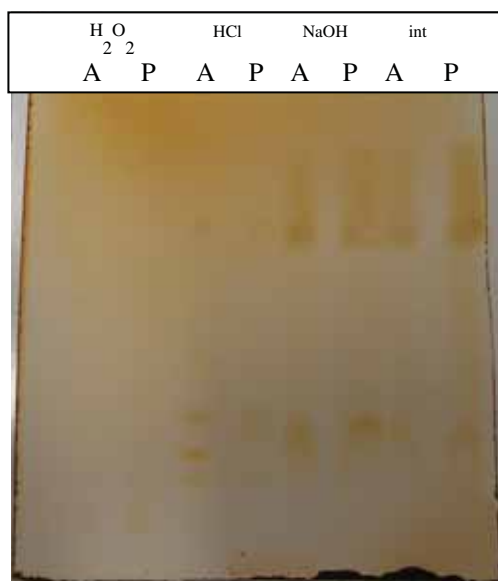


Figura 4.17. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: butanol: água: ácido acético (4:1:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

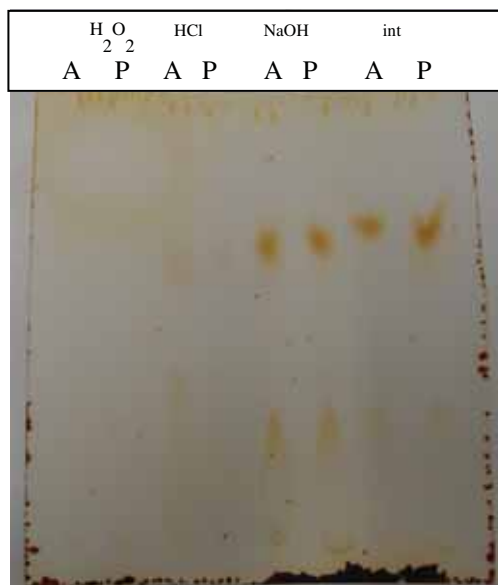


Figura 4.18. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: ácido acético (95:5, v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

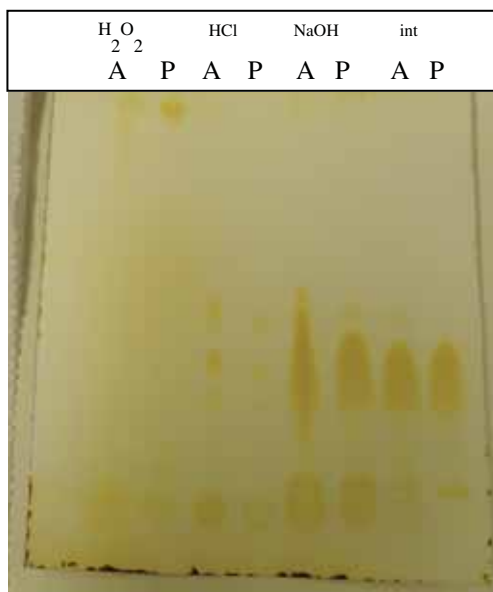


Figura 4.19. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: clorofórmio: isopropanol: água (60:40:4, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

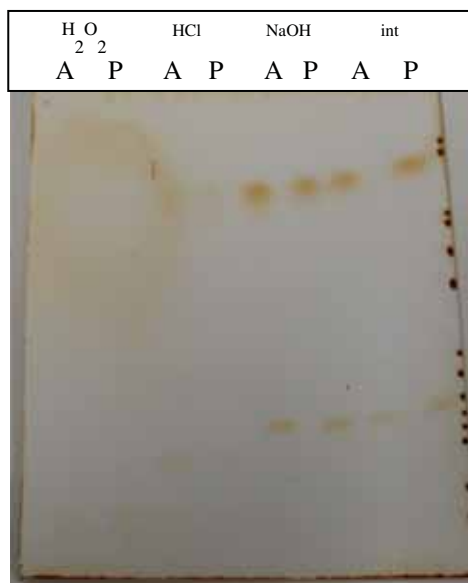


Figura 4.20. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (8:1:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

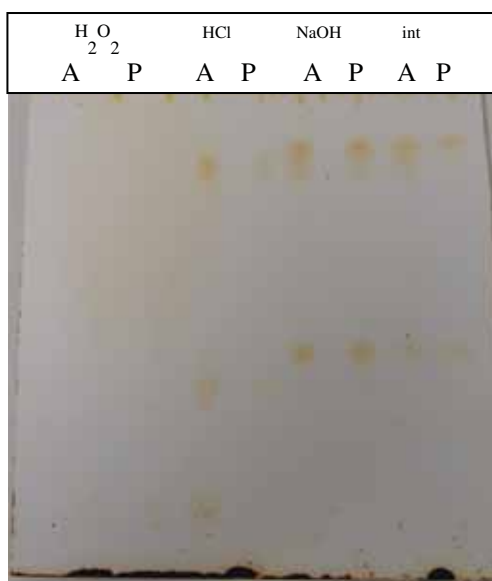


Figura 4.21. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (70:15:15, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

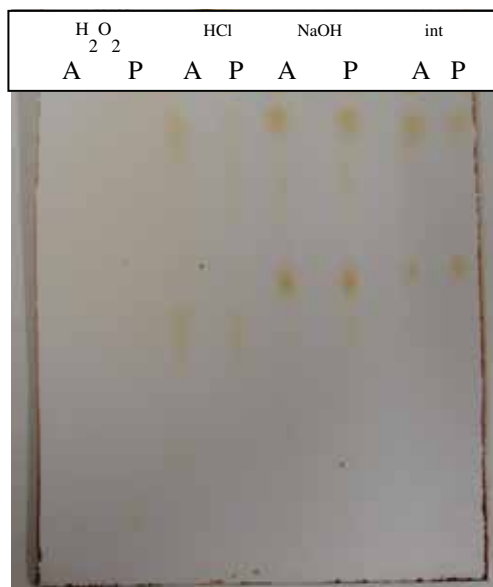


Figura 4.22. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (7:2:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

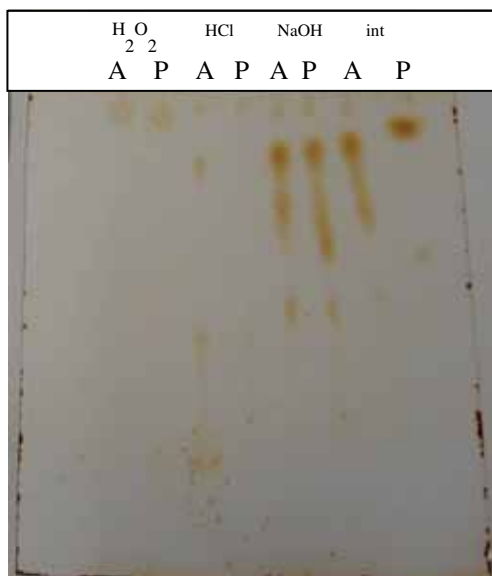


Figura 4.23. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetato de etila: ácido acético: água (3:1:1, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

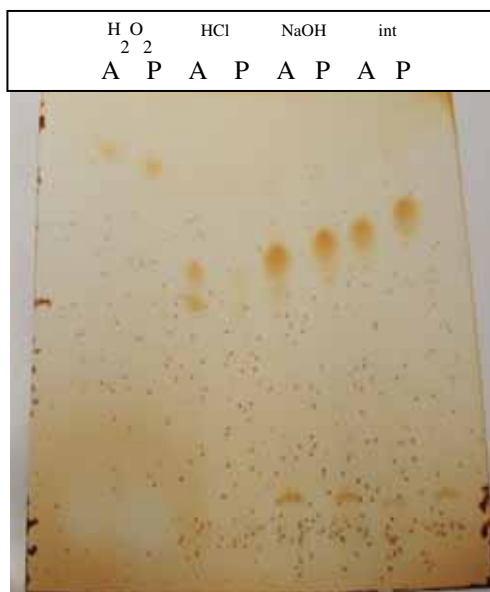


Figura 4.24. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: clorofórmio: etanol: ácido acético (9:1:0,2, v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

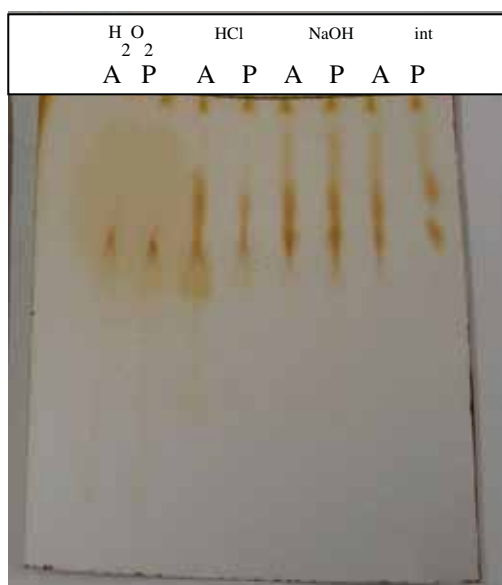


Figura 4.25. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: água: ácido acético: acetona: acetato de etila (1:2:2:5, v/v/v/v). Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

Para o sistema de fase móvel composto por acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 5,0 (70:30 v/v) foram verificadas manchas para as soluções degradadas das amostras apenas com peróxido de hidrogênio, sendo, portanto, apropriada para demonstrar a formação de produto de degradação originado a partir deste agente degradante. Os valores

de Rf obtidos para as soluções íntegras e degradadas de FLU-SQR e amostra estão apresentados na Tabela 4.5. As Figuras 4.26 a 4.30 mostram os perfis cromatográficos das amostras após revelação com vapor de iodo.

Tabela 4.5. Valores de Rf obtidos para soluções íntegras e degradadas com peróxido de hidrogênio 3% de FLU-SQR e FLU-cápsula

	Rf P int	Rf A int	Rf P deg	Rf A deg
Imediatamente à adição de H ₂ O ₂	0,79	0,79	0,4	0,4
30 minutos em aquecimento	0,79	0,79	0,3; 0,78	0,3; 0,78
60 minutos em aquecimento	0,82	0,81	0,34	0,36
120 minutos em aquecimento	0,79	0,79	0,2	0,2
120 minutos em temperatura ambiente	0,83	0,84	0,47; 0,51	0,47; 0,51

Rf P int = Rf solução íntegra do padrão; Rf A int = Rf solução íntegra da amostra; Rf P deg = Rf solução degradada do padrão; Rf A deg = Rf solução degradada da amostra.

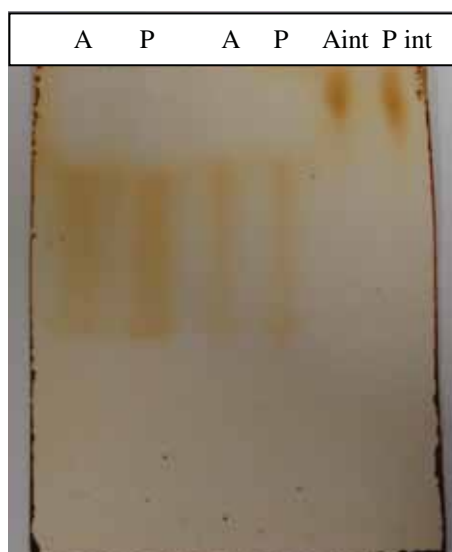


Figura 4.26. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônio 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), imediatamente após adição de H₂O₂ 3%. Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).



Figura 4.27. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônio 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 30 minutos de aquecimento com H_2O_2 3%. Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).



Figura 4.28. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônio 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 60 minutos de aquecimento com H_2O_2 3%. Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

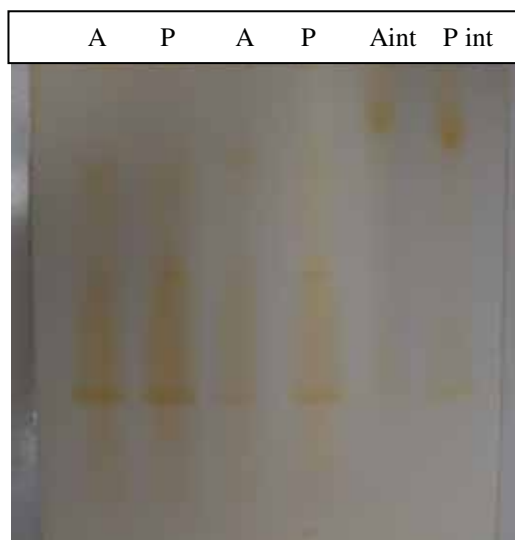


Figura 4.29. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônio 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 120 minutos em temperatura ambiente com H_2O_2 3%. Agente revelador: vapor de iodo. (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

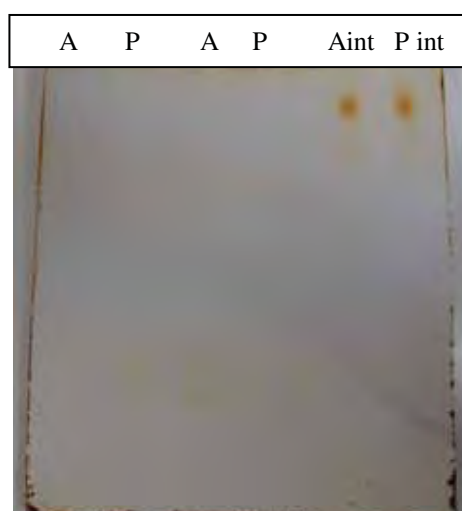


Figura 4.30. Perfil cromatográfico obtido de FLU-SQR e cápsula. Fase móvel: acetona: acetato de amônio 154 g/L, pH 5,0 (70:30, v/v), após 120 minutos em aquecimento com H_2O_2 3%. Agente revelador: vapor de iodo (P = SQR; A = amostra; int = solução íntegra).

Foi possível observar que imediatamente após a adição de peróxido de hidrogênio 3%, a FLU sofre degradação, pois houve uma mancha com R_f diferente daquele obtido para a solução íntegra do fármaco. Após 30 minutos a FLU está presente, entretanto, após 60 minutos em contato com o peróxido de hidrogênio foi observado que a FLU degradou-se totalmente ou está presente em quantidade pequena e não é possível ser identificada por este método, mas há presença de produto de degradação. Após 120 minutos, foi observado que há formação de dois produtos de degradação, evidenciados pelas duas manchas diferentes daquelas obtidas com a solução íntegra do fármaco.

4.2.10.4. Discussão

A CCD foi empregada com o objetivo de identificar a FLU nas cápsulas e também para distingui-la de possíveis produtos de degradação. As placas cromatográficas foram analisadas em câmara com lâmpada de luz UV antes de serem reveladas com vapor de iodo, mas nenhuma mancha foi observada. A FLU apresenta, após exposição ao vapor de iodo, uma mancha de cor marrom, verificada na solução da SQR e amostra.

Os períodos de coletas após degradação com peróxido de hidrogênio, HCl ou NaOH foram determinados a partir das análises realizadas em CLAE nos estudos de estabilidade (seção 7.2.2), nas quais foi possível observar a formação de produtos de degradação originados a partir destas situações de estresse. Os sistemas de fases móveis testados foram utilizados baseado na literatura para análises de penicilinas (VANDAMME, VOETS, 1972; MANNI et al., 1973; SAESMAA, 1989). As soluções FLU-SQR e amostra foram feitas com concentrações baseadas na Farmacopeia Britânica (BP 2010a) e Europeia (EP, 2011) que estabelecem solução com concentração de 5,0 mg/mL para análise de CCD. Em virtude disso, as soluções estoques foram preparadas com concentrações tais que a solução final (após degradações e diluições) estivessem com concentração de 5,0 mg/mL.

Compêndios oficiais também foram consultados quanto às fases móveis utilizadas para a análise de FLU, isoxazolilpenicilinas e outras penicilinas. As Farmacopeias Europeia (EP, 2011) e Britânica (BP, 2010a) descrevem CCD para FLU sódica, dicloxacilina sódica, cloxacilina sódica e benzilpenicilina potássica, empregando como fase móvel acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 5,0 (30:70, v/v). A Farmacopeia Britânica (BP, 2010b) ainda descreve a mesma fase móvel para análise de ticarcilina sódica. A Farmacopeia Brasileira IV (FB 4, 1988) descreve CCD utilizando a fase móvel acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 7,0 (30:70, v/v) para análise de benzilpenicilina procaína e benzatina; a mesma fase móvel, mas com pH 5,0 é utilizada para a benzilpenicilina sódica e potássica; acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 5,0 (10:90, v/v) para identificação de ampicilina triidratada; metanol: clorofórmio: água: acetona (9:8:3:1, v/v/v/v) é usada para a identificação de amoxicilina triidratada; acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 5,0 (90:10, v/v) para análise de ampicilina e ampicilina sódica. A Farmacopeia Britânica (BP, 2010a) descreve a identificação de amoxicilina triidratada, amoxicilina sódica, ampicilina, ampicilina triidratada e ampicilina sódica por CCD utilizando a fase móvel acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 5,0 (10:90, v/v).

Apesar de diversos sistemas de fases móveis terem sido testados, apenas o sistema constituído por acetona: acetato de amônio 154 g/L pH 5,0 (70:30, v/v) apresentou R_f satisfatório para FLU-SQR e amostra. Os demais sistemas solventes apresentaram R_f insatisfatório (acima de 0,8) e/ou as manchas eram amorfas dificultando a visualização do

início e término das mesmas. Porém, estes resultados foram obtidos para SQR e amostra demonstrando que ambas são semelhantes, em relação ao tamanho e intensidade da mancha e, portanto, não há impurezas nas amostras, sendo possível identificar a FLU. Os resultados obtidos sugerem que a FLU-SQR e as cápsulas possuem a mesma identidade.

Com este sistema solvente (acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (70:30, v/v)), então, foram analisadas as soluções degradadas. Apenas para as soluções das amostras degradadas com peróxido de hidrogênio 3% este sistema foi satisfatório. Acredita-se que nas demais condições, o produto de degradação formado estava em pequena quantidade e não foi possível detectar por este método, uma vez que foi possível verificar, por CLAE, produtos de degradação originados por hidrólise ácida e básica, conforme apresentado no capítulo do estudo de estabilidade (seção 7.2.2).

Também foi verificado que as maiores degradações aconteceram quando a solução de FLU foi exposta ao H_2O_2 3%, pois, como pode ser visto nas Figuras 4.16 a 4.25 não há mancha característica de FLU, semelhante às manchas das soluções íntegras, para a solução degradada.

Apesar de a literatura apresentar diversas fases móveis para análise de penicilinas e seus produtos de degradação de maneira satisfatória, este fato não ocorreu quando estes mesmos sistemas solventes foram utilizados neste trabalho para análise de FLU sódica e seus produtos de degradação. Acredita-se que isso tenha acontecido devido às diferenças nas estruturas químicas dos compostos, aos diferentes tipos de sílica gel utilizadas nas placas cromatográficas e aos diferentes tipos de agentes reveladores utilizados pela literatura consultada e neste trabalho (VANDAME, VOETS, 1972; MANNI et al., 1973; SAESMA, 1989).

O método por CCD desenvolvido utilizando como sistema de fase móvel acetona: acetato de amônia 154 g/L pH 5,0 (70:30, v/v), demonstrou ser adequado para a identificação do antimicrobiano na forma farmacêutica em estudo, bem como para a degradação utilizando solução de peróxido de hidrogênio 3% como agente de estresse. Os demais sistemas de fases móveis testados foram adequados para identificar a FLU nas cápsulas íntegras, mas não foi possível observar produto(s) de degradação.

4.3. Conclusão das análises qualitativas

As técnicas tradicionais de controle de qualidade utilizadas para análises qualitativa das cápsulas contendo FLU sódica foram bastante úteis e importantes, uma vez que foi verificado que as cápsulas não possuem adulteração. Também foram importantes para fornecer conhecimentos das características da FLU para dar um tratamento adequado para o preparo das soluções utilizadas nas análises quantitativas, estudos de estabilidade e de dissolução.

5. ANÁLISE QUANTITATIVA

5.1. DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

5.1.1. Introdução

Os ensaios microbiológicos são descritos em compêndios oficiais como a Farmacopeia Americana (USP, 2008), Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010), Farmacopeia Britânica (BP, 2010) e Farmacopeia Europeia (EP, 2011).

O ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar permite a determinação da potência do fármaco, por meio da medida do tamanho do halo de inibição de crescimento do micro-organismo teste causado pelo antimicrobiano. Emprega-se meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, no qual a substância teste se difunde (PINTO et al., 2010). O método de difusão em ágar foi preconizado por Heatley para calcular a potência da penicilina, em 1944 (HEWITT, 2004).

Os métodos microbiológicos são menos exatos, precisos e específicos que o método de cromatografia líquida de alta eficiência, porém, podem revelar mudanças sutis não demonstradas pelos métodos químicos convencionais, como por exemplo, falsificações com moléculas estruturalmente similares, não utilizam solventes tóxicos e podem ser uma técnica analítica complementar para avaliação da potência de antimicrobianos (LOPES, SALGADO, 2010).

Existem trabalhos que descrevem a quantificação de FLU sódica utilizando o ensaio microbiológico, método de difusão em ágar. Porém, tais trabalhos analisam este fármaco e seus metabólitos em amostras de fluidos biológicos (BODEY et al., 1972; THIJSEN, MATTIE, 1976; FRANK et al., 1988; ENTENZA et al., 1997; LEDER et al., 1999), mas não realizam a sua quantificação na forma farmacêutica cápsulas.

O objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento e a validação de ensaio de determinação da potência de FLU sódica em cápsulas, utilizando o ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, empregando a técnica de *templates* em placa.

5.1.2. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a quantificação de FLU sódica na forma farmacêutica cápsulas, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas verificando-se os parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Parâmetros testados para avaliação de potência de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 IAL 636
Meios de cultura	Meio nº 1 para antibióticos para camada base e semeada Meio nº 11 de Grove-Randall para camada base e semeada
Solução diluente	solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 solução tampão fosfato de potássio pH 8,0 água
Concentração das soluções	1,0; 4,0; 16 µg/mL; 2,0; 4,0; 8,0 µg/mL; 1,0; 2,0; 4,0 µg/mL; 8,0; 16,0; 32,0 µg/mL; 5,0; 10,0; 20,0 µg/mL; 1,5; 3,0; 6,0 µg/mL; 1,0; 3,0; 9,0 µg/mL
Concentração do inóculo	0,5; 1,0; 1,5; 2,0%

5.1.3. Execução do ensaio

De acordo com os resultados obtidos com os diferentes micro-organismos e meios de cultura, foram estabelecidos os parâmetros para realização do doseamento microbiológico (Tabela 5.2). A validação do ensaio foi realizada de acordo com a metodologia descrita para outras penicilinas, em que se emprega a técnica 3 x 3, ou seja, três concentrações de solução padrão e três concentrações de solução amostra (FB 5, 2010) e com a literatura (AOAC, 2002; ICH, 2005, SALGADO et al., 2006; TOZO, SALGADO, 2007; LOPES, SALGADO, 2010; FB 5, 2010; CAZEDEY, SALGADO, 2011).

Tabela 5.2. Parâmetros estabelecidos para determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Meio de cultura	Meio nº 1 para antibióticos para camada base (5 mL) e semeada (20 mL)
Solução diluente	solução tampão fosfato de potássio pH 6,0
Concentração das soluções	1,5; 3,0; 6,0 µg/mL
Concentração do inóculo	1,0%
Temperatura de incubação	35 ± 1 °C
Tempo de incubação	18 horas

5.1.4. Material

Além dos materiais estabelecidos, descritos na Tabela 5.2, foram utilizados FLU-SQR e FLU-cápsula, descritos nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente.

Para a incubação dos micro-organismos foi utilizada estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital, Odontobrás® (Ribeirão Preto, Brasil). Para padronização dos micro-organismos foi utilizado espectrofotômetro Beckman® modelo DU 530. Para as leituras dos halos de inibição, utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo® (Japão).

Foi utilizado o meio de cultura ágar caseína-soja (Casoy) (Acumedia®, Lansing, EUA) para manutenção da cepa do micro-organismo, caldo Brain Hearth Infusion (BHI) (Acumedia®, Lansing, EUA) para preparo e padronização do inóculo, meio nº 1 para antibióticos (Difco®, Sparks, EUA) como camada base e semeada.

Para preparo das soluções tampão fosfato de potássio pH 6,0 e 8,0 foram utilizados fosfato de potássio dibásico (Vetec®, Rocha, Brasil) e monobásico (Vetec®, Rocha, Brasil).

Foram empregadas placas de Petri com 20 mm de altura x 100 mm de diâmetro, e nas tampas foi colocado papel de filtro para impedir que gotículas de condensação invalidassem ou dificultassem a leitura dos halos de inibição e *templates* de aço inoxidável. Estes materiais e vidraria não volumétrica foram esterilizados em estufa Nova Ética® 400/5ND São Paulo, Brasil) a 180 °C por 1 hora. A água, obtida por sistema de purificação de água Milli-Q® (Malsheim, França), solução tampão fosfato e ponteiros foram esterilizadas em autoclave Phoenix® AV 60 (Araraquara, Brasil) por 15 minutos a 121 °C.

5.1.4.1. Preparo da solução de flucloxacilina sódica SQR

Foram pesados analiticamente 10 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água estéril, obtendo solução com concentração de 100,0 µg/mL. Em seguida foram transferidas alíquotas de 150, 300 e 600 µL para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com solução tampão fosfato de potássio pH 6,0, obtendo-se soluções com concentrações finais de 1,5; 3,0 e 6,0 µg/mL, codificadas como P₁, P₂ e P₃, respectivamente.

5.1.4.2. Preparo da solução de flucloxacilina sódica em cápsulas

A partir do *pool* obtido das cápsulas de FLU sódica, foram pesados o equivalente a 10,0 mg de FLU sódica e seguiu-se o mesmo procedimento descrito na seção 5.1.4.1, obtendo-se soluções com concentrações finais de 1,5; 3,0 e 6,0 µg/mL, codificadas como A₁, A₂ e A₃, respectivamente.

5.1.4.3. Preparo da solução placebo

A solução placebo foi preparada a partir do único excipiente presente nas amostras de cápsulas, estearato de magnésio. Foram transferidos 10 mg de estearato de magnésio para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, obtendo uma solução com concentração de 100 µg/mL. Em seguida foram transferidas alíquotas de 150, 300 e 600 µL para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com solução tampão fosfato pH 6,0, obtendo soluções com concentrações finais de 1,5; 3,0 e 6,0 µg/mL, respectivamente.

5.1.4.4. Preparo do meio de cultura

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

5.1.4.5. Preparo do inóculo

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mantido em ágar caseína-soja inclinado em tubo de ensaio, foi repicado para caldo BHI e incubado por 24 horas a 35 ± 1 °C. A padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro a 580 nm com transmitância de 25 ± 2%, diluído com o mesmo caldo. Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 1% (v/v) em meio ágar nº 1 para antibióticos, mantido em banho aquecido a 46 ± 1 °C (FB 5, 2010).

5.1.5. Ensaio

A camada base de 20,0 mL de meio ágar nº 1 para antibióticos foi adicionada às placas de Petri. Após sua solidificação, foram adicionados 5,0 mL de meio ágar nº 1 para antibióticos com inóculo a 1% (v/v), com auxílio de pipetador automático. Após a solidificação desta camada, foi colocado o *template* em cada placa, cujos orifícios foram preenchidos com 200,0 µL das soluções descritas nas seções 5.1.4.1 e 5.1.4.2, respectivamente e como apresentado na Figura 5.1. As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 1 °C e após 18 horas foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, com auxílio de paquímetro digital. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Foram preparadas 24 placas para o doseamento de FLU em cápsulas sendo que, em cada ensaio foram utilizadas 6 placas e os resultados foram analisados estatisticamente.

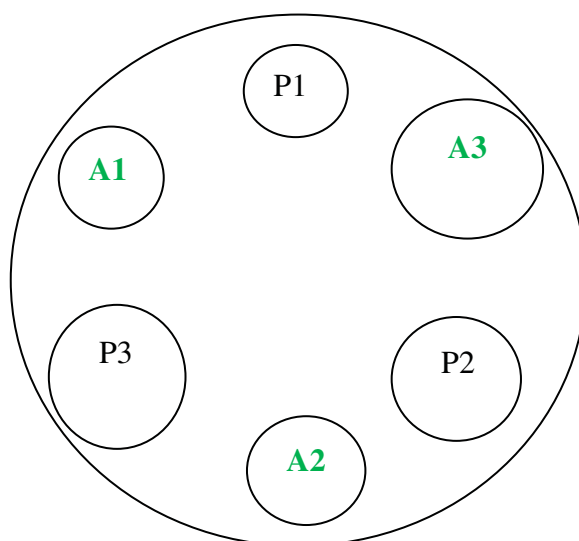


Figura 5.1. Esquema do delineamento 3 x 3 demonstrando a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P₁ (1,5 µg/mL), P₂ (3,0 µg/mL), P₃ (6,0 µg/mL) e A₁ (1,5 µg/mL), A₂ (3,0 µg/mL), A₃ (6,0 µg/mL).

5.1.5.1. Obtenção da curva analítica

Para a construção da curva analítica foram utilizados três pontos como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010) para delineamento 3 x 3 e a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) é apresentado na Figura 5.1. Foram feitas quatro curvas analíticas em quatro dias consecutivos e, cada curva continha seis réplicas de cada concentração.

5.1.5.2. Cálculo da potência de flucloxacilina sódica em cápsulas

A potência de FLU sódica em cápsulas foi determinada conforme equação de Hewitt (2004), (Equação 1). A Equação 1 utiliza as médias dos halos de inibição obtidos com as três doses de FLU-SQR e FLU-amostra, nas seis placas analisadas em cada ensaio.

$$Potência (\%) = Anti \log M \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: $M = F/b$; $b = E/I$; $I = \log R$

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

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

5.1.6. Validação do método microbiológico

5.1.6.1. Linearidade

A curva analítica final foi construída a partir da média de quatro curvas analisadas em quatro dias diferentes, cada uma composta pela média dos halos de seis placas, conforme descrito na seção 5.1.5.1. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e do paralelismo foi constatada pela análise de variância (ANOVA). Também foram avaliados os coeficientes de correlação.

5.1.6.2. Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade (intradia), seis placas com três doses de solução padrão (P) e amostra (A) foram preparadas e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, foram analisados quanto ao coeficiente de variação (CV%) para cada dose utilizada.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido na análise de seis réplicas da solução padrão (P₂) obtidos em três dias consecutivos.

5.1.6.3. Exatidão

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R_1), 100 (R_2) e 120% (R_3) de solução padrão às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 2,4; 3,0 e 3,6 µg/mL, sendo que, estas soluções foram adicionadas no lugar de A_1 , A_2 e A_3 , respectivamente. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar a potência de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Preparo das soluções para o teste de recuperação no ensaio microbiológico de flucloxacilina sódica pelo método de difusão em ágar

	volume de solução amostra (100 µg/mL) (µL)	volume de solução FLU-SQR adicionada (100 µg/mL) (µL)	concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	200	-	2,0
R₁	200	40	2,4
R₂	200	100	3,0
R₃	200	160	3,6
SQR	-	200	2,0

*cada nível de concentração foi preparado em triplicata em balão volumétrico de 10 mL.

5.1.6.3.1. Cálculo do teste de recuperação

A porcentagem de FLU sódica recuperada foi calculada pela equação da reta para encontrar a concentração de cada nível (R_1 , R_2 e R_3), seguido pela Equação 2 (AOAC, 2002) para calcular a porcentagem de recuperação.

$$R (\%) = [(C_r - C_a) / C_p] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que: C_r = concentração da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

C_a = concentração da solução amostra

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

5.1.6.4. Robustez

Foi avaliada por meio de modificações nas condições experimentais estabelecidas, tais como: tempo de incubação (17 e 19 horas) e volume da camada semeada (4,5 e 5,5

mL). As respostas obtidas com a solução padrão (P_2) nas diferentes condições foram analisadas estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* para avaliar a interferência das modificações.

5.1.6.5. Especificidade/ Seletividade

A especificidade foi avaliada por meio das soluções placebo. As amostras foram preparadas com o excipiente presente nas cápsulas de acordo com a seção 5.1.4.3. Foi verificado se houve formação de halo de inibição de crescimento do micro-organismo quando estas soluções foram utilizadas para o preenchimento dos orifícios dos *templates*.

A seletividade foi comprovada pelo teste de análise de variância realizada para os valores da inclinação da reta das curvas analíticas obtidas com a solução de FLU-SQR e FLU-cápsula, durante três dias consecutivos (BRUCE et al., 1998).

5.1.7. Resultados

Os halos de inibição obtidos estão apresentados na Figura 5.2. Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos para as soluções de diferentes concentrações de FLU-SQR e amostras estão apresentados na Tabela 5.4.

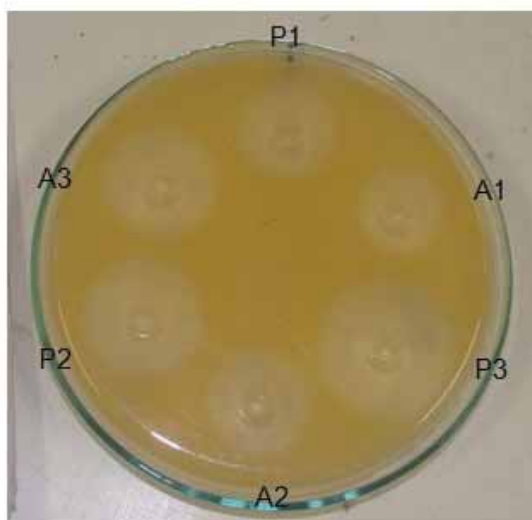


Figura 5.2. Halos de inibição obtidos no doseamento microbiológico da flucloxacilina sódica utilizando o delineamento 3 x 3, em que P_1 (1,5 $\mu\text{g/mL}$), P_2 (3,0 $\mu\text{g/mL}$), P_3 (6,0 $\mu\text{g/mL}$) e A_1 (1,5 $\mu\text{g/mL}$), A_2 (3,0 $\mu\text{g/mL}$), A_3 (6,0 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 5.4. Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos no ensaio microbiológico de flucloxacilina sódica pelo método de difusão em ágar

	Concentração (µg/mL)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)*	Diâmetro médio (mm)	CV (%)**
P₁	1,5	21,72 – 21,83 21,83 – 21,56	21,74	0,59
P₂	3,0	25,92 – 25,84 26,04 – 25,45	25,81	0,99
P₃	6,0	29,79 – 29,60 29,78 – 29,20	29,59	0,93
A₁	1,5	21,57 – 21,32 21,66 – 21,13	21,42	1,12
A₂	3,0	25,50 – 25,66 25,77 – 25,07	25,50	1,21
A₃	6,0	29,24 – 29,41 29,58 – 29,96	29,55	1,04

*cada valor é a média de seis determinações realizadas em um mesmo dia, durante quatro dias; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

As curvas analíticas de FLU-SQR e amostra (Figura 5.3) foram construídas com as médias dos valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano de quatro curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados são: $y = 5,668\ln(x) + 19,486$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997, para FLU-SQR e $y = 5,8628\ln(x) + 19,048$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, para FLU-cápsulas.

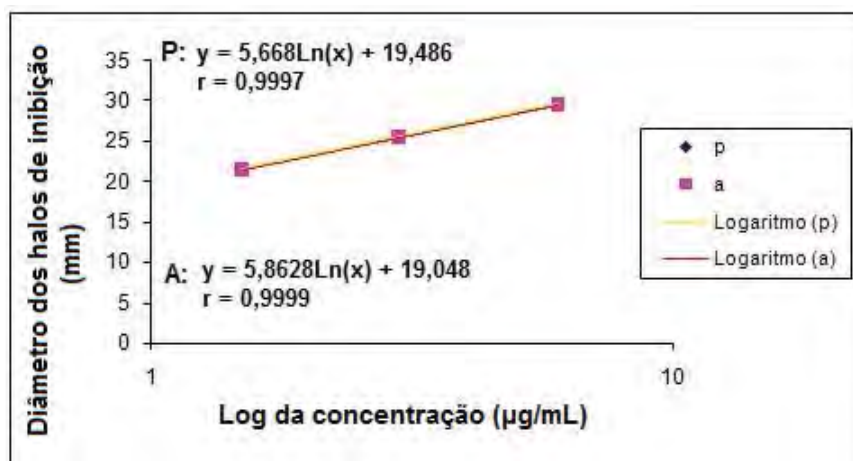


Figura 5.3. Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula, em concentrações de 1,5; 3,0; 6,0 µg/mL, no ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

5.1.7.1. Validação

5.1.7.1.1. Linearidade

A validação da metodologia foi realizada pela ANOVA, segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) para ensaio 3 x 3 (Tabela 5.5). Também foi avaliada por meio dos coeficientes de correlação obtidos.

Tabela 5.5. Análise de variância dos valores dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico com a solução de flucloxacilina sódica, método de difusão em ágar

Fontes de variação	GL	SG	QM	F _{calc}	F _{tab}
Preparação	1	0,302	0,302	5,861*	4,54
Regressão	1	255,520	255,520	4966,835*	4,54
Desvio de paralelismo	1	0,07290	0,07290	1,4170	4,54
Quadrático	1	0,03630	0,03630	0,706	4,54
Diferença de quadrático	1	0,02341	0,02341	0,455	4,54
Desvio de linearidade	2	0,060	0,030	0,580	3,68
Entre doses	5	255,954	51,191	995,055*	2,9
Entre placas	5	0,44325	0,14775	2,872	2,9
Dentro (erro)	15	0,77168	0,05145		
Total	23	257,17			

*significativo para $p < 0,05$; GL = graus de liberdade.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) para validade delineamento de retas paralelas devem ser cumpridos os parâmetros de:

- ✓ Regressão linear: deve ser significativa, pois indica que a inclinação da reta dose-resposta é satisfatória.
- ✓ Termos quadráticos (quadrático e diferença de quadrático): deve ser não significativo, pois satisfaz a linearidade.
- ✓ Paralelismo: deve ser não significativo, pois indicam que as retas da SQR e amostra são paralelas.
- ✓ Preparação: quando significativa, não invalida o ensaio, mas a potência estimada pode ser utilizada como potência suposta em ensaios futuros.

5.1.7.1.2. Precisão

A repetibilidade forneceu CV% inferior a 1,63%.

A precisão interdias forneceu CV% de 1,30%.

5.1.7.1.3. Exatidão

A Tabela 5.6 apresenta os valores experimentais obtidos no teste de recuperação do ensaio microbiológico de FLU sódica.

Tabela 5.6. Teste de recuperação do ensaio microbiológico, pelo método de difusão em ágar, para análise de flucloxacilina sódica

	FLU-SQR adicionada (µg/mL)	FLU-SQR encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)**
R ₁	0,4	0,39	99,75		
R ₂	1,0	0,98	98,12	98,96	0,82
R ₃	1,6	1,58	99,00		

*média de seis determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.1.7.1.4. Robustez

Durante as análises da cápsula sob os parâmetros alterados e estabelecidos, o teste *t* de *Student* comprovou a robustez do método proposto, diante dos parâmetros avaliados, exceto quando o volume da camada semeada foi maior que o estabelecido, conforme apresentado na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Avaliação da robustez do ensaio microbiológico, pelo método de difusão em ágar para análise de flucloxacilina sódica

Variável	Parâmetros investigados	<i>t</i> tab	<i>t</i> calc
Tempo de incubação (horas)	17 horas	2,23	2,13
	19 horas	2,23	2,00
Volume da camada semeada (mL)	4,5 mL	2,23	0,82
	5,5 mL	2,23	14,50*

t tab = *t* tabelado; *t* calc = *t* calculado; **significativo para $p < 0,05$.

5.1.7.1.5. Especificidade/Seletividade

A especificidade foi demonstrada por meio das soluções placebo. Não houve formação de halo de inibição do crescimento bacteriano quando os orifícios dos *templates* foram preenchidos com soluções placebo. Portanto, o teste não sofre interferência do excipiente e os resultados são decorrentes apenas do antimicrobiano em estudo.

A seletividade, comprovada pelo teste de ANOVA, comparando as inclinações das curvas analíticas obtidas com FLU-SQR e amostra, demonstrou valor de F_{calc} e F_{tab} de 0,051 e 7,71, respectivamente, comprovando que não há interferência do excipiente nas análises.

5.1.8. Cálculo da potência de flucloxacilina sódica em cápsulas

A potência foi calculada em quatro dias consecutivos utilizando a equação de Hewitt, conforme apresentado na seção 5.1.5.2 e está apresentada na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Potência de flucloxacilina sódica em cápsula, pelo método de difusão em ágar

Dia	Valor encontrado (mg/cápsula)*	Potência* (%)	Potência média (%)	CV (%)**
1	464,55	92,91		
2	474,95	94,99	94,48	1,64
3	482,10	96,42		
4	468,10	93,62		

* média de seis determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.1.9. Discussão

No desenvolvimento do método por difusão em ágar para FLU sódica foram realizados testes preliminares, e os resultados encontrados nestes ensaios demonstraram que:

- ✓ *M. luteus* com as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% e os meios de cultura ágar nº 1 para antibióticos e meio nº 11 de Grove-Randall apresentou crescimento bacteriano uniforme na placa, porém, os halos de inibição de crescimento foram pequenos sem

diferença de tamanho entre eles, mesmo quando houve aumento da concentração do fármaco em solução, utilizando solução tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0.

✓ *S. epidermidis* com as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% os meios de cultura ágar nº 1 para antibióticos e nº 11 de Grove-Randall apresentou crescimento bacteriano homogêneo na placa, mas os halos foram pequenos, quando utilizada solução tampão fosfato pH 6,0 e 8,0.

✓ *S. aureus* com a concentração de 0,5% utilizando o meio de cultura ágar nº 1 para antibióticos apresentou crescimento bacteriano não homogêneo na placa, e não houve formação de halos de inibição de crescimento. Com inóculo a 1,0%, o crescimento bacteriano na placa foi homogêneo e, houve diferença de tamanho entre os halos de inibição de crescimento quando utilizado solução tampão fosfato pH 6,0, entretanto, não houve diferença no tamanho dos halos quando utilizada solução tampão fosfato pH 8,0. Quando o inóculo foi utilizado a 1,5 e 2,0%, houve crescimento bacteriano muito denso na placa e os halos de inibição de crescimento não foram bem definidos, pois havia colônias nos halos. Ao empregar o meio nº 11 de Grove-Randall, houve crescimento bacteriano uniforme na placa, e, os halos de inibição de crescimento foram pequenos quando empregado solução tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0.

Diante dos resultados, foi padronizado *S. aureus* em concentração de 1,0% para o inóculo, meio de cultura ágar nº 1 para antibiótico, solução tampão fosfato pH 6,0 para diluição das soluções SQR e amostras. Estes resultados concordam com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) que preconiza *S. aureus*, meio nº 1 de Grove-Randall como camada de superfície para doseamento microbiológico de outras isoxazolilpenicilinas. A Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) preconiza meio nº 2 de Grove-Randall para camada base, mas foi utilizado o meio nº 1, pois, os testes preliminares mostraram bons resultados com uso deste meio para ambas as camadas.

Foram determinadas as concentrações 1,5; 3,0 e 6,0 µg/mL, uma vez que demonstraram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como preconizado no ensaio geral para antibióticos pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010).

A fim de assegurar a validade do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar na determinação da potência de FLU sódica, foram utilizadas três concentrações diferentes para a amostra, idênticas às da solução FLU-SQR, em delineamento 3 x 3. Estas doses estão em progressão geométrica (razão 2).

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 há desvio da linearidade e de paralelismo nas curvas

analíticas originadas da FLU-SQR e amostra. Os coeficientes de correlação são 0,9997 e 0,9999 respectivamente, para a SQR e cápsula, e foram satisfatórios.

A seletividade foi comprovada pela ANOVA para comparar as inclinações das curvas analíticas obtidas com a FLU-SQR e cápsulas. Os valores de F_{tab} e F_{calc} foram 7,71 e 0,051, respectivamente, demonstrando que o excipiente presente na cápsula não interfere nas análises, corroborando com os resultados dos ensaios de especificidade no qual não houve halo de inibição de crescimento bacteriano quando utilizada a solução de placebo.

O coeficiente de variação percentual dos halos de inibição de crescimento obtidos no doseamento da amostra foi, em média, de 1,63% para repetibilidade e 1,30% para precisão intermediária, menor que o recomendado de 5% (BRASIL, 2003a).

A quantidade de FLU sódica presente nas amostras analisadas, 94,48%, está de acordo com o compêndio oficial que é de 92,5 a 110,0% (BP, 2010c).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo a recuperação média de 98,96%.

O método mostrou-se robusto quando alteradas as condições de tempo de incubação. Entretanto, ao variar o volume da camada semeada, o método foi robusto quando alterado para menor volume, demonstrando que deve haver muito cuidado ao colocar a camada semeada na placa, pois maior volume do que o estabelecido pode acarretar alterações nos resultados, por haver maior espessura da camada semeada, dificultando a difusão da substância e acarretando em halos menores e, também por haver maior quantidade de micro-organismo inoculado.

Os parâmetros estudados para a validação do método microbiológico por difusão em ágar atenderam às especificações para validação, descritas na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010), comprovando o uso do método para a adequada quantificação de FLU sódica na forma farmacêutica cápsula.

Publicação obtida com os resultados deste estudo:

FIORENTINO, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of flucloxacillin sodium in capsules. **Int. J. Microbiol. Res.**, v. 4, n. 4, p. 213-218, 2012.

5.2. DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

5.2.1. Introdução

Hewitt (2004) descreve que o primeiro trabalho utilizando o ensaio turbidimétrico é de Foster (1942) para análise de penicilina.

Não foi encontrado na literatura trabalhos que descrevam o método turbidimétrico para análise de FLU sódica em cápsulas.

O método turbidimétrico está descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) para outros fármacos e uma de suas principais vantagens em relação ao método por difusão é o menor tempo de análise e ausência dos efeitos da difusão. Este método baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido por meio da turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos sensíveis ao agente antimicrobiano contido em um meio de cultura. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa.

O objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento e a validação de ensaio de determinação da potência de FLU sódica em cápsulas, utilizando o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

5.2.2. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a padronização das condições a serem utilizadas neste método foram realizados diversos ensaios preliminares verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 5.9).

Tabela 5.9. Parâmetros testados para avaliação de potência de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meios de cultura	caldo Heart Infusion Broth (BHI) caldo caseína soja
Diluyente	solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 solução tampão fosfato de potássio pH 8,0 água
Concentração da solução	1,5; 3,0; 6,0 µg/mL; 3,0; 9,0; 27,0 µg/mL; 5,0; 10,0; 20,0 µg/mL; 4,0; 8,0; 16,0 µg/mL
Concentração do inóculo	2,0; 5,0; 10,0%

5.2.3. Execução do ensaio

De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares, foram estabelecidos os parâmetros para desenvolvimento e validação do ensaio microbiológico – método turbidimétrico (Tabela 5.10).

Tabela 5.10. Parâmetros estabelecidos para determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meio de cultura	caldo BHI
Diluyente	solução tampão fosfato de potássio pH 6,0
Concentração da solução	4,0; 8,0; 16,0 µg/mL
Concentração do inóculo	10,0%
Temperatura de incubação	35 ± 1 °C
Tempo de incubação	4 horas

5.2.4. Material

Foram utilizados FLU sódica SQR e cápsulas, descritos nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente.

Foi utilizado o meio de cultura ágar caseína-soja (Casoy) (Acumedia[®], Lansing, EUA) para manutenção da cepa do micro-organismo, caldo BHI (Acumedia[®], Lansing, EUA) para preparo e padronização do inóculo e realização do ensaio. Os meios de cultura, água e ponteiros foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C. A água utilizada foi ultrapura, obtido por sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Malsheim, França).

Para preparo das soluções tampão fosfato de potássio pH 6,0 e 8,0 foram utilizados fosfato de potássio dibásico (Vetec[®], Rocha, Brasil) e monobásico (Vetec[®], Rocha, Brasil).

Foram empregados tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura devidamente tampados com algodão. Para a incubação foi utilizado incubador Shaker Marconi[®] modelo MA420 (Piracicaba, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás[®], Ribeirão Preto, Brasil) e, para as leituras, foi utilizado espectrofotômetro Beckman modelo DU[®] 530.

5.2.4.1. Preparo da solução de flucloxacilina sódica SQR

Foram pesados 11,22 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água e esterilizada, obtendo uma solução com concentração de 100 µg/mL. Esta correção foi realizada porque a SQR estava com 90% de pureza. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 400; 800 e 1600 µL para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com solução tampão fosfato de potássio pH 6,0, obtendo soluções com concentrações finais de 4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL, codificadas de P₁, P₂ e P₃, respectivamente.

5.2.4.2. Preparo das amostras de flucloxacilina sódica em cápsulas

A partir do *pool* obtidos das cápsulas, foram pesados o equivalente a 10 mg de FLU sódica e seguiu-se o mesmo procedimento descrito na seção 5.2.4.1 obtendo-se soluções com concentrações finais de 4,0; 8,0, e 16,0 µg/mL, codificadas de A₁, A₂ e A₃, respectivamente.

5.2.4.3. Preparo do meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultura ágar caseína soja para manutenção da cepa do micro-organismo em tubos de ensaio com meio inclinado, meio de cultura caldo BHI para preparo, padronização do inóculo e realização do ensaio. Os meios de cultura foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em

água deionizada, sob aquecimento, distribuídos nos tubos de ensaio (10 mL/tubo) e esterilizados em autoclave por 15 minutos à 121 °C e 1 atm.

5.2.4.4. Preparo do inóculo

O micro-organismo teste *Staphylococcus aureus*, mantido em ágar caseína soja inclinado em tubo de ensaio, foi repicado para caldo BHI e incubado por 24 horas a 35 ± 1 °C. A padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm com transmitância de $25 \pm 2\%$ (FB 5, 2010). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 10% em caldo BHI.

5.2.5. Ensaio

Após o preparo do inóculo, descrito na seção 5.2.4.4, 10,0 mL de caldo BHI foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 200 µL das soluções de SQR e amostra (P_1 , P_2 , P_3 e A_1 , A_2 , A_3). Em seguida, em cada tubo foi adicionado 1,0 mL de caldo BHI inoculado e previamente padronizado. Foram utilizados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas 3 x 3, sendo três tubos para cada concentração de padrão e da amostra, um tubo para controle negativo (contendo apenas caldo BHI) e um tubo para controle positivo (presença de micro-organismo e caldo). Todas as concentrações de SQR e amostras foram testadas em triplicata.

Todos os tubos foram incubados em banho aquecido a 35 ± 1 °C com agitador orbital, por 4 horas. Terminado o período de incubação, em todos os tubos foram adicionados 500 µL de solução de formaldeído 12%, a fim de interromper o crescimento bacteriano. A absorvância da suspensão de cada tubo foi determinada em espectrofotômetro a 530 nm, sendo que o equipamento foi zerado com o tubo contendo o controle negativo (10 mL de caldo e 500 µL de formaldeído 12%).

5.2.5.1. Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida como descrito na seção 5.2.5. Foram construídas curvas analíticas diariamente, durante três dias consecutivos. A reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração em função da absorvância das suspensões, com as médias das absorvâncias de cada uma das concentrações da curva analítica.

5.2.5.2. Cálculo da potência de flucloxacilina sódica em cápsulas

A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (2004). A equação utiliza as médias das leituras de absorvância dos tubos obtidas com as três doses de FLU-SQR e FLU-cápsulas, nos 18 tubos analisados em cada ensaio. A equação foi descrita para o doseamento microbiológico por difusão em ágar, seção 5.1.5.2.

5.2.6. Validação do método microbiológico

5.2.6.1. Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita na seção 5.2.5.1, foram analisados para obtenção da equação da reta através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada pela análise de variância (ANOVA). Também foram avaliados os coeficientes de correlação.

5.2.6.2. Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade (intradia), três tubos com cada uma das três concentrações de solução de FLU-SQR e FLU-cápsula foram preparados e os resultados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, foram analisados quanto ao coeficiente de variação percentual (CV%) para cada concentração utilizada.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido na análise de três réplicas da solução padrão (P_2) em três dias consecutivos.

5.2.6.3. Exatidão

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R_1), 100 (R_2) e 120% (R_3) de solução de FLU-SQR às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 6,4; 8,0 e 9,6 $\mu\text{g/mL}$. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar a potência de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Preparo das soluções para o teste de recuperação do ensaio microbiológico, pelo método turbidimétrico

	volume de solução amostra (100 µg/mL) (µL)	volume de solução FLU-SQR adicionada (100 µg/mL) (µL)	concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	450	-	4,5
R₁	450	190	6,4
R₂	450	350	8,0
R₃	450	510	9,6
SQR	-	450	4,5

* cada concentração foi preparada em triplicata em balão volumétrico de 10 mL.

5.2.6.3.1. Cálculo do teste de recuperação

A porcentagem de FLU sódica recuperada foi calculada pela equação da reta para encontrar a concentração de cada nível (R₁, R₂ e R₃), seguida pela Equação 2, (AOAC, 2002), descrita na seção 5.1.6.3.1.

5.2.6.4. Robustez

Foi avaliada por meio de modificações nas condições experimentais estabelecidas, tais como: tempo de incubação (3h35min e 4h25min). As respostas obtidas com a solução padrão (P₂) nas diferentes condições foram analisadas estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* para avaliar a interferência das modificações.

5.2.6.5. Especificidade/ Seletividade

A especificidade foi avaliada por meio das soluções placebo. As amostras foram preparadas com o excipiente presente nas cápsulas de acordo com a seção 5.2.4.2. Foi verificado se houve diferença nos valores de absorvâncias em relação ao controle positivo, quando estas soluções foram utilizadas.

A seletividade foi comprovada pelo teste de análise de variância realizada para os valores da inclinação da reta das curvas analíticas obtidas com a solução de FLU-SQR e FLU-cápsula, durante três dias consecutivos (BRUCE et al., 1998).

5.2.7. Resultados

Os resultados dos valores de absorvância obtidos para as soluções de diferentes concentrações de FLU-SQR e FLU-cápsulas estão apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Valores das absorvâncias determinadas para obtenção da curva analítica de flucloxacilina sódica, pelo método turbidimétrico

	Concentração (µg/mL)	Absorvâncias*	Absorvância média	CV (%)**
P₁	4,0	0,640 0,678 0,643	0,654	3,23
P₂	8,0	0,514 0,504 0,522	0,513	1,76
P₃	16,0	0,365 0,369 0,373	0,370	1,08
A₁	4,0	0,656 0,689 0,644	0,663	3,51
A₂	8,0	0,527 0,557 0,523	0,536	3,47
A₃	16,0	0,356 0,366 0,348	0,357	2,53

*cada valor é a média de três determinações realizadas em um dia, durante três dias; ** CV (%) = coeficiente de variação percentual.

As curvas analíticas de FLU-SQR e FLU-cápsula (Figura 5.4) foram construídas com as médias dos valores das absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados são: $y = -0,20823\ln(x) + 0,94367$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, para FLU-SQR e $y = -0,22097\ln(x) + 0,97794$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9953, para FLU-cápsulas.

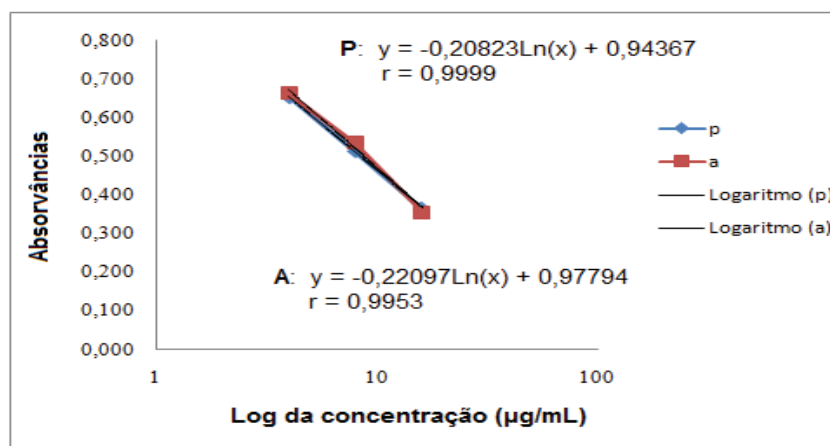


Figura 5.4. Representação gráfica da curva analítica de soluções de FLU-SQR e FLU-cápsulas, em concentrações de 4,0; 8,0; 16,0 µg/mL, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

5.2.7.1. Validação

5.2.7.1.1. Linearidade

A validação da metodologia foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) para ensaio 3 x 3 (Tabela 5.13). Também foram avaliados os coeficientes de correlação.

Tabela 5.13. Análise da variância dos valores das absorvâncias obtidas no ensaio microbiológico com a solução de flucloxacilina sódica pelo método turbidimétrico

Fontes de variação	GL	SG	QM	F _{calc}	F _{tab}
Preparação	1	0,00027	0,00027	1,39	4,96
Regressão	1	0,26552	0,26552	1354,53*	4,96
Desvio de paralelismo	1	0,00023	0,00023	1,19	4,96
Quadrático	1	0,00089	0,00089	4,54	4,96
Diferença de quadrático	1	0,00048	0,00048	2,43	4,96
Entre doses	5	0,2674	0,0535	272,82*	3,33
Entre tubos	2	0,0011	0,0006	2,84	4,10
Dentro (erro)	10	0,0020	0,0002		
Total	17	0,2705			

*Significativo para $p < 0,05$; GL = graus de liberdade.

Assim como para o ensaio microbiológico, método de difusão em ágar, o método turbidimétrico deve atender aos requisitos de regressão linear significativa, termos quadráticos não significativos e paralelismo não significativo (FB 5, 2010).

5.2.7.1.2. Precisão

A repetibilidade forneceu CV% inferior a 1,80%.

A precisão interdias forneceu CV% de 2,84%.

5.2.7.1.3. Exatidão

Foi determinada pelo teste de recuperação. Utilizando a Equação 2, obteve-se valor médio de exatidão de 99,73% e os valores estão apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Teste de recuperação do ensaio microbiológico, método turbidimétrico para análise de flucloxacilina sódica

	FLU-SQR adicionada (µg/mL)*	FLU-SQR encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)**
R ₁	2,3	2,28	99,05		
R ₂	3,5	3,49	99,76	99,73	0,67
R ₃	4,7	4,72	100,39		

*cada valor é a média de três determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.2.7.1.4. Robustez

Durante as análises da solução padrão sob os parâmetros alterados e estabelecidos, o teste *t* de *Student* comprovou a robustez do método proposto, apenas quando o tempo de incubação foi menor que o tempo estabelecido, conforme apresentado na Tabela 5.15.

Tabela 5.15. Avaliação da robustez do ensaio microbiológico, método turbidimétrico para análise de flucloxacilina sódica

Variável	Tempo investigado	<i>t</i> tab	<i>t</i> calc
Tempo de incubação	3h35	2,18	1,14
	4h25	2,18	7,25*

t tab = *t* tabelado; *t* calc = *t* calculado; *significativo para $p < 0,05$.

5.2.7.1.5. Especificidade/ Seletividade

A especificidade foi demonstrada por meio das soluções placebo. Não houve diferença nos valores de absorvâncias em relação ao controle positivo, quando utilizadas estas soluções. Portanto, o teste não sofre interferência do excipiente e os resultados são decorrentes apenas do antimicrobiano em estudo.

A seletividade, comprovada pelo teste de análise de variância, para comparar as inclinações das curvas analíticas obtidas com FLU-SQR e FLU cápsula, demonstrou valor de F_{calc} e F_{tab} de 0,19 e 7,71, respectivamente, indicando que não há interferência do excipiente nas análises, corroborando com os resultados de especificidade.

5.2.8. Cálculo da potência de flucloxacilina sódica nas cápsulas

A potência foi calculada em três dias consecutivos utilizando a equação de Hewitt, conforme apresentado na seção 5.1.5.2 e está apresentada na Tabela 5.16.

Tabela 5.16. Potência de flucloxacilina sódica em cápsula pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico

Dia	Valor encontrado (mg/cápsula)*	Teor (%)*	Teor médio (%)	CV (%) interdía**
1	481,65	96,33		
2	469,05	93,81	96,25	2,50
3	493,10	98,62		

*cada valor é a média de três determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.2.9. Discussão

Foram escolhidas as concentrações 4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL, uma vez que apresentaram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010).

S. aureus foi utilizado como micro-organismo teste diante dos resultados encontrados nos ensaios preliminares, por ser sensível à FLU sódica, e, também porque a FLU é indicada para infecções causadas por esta bactéria, além disso, de acordo com Kavanagh e Ragheb (1979), este micro-organismo é comum para ensaios turbidimétricos por ser uma cultura estável e crescer em meio de cultura relativamente simples.

A linearidade do método foi comprovada pelos coeficientes de correlação de 0,9999 e 0,9953 para FLU-SQR e amostra, respectivamente, os quais foram bastante próximos da unidade. Além disso, a análise de variância demonstrou significativa regressão e ausência de desvios da linearidade e paralelismo nas curvas analíticas originadas da SQR e amostra.

A seletividade foi comprovada estatisticamente pela análise de variância para comparar as inclinações das curvas analíticas obtidas com a FLU-SQR e amostra e os valores de F_{tab} e F_{calc} foram 7,71 e 0,19, respectivamente, demonstrando que o excipiente presente na cápsula não interfere nas análises.

Os testes de repetibilidade e precisão intermediária demonstraram CV% de 1,80 e 2,84%, respectivamente, validando assim a precisão do método turbidimétrico para análise de FLU sódica.

A quantidade de FLU sódica presente nas amostras analisadas, 96,25%, está de acordo com o compêndio oficial que é de 92,50 a 110,0% (BP, 2010c).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada a média de 99,73%, comprovando a capacidade do método de determinar teores pré-definidos de maneira exata.

As pequenas alterações efetuadas no período de incubação do método durante a avaliação da robustez, demonstraram que ao diminuir o período de incubação, o método mostrou-se robusto, porém, ao aumentar o período de incubação houve diferença nos resultados, alertando para a necessidade de prestar muita atenção em relação ao tempo de incubação.

O ensaio turbidimétrico representa importante alternativa para avaliação de potência de antimicrobianos, pois é um método simples e, principalmente, rápido. O método proposto neste trabalho necessita de apenas quatro horas de incubação. Desta maneira, o método validado pode ser amplamente aplicado em laboratórios, onde a disponibilidade de tempo e equipamentos é limitada.

Os parâmetros estudados para a validação do método turbidimétrico atenderam às especificações dos guias nacionais e internacionais, para a adequada e segura avaliação da potência de FLU sódica na forma farmacêutica cápsulas. Portanto, este método pode ser utilizado com segurança e como alternativa ao método de difusão em ágar, por ser mais rápido, para as análises de controle de qualidade.

5.3. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

5.3.1. Introdução

A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, devido ao baixo custo, robustez, exatidão, simplicidade, facilidade e geração de menor quantidade de resíduos, para análise de diversos compostos orgânicos. Porém, esta técnica apresenta limitada seletividade, mas há estratégias que permitem aumentar a sensibilidade de métodos espectrofotométricos, como formação de produtos com maiores absorvidades molares, aumento do caminho óptico e explorar a concentração da substância em análise (ROCHA, TEIXEIRA, 2004). Por possuírem baixa seletividade, quando utilizadas as técnicas espectrofotométricas na região do UV-VIS para analisar a presença de produtos de degradação ou impurezas relacionadas ao fármaco, devem ser complementadas com outras técnicas analíticas como a CLAE (ROCHA, TEIXEIRA, 2004; CARDOSO et al., 2006).

A espectrofotometria tem como fundamento a lei de Lambert-Beer que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido e gasoso, nas regiões do UV, VIS e infravermelho do espectro eletromagnético. A absorção de radiação em determinado comprimento de onda pode ser obtido pela fórmula: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, em que A é absorvância, I_0 é a intensidade de radiação que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. Absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente que depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo b , é a distância percorrida pelo feixe na amostra; c , é a concentração da espécie absorvente (VOGEL, 2002; HARRIS, 2001; ROCHA, TEIXEIRA, 2004).

As técnicas espectrofotométricas continuam sendo utilizadas para análise de diferentes classes de fármacos e medicamentos sejam na forma de matéria-prima, formulações farmacêuticas e em amostras biológicas uma vez que permitem a determinação de parâmetros como quantificação da substância em análise, constante de equilíbrio e velocidade de reações (ROCHA, TEIXEIRA, 2004; AMIN et al., 2008).

Na literatura foi encontrado trabalho utilizando a técnica espectrofotométrica com detecção na região do UV para análise de penicilina G (LEVY et al., 2003), mas não foi encontrado para FLU sódica em cápsulas.

Este estudo teve por objetivo desenvolver e validar metodologia na região do espectro do UV para avaliar o teor de FLU sódica presente na forma farmacêutica cápsulas.

5.3.2. Material

As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS KAYAK® XA modelo HP 8453, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foi utilizado como solvente água, obtida por sistema de purificação Milli-Q® (Malsheim, França). A SQR e as amostras utilizadas foram descritas nas seções 4.1.2 e 4.1.3, respectivamente.

5.3.3. Método

5.3.3.1. Preparo da solução de flucloxacilina sódica SQR

Foram pesados 40 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água. As leituras de absorvâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 274 nm, utilizando o solvente puro como branco para zerar o equipamento.

5.3.3.2. Preparo da solução de flucloxacilina sódica em cápsulas

A partir do *pool* das cápsulas, foram pesados analiticamente o equivalente a 40 mg de FLU e transferidos para balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com água, obtendo solução com concentração de 200 µg/mL. Alíquota de 3,750 mL desta solução foi transferida para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água, obtendo soluções com concentração final de 75 µg/mL. As soluções foram preparadas em sete réplicas e as leituras foram realizadas em comprimento de onda de 274 nm. O cálculo da concentração e do teor de FLU sódica nas amostras foi realizado de acordo com as Equações 4 e 5 (seção 5.3.5).

5.3.3.3. Curva para determinação da faixa linear

A faixa linear foi obtida através de uma curva para estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do UV apresenta linearidade. A partir da solução A, descrita na seção 5.3.3.1., foram preparadas diluições em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se uma curva com 16 pontos, com concentrações variando de 50,0 a 200 µg/mL de FLU-SQR. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 274 nm.

5.3.3.4. Preparo da curva analítica

Para obtenção da curva analítica de FLU-SQR foram transferidas alíquotas de 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mL da solução descrita na seção 5.3.3.1 para balões volumétricos de

10 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se soluções com concentrações finais de 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 274 nm, utilizando água como branco e as curvas foram obtidas em três diferentes dias.

5.3.4. Validação do método espectrofotométrico

Os parâmetros foram determinados de acordo com a literatura (FDA, 2000; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; SOUZA, JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2011; BONFILIO et al., 2011).

5.3.4.1. Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica (seção 5.3.3.4) foram analisados para obtenção da equação da reta através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade foi avaliada pela análise de variância (ANOVA). Também foi avaliado o coeficiente de correlação.

5.3.4.2. Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade, sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 75,0 µg/mL foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista e o coeficiente de variação percentual (CV%) entre as análises foi calculado.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido na análise de sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 75 µg/mL em três dias consecutivos.

Também foi realizada a análise entre analistas diferentes no mesmo dia e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de FLU-SQR preparadas pelos diferentes analistas.

5.3.4.3. Exatidão

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R_1), 100 (R_2) e 120% (R_3), em relação à concentração de trabalho, de solução de FLU-SQR às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 60; 75 e 90 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com

concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 5.17.

Tabela 5.17. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do ultravioleta

	Volume adicionado de amostra (100 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de FLU-SQR (200 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
A	3,0	-	30
R₁	3,0	1,50	60
R₂	3,0	2,25	75
R₃	3,0	3,00	90
SQR	-	1,50	30

*cada nível de concentração foi preparado em triplicata em balão volumétrico de 10 mL.

A percentagem de FLU sódica recuperada (R%) foi calculada utilizando-se a Equação 2, descrita na seção 5.1.6.3.1 (AOAC, 2002).

5.3.4.4. Especificidade e seletividade

A especificidade foi comprovada pela comparação da resposta obtida para o fármaco na ausência do excipiente (SQR), na presença do excipiente (cápsula) e com a solução placebo (BRASIL, 2003a).

A seletividade foi demonstrada pelo teste de análise de variância realizada para os valores da inclinação da reta das curvas analíticas obtidas com a solução de FLU-SQR e FLU-cápsula, durante três dias consecutivos (BRUCE et al., 1998).

5.3.4.5. Robustez

Foi avaliada por meio de modificação nas condições experimentais estabelecidas, tais como: comprimento de onda das análises (273 e 275 nm). Os valores de absorvância obtidos com a solução de FLU-SQR na concentração de 75 µg/mL nos diferentes comprimentos de onda foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* para avaliar a interferência das modificações.

5.3.4.6. Limite de detecção (LD)

Foi estimado a partir das três curvas analíticas obtidas utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto com eixo y e a média das inclinações das curvas analíticas (Equação 3) (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

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

Em que: σ = desvio padrão do intercepto
IC = média das inclinações das curvas analíticas

5.3.4.7. Limite de quantificação (LQ)

Foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto com eixo y e a média das inclinações das curvas analíticas (Equação 4) (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

Em que: σ = desvio padrão do intercepto
IC = média das inclinações das curvas analíticas

5.3.5. Cálculo do teor de flucloxacilina sódica em cápsula

As soluções de FLU-SQR e FLU-cápsulas foram preparadas em sete réplicas. O cálculo da concentração e do teor de FLU sódica nas cápsulas foi realizado de acordo com as Equações 5 e 6, durante três dias consecutivos pelo mesmo analista e, em um mesmo dia por analistas diferentes.

Concentração

$$C_A = (A_A \times C_{SQR}) / A_{SQR} \quad \text{Equação 5}$$

Em que: C_A = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)
 C_{SQR} = concentração da solução SQR ($\mu\text{g/mL}$)
 A_A = absorvância da amostra
 A_{SQR} = absorvância da solução SQR

Teor percentual

$$C_A\% = (C_A \times 100) / C_t \quad \text{Equação 6}$$

Em que: C_A = concentração de FLU sódica encontrada na amostra ($\mu\text{g/mL}$)
 C_t = concentração teórica de FLU sódica na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

5.3.6. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica

Para avaliar a estabilidade da solução de FLU sódica, foi preparada solução estoque de FLU na concentração de 200 µg/mL, conforme descrito no item 5.4.3.2 e foi armazenada em temperatura ambiente por 7 dias. Em seguida, foi preparada solução com concentração de 75 µg/mL, em água e analisada.

5.3.7. Resultados

A Figura 5.5 apresenta os espectros obtidos para solução de FLU-SQR e FLU-cápsulas.

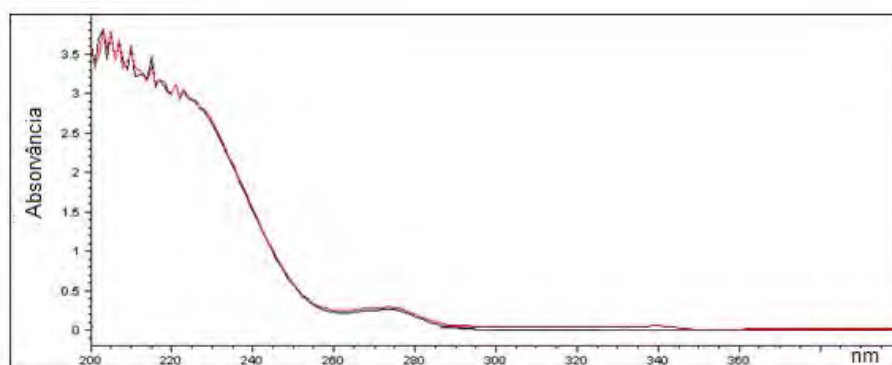


Figura 5.5. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV a 274 nm, de solução de flucloxacilina sódica SQR (preto) e amostra (vermelho), utilizando água como solvente. Comprimento de onda: 274 nm.

5.3.7.1. Obtenção da curva para avaliar a linearidade

A Tabela 5.18 apresenta os valores obtidos com a curva para determinar a faixa linear para FLU-SQR utilizando água como solvente e, a Figura 5.6 apresenta a curva correspondente.

Tabela 5.18. Valores obtidos na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para FLU-SQR, utilizando água como solvente e comprimento de onda de 274 nm

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	Absorvância	100-T%
1	50	0,12035	24,20335
2	60	0,14885	29,01771
3	70	0,17774	33,58594
4	80	0,19756	36,54878
5	90	0,22825	40,87788
6	100	0,24072	42,55133
7	110	0,27230	46,58048
8	120	0,28526	48,15105
9	130	0,32202	52,35910
10	140	0,34525	54,84041
11	150	0,36685	57,03152
12	160	0,39192	59,44168
13	170	0,37983	58,29674
14	180	0,42116	62,08247
15	190	0,45974	65,30555
16	200	0,47260	66,31783

*diluída em balão volumétrico de 10 mL.

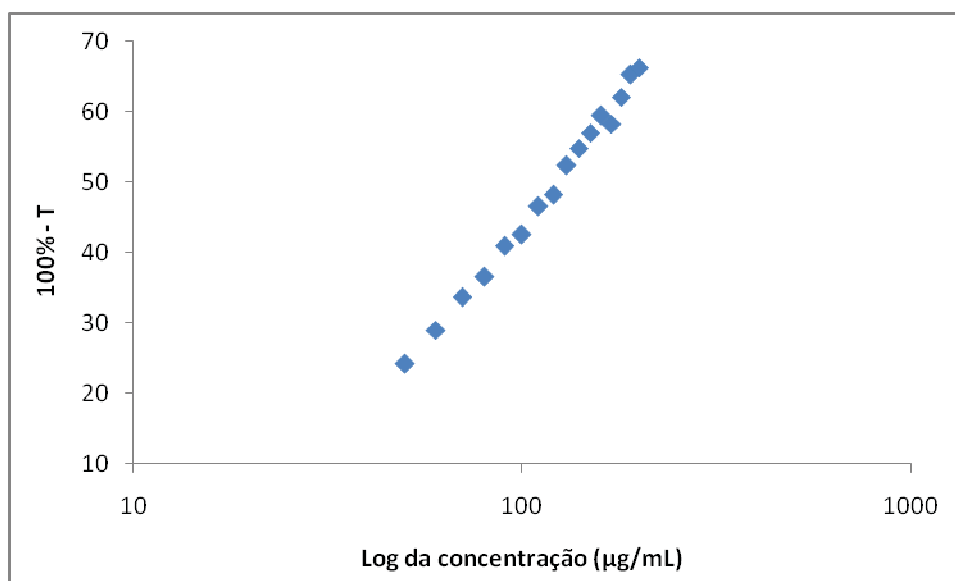


Figura 5.6. Determinação da faixa linear para o método espectrofotométrico na região do UV para solução de FLU-SQR, utilizando água como solvente, no comprimento de onda de 274 nm.

5.3.7.2. Obtenção da curva analítica

A Tabela 5.19 apresenta os valores de absorvância para as diferentes concentrações obtidos na construção da curva analítica para FLU-SQR, utilizando água como solvente.

Tabela 5.19. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de FLU-SQR por espectrofotometria na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente

Concentração de FLU-SQR (µg/mL)*	Absorvância	Absorvância média	CV (%)**
50	0,109	0,110	1,05
	0,109		
	0,111		
60	0,131	0,132	1,15
	0,132		
	0,134		
70	0,156	0,156	0,37
	0,156		
	0,157		
80	0,179	0,180	0,56
	0,180		
	0,181		
90	0,203	0,204	0,75
	0,204		
	0,206		
100	0,224	0,227	1,17
	0,228		
	0,229		

*cada valor é a média de três determinações realizada em um dia, durante três dias; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

A curva analítica de FLU-SQR (Figura 5.7) foi construída com a média dos valores de absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

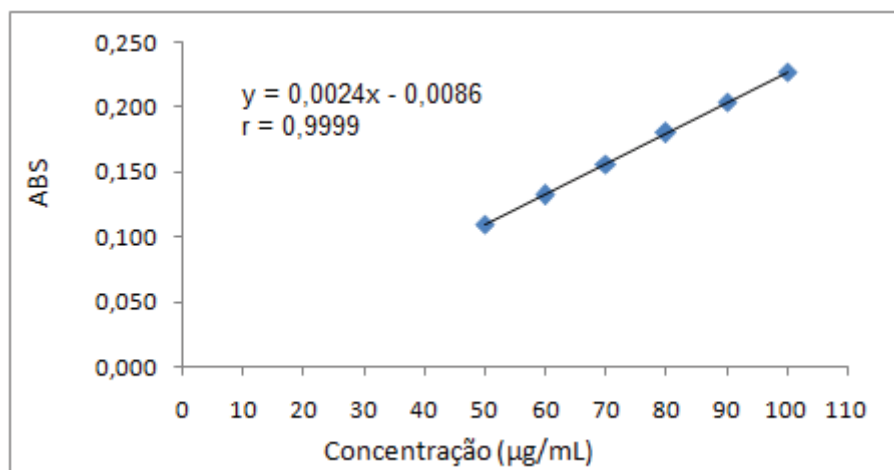


Figura 5.7. Curva analítica da solução de FLU-SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente.

5.3.7.3. Validação

5.3.7.3.1. Linearidade

A regressão linear da curva analítica obtida pelo método dos mínimos quadrados, para obtenção da curva analítica para o método espectrofotométrico na região do UV, foi analisada estatisticamente pela ANOVA e os resultados estão apresentados na Tabela 5.20.

Tabela 5.20. Análise de variância dos valores de absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de FLU-SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente

Fontes de variação	GL	soma dos quadrados	variância	F _{calc}	F _{tab}
entre doses	5	0,02927	0,00585	2450,26*	3,11
regressão linear	1	0,02924	0,02924	12238,72*	4,75
desvio de linearidade	4	0,00003	0,0000075	3,14	4,79
resíduo	12	0,0000287	0,000002389	-	-
total	17	0,02930	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$; GL = graus de liberdade.

Os resultados de regressão significativa e desvio da linearidade não significativo, valida o método espectrofotométrico na região do UV para FLU sódica quanto ao parâmetro de linearidade. Além disso, o coeficiente de correlação foi muito satisfatório indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

A absorvidade molar (ϵ) foi calculada pela Equação 7:

$$\epsilon = A/(c \times b) \quad \text{Equação 7}$$

Em que: A = absorvância

c = concentração molar

b = caminho óptico da cubeta (cm)

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 5.21.

Tabela 5.21. Parâmetros analíticos utilizados no desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV a 274 nm, utilizando água como solvente para quantificação de flucloxacilina sódica em cápsula

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	274
ϵ (L/mol.cm)	$4,67 \times 10^5$
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	50 - 100
Equação: $y = ax + b$	
a	0,0024
b	- 0,0088
r (coeficiente de correlação)	0,99995
n	6

5.3.7.3.2. Precisão

A repetibilidade forneceu CV% de 1,02%.

Para a precisão interdias obteve-se valor de CV% de 2,40% e para precisão entre analistas, obteve-se CV% de 1,61%.

5.3.7.3.3. Exatidão

Foi comprovada através da análise de soluções em três concentrações pré-estabelecidas. Os valores encontrados no teste de recuperação de FLU sódica utilizando espectrofotometria na região do UV estão na Tabela 5.22.

Tabela 5.22. Teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	FLU sódica SQR adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	FLU sódica SQR encontrada ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)**
R₁	30	30,03	101,10		0,91
R₂	45	44,99	99,98	100,09	0,20
R₃	60	60,12	100,20		1,05

*cada valor é a média de três determinações; **CV(%) = coeficiente de variação percentual.

5.3.7.3.4. Especificidade/ Seletividade

A Figura 5.8 apresenta a sobreposição dos espectros obtidos com a FLU-SQR, FLU-cápsula e placebo para comprovação da especificidade do método espectrofotométrico na região do ultravioleta proposto.

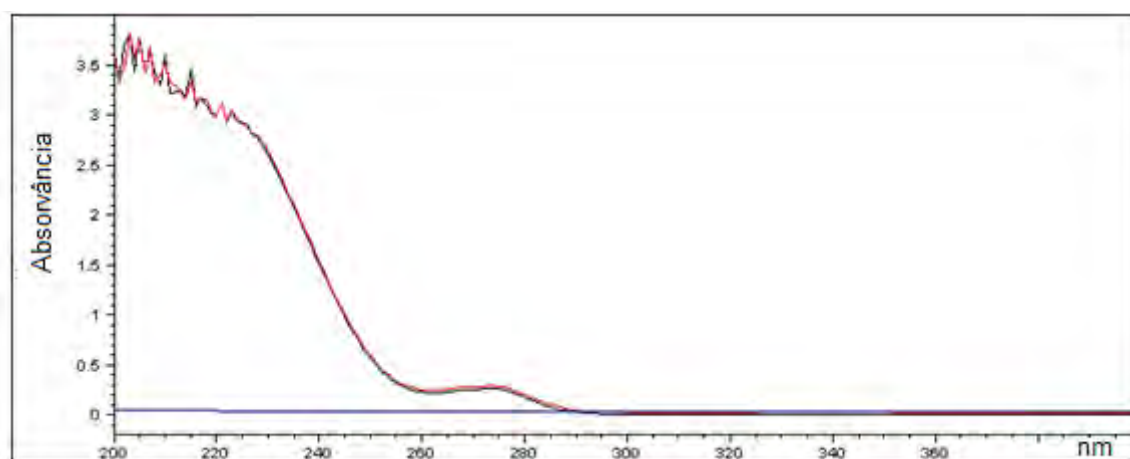


Figura 5.8. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de FLU-SQR (preto), FLU-cápsula (vermelho), placebo (azul), utilizando água como solvente, no comprimento de onda de 274 nm.

Como pode ser visto na Figura 5.8, não há absorção do excipiente no comprimento de onda utilizado para as análises espectrofotométricas na região do UV, demonstrando que o excipiente presente nas cápsulas não interfere nos resultados obtidos.

A Tabela 5.23 apresenta os valores da inclinação das retas das curvas analíticas obtidas com FLU-SQR amostra, no comprimento de onda de 274 nm, utilizando água como solvente e a análise de variância para comprovação da seletividade do método proposto.

Tabela 5.23. Valores da inclinação das retas das curvas analíticas determinadas para FLU-SQR e FLU-cápsula, pelo método espectrofotométrico na região do UV

	Dias			Média	CV (%)*	F_{calc}	F_{tab}
	1	2	3				
FLU-SQR	0,0024	0,0024	0,0023	0,0024	2,44	1,0	7,70
FLU-cápsula	0,0022	0,0023	0,0024	0,0023	4,35		

*CV(%) = coeficiente de variação percentual.

A seletividade do método proposto avaliada pela ANOVA demonstrou que não há diferença significativa entre as médias encontradas para a inclinação da reta da curva analítica obtida com a solução de FLU-SQR e amostra, indicando que não há interferência do excipiente nas análises, corroborando com os resultados obtidos na especificidade.

5.3.7.3.5. Robustez

O teste *t* de *Student* demonstrou que não há diferença significativa entre os valores de absorvância encontrados, comprovando a robustez do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme apresentado na Tabela 5.24.

Tabela 5.24. Avaliação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV para análise de flucloxacilina sódica

λ (nm)	t_{calc}	t_{tab}
273	0,51	2,18
275	0,61	2,18

5.3.7.3.6. Limites de detecção e de quantificação

Foram calculados de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente, e os valores encontrados foram 2,75 µg/mL e 8,34 µg/mL, respectivamente.

5.3.7.4. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica

A solução de FLU sódica na concentração de 200 µg/mL, em água e armazenada em temperatura ambiente, demonstrou ser estável por 7 dias.

5.3.7.5. Cálculo do teor de flucloxacilina sódica nas cápsulas

O teor obtido para as cápsulas de flucloxacilina sódica através do método espectrofotométrico na região do UV está apresentado na Tabela 5.25.

Tabela 5.25. Determinação do teor interdias e entre-analistas das cápsulas de flucloxacilina sódica por espectrofotometria na região de UV

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre analistas		
		Teor (mg)*	Teor (%)*	CV (%)**		Teor (mg)*	Teor (%)*	CV (%)**
1	1	533,30	106,66	1,58	A	533,64	106,73	1,17
	2	541,15	108,23		B	542,58	108,52	
	3	529,35	104,87					

*cada valor é a média de sete determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.3.8. Discussão

Para desenvolver o método espectrofotométrico para a análise quantitativa de FLU sódica na região do UV foram avaliados os espectros de absorção da FLU-SQR em diferentes solventes, bem como a ausência da influência do excipiente das cápsulas na absorção de luz pela substância em análise.

O método espectrofotométrico proposto foi desenvolvido e validado utilizando água como solvente, baseado no pico de absorção do fármaco neste solvente e nos demais solventes utilizados para análise qualitativa, seção 4.2.6, e na facilidade de aquisição deste solvente levando-se em consideração o seu custo e a geração de pouca quantidade de resíduos, que hoje é uma grande preocupação das indústrias farmacêuticas. Além disso, a FLU apresenta degradação em meios ácido e básico, conforme será apresentado no capítulo 7. Os espectros de absorção para FLU-SQR e cápsula mostraram pico de absorção em 274 nm (Figura 5.5).

De acordo com a Figura 5.6, foi possível observar que praticamente todas as concentrações estudadas foram lineares, assim, a faixa de concentração escolhida para desenvolver e validar o método espectrofotométrico na região do UV foi de 50,0 a 100 µg/mL, pois nestas concentrações evita-se o gasto desnecessário de grandes quantidades de SQR.

O método analítico proposto apresentou regressão linear significativa no intervalo de concentração de 50 a 100 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9999 e coeficiente de variação percentual entre as determinações inferior a 2%, demonstrando excelente correlação linear entre os dados analisados.

A repetibilidade forneceu CV% de 1,02%.

A precisão intermediária forneceram CV% de 2,40% e, para precisão entre analisadas o CV% foi de 1,61%.

De acordo com o guia do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2011), o número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a sete para permitir o uso adequado de modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida.

A recuperação média de FLU-SQR foi de 100,09%, comprovando a exatidão do método proposto, pois valores de recuperação entre 98 a 102% atendem os requisitos legais deste ensaio (ICH, 2005).

Os resultados obtidos através do teste *t* de *Student*, para o teste de robustez, demonstraram não haver diferença significativa entre os valores de absorvância obtidos, demonstrando que o método é robusto para o parâmetro analisado.

A especificidade foi analisada a fim de verificar se o método utilizado produz resposta analítica para apenas uma substância de interesse (INMETRO, 2007). Portanto, a especificidade do método em análise foi comprovada comparando os espectros obtidos com a solução de FLU-SQR e cápsulas. De acordo com a Figura 5.8, os espectros de absorção são semelhantes, demonstrando que o excipiente presente nas cápsulas não interferem na absorção, e, portanto, o método é específico para FLU sódica.

A seletividade é analisada a fim de distinguir a substância de interesse de outras substâncias que possam estar presentes na mesma amostra (INMETRO, 2011). A seletividade do método foi comprovada pelo cálculo da ANOVA para os valores da inclinação da reta obtidos para três curvas analíticas para solução de FLU-SQR e três curvas analíticas para solução de FLU-cápsulas. Os resultados mostraram que o valor calculado foi menor que o valor tabelado ($F_{\text{calc}} = 1,0$ e $F_{\text{tab}} = 7,70$), ressaltando que o excipiente presente nas cápsulas de FLU sódica não interfere na análise do fármaco na forma farmacêutica de cápsulas.

O limite de detecção foi analisado com o objetivo de se conhecer qual o menor valor de concentração do fármaco pode ser detectado pelo método espectrofotométrico proposto, com razoável certeza estatística, mas não necessariamente quantificado. O limite de quantificação é a menor concentração do fármaco na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (FDA, 1994; ICH 2005; La ROCA et al., 2007). Diante dos resultados encontrados para LQ e LD, os valores utilizados para validação do método espectrofotométrico proposto são seguros, uma vez que a menor concentração utilizada para obtenção da curva analítica foi 50 µg/mL, e a concentração utilizada para realizar o doseamento da FLU nas cápsulas foi 75 µg/mL, estando bem acima dos LD e LQ, respectivamente, 2,75 e 8,34 µg/mL.

O teor médio de FLU sódica nas cápsulas obtido em três dias consecutivos pelo mesmo analista e, em um mesmo dia por analistas diferentes, foi de 106,59 e 107,62 com CV% de 1,58 e 1,17%, respectivamente (Tabela 5.25). Estes valores de teor de FLU sódica

estão dentro do permitido que é de 92,5 a 110% (BP, 2010c), demonstrando que o método proposto é apropriado para quantificar o fármaco nas cápsulas.

O método espectrofotométrico proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, podendo ser utilizado para quantificar FLU sódica em cápsulas auxiliando na rotina do controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, como um método alternativo à CLAE.

Publicação obtida com os resultados deste estudo:

FIORENTINO, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a UV-spectrophotometric method for determination of flucloxacillin sodium in capsules. **Cur. Pharm. Anal.**, v. 8, p. 101-106, 2012.

5.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

5.4.1. Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica físico-química de separação de uma mistura, realizada pela distribuição dos componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo, fase estacionária (sólida) e a fase móvel (líquida). A separação ocorre por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. 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, dependendo das suas afinidades, resultando em migrações diferentes destes componentes (USP, 2008; FB 5, 2010; JP, 2011).

A CLAE é uma técnica analítica muito empregada em indústrias farmacêuticas, porque possibilita obter dados quali e quantitativos de amostras de ampla variedade de polaridade em uma única corrida, diversos modos de detecção podem aumentar a especificidade e a informação sobre o teor, além de ser aceita com confiabilidade pelas agências regulatórias (KARCHER et al., 2005). Existem diversas modalidades desta técnica sendo que o modo de fase reversa é frequentemente o mais empregado e, a sílica é o suporte mais comum devido aos baixos níveis de impurezas metálicas, disponibilidade em uma grande diversidade de tamanho de partículas, poros e formas, é estável a altas pressões, possui facilidade de modificação e há grande conhecimento de sua estrutura e propriedades (TONHI et al., 2002; SILVA et al., 2006; BISWAS et al., 2009).

Na cromatografia líquida em fase normal, a fase estacionária é mais polar (sílica ou alumina) e a fase móvel é menos polar (hexano, iso-octano ou pentano modificado por solventes mais polares) e o principal mecanismo de separação é a adsorção. Adsorção é um processo de partição que ocorre em uma interface ou superfície, ou seja, é o acúmulo de uma substância sobre uma superfície. Em cromatografia líquida a adsorção ocorre na superfície sólida (fase estacionária). A retenção do soluto é determinada principalmente pelo balanço entre as interações que ele sofre na fase móvel e sua competição com as moléculas da fase móvel pelos sítios de adsorção presentes na superfície da fase estacionária (CIOLA, 1998; LANÇAS, 2009).

Na cromatografia líquida de fase reversa, a fase estacionária é mais apolar que a fase a móvel, portanto, os grupos funcionais da fase estacionária são de natureza apolar, como os grupos octil ($-C_8H_{17}$), octadecil ($-C_{18}H_{37}$) e fenil ($-C_6H_5$). A superfície dos óxidos utilizados como suporte da fase estacionária é polar e, para que se tornem apolares, é necessária a introdução de grupos orgânicos apolares em sua superfície, por exemplo, pela

introdução de monocamadas orgânicas. A fase estacionária apolar pode ser obtida através de reações químicas a partir da sílica, sendo que a reação mais comum é a ligação siloxano por reação do grupo silanol com um agente sililante como organoclorossilano ou organoalcóxissilano (TONHI et al., 2002; COLLINS et al., 2006). Quando o grupo octadecil é ligado à sílica, é obtido o produto octadecilsilano (C18, ODS, RP-18); quando octil é utilizado, obtém-se octilsilano (C8, RP-8); ao ligar grupo fenil, obtém-se fenilsilano; ao empregar grupo cianopropil, obtém-se cianopropilsilano. Quanto maior a cadeia lateral do grupo ligado na fase, maior será a sua característica de fase reversa, ou seja, menos polar, possuindo maior retenção para solutos menos polares. A fase estacionária da cromatografia em fase reversa é mais estável hidroliticamente e termicamente que a fase estacionária da cromatografia em fase normal (CIOLA, 1998; LANÇAS, 2009).

O principal mecanismo de separação em cromatografia em fase reversa é a partição (FB 5, 2010). A partição é baseada nas diferentes afinidades que os componentes da amostra apresentam pela fase móvel e fase estacionária, portanto, os componentes mais solúveis na fase estacionária são retidos e, os menos solúveis são transportados com maior velocidade pela fase móvel. Normalmente a fase móvel é constituída por água, solvente apolar (metanol ou acetonitrila), modificador orgânico e um aditivo (sal ou solução tampão). Desta maneira, a fase móvel interfere no tempo de retenção do composto em estudo, ou seja, quanto maior a proporção do solvente orgânico, menor será a retenção e vice-versa (COLLINS et al., 2006; LANÇAS, 2009).

Durante o desenvolvimento de um fármaco, métodos cromatográficos líquidos indicativos de estabilidade são utilizados para determinar a qualidade da substância ativa e do produto acabado e, métodos para determinação de impurezas são desenvolvidos para que o paciente receba um produto seguro (BISWAS et al., 2009).

A CLAE, por ter um alto poder de resolução, é considerada o método mais importante para isolamento e purificação de antibióticos, além de permitir analisar compostos voláteis e não voláteis e determinar traços de compostos. Também devido à sua alta especificidade, precisão e rapidez, este método é preferido aos métodos microbiológicos para análise de antibióticos (JOSHI, 2002), além disso, os métodos microbiológicos necessitam de ambiente estéril, técnica asséptica e algumas vezes, incubação durante a noite (CHARLES et al., 1994). Por outro lado, há diversos fatores químicos e físico-químicos que influenciam a separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias analisadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária.

A CLAE tem sido amplamente utilizada para estudo de farmacocinética e para análises de controle da pureza das penicilinas, bem como para estudos de estabilidade. Em

uma revisão descrita por Joshi (2002), a maioria dos trabalhos relatou o emprego da coluna C₁₈ e o detector de UV na análise de produtos de degradação de penicilinas.

A FLU sódica na forma de matéria-prima é descrita nas Farmacopeias Portuguesa (FP, 2005), Britânica (BP, 2010b) e Europeia (EP, 2011), e em formas farmacêuticas inclusive cápsulas, é apresentada na Farmacopeia Britânica (BP, 2010c), sendo preconizado o método por CLAE para determinação do fármaco em matéria-prima e em formas farmacêuticas, o qual utiliza como fase móvel acetonitrila: solução tampão fosfato de potássio (25:75), pH 5,0. A literatura descreve alguns trabalhos utilizando CLAE para análise quali e quantitativa de FLU sódica em fluidos biológicos e em preparações farmacêuticas como pode ser visto na revisão da literatura deste trabalho (capítulo 3).

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método por CLAE em fase reversa, para quantificação de FLU sódica em cápsulas e separação de seus produtos de degradação, visando o aperfeiçoamento do sistema com melhora na constituição da fase móvel, diminuição do tempo de análise, gastos com reagentes e menor geração de resíduos.

5.4.2. Ensaios preliminares

Diferentes condições cromatográficas foram testadas com objetivo de encontrar aquelas favoráveis à quantificação do fármaco na forma farmacêutica de cápsulas e adequada separação de seus produtos de degradação.

5.4.3. Material

Foram utilizados FLU-SQR e FLU-cápsulas, descritos nas seções 4.1.2. e 4.1.3, respectivamente.

Foram utilizados os solventes: metanol (J.T. Baker[®], Xelostoc, México), acetonitrila (J.T. Baker[®], Xelostoc, México), ambos grau CLAE; ácido fosfórico (Berzog[®], Alemanha), ácido fosfórico (Synth[®], Diadema, Brasil) e ácido acético (J.T. Baker[®], EUA) grau analítico e água ultrapura, obtida por sistema Milli-Q[®] (Malsheim, França). Os reagentes utilizados foram fosfato de potássio monobásico (Vetec[®], Rocha, Brasil), fosfato de potássio dibásico (Vetec[®], Rocha, Brasil) e estearato de magnésio (Audaz Farmacopeia Fina[®], São Paulo, Brasil), grau farmacêutico. Foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius[®], Gettinge, Alemanha) para filtrar a fase móvel e membrana com poro de 0,45 µm e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nagel[®], Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula. As soluções constituintes da fase móvel foram desgaseificadas em ultrassom (Unique[®], Indaiatuba, Brasil) por 30 minutos.

O sistema cromatográfico utilizado foi o cromatógrafo Waters[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters[®], injetor manual Rheodyne Breeze[®] 7725i e detector de absorvância UV-VIS Waters[®] 2487; equipado com *software* Empower[®]. Foram utilizadas colunas Symmetry C₁₈ Waters[®] (250 x 4,6 mm), 5 µm e Zorbax Agilent[®] C₁₈ (250 x 4,6 mm), 5 µm.

5.4.3.1. Preparo das fases móveis

Para as fases móveis, foram preparadas soluções aquosas de ácido fosfórico na concentração de 0,025 M em diferentes valores de pH. As soluções tampão utilizadas foram fosfato de potássio 0,025 M (pH 5,0 e 7,0). As fases móveis foram compostas de diferentes proporções das soluções e solventes e as misturas foram realizadas no equipamento. Todas as fases móveis foram filtradas e desgaseificadas antes do uso.

5.4.3.2. Preparo da solução de flucloxacilina SQR

Foram pesados analiticamente 22,222 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL (solução-mãe). A correção na massa de FLU-SQR foi feita uma vez que a pureza descrita para este padrão é de 90%. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com as concentrações finais requeridas.

5.4.3.3. Preparo da solução de flucloxacilina sódica em cápsulas

A partir do *pool* obtido das cápsulas, foram pesados analiticamente o equivalente a 20 mg de FLU sódica e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL. Alíquota de 2,5 mL desta solução foi transferida para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com concentração final de 50 µg/mL. O cálculo da concentração e do teor de FLU sódica nas amostras foi realizado de acordo com as Equações 5 e 6, descritas na seção 5.3.5.

5.4.4. Método

Diversas condições cromatográficas foram testadas, a fim de encontrar aquela que permitisse a quantificação confiável do fármaco, verificação da presença de produto de degradação, redução da assimetria do pico, redução de danos à coluna cromatográfica, além de diminuir a geração de resíduos. As condições testadas durante o desenvolvimento do método estão apresentadas na Tabela 5.26.

Tabela 5.26. Condições testadas durante o desenvolvimento do método por CLAE indicativo de estabilidade para a determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas

Fase móvel	metanol: água (30:70, v/v); metanol: água (95:5, v/v);
	metanol: água (60:40, v/v);
	água: acetonitrila (75:25, v/v); acetonitrila: água (80:20, v/v);
	solução tampão fosfato de potássio pH 5,4: metanol (70:30, v/v);
	solução tampão fosfato de potássio pH 6,1: metanol (50:50, v/v);
	metanol: ácido acético 4% (60:40, v/v);
	metanol: ácido acético 4% (80:20, v/v);
	metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,2 (60:40, v/v);
	metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 7,0 (65:35, v/v);
	metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 4,1 (65:35, v/v);
	metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 7,0 (60:40, v/v);
	metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v)
Coluna	Symetry® C ₁₈ Waters; Zorbax® C ₁₈ Agilent
Comprimento de onda	225 e 274 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C
Solvente	água e fase móvel

De acordo com os resultados obtidos, os parâmetros estabelecidos para desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE estão apresentados na Tabela 5.27.

Tabela 5.27. Parâmetros estabelecidos para a determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas, pelo método por CLAE indicativo de estabilidade

Fase móvel	metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v)
Coluna	Zorbax® C ₁₈ Agilent
Comprimento de onda	225 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C
Solvente	fase móvel

5.4.5. Validação do método analítico por CLAE

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP, 2008; BONFÍLIO et al., 2011b). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

5.4.5.1. Especificidade / seletividade e estudos de estresse

A especificidade / seletividade é a habilidade de um método analítico medir a resposta do analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005). Estes termos são empregados indistintamente ou com diferentes interpretações. Um método analítico que produz resposta para um único analito é um método específico, enquanto que, um método que produz respostas para diferentes analitos, mas que consegue identificar a resposta de um composto na presença de outros, é um método seletivo (INMETRO, 2007).

A solução-mãe previamente preparada com concentração de 200 µg/mL foi diluída para 100 µg/mL, em água e utilizada para os ensaios de degradações. A capacidade indicadora de estabilidade e de especificidade do método foi determinada submetendo a solução de FLU-SQR (100 µg/mL) à degradação acelerada por condições ácida, básica, térmica, oxidativa e fotolítica para avaliar a interferência na quantificação de FLU sódica (FDA, 1994; BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Após os procedimentos de degradação as amostras foram diluídas em fase móvel para concentração final de 50 µg/mL.

❖ *Degradação ácida:* foi realizada em HCl 0,001 M. A solução foi mantida em temperatura ambiente, neutralizada e analisada.

- ❖ *Degradação alcalina:* foi realizada em NaOH 0,001 M. A solução foi mantida em temperatura ambiente e em banho aquecido a 70 °C, resfriada neutralizada e analisada.
- ❖ *Degradação térmica:* a solução preparada em água (100 µg/mL) foi mantida em banho aquecido a 70 °C, resfriada e analisada. O mesmo procedimento foi realizado com a solução preparada em fase móvel (200 µg/mL).
- ❖ *Degradação oxidativa:* foi preparada solução de FLU-SQR em peróxido de hidrogênio 3%, mantendo-a em temperatura ambiente e em banho aquecido a 70 °C, resfriada e analisada.
- ❖ *Degradação fotolítica:* foi induzida expondo as soluções de FLU-SQR à luz ultravioleta UVC 254 nm (200 W h m⁻²) por 3 dias.

Desta maneira, a capacidade indicadora de estabilidade e especificidade do método cromatográfico foi estabelecida através da resolução obtida entre o pico principal da FLU sódica e seus produtos de degradação. Além disso, uma solução do excipiente da formulação farmacêutica (placebo) foi analisada pelo método.

5.4.5.2. Linearidade

Para a curva analítica foram preparadas soluções de FLU-SQR na concentração de 200 µg/mL (solução-mãe), conforme descrito na seção 5.4.3.2. A partir da solução-mãe, foram transferidas alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações finais de 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 µg/mL. As curvas analíticas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada a análise de variância (ANOVA), para análise de parâmetros estatísticos. Também foi avaliado o coeficiente de correlação.

5.4.5.3. Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade, sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 50 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, mesmo analista e no mesmo laboratório. O coeficiente de variação percentual (CV%) entre as análises foi calculado.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido na análise de sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 50 µg/mL em três dias consecutivos.

Também foi realizada a análise entre analistas diferentes no mesmo dia e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de FLU-SQR preparadas pelos diferentes analistas.

5.4.5.4. Exatidão

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração 80 (R₁), 100 (R₂) e 120% (R₃) em relação à concentração de trabalho, de solução de FLU-SQR às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 40; 50 e 60 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 5.28.

Tabela 5.28. Preparo das soluções de FLU para o teste de recuperação do método CLAE indicativo de estabilidade

	Volume de FLU-cápsula (200 µg/mL) (mL)*	Volume adicionado de FLU- SQR (200 µg/mL) (mL)*	Concentração teórica final (µg/mL)**
A	1,5	-	30
R₁	1,5	0,5	40
R₂	1,5	1,0	50
R₃	1,5	1,5	60
SQR	-	1,5	30

*cada nível de concentração foi preparado em triplicata em balão volumétrico de 10 mL.

A porcentagem de FLU sódica recuperada (R%) foi calculada utilizando-se a Equação 2, descrita na seção 5.1.6.3.1 (AOAC, 2002).

5.4.5.5. Robustez

Foi avaliada por meio de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: fabricante da coluna: Agilent® e Phenomenex®; pH da fase móvel: 5,2; 5,5 e 5,8; vazão da fase móvel: 0,8, 1,0 e 1,2 mL; concentração de metanol na fase móvel: 57; 60 e 63%; comprimento de onda de detecção: 220, 225 e 230 nm; fabricante do metanol: JT Baker® e Merck® e, fabricante do ácido fosfórico utilizado na fase móvel: Berzog® e Synth®.

A análise do teor de FLU sódica nas diferentes condições foi realizada, avaliando-se as alterações de modo simultâneo, aplicando o teste de Youden e Steiner.

O teste de Youden e Steiner constitui um método confiável para avaliação de robustez de métodos analíticos, por meio do delineamento que envolve sete parâmetros analíticos combinados em oito experimentos (BEDREGAL et al., 2008; CÉSAR, PIANETTI, 2009; BONFILIO et al., 2011). Foram realizados dois testes independentes, utilizando variações dos parâmetros analíticos para valores maiores e menores, Teste 1 e Teste 2, respectivamente. Em cada ensaio foram avaliadas as soluções de FLU-SQR e FLU-cápsulas. Na Tabela 5.29 é apresentada a combinação fatorial utilizada no teste, no qual letras maiúsculas referem-se às condições normais do método analítico e letras minúsculas às alterações dos parâmetros analíticos.

Tabela 5.29. Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden e Steiner

Parâmetro Analítico	Combinação Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fabricante da coluna	A	A	A	A	a	a	a	a
pH da FM	B	B	b	b	B	B	b	b
Vazão	C	c	C	c	C	c	C	c
Concentração de metanol na FM	D	D	d	d	d	d	D	D
Comprimento de onda	E	e	E	e	e	E	e	E
Fabricante do metanol	F	f	f	F	F	f	f	F
Fabricante do ácido fosfórico	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

As condições dos Testes 1 e 2 de Youden e Steiner, com variações dos parâmetros analíticos para valores maiores e menores, respectivamente, são apresentados nas Tabelas 5.30 e 5.31, respectivamente.

Tabela 5.30. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no Teste 1 de Youden e Steiner

Parâmetro		Condição normal			Variação		
A/a	Fabricante da coluna	Agilent®	-	A	Phenomenex®	-	a
B/b	pH da FM	5,5	-	B	5,8	-	b
C/c	Vazão	1 mL/min	-	C	1,2 mL/min	-	c
D/d	Metanol	60%	-	D	63%	-	d
E/e	Comprimento de onda	225 nm	-	E	230 nm	-	e
F/f	Marca do metanol	J.T.Baker®	-	F	Merck®	-	f
G/g	Marca do ácido fosfórico	Berzog®	-	G	Synth®	-	g

Tabela 5.31. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no Teste 2 de Youden e Steiner

Parâmetro		Condição normal			Variação		
A/a	Fabricante da coluna	Agilent®	-	A	Phenomenex®	-	a
B/b	pH da FM	5,5	-	B	5,2	-	b
C/c	Vazão	1 mL/min	-	C	0,8 mL/min	-	c
D/d	Metanol	60%	-	D	57%	-	d
E/e	Comprimento de onda	225 nm	-	E	220 nm	-	e
F/f	Marca do metanol	J.T.Baker®	-	F	Merck®	-	f
G/g	Marca do ácido fosfórico	Berzog®	-	G	Synth®	-	g

Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média de quatro doseamentos correspondentes a letras maiúsculas (condições normais) foi comparada à média de quatro outros doseamentos correspondentes a letras minúsculas (condições alteradas). A Equação 8 exemplifica a avaliação do efeito da mudança do fabricante da coluna cromatográfica.

$$\text{EfeitoA} / a = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4} \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

s, t, u e v = teores das amostras determinados com a coluna utilizada no método

w, x, y e z = teores das amostras determinados com a coluna de fabricante diferente

A interpretação do teste é realizada através da comparação do valor obtido na Equação 8 com o valor resultante da Equação 9 (BEDREGAL, 2008):

$$\text{Valor de referência} = S\sqrt{2} \quad \text{Equação 9}$$

Em que:

S = desvio padrão dos oito teores (s, t, u, v, w, x, y, z) das amostras analisadas no teste

O valor encontrado na Equação 8 deve ser menor que o valor determinado na Equação 9 para que o efeito seja interpretado como não significativo.

5.4.5.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

LD e LQ foram estimados a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2003a; ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, conforme as Equações 3 e 4, descritas nas seções 5.3.4.6 e 5.3.4.7, respectivamente.

5.4.5.7. Adequabilidade do sistema cromatográfico

Para assegurar o desempenho do cromatógrafo a líquido antes e durante a realização das análises, foram efetuadas cinco injeções da mesma solução de FLU-SQR na concentração de 50 µg/mL, avaliando o coeficiente de variação percentual (CV%) dos parâmetros de tempo de retenção e área do pico e também através dos valores de assimetria do pico (S), número de pratos (N), fator de capacidade (k').

O número de pratos (N) é definido como uma medida da eficiência da coluna cromatográfica e é calculado pela Equação 10 (USP, 2008; FB 5, 2010; JP, 2011).

$$N = 5,54 \times \left(\frac{tr}{W_{h/2}} \right)^2 \quad \text{Equação 10}$$

Em que: tr = tempo de retenção da substância analisada

W = largura do pico à meia altura, medido a partir de sua base

O fator capacidade (k') é a medida da posição do pico de interesse relativo ao volume morto (composto não retido) (FDA, 1994; USP, 2008), e calcula-se pela Equação 11.

$$k' = \frac{tr}{t_0} \quad \text{Equação 11}$$

Em que: tr = tempo de retenção do pico de interesse

t_0 = tempo do composto não retido (volume morto)

O fator de simetria (S) é calculado pela Equação 12 (USP, 2008; FB 5, 2010; JP, 2011).

$$S = \frac{W_{0,05h}}{2f} \quad \text{Equação 12}$$

Em que: $W_{0,05h}$ = largura do pico medido a 5% da sua altura

f = distância percorrida pelo pico, medida no ponto de 5% da sua altura

5.4.6. Cálculo do teor das cápsulas de flucloxacilina sódica

O teor foi calculado com base nos resultados de áreas obtidos em três dias consecutivos pelo mesmo analista e, em um mesmo dia por analistas diferentes, utilizando as Equações 5 e 6 descritas na seção 5.3.5.

5.4.7. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica

Para avaliar a estabilidade da solução de FLU sódica, foi preparada uma solução estoque de FLU na concentração de 200 µg/mL, conforme descrito no item 5.4.3.2 e foi armazenada em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foi preparada uma solução com concentração de 50 µg/mL, fase móvel e analisada.

5.4.8. Resultados

Os cromatogramas obtidos são apresentados nas Figuras 5.9 (FLU-SQR) e 5.10 (FLU-cápsula).

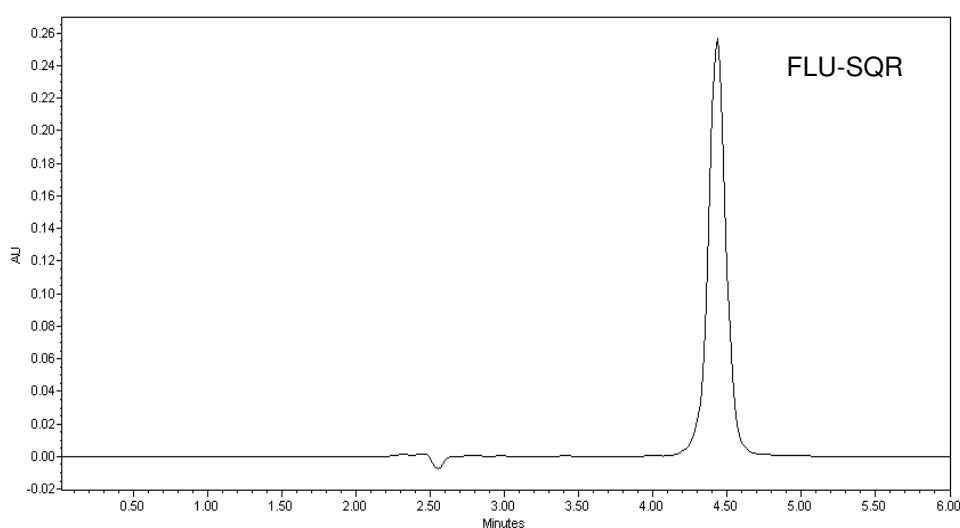


Figura 5.9. Cromatograma de FLU-SQR (50 µg/mL). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos.

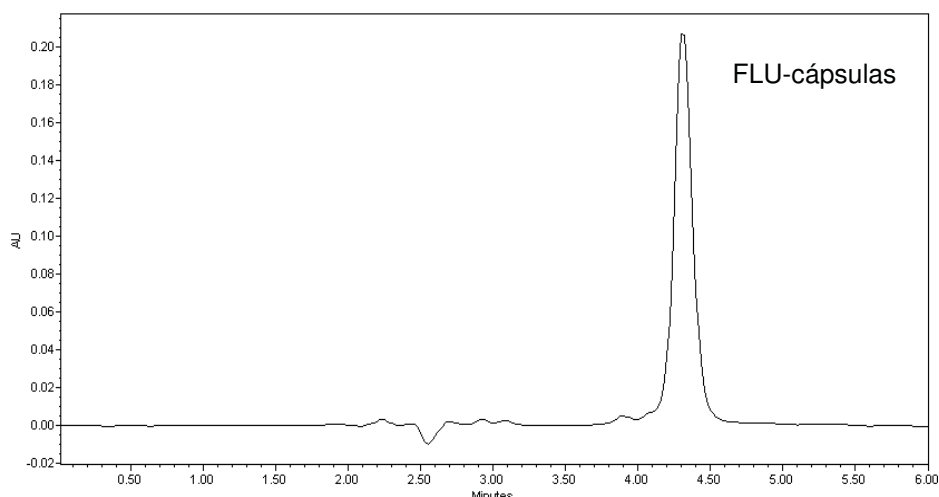


Figura 5.10. Cromatograma de FLU-cápsula (50 µg/mL). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos.

5.4.8.1. Validação

5.4.8.1.1. Especificidade e estudos de degradação forçada

As Figuras 5.11 a 5.16 mostram os cromatogramas obtidos após as degradações forçadas, com picos correspondentes aos produtos de degradações (picos com tempo de retenção anterior a 4,4 minutos) bem resolvidos do pico principal da FLU (tempo de retenção: 4,4 minutos). Assim, foi demonstrada a especificidade do método para a análise de cápsula de FLU sódica.

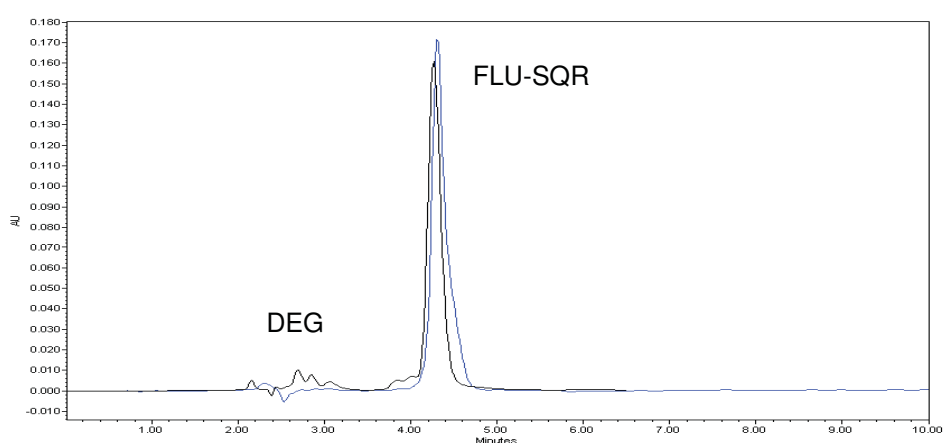


Figura 5.11. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em HCl 0,001 M, em temperatura ambiente por 180 minutos. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos. FLU-SQR (azul). FLU-SQR degradada (preto). DEG = produto de degradação.

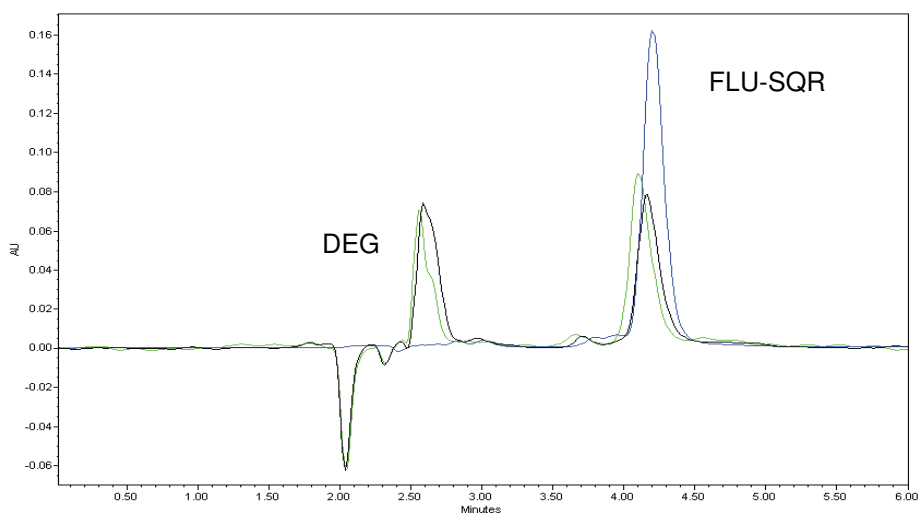


Figura 5.12. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em NaOH 0,001 M, sob aquecimento de 70 °C por 30 minutos (preto) e em temperatura ambiente por 180 minutos (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

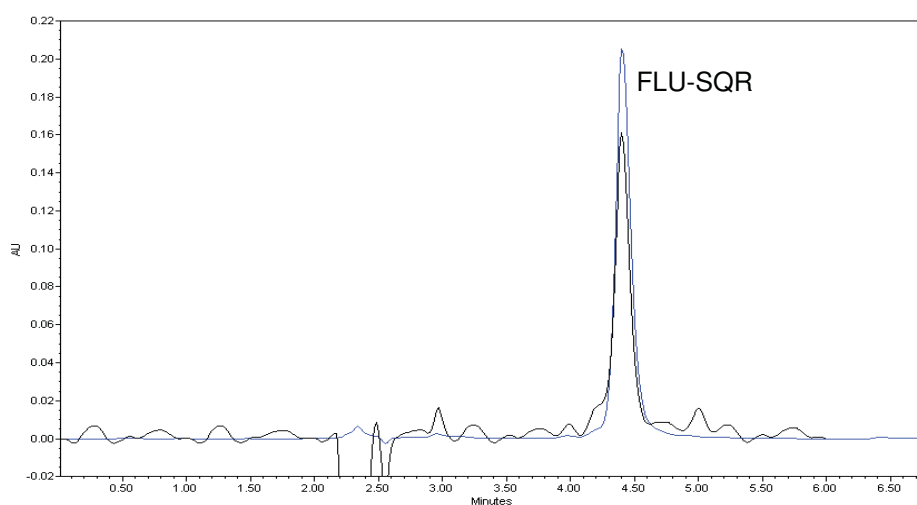


Figura 5.13. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR, preparada em água e mantida em banho aquecido a 70 °C por 24 h, e diluída na FM para 50 µg/mL. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos. FLU-SQR (azul). FLU-SQR degradada (preto).

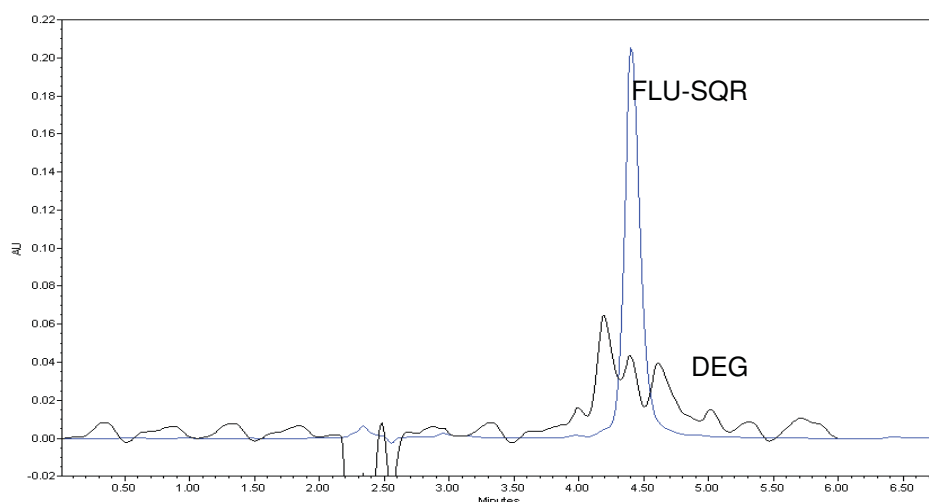


Figura 5.14. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR, preparada em FM e mantida em banho aquecido a 70 °C por 24 h, e diluída na FM para 50 µg/mL. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos. FLU-SQR (azul). FLU-SQR degradada (preto). DEG = produto de degradação.

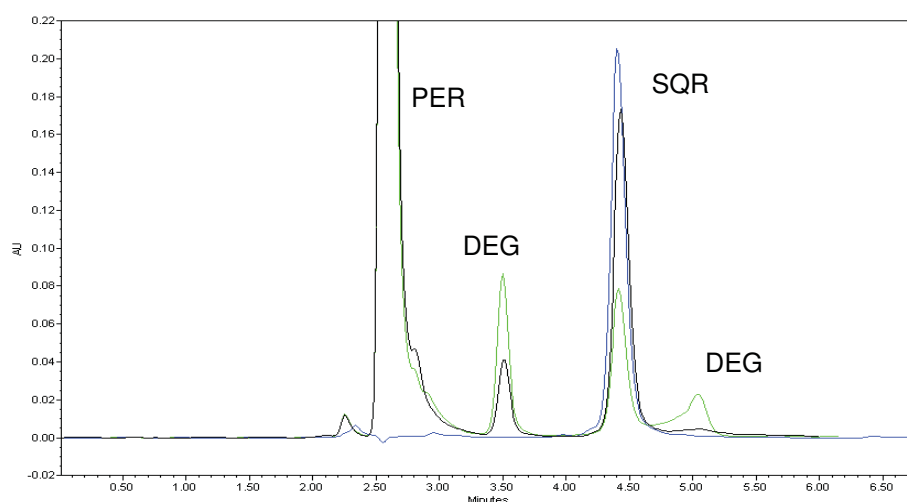


Figura 5.15. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em H₂O₂ 3%, sob aquecimento a 70 °C por 30 minutos (preto) e 30 minutos em temperatura ambiente (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação. PER = solução de peróxido de hidrogênio 3%.

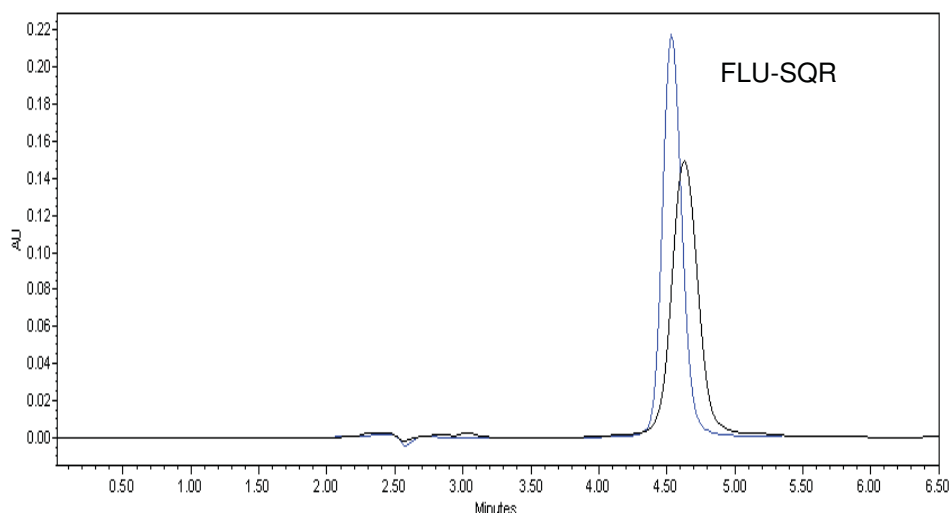


Figura 5.16. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de FLU-SQR (50 µg/mL), em luz UV durante 3 dias. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos. FLU-SQR (azul). FLU-SQR degradada (preto).

A Tabela 5.32 apresenta os valores, em percentagem, das perdas da área do pico da FLU-SQR e os tempos de retenção dos picos de degradação, quando presentes.

Tabela 5.32. Perdas percentuais encontradas para solução de FLU-SQR na concentração de 50 µg/mL, obtidas pelo método CLAE indicativo de estabilidade

	Degradação				
	Ácida	Básica	Térmica	Fotolítica	Oxidativa
Perda (%)	18,50	52,25 (aquec)	20,48 (H ₂ O)	1,60	65,72 (aquec)
	(amb)	53,74 (amb)	88,81 (FM)		18,01 (amb)
Pico adicional	2,6	2,6 (aquec)	NO (H ₂ O)	NO	3,5 e 5,0 (aquec)
(minutos)	(amb)	2,6 (amb)	NO (FM)		3,5 (amb)

NO = não observado; aquec = solução em aquecimento; amb = solução em temperatura ambiente; H₂O = solução preparada em água; FM = solução preparada em fase móvel.

A hidrólise térmica para solução preparada em fase móvel foi a condição mais agressiva para solução de FLU, com perda de 88,81% da área do pico, porém não foi verificado pico de produto de degradação (Figuras 5.14). As condições em meio alcalino e oxidativa também demonstraram ser agentes muito agressivos à solução de FLU principalmente quando foram associadas ao aquecimento. A condição menos agressiva foi a fotolítica, com perda de 1,50% quando a solução foi mantida por 60 minutos em exposição à luz UV mas também não foi observado pico de produto de degradação.

Não houve interferência do excipiente da formulação, indicando que o pico de FLU estava livre de picos coeluentes, confirmando que o método é específico para análise de FLU.

5.4.8.1.2. Linearidade

Os resultados dos valores das áreas obtidas para a curva analítica de FLU-SQR estão apresentados na Tabela 5.33.

Tabela 5.33. Valores das áreas referentes ao pico de FLU-SQR para obtenção da curva analítica do método cromatográfico, utilizando como fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v) a 225 nm

Conc. (µg/mL)	Áreas*	Área média	CV (%)**
20,0	880189,00	891714,11	1,21
	901585,67		
	893368,67		
30,0	1297685,33	1314655,89	1,43
	1334823,67		
	1311458,67		
40,0	1772947,00	1758463,00	1,77
	1779730,00		
	1722713,00		
50,0	2209285,00	2210768,00	1,43
	2243110,00		
	2179910,00		
60,0	2646754,00	2622006,00	2,42
	2669377,00		
	2549888,00		
70,0	3229574,00	3119966,00	3,90
	3141349,00		
	2988976,00		
80,0	3454320,00	3495866,00	2,29
	3588320,00		
	3444957,00		

*cada valor é a média de três determinações realizadas em um mesmo dia, durante três dias; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

A curva analítica de FLU-SQR (Figura 5.17) 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: $y = 43881x + 7881$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,99949.

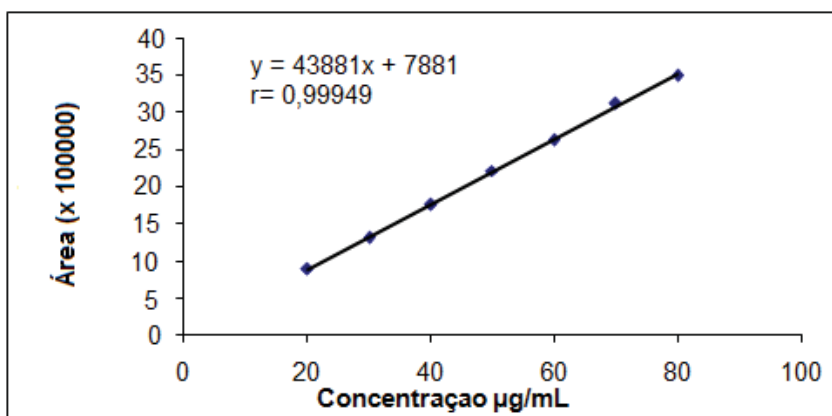


Figura 5.17. Curva analítica da FLU-SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel. Fase móvel: metanol:ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40 v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈[®] Agilente (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção: 4,4 minutos.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de FLU-SQR é apresentada na Tabela 5.34.

Tabela 5.34. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de FLU-SQR utilizando o método de CLAE indicativo de estabilidade

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F calc	F tab
Entre	6	$1,618 \times 10^{13}$	$2,70 \times 10^{12}$	681,20*	2,85
Regressão linear	1	$1,617 \times 10^{13}$	$1,62 \times 10^{13}$	4084,49*	4,6
Desvio da linearidade	5	$1,06 \times 10^{10}$	$2,12 \times 10^9$	0,54	2,96
Resíduo	14	$5,54 \times 10^{10}$	$3,96 \times 10^9$		
Total	20				

*Significativo para $p < 0,05\%$; GL = graus de liberdade

Os resultados são significativos para regressão e não significativos para o desvio da linearidade, validando o método de CLAE para FLU sódica quanto ao parâmetro de linearidade. Além disso, o coeficiente de correlação foi muito satisfatório, indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

5.4.8.1.3. Precisão

A repetibilidade forneceu CV% de 1,36%.

Para a precisão interdias obteve-se valor de CV% de 1,10% e para a precisão entre analistas, o CV% foi de 1,23%.

5.4.8.1.4. Exatidão

A exatidão do método foi comprovada através da análise de soluções em três concentrações pré-estabelecidas. Os valores encontrados no teste de recuperação de FLU sódica utilizando CLAE estão na Tabela 5.35.

Tabela 5.35. Teste de recuperação do método CLAE indicativo de estabilidade

	FLU-SQR adicionado (µg/mL)	FLU-SQR encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)**
R₁	10,0	10,04	100,40		
R₂	20,0	19,99	99,94	100,06	1,21
R₃	30,0	29,95	99,83		

*cada valor é a média de três determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.4.8.1.5. Robustez

Foi determinada pelos testes de Youden e Steiner (Tabela 5.29). Foram realizados dois testes independentes e aplicaram-se as Equações 8 e 9 para avaliação da significância dos efeitos. Nenhum efeito apresentou resultado significativo. Os resultados obtidos nos testes de Youden e Steiner 1 e 2 são apresentados na Tabela 5.36. Os valores de referência obtidos na Equação 9 foram 2,56 e 1,97 para os Testes 1 e 2, respectivamente, de modo que qualquer valor acima destes, foram considerados significativos.

Tabela 5.36. Resultados de cada variação obtidos nos Testes de Youden e Steiner 1 e 2

Teste de Youden e Steiner 1		Teste de Youden e Steiner 2	
Efeito	Teor (%)*,**	Efeito	Teor (%)*,**
Marca da coluna	97,73 - 98,44 = -0,71	Marca da coluna	92,04 - 91,54 = 0,50
pH da FM	97,80 - 98,37 = -0,57	pH da FM	90,86 - 92,72 = -1,86
Vazão (mL/min)	98,61 - 97,55 = 1,06	Vazão (mL/min)	92,27 - 91,31 = 0,96
Metanol (%)	97,11 - 99,06 = -1,95	Metanol (%)	91,78 - 93,30 = -1,52
Comprimento de onda (nm)	98,24 - 97,92 = 0,32	Comprimento de onda (nm)	92,42 - 91,16 = 1,26
Marca metanol	98,22 - 97,95 = 0,27	Marca metanol	91,77 - 91,82 = -0,05
Marca ácido fosfórico	98,82 - 97,35 = 1,47	Marca ácido fosfórico	92,18 - 91,40 = 0,78

*Média de teores obtidos nas condições normais - média de teores obtidos nas condições alteradas

**Critérios de referência calculados: 2,56 (Teste 1) e 1,97 (Teste 2).

5.4.8.1.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os valores estimados para LD e LQ pelo método cromatográfico foram 1,44 µg/mL e 4,37 µg/mL, respectivamente.

5.4.8.2. Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foi verificada pela análise quantitativa, através do cálculo dos coeficientes de variação percentual (CV%) do tempo de retenção e área do pico principal de cinco injeções da mesma solução de FLU-SQR e através dos valores de assimetria do pico, número de pratos e fator capacidade. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.37.

Tabela 5.37. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de flucloxacilina sódica

Parâmetros avaliados					
	Assimetria	Fator de capacidade	Pratos	Tempo de retenção (min)	Área
	1,40	2,000	4138,99	4,10	1833029
	1,36	2,005	4159,21	4,11	1823332
	1,33	2,007	4158,22	4,11	1835809
	1,33	1,999	4098,71	4,08	1885659
	1,33	2,001	4138,99	4,10	1791848
Média	1,35	2,001	4139,02	4,10	1833935
CV (%)*	2,10	0,24	0,60	0,30	1,84

*CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.4.8.3. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica

A solução de FLU sódica foi estável por, pelo menos, 24 horas quando armazenada em temperatura ambiente.

5.4.8.4. Cálculo do teor de flucloxacilina sódica nas cápsulas

O teor obtido para as cápsulas de flucloxacilina sódica através do método cromatográfico está apresentado na Tabela 5.38.

Tabela 5.38. Determinação do teor interdias e entre analistas das cápsulas de flucloxacilina sódica pelo método CLAE indicativo de estabilidade

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre analistas		
		Teor (mg)*	Teor (%)*	CV (%)**		Teor (mg)*	Teor (%)*	CV (%)**
1	1	464,1	92,81	1,11	A	464,1	92,82	0,13
	2	473,6	94,72		B	464,95	92,99	
	3	472,7	94,53					

*cada valor é a média de sete determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.4.9. Discussão

5.4.9.1. Otimização do método

A CLAE é útil para estudos farmacêuticos e para amostras biológicas de antibióticos e análogos semissintéticos por apresentar facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (JOSHI, 2002).

Durante o desenvolvimento do método analítico proposto neste trabalho, diversas fases móveis, colunas e solventes foram testados a fim de se obter as melhores condições para a validação e aplicação do método cromatográfico indicativo de estabilidade para análise quantitativa de FLU sódica em cápsulas. Os resultados obtidos com as diversas fases móveis testadas estão apresentados na Tabela 5.39.

Tabela 5.39. Resultados obtidos durante o desenvolvimento do método por CLAE indicativo de estabilidade para análise quantitativa de flucloxacilina sódica em cápsulas

Fase móvel analisada	Resultados
metanol: água (30:70 e 95:5, v/v)	corridas realizadas por 30 min e
água: acetonitrila (75:25 e 80:20, v/v)	nenhum pico foi detectado
metanol: água (60:40, v/v)	pico em 2,15 min e picos menores com tempo de retenção anteriores
solução tampão fosfato de potássio pH 5,4: metanol (70:30, v/v)	pico em 30 min (considerado como não satisfatório)
solução tampão fosfato pH 6,1: metanol (50:50, v/v)	pico em 16,7 min (tempo de análise foi considerado longo)
metanol: ácido acético 4% (60:40, v/v)	pico largo em 11,6 min
metanol: ácido acético 4% (80:20, v/v)	pico largo em 5,0 min
metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 4,1 (65:35, v/v)	pico largo em 4,35 min
metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,2 (60:40, v/v)	pico largo em 4,38 min
metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 7,0 (65:35, v/v)	pico largo em 4,38 min
metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 7,0 (60:40, v/v)	pico largo em 4,31 min
*metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v)	pico satisfatório em 4,4 min

*fase móvel utilizada para desenvolvimento e validação do método cromatográfico.

Inicialmente os resultados não foram satisfatórios em vista de o pico da FLU ter apresentado-se muito próximo ao volume morto, apresentado tempo de retenção considerado longo ou, por não ter sido simétrico. Foi possível verificar que quanto maior a

proporção de solvente polar, menor foi o tempo de corrida, concordando com a literatura (COLLINS, et al., 2006; LANÇAS, 2009). Enfim, foram obtidos resultados satisfatórios depois de diversas tentativas, ao utilizar a fase móvel composta por metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60/40, v/v).

Em seguida, foram testados como solventes para o preparo das soluções água e fase móvel. Ao utilizar água, o pico obtido foi assimétrico e ao utilizar fase móvel, foi simétrico, por isso, foi escolhida como solvente para o preparo das soluções.

Com as condições já estabelecidas, a coluna também foi testada. Ao utilizar a coluna Waters®, o pico apresentou-se largo e, ao utilizar a coluna Agilent®, o pico foi simétrico, portanto, esta coluna foi escolhida.

5.4.9.2. Validação do método

O método cromatográfico por fase reversa foi validado de acordo com a literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2011; BONFILIO et al., 2012a).

O teste de adequabilidade do sistema (*system suitability*) visa demonstrar que o sistema é adequado para as análises pretendidas (FDA, 1994). Em geral, considera-se que o número de pratos deve ser > 2000 (FDA, 1994), e o valor encontrado pelo método proposto foi 4139,02 com CV% de 0,60. O fator de assimetria do pico cromatográfico deve ser $\leq 2,0$ (FDA, 1994) e valores iguais a 1, indicam que o pico é perfeitamente simétrico (FB 5, 2010) e o método proposto encontrou 1,35, com CV% de 2,17. É considerado satisfatório o valor do fator capacidade $> 2,0$ (FDA, 1994) e o valor encontrado pelo método proposto foi 2,01, com CV% de 0,23%. Diante dos resultados obtidos, todos os requisitos para o teste de adequabilidade do sistema foram satisfatórios, demonstrando que o sistema é adequado para as análises propostas.

A separação foi alcançada com tempo de retenção médio de, aproximadamente, 4,4 minutos (Figura 5.9). Todas as condições avaliadas nos testes de degradações forçadas resultaram na diminuição da área do pico da FLU e quando houve formação de produtos de degradação, estes apresentaram-se bem resolvidos do pico da FLU. O desenvolvimento de picos adicionais, relativos aos produtos de degradação, sob condições de estresse avaliadas bem como a análise de amostra preparada com excipiente, confirmaram a especificidade do método, uma vez que os picos da FLU e dos produtos de degradação apresentaram-se bem resolvidos e o excipiente não apresentou pico nas condições analisadas.

As condições de degradação térmica para solução de FLU-SQR preparada em fase móvel e oxidativa associada ao aquecimento (70 °C), provocaram as maiores diminuições da área do pico da FLU (88,81% e 65,72%, respectivamente). Para hidrólise térmica não foi

observado pico de produto de degradação porém, para hidrólise oxidativa houveram dois pico de produto de degradação com tempos de retenção de aproximadamente 3,5 e 5,0 minutos.

Para hidrólise térmica da solução de FLU-SQR preparada em água e após o aquecimento, diluída em fase móvel, houve perda de 20,48% da área do pico e não foi observado pico de produto de degradação.

Sob a condição fotolítica, em 60 minutos, houve perda de 1,50% e não foi observado pico de produto de degradação.

No teste da hidrólise ácida, ao utilizar solução de HCl 0,001 *M* a perda foi de 18,50% da área do pico e houve pico de produto de degradação com tempo de retenção aproximadamente de 2,6 minutos.

O método analítico proposto apresentou regressão linear significativa no intervalo de concentração de 20,0 a 80,0 µg/mL com coeficiente de correlação (*r*) de 0,9997.

A exatidão foi comprovada pela recuperação média de FLU-SQR de 100,06%, pois valores entre 98 a 102% atendem os requisitos legais deste ensaio (ICH, 2005).

Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV% inferior a 2%, comprovando a precisão do método proposto, uma vez que a literatura preconiza CV% menor ou igual a 2,0% (FDA, 1994).

Os limites de quantificação e de detecção calculados foram 4,37 e 1,44 µg/mL, respectivamente, demonstrando que o método proposto é capaz de detectar e quantificar com confiabilidade a FLU sódica em produtos comerciais.

O teor de FLU sódica encontrado nas cápsulas foi, em média, 94,02%, estando dentro do permitido, que é de 92,5 a 110% (BP, 2010c).

O método proposto mostrou-se robusto quando avaliado pelos testes de Youden e Steiner, demonstrando não haver efeito considerado significativo nas condições estudadas.

Como relatado anteriormente, uma fase móvel diferente da que foi utilizada neste trabalho, está preconizada pelas Farmacopeias Portuguesa (FP, 2005), Britânica (BP, 2010a; BP, 2010c) e Europeia (EP, 2011). Entretanto, um dos objetivos deste estudo foi o desenvolvimento de um método cromatográfico indicativo de estabilidade que utiliza uma fase móvel menos agressiva ao equipamento e à coluna e menos dispendiosa, além de menor geração de resíduos.

O método cromatográfico proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, limites de detecção e de quantificação adequados, além de adequabilidade do sistema, portanto, pode ser empregado para análise de FLU sódica em cápsulas.

5.5. ELETROFORESE CAPILAR

5.5.1. Introdução

A eletroforese capilar tem se mostrado como uma poderosa técnica analítica para análise farmacêutica, com aplicação na separação de compostos de diferentes tamanhos e características químicas e estruturais. Apesar de ser menos sensível que a CLAE, possui vantagens como, alta eficiência, precisão e resolução; é utilizada para determinação de substância ativa, impurezas relacionadas ao medicamento e separação quiral; pode ser utilizada quando a quantidade de amostra disponível é pequena; pode ser realizada em condições aquosas; o volume de injeção é de nanolitros, tendo como consequência o uso de pouca quantidade de solvente e geração de pouco resíduo, causando menor dano ambiental e tem custo reduzido de operação, uma vez que não utiliza colunas e fase móvel (HOLLAND et al., 1997; HARDLEY et al., 2000; GARCIA et al., 2005; MALESUIK et al., 2010; SUNTORNUSUK, 2010; SANGOI et al., 2010; TODESCHINI et al., 2011).

A EC é eficiente e versátil (SUNTORNUSUK, 2010), podendo ser uma ferramenta analítica alternativa com diversos mecanismos de separação diferente da CLAE, o que permite a análise de praticamente todas as classes de compostos (ASSUNÇÃO et al., 2008; TODESCHINI et al., 2011).

A eletroforese capilar (EC) é um método físico de análise, baseado na migração de analitos, através de um capilar, carregados eletricamente e dissolvidos ou suspensos em uma solução de eletrólito, sob a influência de um campo elétrico (BP, 2010d; FB 5, 2010; EP, 2011). Os compostos são separados de acordo com a diferença entre as mobilidades iônicas, que se relacionam com a razão carga/massa e com fatores estruturais (JAGER, TAVARES, 2001).

O processo de separação ocorre pela aplicação da tensão e a velocidade de migração do analito é determinada pela sua mobilidade eletroforética e pela mobilidade eletrosmótica da solução tampão dentro do capilar. A mobilidade eletroforética do analito depende da sua carga elétrica, peso molecular e forma, e pode ser calculada pela Equação 13 (USP, 2008; BP, 2010d; FB 5, 2010; EP, 2011).

$$\mu E = (q / 6\pi) / \eta r \quad \text{Equação 13}$$

Em que: μE = mobilidade eletroforética

q = carga

η = viscosidade da solução

r = raio do íon

Os cátions migram para o pólo negativo (cátodo), os ânions migram para o pólo positivo (ânodo) e as partículas sem carga, não são atraídas para nenhum pólo, (USP, 2008). Portanto, cátions e ânions podem ser separados na mesma corrida eletroforética (FB 5, 2010). Quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior será a sua mobilidade eletroforética e portanto, menor será o tempo de migração (BONATO et al., 2005).

O fluxo eletrosmótico (EOF “*electroosmotic flow*”) é responsável pelo transporte das espécies iônicas ao longo do capilar, ou seja, tem origem no ânodo, segue em direção ao cátodo até chegar no detector (BONATO et al., 2005). O EOF ocorre quando um campo elétrico (tensão) é aplicado através do capilar, pela solução tampão. A velocidade do EOF depende da mobilidade eletrosmótica que está relacionada à carga da parede interna do capilar e das características do tampão utilizado (tipo e força iônica do eletrólito, pH e viscosidade) (BP, 2010d; FB 5, 2010; EP, 2011).

O EOF acontece pela ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar de sílica. Estes grupos têm caráter ácido e, quando em contato com a solução tampão, em altos valores de pH (acima de 2), sofrem dissociação resultando em cargas negativas (grupos silanoatos) na superfície, enquanto os íons H^+ liberados difundem-se para o seio da solução que preenche o capilar. Estes silanoatos atraem íons carregados positivamente da solução tampão, formando uma camada interna fixa de cátions próxima à parede do capilar. Estes cátions não conseguem neutralizar todas as cargas negativas, e então, outra camada de cátions é formada (camada móvel) e é puxada no sentido do cátodo quando uma tensão é aplicada (COLAMBRA et al., 1997; HOLLAND et al., 1997; SANTORO et al., 2000; VALKÓ, 2000).

De maneira simplificada, quando o potencial é aplicado os cátions migram em direção ao cátodo carregando sua esfera iônica de hidratação, induzindo o aparecimento de um fluxo de líquido no capilar (COLAMBRA et al., 1997). As moléculas de água que solvatam o analito também contribuem para o deslocamento da amostra pelo capilar. Portanto, o EOF é dependente da carga do capilar (c), da viscosidade (η) e da constante dielétrica do tampão (ϵ) e pode ser calculado pela Equação 14.

$$\mu_{EOF} = \epsilon c / \eta \quad \text{Equação 14}$$

Assim sendo, o EOF depende do pH do eletrólito, pois a carga do capilar é guiada pela ionização dos grupos silanóis, que é pH dependente (SANTORO et al., 2000).

Como pode ser observado, o movimento do analito é a soma do EOF com a migração individual das espécies. Normalmente, ânions migram para direção oposta ao EOF e sua velocidade é menor que a velocidade eletrosmótica, portanto, eluem mais lentamente.

Cátions migram na mesma direção do EOF e sua velocidade é maior que a do EOF, portanto, eluem mais rapidamente e, os analitos neutros migram na mesma velocidade do EOF (BONATO et al., 2005; USP, 2008).

O potencial zeta (Z) é o parâmetro mais importante para compreensão do EOF e o mecanismo pelo qual a superfície do capilar responde às mudanças na composição do eletrólito (TAVARES; McGUFFIN, 1995). Isso pode ser exemplificado no trabalho apresentado por Tavares (1996), o qual descreve que o potencial zeta e, consequentemente, a velocidade eletrosmótica são muito altos em pH básico mas diminuem rapidamente em pH entre 8 e 4 e, são praticamente estáveis em pH ácido.

Para controlar o EOF diversas estratégias podem ser utilizadas, por exemplo, alteração de pH, concentração e força iônica da solução tampão, tipo e concentração de um eletrólito inerte ou adição de composto orgânico, alteração na viscosidade do solvente, constante dielétrica e temperatura, além de modificações na superfície interna do capilar (uso de vidro, por exemplo) (TAVARES, 1996). A fim de que aconteça a inversão do EOF, é comum adicionar surfactantes catiônicos, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa, ao eletrólito. A inversão ocorre baseada na formação de uma camada de semi-micelas na superfície interna do capilar (COLAMBRA et al., 1997).

O perfil radial constante da velocidade do EOF, apenas um pouco mais lento próximo à parede do capilar, resulta em menor resistência à transferência de massa e desta maneira, todas as moléculas têm a mesma velocidade, causando menor dispersão da amostra e não contribuindo para o alargamento das bandas, apresentando como consequência, maior eficiência na separação (picos mais estreitos) quando comparado ao perfil parabólico da velocidade da CLAE, característico do fluxo induzido por pressão (TAVARES, 1997; BONATO et al., 2005). Outro fator importante é que o EOF é responsável pela condução dos solutos, independentemente de sua carga, em direção ao detector, o que permite a análise de amostras que contenham cátions, ânions ou neutras (TAVARES, 1997).

Existem diversos tipos de técnica de eletroforese capilar, entre elas, eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*) ou solução livre (FSCE, *free solution capillary electrophoresis*) e eletroforese capilar micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*), sendo ambas muito utilizadas para análise farmacêutica ao lado da CLAE ou muitas vezes são utilizadas como técnicas complementares (HADLEY et al., 2000; SUNTORNSUK, 2010).

Quando a CZE é utilizada, a separação do analito ocorre no capilar contendo apenas solução tampão que tem a função de aumentar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e diminuir as causas de alargamento das zonas. A separação acontece por que os componentes da amostra migram como bandas discretas com velocidades diferentes que

depende da mobilidade eletroforética do soluto e do EOF dentro do capilar (TAVARES, 1997; BP, 2010d; EP, 2011). Esta técnica é muito útil para indústria farmacêutica, especialmente para compostos intermediários e compostos com grupos amino e/ou carboxílico ionizáveis (HADLEY et al., 2000).

Quando a MEKC é empregada, agentes tensoativos iônicos formadores de micelas são adicionados ao eletrólito proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito constitui a fase primária, que é transportada eletrosmoticamente sob ação do campo elétrico, e as micelas representam a fase secundária ou pseudo fase estacionária, e é transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose. Dessa maneira, a separação acontece na solução tampão contendo um surfactante na concentração acima da concentração micelar crítica (CMC) (micelas são formadas rapidamente quando o surfactante excede a CMC). As moléculas do soluto são distribuídas entre o tampão aquoso e a pseudo fase estacionária composta de micelas, de acordo com o coeficiente de partição do soluto, com a qual as moléculas neutras podem interagir (TAVARES, 1997; BP, 2010d; EP, 2011).

Em MEKC, as diferenças de mobilidade eletroforética podem ser utilizadas para separar compostos iônicos, ao mesmo tempo que, diferenças de distribuição entre a fase micelar e o eletrólito podem ser usadas para separar analitos neutros. Além disso, possui maior eficiência que as técnicas cromatográficas similares (pareamento iônico, por exemplo) devido às características do EOF (perfil radial) e a uniformidade das micelas, em relação ao tamanho, minimiza os problemas relacionados à resistência de transferência de massa (TAVARES, 1997).

Entretanto, a MEKC apresenta limitações. As micelas são instáveis em soluções aquosas com altos teores de solventes orgânicos e, de maneira geral, impossibilita o uso da MEKC para analitos com forte caráter apolar, uma vez que estes analitos são completamente retidos pela micela, portanto, não são separados quando atingem o detector. Outro problema é que a velocidade e o volume efetivo das micelas dependem muito das condições experimentais, ou seja, para reprodutibilidade do tempo de migração é necessário cuidado com as condições experimentais. Ainda é importante lembrar que a MEKC possui baixa capacidade de picos, limitando seu uso a misturas mais simples. Este fato tem relação com as micelas estarem em movimento e, como consequência, todos os analitos, mesmo os completamente retidos pela micela, são eluídos (TAVARES, 1997).

Embora a MEKC tenha sido desenvolvida para separar compostos neutros, esta técnica também pode auxiliar na separação de compostos iônicos e, por este motivo, tem sido muito utilizada para análise deste tipo de composto. A MEKC mantém a eficiência, velocidade e estabilidade instrumental da EC. O surfactante mais empregado é o dodecilsulfato de sódio (SDS), pois forma micela cuja migração eletroforética se opõe ao

EOF, mas possui mobilidade menor e, por isso, produzem melhores desempenhos (TAVARES, 1997; BP, 2010d; EP, 2011).

A literatura descreve vários trabalhos utilizando EC para análise quali e quantitativa de penicilinas em fluidos biológicos e em preparações farmacêuticas (YONGXIN et al., 1997; LI et al., 1998; PAJCHEL, TYSKY, 1999; PAJCHEL et al., 2002; NOZAL et al., 2004; MICHALSKA et al., 2004; PAJCHEL et al., 2004; PAJCHEL et al., 2005; PUIG et al., 2006; PÉREZ et al., 2007; CASTRO-PUYAMA et al., 2010), porém, não foi encontrado metodologia de EC descrita na literatura para análise de FLU sódica em cápsulas.

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método por eletroforese capilar micelar através do estudo dos parâmetros como preparo da amostra, eletrólito e padrão interno a serem utilizados para quantificação de FLU sódica em cápsulas e separação de seus diferentes produtos de degradação.

5.5.2. Ensaios preliminares

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

5.5.3. Material

Foram utilizados FLU-SQR e FLU-cápsulas, descritos nas seções 4.1.2. e 4.1.3, respectivamente.

Os reagentes de grau analítico utilizados para preparo do eletrólito foram: ácido bórico (Spectrum®, Gardena, USA), fosfato de sódio dibásico (Vetec®, Rocha, Brasil), dodecilsulfato de sódio (SDS) (Synth®, Diadema, Brasil) e água ultrapura (obtido por sistema de purificação Milli-Q® (Malsheim, França). Para o preparo das soluções testadas como padrão interno foram utilizados nimesulida (Farmacopeia Brasileira), metanol grau CLAE (Tedia®, Ohio, USA) e ácido salicílico (Synth®, Diadema, Brasil). Estearato de magnésio (Audaz Farmacopeia Fina®, São Paulo, Brasil), grau farmacêutico foi utilizado para preparo do placebo. Hidróxido de sódio (Synth®, Diadema, Brasil) foi utilizado para o condicionamento do capilar.

As soluções tampão borato de sódio e fosfato de sódio, FLU-SQR, FLU-cápsula e hidróxido de sódio foram filtradas através de membrana de *nylon* 0,45 µm de diâmetro de poro (Vertical®, Bangkok, Tailândia). Para verificar o pH do eletrólito foi utilizado o potenciômetro modelo DM-20, Digimed® (Santo Amaro, Brasil).

O equipamento de eletroforese capilar utilizado foi o modelo Agilent® 3DCE (Agilent® Technologies, Waldbronn, Alemanha), acoplado com detector de arranjo de diodos (PDA),

injetor automático, com controle de temperatura e tensão de 30 kV, instalado no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O *software* ChemStation foi utilizado para controle do equipamento e aquisição de dados. O capilar de sílica fundida, utilizado para as análises, apresenta 50 µm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total (comprimento efetivo de 40 cm) (Agilent® Technologies, Waldbronn, Alemanha).

5.5.3.1. Preparo dos eletrólitos

Foram preparadas soluções de tampão borato de sódio nas concentrações de 10 a 50 mM, pH de 8,0 a 10,0; solução tampão fosfato de sódio nas concentrações de 25 e 50 mM, pH de 8,0 a 10,0; solução de SDS nas concentrações de 40 a 100 mM. Os eletrólitos foram compostos por diferentes proporções das soluções tampão.

5.5.3.2. Preparo da solução de FLU-SQR

Foram pesados 6,7 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 300 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para tubos de *ependorf* que foram adicionados de 75 µL de solução de padrão interno nimesulida e o volume foi completado com eletrólito para obter soluções com as concentrações finais desejadas.

5.5.3.3. Preparo da solução de flucloxacilina sódica na forma farmacêutica

A partir do *pool* obtido das cápsulas, foram pesados analiticamente o equivalente a 6,0 mg de flucloxacilina sódica e transferidos para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 300 µg/mL. Alíquota de 250 µL desta solução foi transferida para tubos de *ependorf* que foram adicionados de 75 µL de solução de padrão interno nimesulida e o volume foi completado com eletrólito, obtendo-se soluções com concentração final de 50 µg/mL de FLU e de PI.

5.5.3.4. Preparo da solução de padrão interno nimesulida

A solução do padrão interno (PI) foi preparada pesando 100 mg de nimesulida e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução com concentração de 1000 µg/mL. Alíquotas de 75 µL foram transferidas para os tubos de *ependorf* contendo as soluções de FLU-SQR e FLU-cápsula.

5.5.4. Método

Diferentes eletrólitos, valores de pH, temperaturas, tensões, volumes de injeção e solventes da amostra foram testados para encontrar condições favoráveis à quantificação do fármaco e adequada separação de seus produtos de degradação (Tabela 5.40).

Tabela 5.40. Parâmetros testados durante o desenvolvimento do método de eletroforese capilar indicativo de estabilidade para determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas

Parâmetro	Descrição
Eletrólito	solução tampão borato de sódio adicionado de SDS solução tampão fosfato de sódio adicionado de SDS solução tampão fosfato de sódio e borato de sódio juntos e adicionados de SDS
Tensão	15; 17,5; 20 e 22,5 kV
Temperatura do capilar	25; 27,5; 30; 32,5; 35 °C
pH e concentração do eletrólito	solução tampão fosfato de sódio 25 a 50 mM, pH 8,0 a 10,0 solução tampão borato de sódio 10 a 50 mM, pH 8,0 a 10,0 solução de SDS 40 – 100 mM
Solvente das soluções	água eletrólito
Tempo de injeção	4-8 segundos
Padrão interno	solução de nimesulida com concentração de 1000 µg/mL solução de ácido salicílico com concentração de 200 µg/mL

As condições eletroforéticas estabelecidas para a determinação de FLU sódica em cápsulas estão apresentadas na Tabela 5.41.

Tabela 5.41. Parâmetros estabelecidos para a determinação de flucloxacilina sódica em cápsulas, pelo método de EC indicativo de estabilidade

Parâmetro	Descrição
Eletrólito	solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5
Tensão	20 kV
Temperatura do capilar	27,5 °C
Solvente das soluções	eletrólito (solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5)
Tempo de injeção	4 segundos
Padrão interno	solução de nimesulida com concentração de 1000 µg/mL
Injeção hidrodinâmica	50 mBar
Comprimento de onda	210 nm
Diâmetro interno do capilar	50 µm

O condicionamento inicial do capilar foi realizado com lavagem de solução de hidróxido de sódio 1,0 M durante 1 hora e água por 15 minutos. O condicionamento diário do capilar consistiu em lavagens de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, água e eletrólito por 15 minutos com cada solução. Para as demais corridas, o capilar foi submetido ao pré-condicionamento por meio de lavagens de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, água e eletrólito por 2, 1 e 3 minutos, respectivamente. Após a migração de cada amostra, o capilar foi submetido ao pós-condicionamento por meio de lavagens com água durante 3 minutos.

A identificação da FLU presente nas cápsulas utilizando a técnica de EC foi realizada através da comparação entre o tempo de migração e o perfil eletroforético observados na solução de FLU-SQR e FLU-cápsulas.

5.5.5. Validação do método analítico por EC

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP, 2008). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

5.5.5.1. Especificidade e estudos de degradação forçada

A especificidade é a habilidade de um método analítico medir a resposta do analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005). A capacidade indicadora de estabilidade do método foi determinada submetendo a solução de FLU-SQR (100 µg/mL) ao estudo de degradação forçada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica para avaliar a interferência na quantificação de FLU (ICH, 2003). Após os procedimentos de degradação as amostras foram diluídas em eletrólito para concentração final de 50 µg/mL e foram adicionadas de solução de PI.

❖ *Degradação ácida e básica:* a solução de FLU-SQR foi preparada em HCl 0,001 M e NaOH 0,001 M para a hidrólise ácida e básica, respectivamente. Ambas as soluções foram mantidas em temperatura ambiente durante 1,5 horas, neutralizadas, diluídas e analisadas.

❖ *Degradação térmica:* a solução de FLU-SQR preparada em água foi aquecida a 60 °C durante 6 horas, diluída e analisada.

❖ *Degradação oxidativa:* foi realizada dissolvendo a amostra em solução de peróxido de hidrogênio 1%, mantida em temperatura ambiente por 30 minutos e protegida da luz. Em seguida foi diluída em eletrólito e analisada.

❖ *Degradação fotolítica:* foi induzida expondo a solução de FLU-SQR em concentração de 100 µg/mL (em água) à luz ultravioleta (200 W h m⁻²) por 1 hora. Em seguida foi diluída em eletrólito e analisada.

Assim, a capacidade indicadora de estabilidade do método foi estabelecida através da resolução obtida entre o pico principal da FLU e seus produtos de degradação. Também foi avaliada a pureza do pico da FLU nas soluções degradadas utilizando o detector PDA.

Além disso, uma solução do excipiente da formulação farmacêutica foi analisada pelo método para verificar se o mesmo interfere nas análises.

5.5.5.2. Linearidade

A linearidade do método analítico foi determinada pela obtenção de três curvas analíticas, em três dias, cada uma com sete pontos, no intervalo de 20 a 100 µg/mL. Para cada curva analítica foi preparado uma solução de FLU-SQR na concentração de 300 µg/mL (solução-mãe), conforme descrito no item 5.5.3.2. A partir desta solução, alíquotas de 100; 150; 200; 250; 300; 400; 500 µL foram transferidas para tubos de *ependorf*, obtendo-se

soluções com concentrações de 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em eletrólito e adicionadas de solução PI obtendo concentração final de PI de 50 µg/mL. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos. Também foi avaliado o coeficiente de correlação.

5.5.5.3. Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade, sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 50 µg/mL foram preparadas sob as mesmas condições experimentais, mesmo analista e no mesmo laboratório e, foram analisadas. O coeficiente de variação percentual (CV%) entre as análises foi calculado.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido na análise de sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 50 µg/mL adiciona de PI preparada em três dias consecutivos.

Também foi realizada a análise entre analistas diferentes no mesmo dia e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de FLU-SQR adicionada de PI e preparadas pelos diferentes analistas.

5.5.5.4. Exatidão

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração 80 (R_1), 100 (R_2) e 120% (R_3) em relação á concentração de trabalho, de solução de FLU-SQR às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 40; 50 e 60 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preradadas conforme apresentados na Tabela 5.42. Todas as soluções finais foram adicionadas de PI.

Tabela 5.42. Preparo das soluções de FLU para o teste de recuperação do método de EC indicativo de estabilidade

	Volume de FLU-cápsula (300 µg/mL) (mL)*	Volume adicionado de FLU- SQR (300 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
A	0,150	-	30
R₁	0,150	0,050	40
R₂	0,150	0,100	50
R₃	0,150	0,150	60
SQR	-	0,150	30

* cada nível de concentração foi preparado em triplicata em tubos de *eppendorf* de 1,5 mL.

A percentagem de FLU sódica recuperada (R%) foi calculada utilizando-se a Equação 2, descrita na seção 5.1.6.3.1 (AOAC, 2002).

5.5.5.5. Robustez

Foi avaliada por meio de um procedimento de combinação fatorial, denominado ensaio fatorial 2-Level 2⁵⁻² Fraction Factorial Design (SANGOI, STEPPE, 2010), no qual foram realizados oito experimentos com a seleção de cinco fatores estabelecidos a serem modificados: concentração da solução tampão borato de sódio, concentração na solução de SDS, pH do eletrólito, tensão e temperatura do capilar (Tabela 5.43). As modificações foram realizadas em dois níveis: alto e baixo (Tabela 5.44). As respostas foram avaliadas por meio do tempo de migração e doseamento da solução de FLU. Os resultados obtidos foram analisados pelo Minitab 14 statistical *software* (Minitab State College®, PA, USA) para avaliar a significância dos efeitos, comparando com as respostas obtidas em condições normais.

Tabela 5.43. Variáveis selecionadas para serem avaliadas pelo teste de robustez do método de EC indicativo de estabilidade

Fator	Normal	Baixo nível	Alto nível
Concentração da solução de SDS (mM)	80	78	82
Concentração da solução tampão de sódio (mM)	50	48	52
Valor de pH	8,5	8,4	8,6
Tensão (kV)	20	19	21
Temperatura do capilar (°C)	27,5	26,5	28,5

Tabela 5.44. Parâmetros analíticos e variações realizadas no teste de robustez do método de EC indicativo de estabilidade

Ordem de corrida	Concentração solução tampão borato de sódio (mM)	Concentração SDS (mM)	pH	Tensão (kV)	Temperatura (°C)
1	52	78	8,6	19	28,5
2	48	82	8,4	19	28,5
3	48	78	8,6	21	26,5
4	52	82	8,6	21	28,5
5	52	82	8,4	21	26,5
6	48	82	8,6	19	26,5
7	48	78	8,4	21	28,5
8	52	78	8,4	19	26,5

5.5.5.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

LD e LQ foram estimados a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, conforme as Equações 3 e 4, descritas nas seções 5.3.4.6 e 5.3.4.7, respectivamente.

5.5.5.7. Adequabilidade do sistema eletroforético

Para assegurar o desempenho do equipamento antes e durante a realização das análises, foram efetuadas cinco injeções da mesma solução de FLU-SQR na concentração de 50 µg/mL, avaliando-se o coeficiente de variação percentual (CV%) dos parâmetros estabelecidos pelo FDA (1994): tempo de migração e área do pico e também através dos valores de *tailing factor* ou fator de cauda (*T*), fator de assimetria do pico (*S*), número de pratos (*N*).

O número de pratos (*N*) é definido como uma medida da eficiência do capilar (USP, 2008; JP, 2011). O fator assimetria (*S*) e cauda (*T*) são medidas da simetria do pico eletroforético, porém o fator de cauda é medido à 5% da altura do pico (USP, 2008) e o fator de assimetria é verificado à 10% da altura do pico (AGILENT TECHNOLOGIES, 2011; FDA, 1994). Estes parâmetros foram calculados pelo *software* do equipamento.

5.5.6. Cálculo do teor das cápsulas de flucloxacilina sódica

A concentração e o teor de FLU sódica nas cápsulas foram obtidos pelas Equações 5 e 6, descritas na seção 5.3.5.

5.5.7. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica

Para avaliar a estabilidade da solução de FLU sódica, foi preparada uma solução estoque de FLU na concentração de 300 µg/mL, conforme descrito no item 5.5.6. Em seguida, foram preparadas diversas soluções para avaliar a sua estabilidade: solução na concentração de 100 µg/mL em água, mantida em refrigerador (2 - 8 °C) por 72 horas e diluída para 50 µg/mL, em eletrólito e analisada; solução com concentração de 100 µg/mL em água, mantida em aquecimento (60 °C) por 24 horas e diluída para 50 µg/mL, em eletrólito, e analisada; solução na concentração de 50 µg/mL, em eletrólito, mantida em temperatura ambiente por 72 horas e analisada e solução com concentração de 100 µg/mL, em água, mantida em temperatura ambiente por 72 horas, em seguida diluída para 50 µg/mL, em eletrólito, adicionada de PI e analisada.

5.5.8. Resultados

O eletroferograma típico obtido pelo método proposto, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente à FLU sódica, é apresentado na Figura 5.18. O tempo de migração médio observado (4,6 minutos) permitiu rápida determinação do fármaco, contribuindo com a sua aplicação em controle de qualidade. A Figura 5.19 apresenta o eletroferograma obtido com a solução de FLU-cápsula.

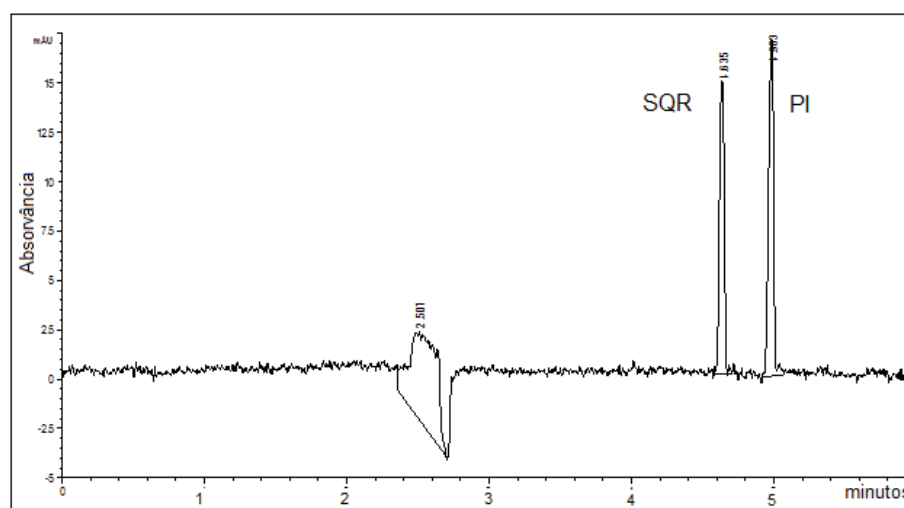


Figura 5.18. Eletroferograma de FLU-SQR (50 µg/mL), obtido pelo método eletroforético. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno; (SQR) substância química de referência.

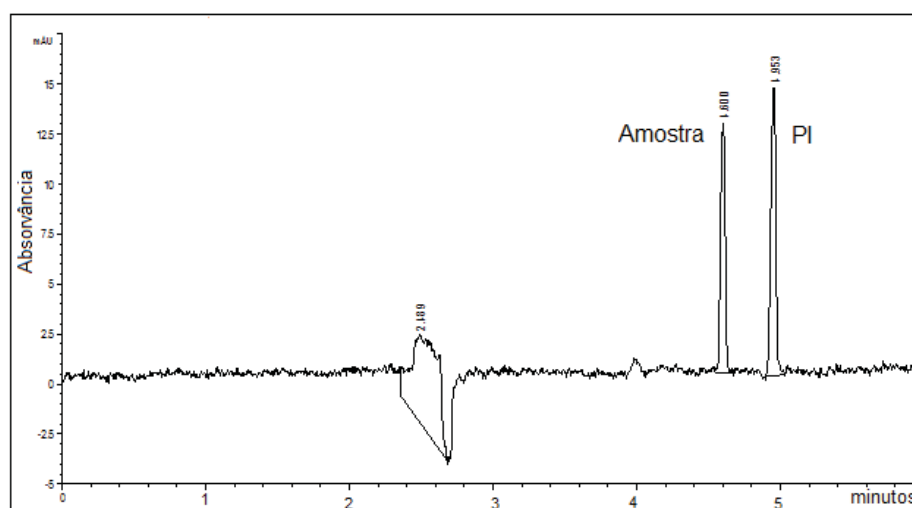


Figura 5.19. Eletroferograma de FLU-cápsula (50 µg/mL), obtido pelo método eletroforético. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno.

5.5.8.1. Especificidade e estudos de degradação forçada

As degradações forçadas foram realizadas para verificar as propriedades indicadoras de estabilidade do método analítico. As Figuras 5.20 a 5.25 mostram os eletroferogramas obtidos após as degradações ácida, básica, térmica, oxidativa, fotolítica e com placebo, respectivamente, com picos correspondentes aos produtos de degradações bem resolvidos do pico principal da FLU sódica (tempo de migração médio: 4,6 minutos).

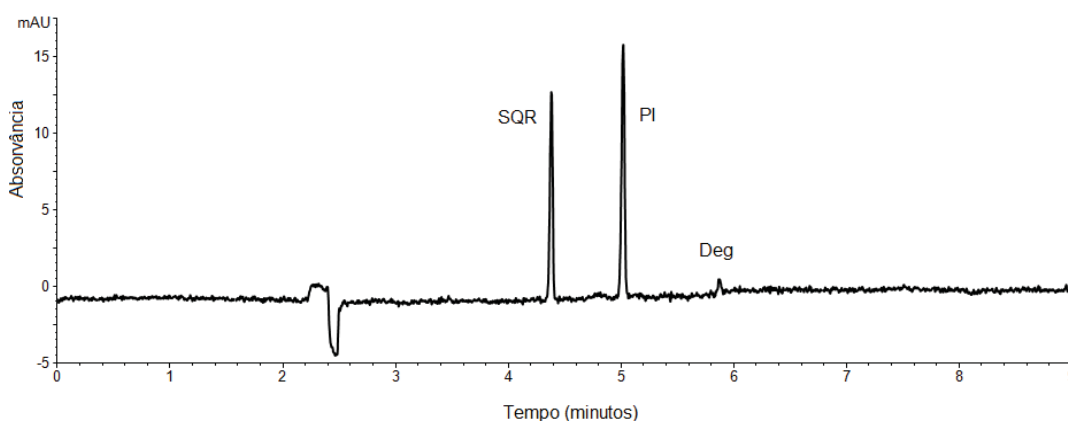


Figura 5.20. Eletroferograma da degradação de FLU-SQR (50 µg/mL) em meio ácido (HCl 0,001 M) após 1,5 horas. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno. (SQR) substância química de referência. (Deg) produto de degradação.

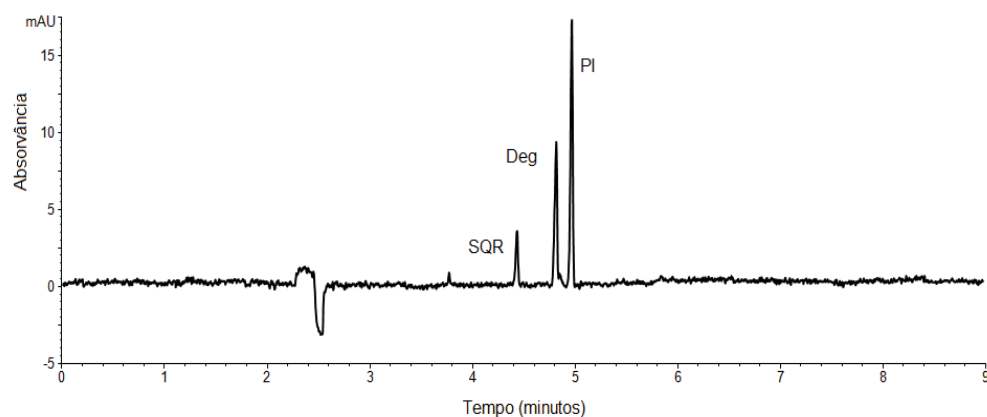


Figura 5.21. Eletroferograma da degradação de FLU-SQR (50 µg/mL) em meio básico (NaOH 0,001 M) após 1,5 horas. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno. (SQR) substância química de referência. (Deg) produto de degradação.

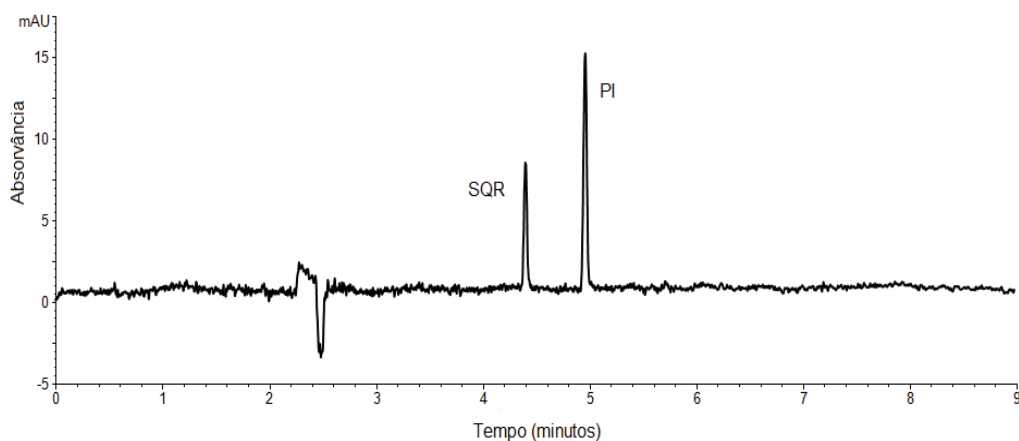


Figura 5.22. Eletroferograma da degradação térmica a 60 °C de FLU-SQR (50 µg/mL) após 6,0 horas. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno. (SQR) substância química de referência.

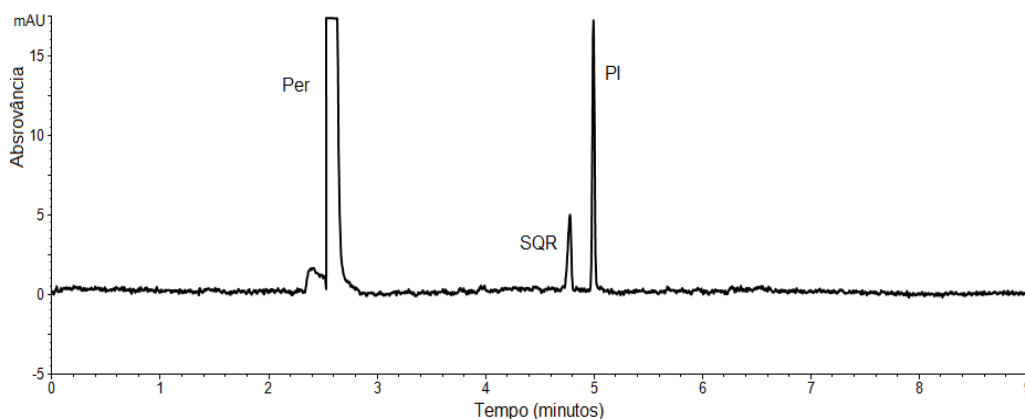


Figura 5.23. Eletroferograma da degradação oxidativa de FLU-SQR (50 µg/mL) após 30 minutos. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno. (SQR) substância química de referência. (Per) solução de peróxido de hidrogênio 1%.

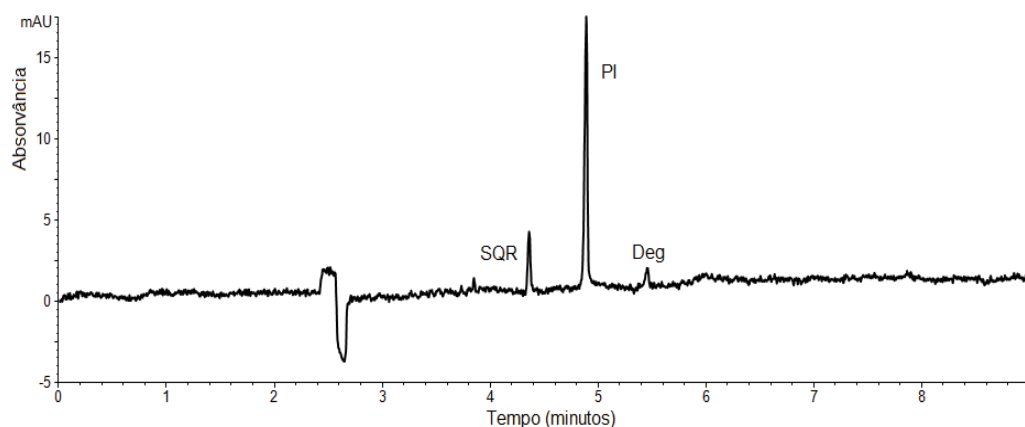


Figura 5.24. Eletroferograma da degradação fotolítica de FLU-SQR (50 µg/mL), após 1,0 hora. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração: 4,6 minutos. (PI) padrão interno. (SQR) substância química de referência. (Deg) produto de degradação.

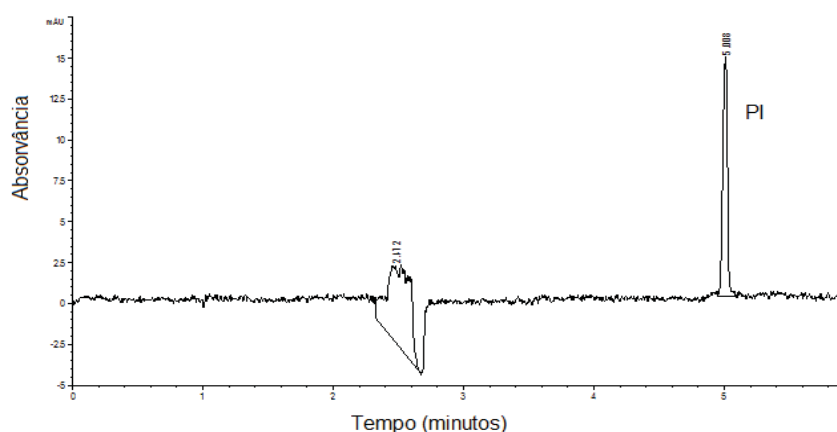


Figura 5.25. Eletroferograma da solução placebo (50 µg/mL). Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. (PI) padrão interno.

A Tabela 5.45 apresenta os valores, em percentagem, das perdas da área do pico da FLU-SQR e os tempos de migração dos picos originados a partir das respectivas condições de degradação.

Tabela 5.45. Perdas percentuais encontradas para solução de FLU-SQR na concentração de 50 µg/mL, obtidas pelo método de EC indicativo de estabilidade

	Degradação				
	Ácida	Básica	Térmica	Fotolítica	Oxidativa
Perda (%)	9	75	19	74	51
Pico adicional (minutos)	6,0	4,9	NO	NO	5,5

NO = não observado.

As condições em meio básico e fotolítica demonstraram as degradações mais agressivas para a solução de FLU, pois ocorreu perda de 75% e 74% da área do pico, respectivamente, e surgiu um pico de produto de degradação em torno de 4,9 e 5,5 minutos, respectivamente (Figura 5.26). A condição oxidativa também demonstrou ser bastante agressiva com grande degradação da solução de FLU, porém, não foi verificado pico de produto de degradação, pelo menos nas condições analíticas utilizadas neste estudo.

A condição menos agressiva foi em meio ácido, com perda de 9% do teor da FLU e foi observado pico de produto de degradação com tempo de migração de, aproximadamente, 6,0 minutos.

Também foi determinada a pureza do pico da FLU-SQR nas soluções degradadas, utilizando detector PDA, para demonstrar a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto. Em todos os casos a pureza do pico foi maior que 99,0%.

Não houve interferência do excipiente da formulação (Figura 5.27), indicando que o pico de FLU sódica estava livre de qualquer pico coeluyente, uma vez que apresentou pureza de 99,9%, comprovando que o método proposto é específico para análise de FLU sódica.

5.5.8.2. Linearidade

Os resultados dos valores das áreas obtidas para a curva analítica de FLU-SQR estão apresentados na Tabela 5.46.

Tabela 5.46. Valores das áreas referente ao pico de FLU-SQR para obtenção da curva analítica do método eletroforético, utilizando como eletrólito solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5 a 210 nm

Conc. (µg/mL)	Áreas*	Área média ± e.p.m.**	CV (%)***
20,0	0,3567	0,3506 ± 0,0042	2,10
	0,3424		
	0,3536		
30,0	0,4860	0,4831 ± 0,0014	0,51
	0,4816		
	0,4818		
40,0	0,6384	0,6247 ± 0,0074	2,06
	0,6228		
	0,6129		
50,0	0,7645	0,7571 ± 0,0040	0,92
	0,7507		
	0,7561		
60,0	0,8757	0,8858 ± 0,0068	1,34
	0,8988		
	0,8828		
80,0	1,1440	1,1389 ± 0,3285	0,68
	1,1300		
	1,1428		
100,0	1,3619	1,3766 ± 0,0079	1,00
	1,3889		
	1,3791		

*cada valor corresponde à média de três determinações realizadas em um mesmo dia, durante três dias; **e.p.m. = erro padrão da média; ***CV (%) = coeficiente de variação percentual.

A curva analítica de FLU-SQR (Figura 5.26) foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é $y = 0,0129x + 0,1043$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9996.

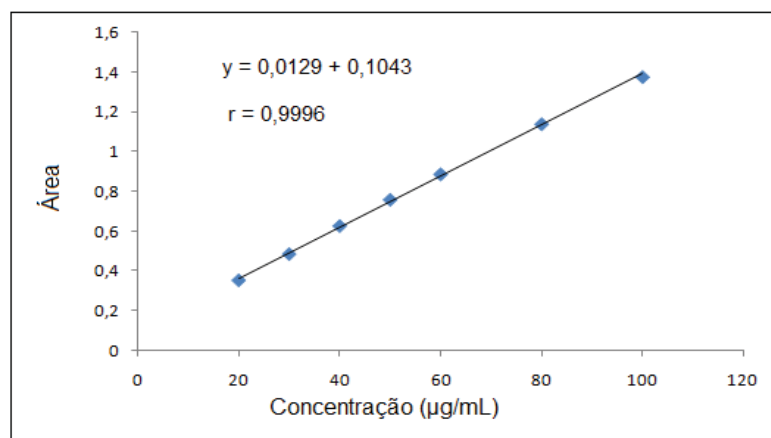


Figura 5.26. Curva analítica de FLU-SQR para método eletroforético. Eletrólito: solução tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM, pH 8,5. Capilar Agilent® (48,5 cm), 50 µm. Comprimento de onda: 210 nm. Tempo de migração médio: 4,6 minutos.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de FLU-SQR é apresentada na Tabela 5.47.

Tabela 5.47. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de FLU-SQR utilizando o método de EC indicativo de estabilidade

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F calc	F tab
Entre	6	2,3687	0,3948	4195,87*	4,46
Regressão linear	1	2,3667	2,3667	25154,21*	8,86
Desvio da linearidade	5	0,0020	0,0004	4,20	4,69
Resíduo	14	0,0013	0,0001		
Total	20	2,3700			

*Significativo para $p < 0,01\%$; GL = graus de liberdade.

Os resultados significativo para regressão e não significativo para o desvio da linearidade, valida o método de EC para FLU sódica quanto ao parâmetro de linearidade. Além disso, o coeficiente de correlação foi muito satisfatório indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

5.5.8.3. Precisão

A repetibilidade forneceu CV% de 1,60%.

A precisão interdias forneceu CV% de 2,00% e a precisão entre analistas, forneceu CV% de 2,50%.

5.5.8.4. Exatidão

Foi comprovada através da análise de soluções em três concentrações pré-estabelecidas e os resultados experimentais, que correspondem à porcentagem média de 99,45%, encontram-se na Tabela 5.48.

Tabela 5.48. Teste de recuperação do método de EC indicativo de estabilidade

	FLU-SQR adicionado (µg/mL)	FLU-SQR encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)**
R₁	10,0	9,81	99,63		
R₂	20,0	20,38	100,20	99,45	0,86
R₃	30,0	29,59	98,52		

*cada valor é a média de três determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.5.8.5. Robustez

Para determinação da robustez, a significância dos efeitos estudados foi avaliado pelo gráfico de Pareto que consiste em um gráfico de barras com comprimento proporcional ao valor absoluto do efeito estimado, dividido pelo pseudo erro padrão definido por Lenth (Lenth's PSE) (LENTH, 1989). Os códigos A, B, C, D e E correspondem à solução tampão borato de sódio, solução de SDS, valor de pH, tensão e temperatura, respectivamente. A combinação de dois códigos indica a interação dos efeitos entre as duas variáveis. As barras foram construídas de acordo com o tamanho do efeito, com o maior efeito no topo. O gráfico inclui uma linha vertical para o valor crítico de t para $\alpha = 0,05$. Os efeitos nos quais as barras são menores do que o valor crítico de t foram considerados não significantes e não afetam a resposta da variável analisada. As Figuras 5.27 e 5.28 demonstram que os efeitos e os fatores, nos intervalos analisados, não foram estatisticamente significantes para as respostas ensaiadas (teor (%) e tempo de migração). Portanto, o método pode ser considerado robusto diante das condições analisadas.

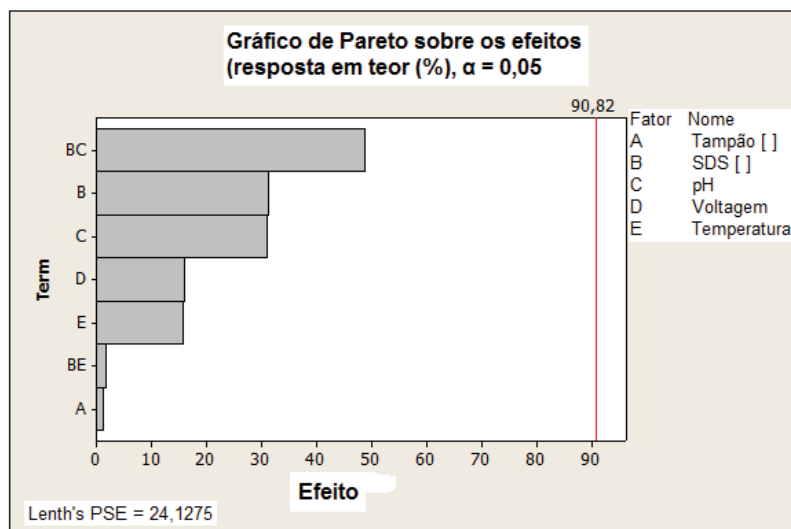


Figura 5.27. Gráfico de Pareto demonstrando o ensaio de robustez sobre o efeito de teor (%) pelo método de EC para flucloxacilina sódica.

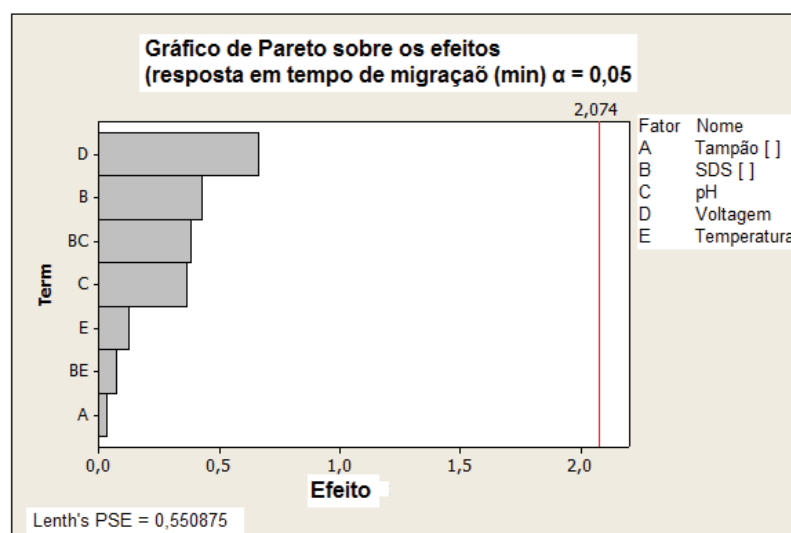


Figura 5.28. Gráfico de Pareto demonstrando o ensaio de robustez sobre o efeito de tempo de migração (min) pelo método de EC para flucloxacilina sódica.

5.5.8.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os valores estimados pelo método eletroforético para LD e LQ foram 3,20 µg/mL e 9,70 µg/mL, respectivamente.

5.5.8.7. Adequabilidade do sistema eletroforético

Foi verificada pela análise quantitativa, através do cálculo dos coeficientes de variação percentual (CV%) dos valores de tempo de migração e área do pico principal e,

também através dos valores de assimetria do pico, número de pratos e fator de cauda, de cinco replicatas de FLU-SQR. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.49.

Tabela 5.49. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema eletroforético desenvolvido para análise de flucloxacilina sódica

Parâmetros avaliados					
	Assimetria	Fator de cauda	Pratos	Tempo de migração (min)	Área
	1,043	0,944	89735	4,56	0,8767
	1,022	0,931	89281	4,56	0,8767
	1,080	0,933	91199	4,66	0,8561
	1,039	0,930	88528	4,62	0,8546
	1,030	0,923	88528	4,62	0,8362
Média	1,044	0,9322	89454	4,61	0,8601
CV (%)*	2,05	0,81	1,23	0,94	1,99

*CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.5.8.8. Estabilidade da solução de flucloxacilina sódica

A Tabela 5.50 apresenta os resultados da estabilidade da solução de FLU-SQR submetida às diferentes condições de armazenamento.

Tabela 5.50. Estabilidade da solução de FLU-SQR submetida às diferentes condições de armazenamento e analisadas pelo método de EC indicativo de estabilidade

	Condições			
	Refrigerador (2 a 8 °C)	Estufa (60 °C)	Temp. ambiente (eletrólito)	Temp. ambiente (água)
Perda (%)	Estável por 72 horas	6 horas: 10% 24 horas: 44%	Estável por 5 horas 48 horas: 11%	Estável por 72 horas
Pico adicional (minutos)	NO	24 horas: 3,7 e 5,0	NO	NO

NO= não observado; Temp. ambiente = temperatura ambiente.

5.5.8.9. Cálculo do teor das cápsulas de flucloxacilina sódica

O teor obtido para as cápsulas de flucloxacilina sódica através do método eletroforético está apresentado na Tabela 5.51.

Tabela 5.51. Determinação do teor interdias e entre-analistas das cápsulas de flucloxacilina sódica pelo método de EC indicativo de estabilidade

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre analistas		
		Teor (mg)*	Teor (%)*	CV (%)**		Teor (mg)*	Teor (%)*	CV (%)**
1	1	472,95	94,59	0,78	A	470,20	94,04	0,76
	2	465,60	93,13		B	467,65	93,53	
	3	470,20	94,04					

*cada valor é a média de sete determinações; **CV (%) = coeficiente de variação percentual.

5.5.9. Discussão

5.5.9.1. Otimização do método

A FLU é um composto ácido (pka próximo a 2,7) (ALEKSEEV, 2010). Embora Altria (1999) relate que compostos ácidos têm sido analisados por CZE utilizando solução tampão borato de sódio, fosfato de sódio ou uma combinação de ambos, em altos valores de pH, este trabalho utilizou a técnica MEKC, baseada na literatura que destaca esta técnica para análise de outras penicilinas (YONGXIN et al., 1997; LI et al., 1998; PAJCHEL, TYSKY, 1999; PAJCHEL et al., 2002; NOZAL et al., 2004; MICHALSKA et al., 2004; PAJCHEL et al., 2004; PAJCHEL et al., 2005; PUIG et al., 2006; PÉREZ et al., 2007; CASTRO-PUYAMA et al., 2010). Flurer (2007) complementa que para análise de antimicrobianos β -lactâmicos, a técnica mais amplamente utilizada é a MEKC, utilizando como eletrólito solução tampão acetato, fosfato de sódio ou borato de sódio associado ao SDS.

A MEKC é um método baseado na solubilização micelar que utiliza a técnica instrumental de eletroforese capilar e um surfactante com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos adicionados à solução de eletrólito, o qual age como uma pseudo fase estacionária, que é similar à fase móvel em cromatografia (EL DEEB et al., 2011).

Para reduzir a imprecisão relacionada à injeção, melhorar a reprodutibilidade do método e aumentar o controle sobre a quantidade de amostra injetada, frequentemente é recomendado o uso de um padrão interno (PI) nas análises quantitativas (ALTRIA et al., 1997). Ácido salicílico e nimesulida foram testados como PI para o desenvolvimento e validação do método por MEKC para FLU sódica, e a nimesulida foi selecionada como PI

devido ao pico, tempo de migração e absorvância adequados no comprimento de onda utilizado nas análises.

Para obter as condições ótimas do método por MEKC, algumas soluções de eletrólitos contendo fosfato de sódio, ácido bórico e fosfato de sódio com ácido bórico foram investigadas. Embora FLU sódica seja um composto ácido e a literatura relate que solução tampão borato de sódio tem um pH natural de 9,4, o qual seria suficientemente alto para separação de maioria dos ácidos, além de fornecer um substancial e consistente fluxo eletrosmótico (ALTRIA et al., 1997), o surfactante SDS foi adicionado para aumentar a sensibilidade do método, diminuir o tempo de análise, melhorar a resolução e a simetria do pico e porque é o surfactante mais comumente utilizado em MEKC (EL DEEB et al., 2011). Estes eletrólitos foram investigados uma vez que, conforme relatado anteriormente, a literatura descreve estas soluções para análise de penicilinas.

O pH da solução de eletrólito contendo tampão borato de sódio 50 mM e SDS 80 mM foi verificado no intervalo de 8,0 a 10,0. O pH 8,5 foi escolhido porque maiores valores de pH resultaram no aumento da largura e diminuição do tamanho do pico e também, a corrente elétrica foi maior.

A influência da concentração de SDS foi avaliada no intervalo de 40,0 a 100,0 mM, baseado na literatura que descreve intervalo de 20,0 a 100,0 mM (ALTRIA, 1999), em solução tampão borato de sódio na concentração constante de 50 mM. A concentração de SDS em 80 mM foi escolhida por que em menores concentrações o pico aparece próximo ao fluxo eletrosmótico (EOF) e, em maiores concentrações, o pico aparece próximo ao PI.

O efeito da concentração do eletrólito foi estudado no intervalo de 10,0 a 50,0 mM em concentração constante de SDS em 80 mM, em pH 8,5. A solução tampão borato de sódio em concentração de 50 mM foi selecionada por que o tempo de migração do pico aumentou quando a concentração da solução diminuiu.

A influência da tensão sobre o método foi investigada no intervalo de 15 a 25 kV e demonstrou menor tempo de migração e boa eficiência de separação quando uma corrente de 20 kV foi aplicada. Em menores valores de tensão, o tempo de migração aumentou e a corrente elétrica diminuiu, enquanto que em maiores valores de tensão, o tempo de migração diminuiu aproximando o pico do EOF e a corrente elétrica aumentou. O melhor pico com corrente aceitável (em torno de 30 μ A) sem aquecimento excessivo e surgimento do efeito Joule (calor gerado pela passagem da corrente elétrica), permitiu selecionar 20 kV como ótima tensão.

A temperatura do capilar foi avaliada no intervalo de 25 a 35 °C e a temperatura de 27,5 °C foi selecionada devido à melhor resolução entre a FLU-SR e o PI, menor tempo de

análise e corrente elétrica satisfatória. Quando a temperatura foi maior, a corrente elétrica aumentou demonstrando o efeito Joule.

Água e solução de eletrólito foram avaliadas como solvente para diluição das soluções. Os melhores resultados foram obtidos quando foi utilizada a solução de eletrólito, portanto, foi escolhida como solvente. Quando a água foi utilizada o pico do PI não apareceu, provavelmente devido à insolubilidade da nimesulida em água.

Como pode ser observado, os parâmetros para o método MEKC foram otimizados para obter melhor área, resolução, simetria e menor tempo de migração do pico. Baseado nos resultados, os parâmetros selecionados foram: solução tampão borato de sódio na concentração de 50 mM e SDS na concentração de 80 mM em pH 8,5, temperatura do capilar em 27,5 °C, 4 segundos para o tempo de injeção e a detecção foi em 210 nm.

5.5.9.2. Validação do método

O método de eletroforese capilar micelar foi validado de acordo com a literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008). A separação foi conseguida com tempo de migração médio de 4,6 minutos (Figura 5.18).

Os dados resultantes da avaliação da adequabilidade do sistema eletroforético (Tabela 5.47) demonstraram que o equipamento utilizado e as condições do método são adequados para fornecer confiança aos resultados, estando de acordo com a literatura, que preconiza a assimetria do pico ≤ 2 , número de pratos > 2000 (FDA, 1994) e fator cauda deve ser $\leq 1,0$ (USP, 2008). De maneira geral, é aceito como critério de avaliação, valor de CV% $\leq 2,0\%$ para todos os parâmetros avaliados (FDA, 1994). A Farmacopeia Americana (USP, 2008) é ainda mais abrangente e permite CV% $\leq 3,0\%$ para os parâmetros estudados durante a adequabilidade do sistema. Foi verificado que o CV% para área do pico e tempo de migração de FLU-SQR durante o teste de adequabilidade do sistema foi $< 2,0\%$. Com este valor de CV% para o tempo de migração, é possível verificar que o procedimento de lavagem do capilar foi eficiente (EP, 2011).

As condições indicadoras de estabilidade do método proposto foram avaliadas por estudo de degradação forçada (ICH, 2003). Todas as condições avaliadas resultaram na diminuição da área do pico da FLU sódica, entretanto, nem todas as condições resultaram na formação de produtos de degradação visíveis, pelo menos utilizando as condições analíticas estabelecidas (Tabela 5.43). As condições básicas e fotolíticas provocaram as maiores diminuições da área do pico da FLU-SQR, com picos adicionais em 4,9 e 5,5 minutos, respectivamente. A condição oxidativa também resultou em perda significativa da área do pico, porém, não foi percebido pico resultante da degradação. As condições ácida e térmica foram menos agressivas, e, na hidrólise ácida ocorreu o aparecimento de um pico

de degradação, enquanto que, na hidrólise térmica nenhum pico adicional foi detectado. Deste modo, os picos adicionais relacionados aos produtos de degradação sob as condições básica, fotolítica e ácida e a análise da amostra com excipiente (cápsula), confirmaram a especificidade do método, já que os picos da FLU-SQR e dos produtos de degradação apresentaram-se bem resolvidos e o excipiente não demonstrou nenhum pico nas condições analisadas.

O método analítico proposto apresentou regressão linear significativa no intervalo de concentração de 20 a 100 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9996. Os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária demonstraram CV% inferiores a 2,00%, comprovando a precisão do método analítico, uma vez que a literatura oficial preconiza CV% menor ou igual a 2,0% (FDA, 1994; USP, 2008).

A exatidão foi demonstrada por meio do valor médio experimental de 99,45%, pois valores entre 98 e 102% comprovam a exatidão do método (ICH, 2005).

Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 3,20 e 9,70 µg/mL, respectivamente, indicando que o método tem capacidade confiável para detectar e quantificar FLU sódica em cápsula.

O método proposto mostrou-se robusto quando avaliado pelo modelo fatorial *2-Level/2⁵⁻² Fraction Factorial Design* (Tabela 5.42), e interpretada pelo gráfico de Pareto, demonstrando não haver efeito considerado significativo nas condições estudadas.

A solução de FLU-SQR demonstrou ser estável quando mantida sob refrigeração por 72 horas. Quando mantida sob aquecimento por 6 horas foi observado perda de aproximadamente 10% da área do pico, no entanto, não foi detectado pico de produtos de degradação. Quando mantida em temperatura ambiente e preparada em eletrólito, a solução de FLU-SQR demonstrou perda de 11% da área do pico após 48 horas, mas não foi verificado pico de degradação. Finalmente, a solução de FLU-SQR preparada em água e mantida em temperatura ambiente, mostrou-se estável por até 72 horas.

O teor de FLU sódica encontrado nas cápsulas foi em média de 93,92%, estando dentro do permitido que é de 92,5 a 110% (BP, 2010c).

Diante de todos os resultados obtidos, é possível demonstrar que o método analítico proposto cumpre com as exigências preconizadas pela literatura oficial, podendo ser empregado para análise de FLU sódica na forma farmacêutica cápsulas.

O método eletroforético proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, baixo consumo de reagentes e solventes, baixíssima geração de resíduos, além de especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, LD e LQ satisfatórios, podendo ser utilizado para quantificar FLU sódica em cápsulas.

6. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE ANÁLISE

6.1. Introdução

A análise comparativa dos métodos tem como objetivo estabelecer uma comparação entre os métodos desenvolvidos neste trabalho para determinação de FLU sódica em cápsulas, uma vez que é necessário verificar se variabilidade dos métodos difere de forma significativa. Para execução desta análise foi realizada análise estatística dos teores médios de FLU sódica obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA).

6.2. Resultados

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de FLU sódica em cápsulas, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Aplicabilidade dos métodos propostos para análise da flucloxacilina sódica

Métodos	Dif	Turb	UV	CLAE	EC
Teor	93,62	96,33	106,66	92,81	94,59
	92,91	93,81	108,23	94,72	93,13
	96,44	98,62	104,87	94,53	94,04
Teor médio $\pm$ e.p.m.	94,33 $\pm$	96,25 $\pm$	106,59 $\pm$	94,02 $\pm$	93,92 $\pm$
	1,08	1,39	0,97	0,61	0,43
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	1,5 – 6,0	4,0 - 16	50,0 – 100,0	20,0 – 80,0	20,0 – 100,0
r	0,9997	0,9999	0,9999	0,9995	0,9996

Dif = difusão em ágar; Turb = turbidimétrico; UV = espectrofotometria na região do UV; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; EC = eletroforese capilar; e.p.m. = erro padrão da média.

A Tabela 6.2 apresenta o resultado de ANOVA calculado, utilizando os valores experimentais obtidos do teor de FLU sódica em cápsulas, a partir dos métodos desenvolvidos e validados.

Tabela 6.2. Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de flucloxacilina sódica em cápsulas, pelos métodos propostos

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calc	F tab
Tratamentos	4	353,97	88,49		
Resíduo	10	27,50	2,75	32,17*	3,48
Total	14	381,48			

*Significativo para $p < 0,05\%$; GL = graus de liberdade.

Embora os parâmetros apresentados na validação tenham demonstrado que todos os métodos são considerados satisfatórios (capítulo 5), os resultados obtidos através da ANOVA demonstraram haver diferença estatisticamente significativa entre os métodos propostos, para nível de significância de 5%. Então a ANOVA foi repetida, mas não levando em consideração o resultado encontrado para o teor através do método espectrofotométrico na região do UV.

A Tabela 6.3 apresenta o resultado de ANOVA calculado, utilizando os valores experimentais obtidos dos teores de FLU sódica em cápsula, com exceção do método espectrofotométrico na região de ultravioleta.

Tabela 6.3. Análise de variância dos resultados obtidos no doseamento de flucloxacilina sódica em cápsula, pelos métodos microbiológicos por difusão em ágar e turbidimétrico, CLAE e EC

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamentos	3	10,82	3,60		
Resíduo	8	21,88	2,73	1,32*	4,07
Total	11	32,67			

*não significativo para $p < 0,05$; GL = graus de liberdade

Foi realizado o teste de Tukey para identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si. A Tabela 6.4 apresenta o resultado do teste de Tukey utilizando os valores experimentais obtidos do teor de FLU sódica em cápsula, a partir dos métodos validados.

Tabela 6.4. Teste de Tukey dos resultados obtidos no doseamento de flucloxacilina sódica em cápsula, pelos cinco métodos propostos

Comparação		q calculado	q tabelado
UV	EC	11,709*	4,60
UV	CLAE	11,609*	
UV	Difusão	11,306*	
UV	Turbi	9,376*	
Turbi	EC	1,376	
Turbi	CLAE	1,276	
Turbi o	Difusão	0,973	
Difusão	EC	0,554	
Difusão	CLAE	0,654	
Difusão	EC	0,857	

*Significativo para $p < 0,05\%$; UV = espectrofotometria na região de UV; Difusão = doseamento microbiológico, método de difusão; Turbi = doseamento microbiológico, método turbidimétrico; CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência; EC = eletroforese capilar.

6.2. Discussão

De acordo com os resultados obtidos com a ANOVA há diferença significativa entre os métodos propostos. Então, foi realizado o teste de Tukey (comparação de médias) para conhecer as diferenças entre os métodos propostos.

Desta maneira, os métodos validados, com exceção do método espectrofotométrico na região do UV, são equivalentes, ou seja, o resultado comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa do fármaco em cápsulas.

Os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamentos oficiais e, apesar de demonstrarem intercambialidade, com exceção do método espectrofotométrico, cada método possui características próprias. Mas alguns métodos são mais específicos e adequados para análise de rotina em laboratórios.

Os métodos espectrofotométricos são simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas não são específicos e seletivos para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação na amostra.

Os ensaios microbiológicos são importantes, pois fornecem informação sobre a potência do produto farmacêutico, devendo ser aplicados em paralelo com métodos físicos-químicos, a fim de assegurar a eficácia terapêutica dos antimicrobianos, entretanto, não são capazes de identificar a formação de produtos de degradação, quando estes não foram

ainda separados do composto aparentado. Além disso, há necessidade de ambiente estéril para realização dos ensaios, o tempo de análise é maior, mas esta variável pode ser diminuída empregando o método turbidimétrico de doseamento microbiológico. Por outro lado, os métodos microbiológicos possuem baixo custo, facilidade de execução e não geram resíduos tóxicos quando cuidados de descontaminação do material utilizado são empregados.

Os métodos mais adequados para quantificar o fármaco em estudo e avaliar os produtos de degradação formados e impurezas seriam CLAE e EC, devido à maior especificidade, que além de possibilitarem tais estudos, demonstraram tempos de análises relativamente curtos com tempo de retenção e de migração de 4,4 minutos e 4,6 minutos, respectivamente. Entretanto, apesar de CLAE ser mais difundida para análises farmacêuticas, esta técnica possui maior custo devido ao uso de solventes com alto grau de pureza e colunas cromatográficas, além de gerar resíduos em maior quantidade e toxicidade que EC. Outra vantagem da técnica de EC é a possibilidade de ser utilizada quando a amostra disponível está em pouca quantidade, pois as soluções são preparadas em volumes menores que para CLAE porque o volume de injeção é menor. Porém, o tempo de análise por EC pode ser maior quando comparado ao tempo da CLAE pelo fato de ser necessário lavar o capilar entre as análises, enquanto que para CLAE não é necessário lavar a coluna entre as análises.

7. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

7.1. Introdução

A estabilidade pode ser definida como a extensão na qual um produto farmacêutico mantém, dentro dos limites especificados e por todo período de armazenamento e uso, ou seja, dentro do prazo de validade, todas as propriedades e características que possuía no momento da fabricação (ALLEN Jr, et al., 2007).

Prazo de validade é definido como período de tempo em que a preparação farmacêutica permanecerá estável, dentro dos limites aceitáveis para efeito terapêutico, quando armazenada sob as condições recomendadas e assegura que tenha padrões de identidade, pureza, teor, qualidade e potência no momento do uso (VADAS, 2004).

De acordo com a ANVISA, RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005) e com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*) (WHO, 2009), a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais, como, temperatura, umidade e luz, e de fatores intrínsecos, como, propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem.

Estudos de estabilidade são preconizados a fim de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e do medicamento dentro dos limites especificados, avaliando seu comportamento sob influência de fatores ambientais em função do tempo, considerando o fármaco, a mistura de excipientes ou veículos utilizados e suas interações, frente às condições as quais são submetidos (SILVA et al., 2009). Estes estudos são importantes para estabelecer o prazo de validade conforme as condições de armazenamento estabelecidas (ICH, 2003).

A monitorização da estabilidade dos medicamentos é uma das maneiras mais eficientes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante o seu prazo de validade e, por meio de estudos de produtos de degradação, os quais podem ocasionar perda de atividade terapêutica ou toxicidade, a segurança e eficácia podem ser avaliadas (SILVA et al., 2009).

A avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é dividida em estudos de estabilidade física e química. Luz, ar, calor e umidade são fatores que podem afetar a estabilidade física e acelerar as reações químicas do fármaco. Reações químicas que podem ocorrer são hidrólise e oxidação (mais comuns), fotólise, isomerização, ciclização, fragmentação, polimerização, racemização e incompatibilidades com os componentes da formulação ou embalagem tendo como consequência, comprometimento da eficácia e segurança do medicamento (ICH, 2003; VADAS, 2004; ALLEN Jr et al., 2007).

De acordo com a literatura (BAKSHI, SINGH, 2002; ICH, 2003; BRASIL, 2005; WHO, 2009), é recomendado a realização de testes de estresse, testes de estabilidade acelerada e

estabilidade de longa duração para avaliação da degradação do fármaco e produtos farmacêuticos.

- ❖ *Estudos de estresse:* podem ajudar na identificação dos produtos de degradação que auxiliam a definir os caminhos da degradação e também, a validar os métodos analíticos indicativos de estabilidade e incluem o estudo do efeito da temperatura, umidade, oxidação, hidrólise ácida e básica e fotólise, podendo ser realizados com o medicamento fora de sua embalagem primária.
- ❖ *Estudos acelerados de estabilidade:* visam forçar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições estressantes de armazenamento (temperatura e umidade) e são utilizados para pré-definir o prazo de validade de um medicamento e acompanhar as reações de degradação.
- ❖ *Estudos de longa duração de estabilidade:* objetivam verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado e, portanto, estabelecem ou confirmam o prazo de validade e recomendam as condições de armazenamento.
- ❖ *Estudos de acompanhamento:* são requeridos, mas somente são realizados se o produto não sofrer nenhuma alteração após a conclusão do estudo de longa duração.

A ANVISA, RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), preconiza que para o estabelecimento do prazo de validade, o estudo de estabilidade deve ser realizado com o medicamento em sua embalagem primária e a frequência dos testes de doseamento e quantificação de produtos de degradação (quando aplicável) é de 0, 3 e 6 meses para estudo acelerado e, 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses para estudo de longa duração.

A ICH recomenda que se houver expectativa de mudança significativa nos resultados obtidos com os estudos acelerados, amostras podem ser adicionadas ao ponto final do teste ou outro tempo de amostragem pode ser incluído. Estudos de longa duração devem ser realizados por, pelo menos, 12 meses e devem continuar por período suficiente para cobrir o período de reteste. Estudos intermediários podem ser realizados quando há mudança significativa dos resultados obtidos com estudos acelerados e a frequência deve ser de 0, 6, 9 e 12 meses (ICH, 2003).

Além dos estudos mencionados, também devem ser verificadas características de degradação específicas das formas farmacêuticas, por exemplo, para cápsulas é necessário

analisar umidade (presença de colabação, fissura ou cápsula quebradiça), alterações de cor e odor (podem ser causadas pela luz), aparência, forma e dissolução (EV, 2003; ALLEN Jr et al., 2007).

Estudos cinéticos são necessários para determinar a estabilidade e o prazo de validade dos produtos farmacêuticos. Estes estudos analisam a velocidade de alteração química e a maneira como esta alteração é influenciada pela concentração de reagentes, produtos e outras espécies químicas, além do solvente, pressão e temperatura. Em outras palavras, os estudos cinéticos são importantes para definir o tempo necessário para uma reação degradar 10% da concentração inicial do fármaco (LACHMAN et al., 2001; EV, 2003; ALLEN Jr et al., 2007).

A velocidade de reação é a descrição da concentração do fármaco em relação ao tempo. Estabelecendo a razão pela qual a velocidade de reação varia com a concentração dos reagentes em função do tempo, é possível definir a ordem de uma reação. Para muitos compostos a degradação das substâncias ocorre de acordo com as reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (LACHMAN et al., 2001; EV, 2003; ALLEN Jr et al., 2007).

❖ *Reação de ordem zero:* a velocidade da decomposição do fármaco é constante e não depende da concentração de qualquer reagente. O fator limitante pode ser a solubilidade ou absorção de luz. Esta reação pode ser calculada pela Equação 15 (LACHMAN et al., 2001; EV, 2003).

$$C = C_0 - kt \quad \text{Equação 15}$$

Em que: C = concentração no tempo t

C_0 = concentração inicial

k = constante de velocidade de reação

A velocidade de decomposição pode ser expressa como a taxa com que a concentração do fármaco diminui em função do tempo.

❖ *Reação de primeira ordem:* a velocidade da reação depende da concentração do reagente, portanto, são diretamente proporcionais. Esta reação pode ser calculada pela Equação 16 (LACHMAN et al., 2001; EV, 2003).

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Equação 16}$$

A concentração do reagente diminui exponencialmente em função do tempo.

❖ *Reação de segunda ordem:* ocorre quando a velocidade da reação depende da concentração de dois reagentes ou é proporcional à segunda potência da concentração de um dos reagentes. Esta reação pode calculada pela Equação 17 (LACHMAN et al., 2001; EV, 2003).

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt \quad \text{Equação 17}$$

É possível deduzir a ordem de reação, quando desconhecida, analisando os gráficos plotados para cada ordem de reação. Plotando um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) originará uma reta correspondente à ordem zero. Para reação de primeira ordem, plota-se um gráfico com a representação do logaritmo da concentração ($\log C$) em função do tempo (t). Para reação de segunda ordem, plota-se um gráfico representando o inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t). A representação gráfica que resultar em linha reta indicará a ordem de reação e a inclinação da reta corresponderá à constante de velocidade de reação (k) de degradação do fármaco. Entretanto, este método apresenta limitações principalmente em relação ao tempo de exposição da amostra ao degradante. Quando a decomposição é muito baixa, as ordens de reação tornam-se difíceis de serem diferenciadas, por todas parecerem ser lineares (LACHMAN et al., 2001; NETZ, ORTEGA, 2002; EV, 2003).

Para calcular o período de tempo em que o fármaco mantém 90% ($t_{90\%}$) de sua concentração inicial, ou seja, para calcular o prazo de validade, na condição de temperatura avaliada, as Equações 18 a 20 são utilizadas, de acordo com a ordem de reação determinada (EV, 2003).

$$t_{90\%} = 0,1 \times C_0 / k \quad (\text{reação de ordem zero}) \quad \text{Equação 18}$$

$$t_{90\%} = 0,106 / k \quad (\text{reação de primeira ordem}) \quad \text{Equação 19}$$

$$t_{90\%} = 1 / (9kC_0) \quad (\text{reação de segunda ordem}) \quad \text{Equação 20}$$

Em que: k = constante de velocidade

$t_{90\%}$ = tempo em que o fármaco mantém 90% de seu teor inicial

C_0 = concentração inicial do fármaco

De acordo com Allen Jr e colaboradores (2007), não há necessidade de avaliar o tempo para que haja decomposição de todo o material, pois este tempo é infinito. Desta maneira, as velocidades de reação muito comumente são descritas por k ou pelo seu tempo de meia-vida $t_{1/2}$. As Equações 21 e 22 apresentam o cálculo de tempo de meia-vida para reação de ordem zero e primeira ordem, respectivamente.

$$t_{1/2} = 1/k_0(C_0/k_0) \quad \text{Equação 21}$$

$$t_{1/2} = 0,693/k \quad \text{Equação 22}$$

Em que: C_0 = concentração inicial do fármaco

k_0 = constante de velocidade de ordem zero

k = constante de velocidade de reação

Métodos indicativos de estabilidade validados são importantes para avaliar o comportamento do fármaco ou medicamento diante das diferentes condições de estresse às quais podem ser submetidos para estudo de estabilidade. A CLAE é indispensável para estas análises, por ser mais específica, sensível e precisa que outros métodos, além de possibilitar a separação e quantificação da substância ativa junto com os produtos de degradação. Estes motivos fazem com que a CLAE seja o método analítico preferível para estudo de estabilidade de fármacos e formas farmacêuticas (LACHMAN et al., 2001; BAKSHI, SINGH, 2002; ICH, 2003).

O estudo de degradação frente à exposição à luz tem recebido cada vez mais atenção, uma vez que praticamente todos os fármacos têm um máximo de absorção na região de UV podendo ocasionar reações como, oxidação, redução, rearranjo de anéis ou polimerização. As reações químicas decorrentes da absorção de radiação na região de UV-VIS iniciam mais facilmente as reações químicas do que aquelas absorvidas de outros comprimentos de onda (CPMC, 1998; LACHMAN et al., 2001; EV, 2003).

A cinética de reações fotoquímicas é mais complexa que a cinética de reações térmicas devido ao maior número de variáveis envolvidas, como, por exemplo, intensidade e comprimento de onda da radiação e o tamanho, a forma e a cor do recipiente onde a substância é armazenada, os quais podem afetar a velocidade da reação (VADAS, 2004).

Os estudos de estabilidade realizados neste trabalho não buscam a determinação do prazo de validade do produto, pois este já se encontra no mercado com seu prazo de validade estabelecido. O objetivo deste estudo foi a avaliação do comportamento das amostras sob condições estressantes através de análises pelos métodos de CLAE, espectrofotometria na região do UV e microbiológico por difusão em ágar, desenvolvidos neste trabalho, observando a possível formação de produtos de degradação e/ou perda de atividade antimicrobiana e a determinação da cinética de degradação para a fotólise.

7.2. Método

7.2.1. Estudo preliminar da estabilidade de flucloxacilina sódica

7.2.1.1. Condições de estudo

O estudo preliminar da estabilidade de FLU sódica foi realizado em meio ácido, básico, peróxido de hidrogênio 3%, temperatura (refrigerador 5 °C, ambiente e banho aquecido a 70 °C) e luz UVC, empregando-se o *pool* obtido das cápsulas de FLU sódica. As amostras foram avaliadas quanto ao teor residual de FLU sódica e a possível formação de produtos de degradação por meio do método cromatográfico previamente validado.

Para estudo de degradação fotoquímica foi utilizada câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm), 20 W e 45 cm de comprimento. Água purificada foi obtida por sistema de purificação Milli-Q® (Malsheim, França).

As condições empregadas nos estudos preliminares de estabilidade foram:

➤ **Degradação em meio ácido:** a solução de FLU-cápsulas foi preparada pesando analiticamente o equivalente a 20 mg de FLU sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas de FLU e transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração teórica de 200 µg/mL (solução A). Alíquota de 25 mL da solução A foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, adicionada de solução de HCl para obter concentrações de 0,1; 0,01 ou 0,001 M, respectivamente e o volume foi completado com água, obtendo-se soluções com concentração final de 100 µg/mL (soluções B, C e D, respectivamente). A solução B foi dividida em duas porções sendo que, uma porção foi exposta à temperatura ambiente e a outra porção, foi aquecida em banho a 70 °C. As soluções C e D foram mantidas apenas em temperatura ambiente. Todas as soluções foram analisadas em diversos períodos. Em cada período de exposição ao meio ácido, alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e foi adicionada uma solução de NaOH para neutralização do meio e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com concentração final de 50 µg/mL para as análises.

➤ **Degradação em meio alcalino:** a solução de FLU-cápsulas foi preparada pesando analiticamente o equivalente a 20 mg de FU sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas de FLU e transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL (solução A). Alíquota de 25 mL da solução A foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, adicionada de solução de NaOH para obter concentrações de 0,1; 0,01 ou 0,001 M, respectivamente e o volume foi

completado com água, obtendo-se soluções com concentração final de 100 µg/mL (soluções B, C e D, respectivamente). As soluções B, C e D foram divididas em duas porções sendo que, uma porção foi exposta à temperatura ambiente e a outra porção, foi aquecida em banho a 70 °C. Estas soluções foram analisadas em diversos períodos. Em cada período de exposição ao meio básico, alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e foi adicionada uma solução de HCl para neutralização do meio e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com concentração final de 50 µg/mL para as análises.

➤ **Degradação oxidativa:** a solução de FLU-cápsulas foi preparada pesando analiticamente o equivalente a 20 mg de FLU sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas de FLU e transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL (solução A). Alíquota de 25 mL da solução A foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, adicionada de solução de peróxido de hidrogênio para obter concentração de 3% e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL (solução B). A solução B foi mantida por 60 e 90 minutos em temperatura ambiente.

➤ **Hidrólise neutra e estabilidade da solução:** a solução de FLU-cápsulas foi preparada pesando analiticamente o equivalente a 20 mg de FLU sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas de FLU e transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL (solução A). Esta solução foi dividida em duas porções, denominadas de “A, B”, respectivamente. A porção (A) foi armazenada em temperatura ambiente por 24 horas e depois diluída para 50 µg/mL em fase móvel e analisada. A porção (B) foi armazenada em refrigerador (5 °C) por 24 horas e depois diluída para 50 µg/mL em fase móvel e analisada. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra preparada em fase móvel (200 µg/mL).

➤ **Degradação fotoquímica:** a solução de FLU-cápsulas foi preparada pesando analiticamente o equivalente a 20 mg de FLU sódica a partir do *pool* obtido das cápsulas de FLU e transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL (solução A). Alíquota de 25 mL da solução A foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração final de 50 µg/mL. Esta solução foi exposta à luz UVC 254 nm, por período de 7 dias.

7.2.1.2. Resultados

7.2.1.2.1. Degradação em meio ácido

Os cromatogramas obtidos por CLAE para FLU-cápsulas, na concentração de 50 µg/mL, submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) durante 30 minutos à temperatura de 70 °C e 180 minutos à temperatura ambiente estão apresentados na Figura 7.1.

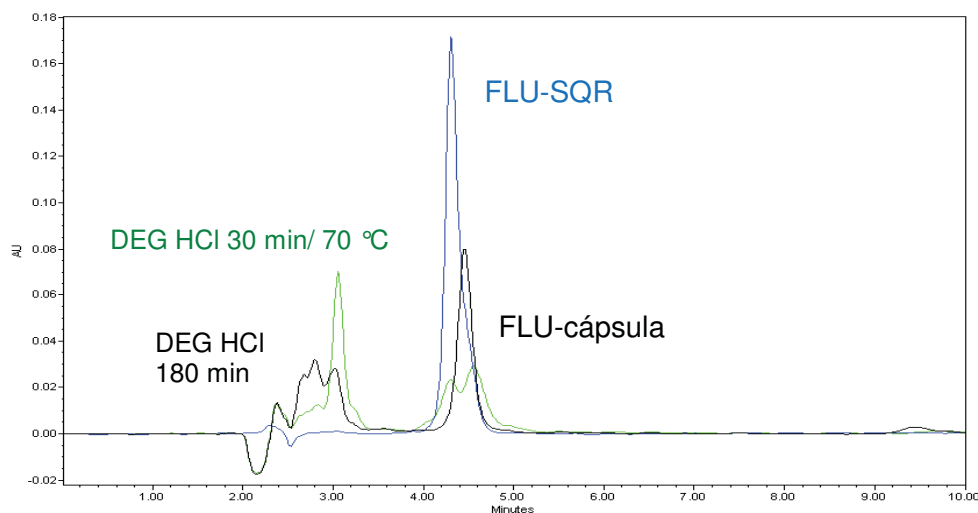


Figura 7.1. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação em meio ácido (HCl 0,1 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C (verde) e 180 minutos em temperatura ambiente (preto). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,5 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

Os cromatogramas obtidos por CLAE para FLU-cápsulas, na concentração de 50 µg/mL submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,01 M e 0,001 M) durante 180 minutos à temperatura ambiente estão apresentados nas Figuras 7.2 e 7.3, respectivamente.

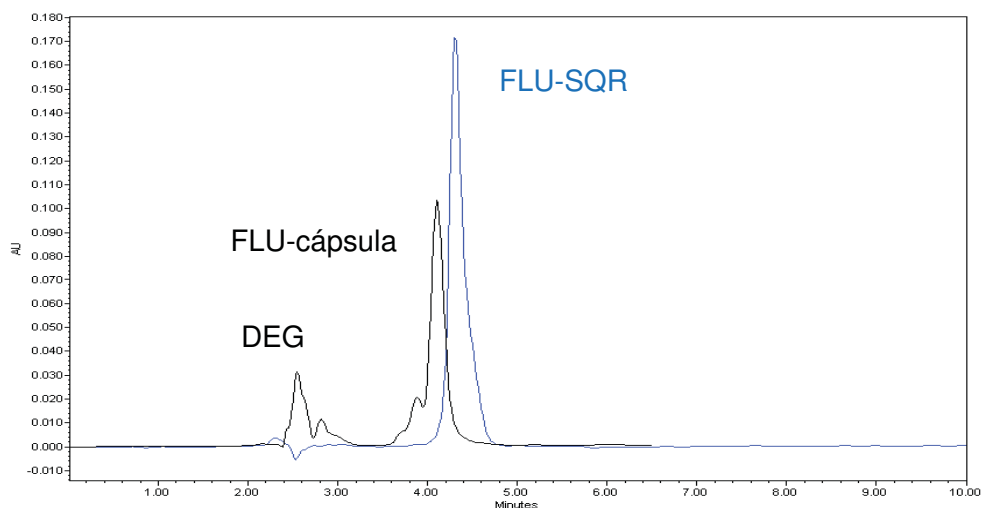


Figura 7.2. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação em meio ácido (HCl 0,01 M), por 180 minutos em temperatura ambiente (preto). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,1 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

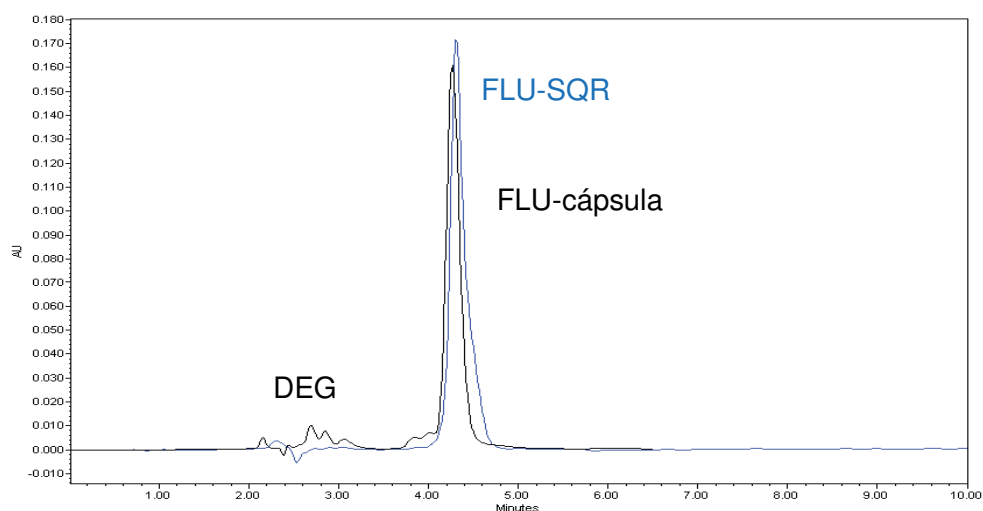


Figura 7.3. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação em meio ácido (HCl 0,001 M), por 180 minutos em temperatura ambiente (preto). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,3 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

7.2.1.2.2. Degradação em meio alcalino

A degradação da FLU em meio alcalino foi mais agressiva e por isso não foi possível observar a presença do pico da FLU quando utilizadas as soluções de NaOH 0,1 e 0,01 M, ou seja, o pico da FLU desapareceu, demonstrando sua completa degradação e, houve a

presença de pico oriundo da degradação, em tempo de retenção diferente daquele observado para FLU, quando íntegra.

Os cromatogramas obtidos por CLAE para soluções de FLU-cápsulas, na concentração de 50 µg/mL submetida à degradação em meio alcalino (NaOH 0,1 M) durante 30 minutos em banho aquecido a 70 °C e 60 minutos em temperatura ambiente, estão apresentados na Figura 7.4.

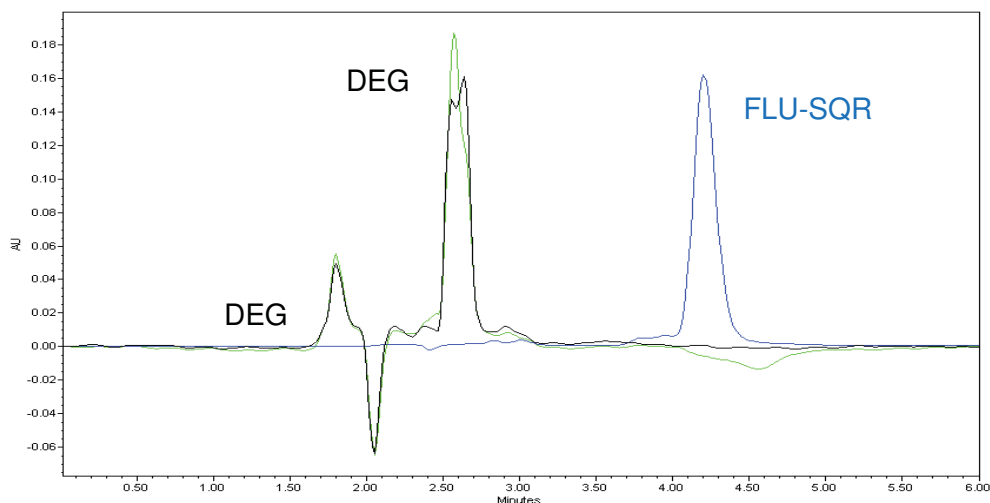


Figura 7.4. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação em meio alcalino (NaOH 0,1 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C (preto) e 60 minutos em temperatura ambiente (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Tempo de retenção ≈ 4,3. Comprimento de onda: 225 nm. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

Os cromatogramas obtidos por CLAE para soluções de FLU-cápsulas, na concentração de 50 µg/mL submetida à degradação em meio alcalino (NaOH 0,01 M) durante 30 minutos em banho aquecido a 70 °C e 90 minutos em temperatura ambiente estão apresentados na Figura 7.5.

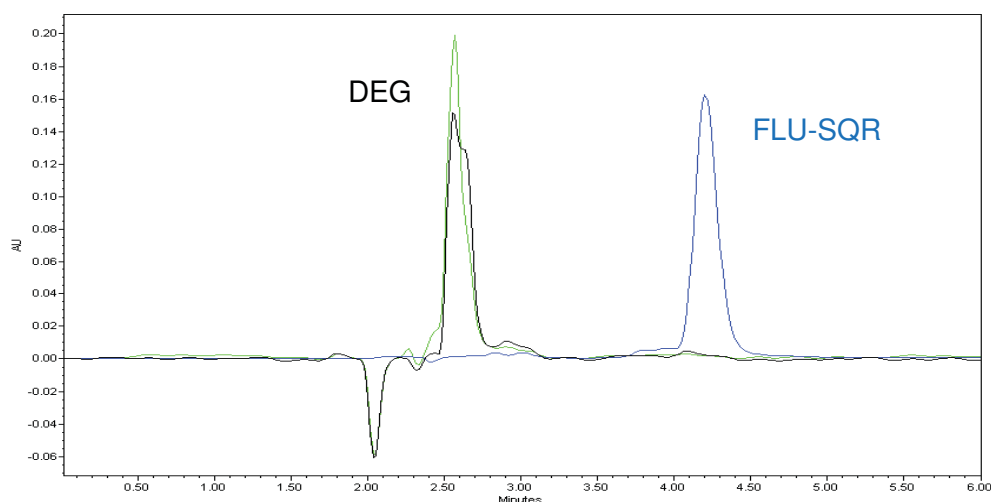


Figura 7.5. Cromatogramas de solução FLU-cápsula (50 µg/mL), representando a degradação em meio alcalino (NaOH 0,01 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C (preto) e 90 minutos em temperatura ambiente (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Tempo de retenção ≈ 4,3. Comprimento de onda: 225 nm. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

Os cromatogramas obtidos por CLAE para FLU-cápsula, na concentração de 50 µg/mL submetida à degradação em meio alcalino (NaOH 0,001 M) durante 30 minutos em banho aquecido a 70 °C e 180 minutos em temperatura ambiente estão apresentados na Figura 7.6.

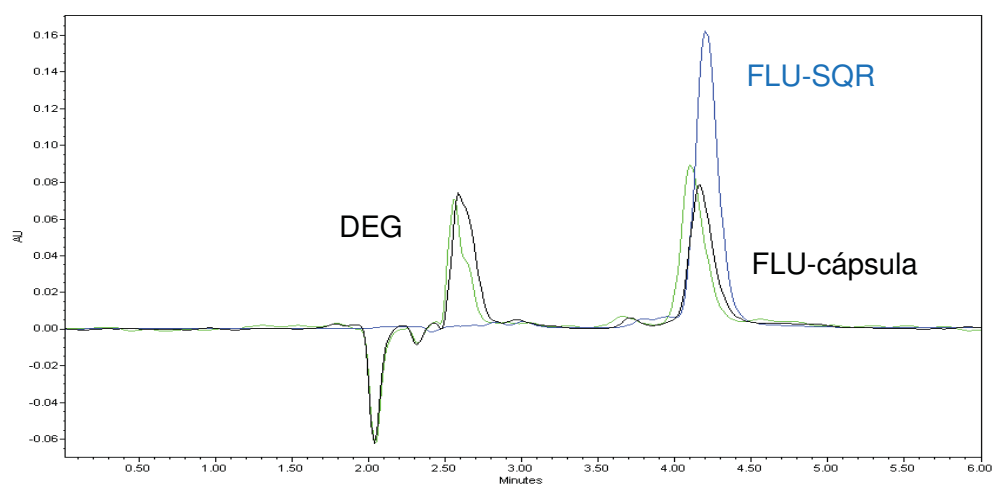


Figura 7.6. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação em meio alcalino (NaOH 0,001 M), por 30 minutos em banho aquecido a 70 °C (preto) e 180 minutos em temperatura ambiente (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,3 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação.

7.2.1.2.3. Degradação oxidativa

Os cromatogramas obtidos por CLAE para soluções de FLU-cápsula, na concentração de 50 µg/mL, submetida à degradação oxidativa (solução de H₂O₂ 3%) durante 60 e 90 minutos em temperatura ambiente estão apresentados na Figura 7.7.

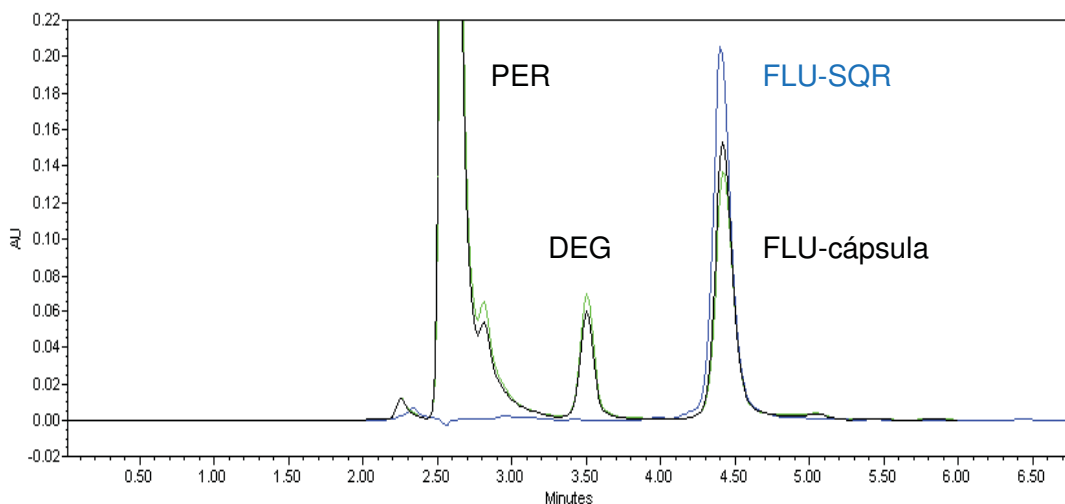


Figura 7.7. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a degradação oxidativa (H₂O₂ 3%), por 60 minutos (preto) e 90 minutos (verde) em temperatura ambiente. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax® C₁₈ (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,3 minutos. FLU-SQR (azul). DEG = produto de degradação. PER = solução de peróxido de hidrogênio.

7.2.1.2.4. Hidrólise neutra e estabilidade da solução de FLU

A Figura 7.8 representa os cromatogramas obtidos por CLAE para as soluções FLU-cápsulas preparada em concentração de 200 µg/mL em água e armazenadas em temperatura ambiente e refrigerador a 5 °C por período de 24 horas. As soluções foram diluídas para 50 µg/mL em fase móvel antes de serem analisadas.

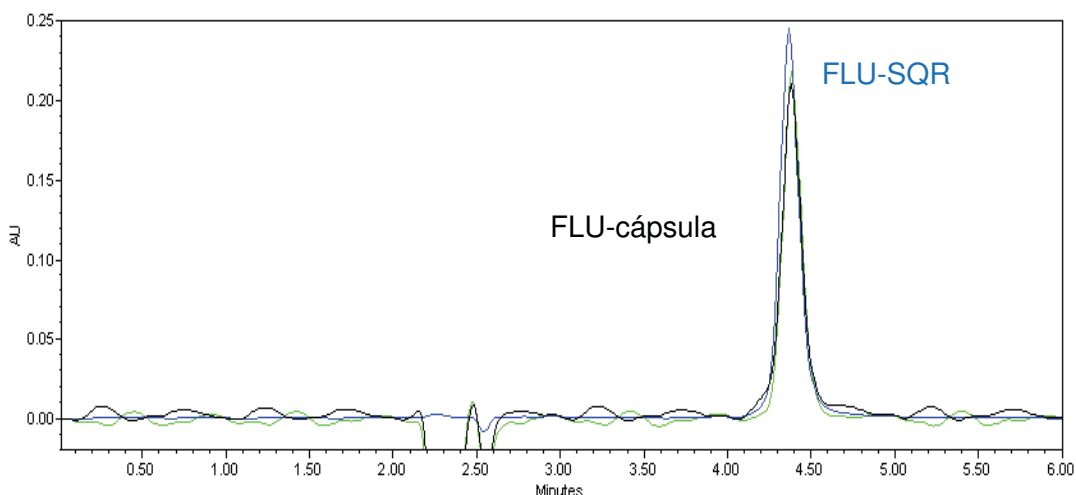


Figura 7.8. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a estabilidade em água por 24 horas, em temperatura ambiente (preto) e 24 horas em refrigerador a 5 °C (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,4. FLU-SQR (azul).

A Figura 7.9 representa os cromatogramas obtidos por CLAE para soluções de FLU-cápsulas preparada em concentração de 200 µg/mL em fase móvel e armazenadas em temperatura ambiente e refrigerador a 5 °C por período de 24 horas. As soluções foram diluídas para 50 µg/mL em fase móvel antes de serem analisadas.

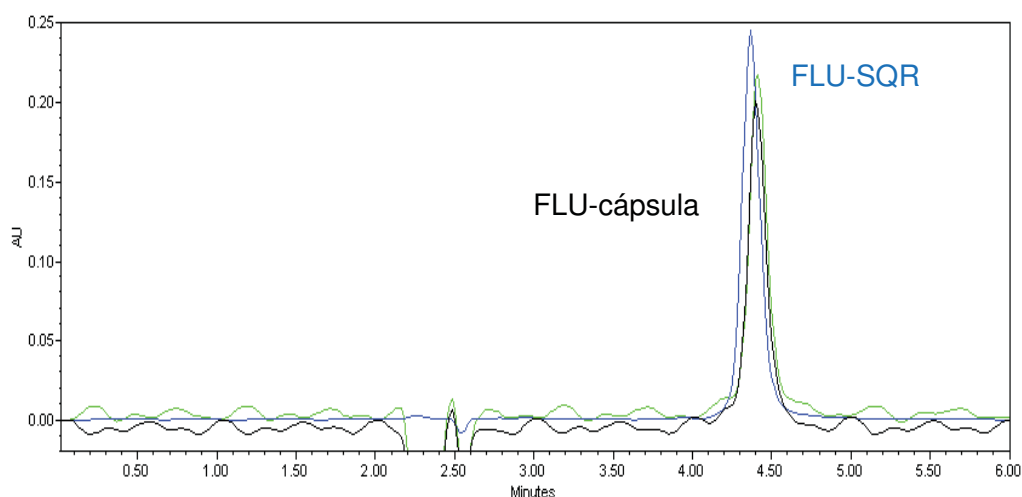


Figura 7.9. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a estabilidade em fase móvel, por 24 horas em temperatura ambiente (preto) e 24 horas em refrigerador a 5 °C (verde). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,4. FLU-SQR (azul).

7.2.1.2.5. Degradação fotoquímica

A Figura 7.10 representa os cromatogramas obtidos por CLAE para a solução FLU-cápsulas preparada em concentração de 50 µg/mL em fase móvel e exposta à luz UVC 254 nm, por período de 7 dias.

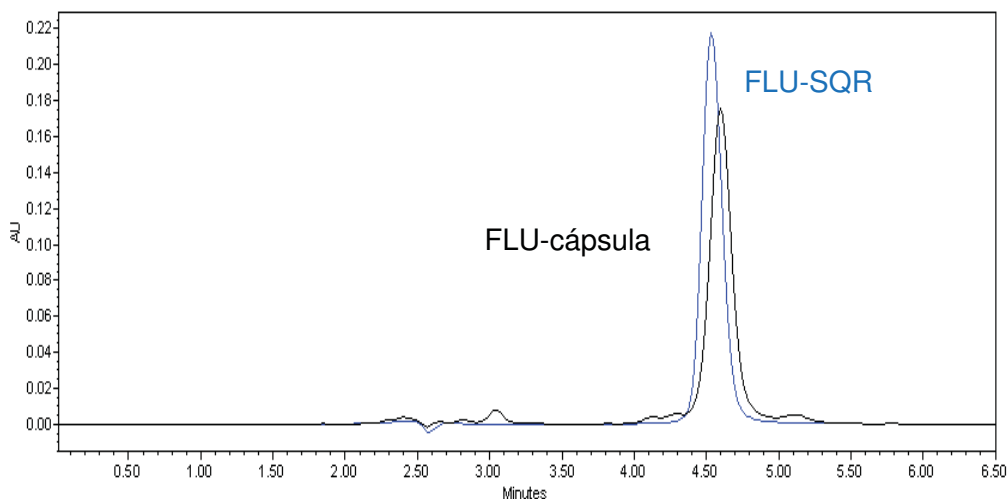


Figura 7.10. Cromatogramas de solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), representando a estabilidade fotoquímica por 7 dias em luz UVC 254 nm (preto). Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M, pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax® C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,6. FLU-SQR (azul).

A Tabela 7.1 apresenta os valores, em percentagem, das perdas da área do pico da FLU-cápsulas e os tempos de retenção dos picos originados a partir das respectivas condições de degradação, pelo método cromatográfico.

Tabela 7.1. Degradações para solução de FLU-cápsula na concentração de 50 µg/mL, obtidas pelo método de CLAE

Degradação	Perda (%)	Pico adicional (aproximadamente em minutos)
HCl 0,1 M	(aquec)	2,8
	52,02 (amb)	2,8
HCl 0,01 M	33,92 (amb)	2,6
HCl 0,001 M	18,50 (amb)	2,6
NaOH 0,1 M	100 (amb)	2,6
NaOH 0,01 M	100 (amb)	2,6
NaOH 0,001 M	52,25 (aqec)	2,6
	53,74 (amb)	2,6
H ₂ O ₂ 3%	28,76 (60 min)	3,5
	35,86 (90 min)	3,5
Neutra H ₂ O	12,15 (amb)	NO
	11,55 (refrig)	NO
Neutra em FM	11,78 (amb)	NO
	14,68 (refrig)	NO
Fotolítica	10,64	3,0

NO = não observado; aquec = solução armazenada em aquecimento; amb = solução armazenada em temperatura ambiente; refrig = solução armazenada em refrigerador; H₂O = solução preparada em água; FM = solução preparada em fase móvel.

7.2.1.3. Discussão

Os estudos preliminares de estabilidade envolveram condições de estresse, como degradação em meio ácido, básico, oxidação, fotólise e temperatura. O método desenvolvido e validado em CLAE demonstrou a capacidade de diferenciar os produtos de degradação do fármaco não degradado.

Em relação à degradação em meio ácido foi possível observar que a FLU foi menos sensível a este tipo de degradação, pois ao utilizar solução de HCl nas concentrações de 0,01 e 0,001 M, foi verificado que a FLU pouco se degradou e a formação de produto de degradação também foi menor. Este dado corrobora com a literatura que diz que a FLU possui certa estabilidade em meio ácido. Entretanto, quando esta solução foi associada ao aquecimento, a degradação foi maior e o produto de degradação formado também foi em maior quantidade e apresentou tempo de retenção de, aproximadamente, 3 minutos (Figura 7.1).

Em relação à degradação em meio básico, a FLU é muito mais sensível a esta condição, e em virtude da grande degradação da FLU, diluições nas soluções de NaOH foram realizadas e o perfil de degradação nestas condições foi avaliado. Quando utilizadas soluções de NaOH 0,1 e 0,01 M, a FLU apresentou-se totalmente degradada e houve formação de produto de degradação com tempo de retenção de, aproximadamente, 2,6 minutos (Figuras 7.4 e 7.5). Ao utilizar a solução de NaOH 0,001 M, associada ou não ao aquecimento, ocorreu a degradação da FLU e a formação de produto de degradação no tempo de, aproximadamente, 2,6 minutos (Figuras 7.6). O produto de degradação formado provavelmente é em decorrência da abertura do anel β -lactâmico, pois de acordo com Carey e van Pelt (2005), este anel se rompe facilmente em pH alcalino.

Na degradação oxidativa foi observado a redução no teor de FLU nas cápsulas e foi possível verificar a presença de produto de degradação com tempo de retenção de, aproximadamente, 3,5 minutos (Figuras 7.7).

No estudo da estabilidade das soluções em temperatura ambiente e em refrigerador, foi verificado que, quando as soluções de FLU-cápsulas foram preparadas em água e armazenadas nas diferentes condições, ocorreu pouca degradação da FLU e não foi verificado a formação de produto de degradação (Figura 7.8). Estes resultados também foram obtidos para as soluções de FLU preparadas em fase móvel (Figura 7.9). Diante destes resultados, pode-se observar que o solvente (água ou fase móvel) utilizado para preparo da solução de FLU e a maneira de armazenamento (diferentes temperaturas) não apresentou diferença em relação à sua degradação, mas é importante lembrar que a solução deve ser preparada diariamente para as análises.

Os resultados encontrados nos estudos de estabilidade relacionados à avaliação do efeito da temperatura na degradação da FLU corroboram com os resultados encontrados na literatura para estudo de estabilidade de solução aquosa deste fármaco mantida em temperatura ambiente e em refrigerador, pois a solução de FLU mostrou-se estável por 60 dias quando acondicionada em temperatura de -20 °C; por 24 horas em temperatura ambiente; em solução em água para injetável, demonstrou estabilidade por 7 dias em 20 a 25 °C (PULLEN et al., 2006; LANDERSDORFER et al., 2007; ZHOU et al., 2007). Leder e colaboradores (1999) verificaram que não há perda da potência de FLU quando a solução injetável permanece por 24 horas em temperatura ambiente (25 °C) ou 72 horas em refrigerador (5 °C). Liu e colaboradores (2005) verificaram que a solução aquosa de FLU é estável em temperatura ambiente por 4 horas.

Em relação ao aquecimento, também há concordância com dados da literatura, pois segundo Squella e colaboradores (1981), quando a FLU foi submetida ao aquecimento de 90 °C por 3 horas, houve hidrólise. Porém, de acordo com Gujral e colaboradores (2009) a

solução de FLU, quando estressada com luz e aquecimento (acima de 50 °C) por 5 horas não apresentou degradação significativa, uma vez que não foi observada mudança no espectro de absorção. Esta diferença de resultado pode ser devido à diferença de temperatura de aquecimento ou, ao diferente método analítico, uma vez que foi utilizado espectrofotometria. Amin (2001); Bashi e Singh (2002) e Aly e Amin (2007) complementam que os produtos de degradação da FLU resultantes da quebra hidrolítica e térmica são ácido benzilpeniciloico, ácido benzil penicilênico, ácido penicílico, peniciloaldeído, penicilamina, ácido penaldico, ácido penílico e ácido peniloico.

Jacobs (1979) e Jacobs e colaboradores (1986) também relatam a degradação da FLU em altas temperaturas, pois em trabalhos realizados por esses autores, foi verificado que a FLU não pode ser esterilizada por autoclavação, por ser suscetível à hidrólise em elevadas temperaturas, mas relatam que penicilinas semissintéticas quase nunca são afetadas por radiação γ de até 5,0 Mrad. Este fato pode ser demonstrado para FLU, que se apresentou estável à esterilização por radiação γ de 2,5 e 5,0 Mrad.

Em relação à fotodegradação, houve degradação da solução de FLU sódica, quando esta foi exposta à luz UVC por 7 dias, entretanto, não houve formação de produto de degradação (Figura 7.9). O efeito da radiação UV foi estudado para outras penicilinas, como por exemplo, amoxicilina, ampicilina e cloxacilina e demonstrou degradação de 2,9; 3,8 e 4,9%, respectivamente, após as soluções serem expostas por 5 horas à radiação (ELMOLLA, CHAUDHURI, 2010).

7.2.2. Estudos acelerados e de longa duração da estabilidade de flucloxacilina sódica

7.2.2.1. Condições do estudo

Para os estudos acelerados e de longa duração da estabilidade foi utilizada câmara climática MA 835/UR (Marconi®, Piracicaba, Brasil). O estudo acelerado da estabilidade foi conduzido a 40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR, por 6 meses e, o estudo de longa duração foi conduzido a 30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR, por 2 anos.

As amostras foram avaliadas quanto aos caracteres físicos, teor residual de FLU sódica e a possível formação de produtos de degradação. O monitoramento da degradação foi realizado por meio de métodos cromatográfico, microbiológico, por difusão em ágar e espectrofotométrico na região do UV, previamente validados.

❖ **Estudos acelerados:** quatro cápsulas íntegras e o equivalente a quatro pesos médios obtidos do *pool* das cápsulas de flucloxacilina foram armazenados na câmara. Tanto o pó quanto as cápsulas (fora da embalagem) foram acondicionados em placas de Petri. Os

tempos de exposição foram 0, 3 e 6 meses. Para o pó, em cada tempo de análise, foram retirados o equivalente a 50 mg de FLU e transferido para balão volumétrico de 500 mL, obtendo-se solução com concentração final de 100 µg/mL em água (solução-mãe). Diferentes alíquotas da solução-mãe foram utilizadas para o preparo das soluções que foram analisadas conforme descrito a seguir, pelos métodos cromatográfico, espectrofotométrico e microbiológico.

1- *Análises cromatográficas:* alíquota de 5,0 mL da solução-mãe foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração final de 50 µg/mL.

2- *Análises espectrofotométricas:* alíquota de 7,5 mL da solução-mãe foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração final de 75 µg/mL.

3- *Análises microbiológicas:* alíquotas de 0,375; 0,750 e 1,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completado o volume com solução tampão fosfato de potássio pH 6,0, obtendo-se soluções com concentrações finais de 1,5; 3,0 e 6,0 µg/mL, denominadas de A₁, A₂ e A₃, respectivamente.

❖ ***Estudos de longa duração:*** sete cápsulas íntegras e o equivalente a sete pesos médios obtidos do *pool* das cápsulas de flucloxacilina foram mantidos na câmara. Tanto o pó quanto as cápsulas (fora da embalagem) foram acondicionados em placas de Petri. Os tempos de exposição foram 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. O preparo das soluções e as análises foram realizados conforme descrito na seção 7.2.2.1, para estudos acelerados de estabilidade.

7.2.2.2. Resultados

7.2.2.2.1. Estudos acelerados de estabilidade

A avaliação das características físicas demonstrou que as cápsulas contendo FLU sódica derreteram, tiveram seu invólucro misturado ao conteúdo e aderido ao fundo da placa de Petri. O pó das cápsulas apresentou-se amarelo e aderido ao fundo da placa de Petri (Figura 7.11), sendo que inicialmente era branco.



Figura 7.11. Pó das cápsulas de FLU sódica após armazenamento em câmara climática para estudos acelerados da estabilidade (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 6 meses.

Os espectros obtidos através de espectrofotometria na região do UV para as soluções de FLU-cápsulas, na concentração de $75 \mu\text{g/mL}$ submetidas ao estudo acelerado de estabilidade estão apresentados nas Figuras 7.12 e 7.13, respectivamente.

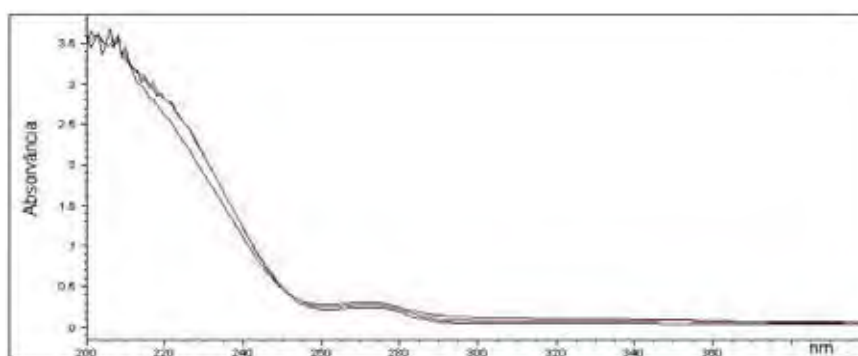


Figura 7.12. Espectro da solução de flucloxacilina sódica ($75 \mu\text{g/mL}$), em água, representando o estudo acelerado da estabilidade (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 3 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

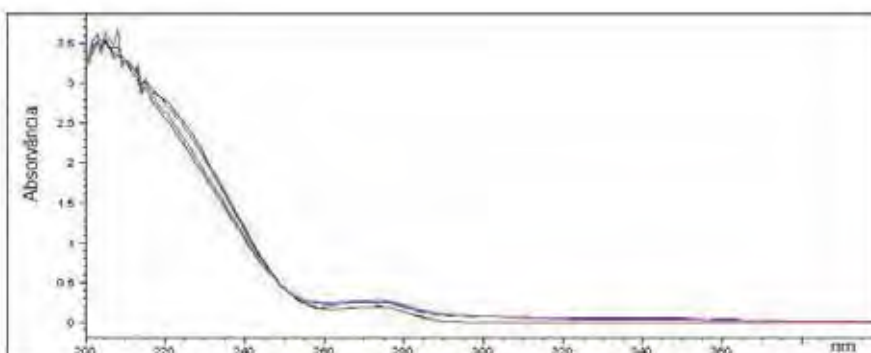


Figura 7.13. Espectro da solução de flucloxacilina sódica ($75 \mu\text{g/mL}$), em água, representando o estudo acelerado da estabilidade (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 6 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

A Tabela 7.2 apresenta os valores de teor e concentração encontrados por espectrofotometria na região de UV, para o *pool* do pó das cápsulas submetido ao estudo de degradação acelerada.

Tabela 7.2. Valores de teor e concentração obtidos após estudo acelerado de estabilidade do pó das cápsulas de flucloxacilina sódica, por espectrofotometria na região do UV.

Tempo (meses)	Teor (%)	Concentração (mg)
0	101,83	509,16
3	128,50	642,50
6	136,34	681,73

Os cromatogramas obtidos por CLAE para as soluções FLU-cápsulas, na concentração de 50 µg/mL submetidas ao estudo acelerado da estabilidade estão apresentados nas Figuras 7.14 e 7.15, respectivamente.

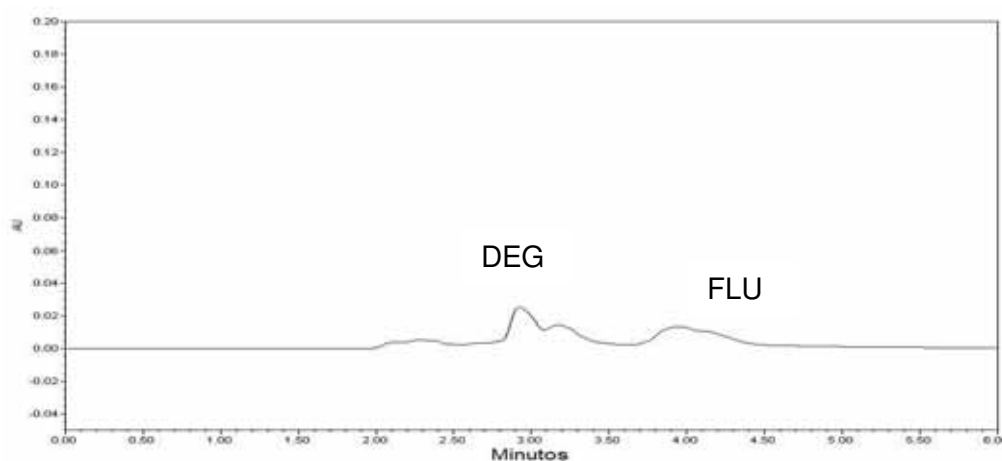


Figura 7.14. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo acelerado da estabilidade (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 3 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

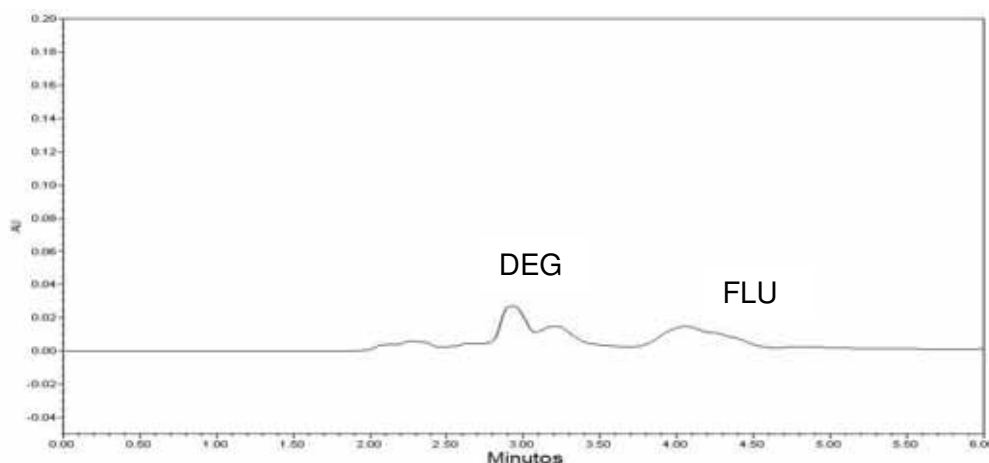


Figura 7.15. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo acelerado da estabilidade (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 6 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

Para o estudo acelerado da estabilidade, analisados por CLAE, o teor e a concentração encontrados para FLU-cápsulas no tempo zero foram 86,08% e 430,38 mg, respectivamente. O teor e a concentração das amostras submetidas ao estudo não foram calculados em virtude da grande degradação da FLU.

Para os ensaios microbiológicos a potência encontrada no tempo zero foi 82,85% e após os períodos de degradação não houve formação de halos de inibição em nenhum tempo de análise para nenhuma concentração de amostra degradada utilizada, demonstrando que a perda de atividade destas amostras foi total.

Para as cápsulas íntegras, quando acondicionadas na câmara climática, não foram realizadas análises, uma vez que o invólucro das cápsulas derreteu e misturou com seu conteúdo, portanto, para evitar interferências nos resultados estas análises não foram realizadas.

7.2.2.2.2. Estudos de longa duração da estabilidade

A avaliação das características físicas apresentou os mesmos resultados encontrados no estudo acelerado da estabilidade (as cápsulas contendo FLU sódica derreteram e tiveram seu invólucro misturado ao conteúdo e o pó das cápsulas apresentou-se amarelo e aderido ao fundo da placa de Petri, sendo que inicialmente era branco) (Figura 7.11).

Os espectros obtidos através de espectrofotometria na região do UV para soluções de FLU-cápsulas, na concentração de 75 µg/mL, submetidas ao estudo de longa duração da estabilidade estão apresentados nas Figuras 7.16 a 7.19.

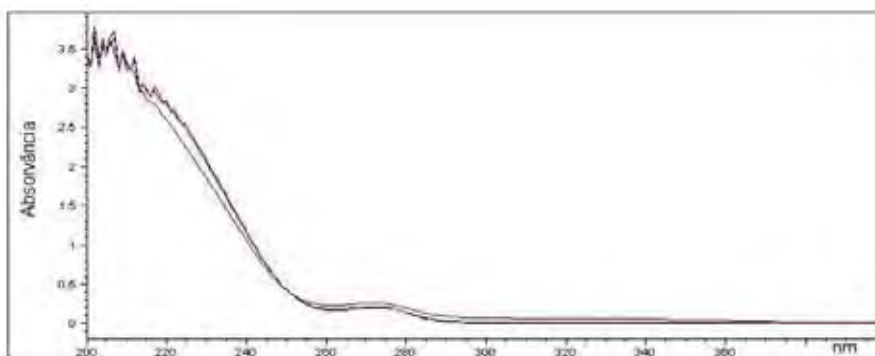


Figura 7.16. Espectro da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), em água, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 3 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

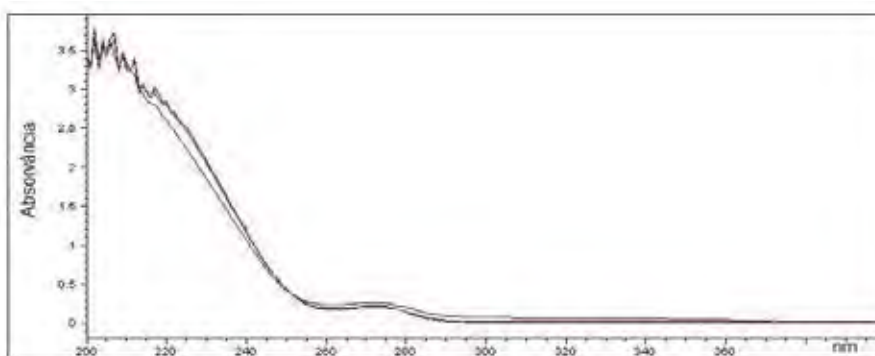


Figura 7.17. Espectro da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), em água, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 6 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

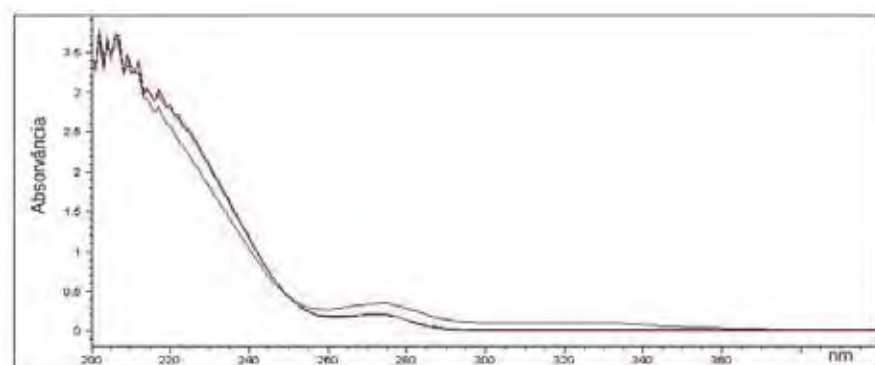


Figura 7.18. Espectro da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), em água, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 9 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

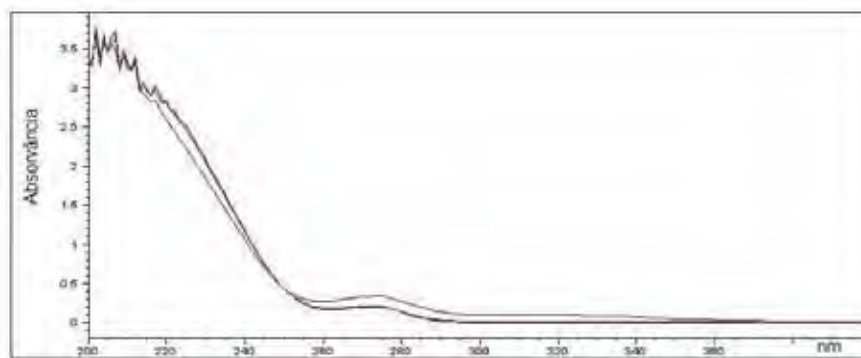


Figura 7.19. Espectro da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), em água, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 12 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

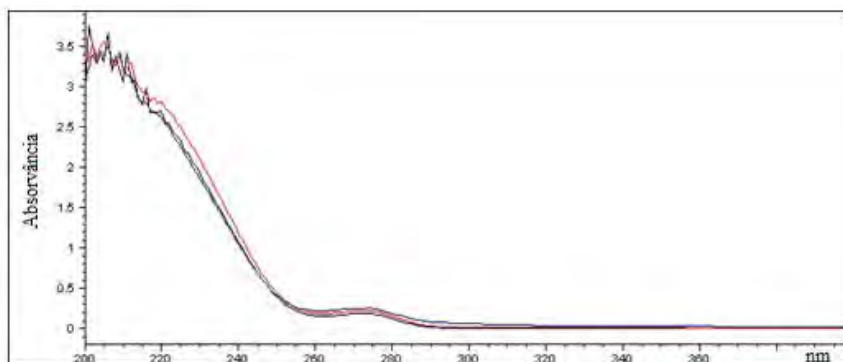


Figura 7.20. Espectro da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), em água, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 18 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

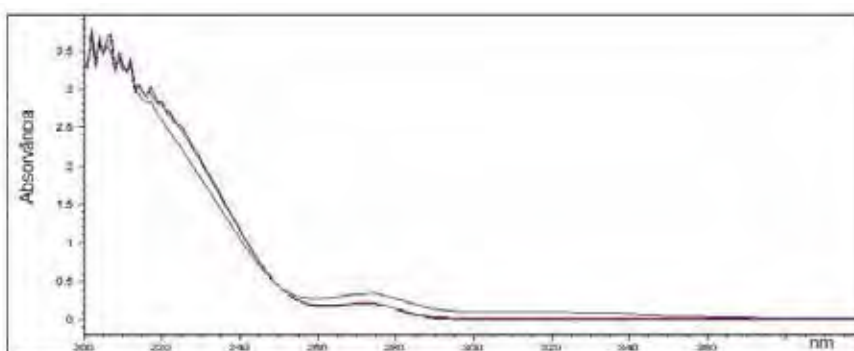


Figura 7.21. Espectro da solução de flucloxacilina sódica (75 µg/mL), em água, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 24 meses. Padrão íntegro (preto), amostra íntegra (vermelha) e amostra degradada (azul).

A Tabela 7.3 apresenta os valores de teores e concentrações encontrados, por espectrofotometria na região do UV, para o *pool* das cápsulas submetido ao estudo de longa duração da estabilidade.

TABELA 7.3. Valores de teor e concentração obtidos após estudo de longa duração da estabilidade do pó das cápsulas de FLU sódica, por espectrofotometria na região do UV

Tempo (meses)	Teor (%)	Concentração (mg)
0	105,99	529,93
3	127,75	638,75
6	125,82	629,20
9	173,20	866,02
12	174,96	874,81
18	188,65	943,27
24	195,44	977,19

Os cromatogramas obtidos por CLAE para as soluções de FLU-cápsula, na concentração de 50 µg/mL submetidas ao estudo de longa duração da estabilidade estão apresentados nas Figuras 7.22 a 7.27.

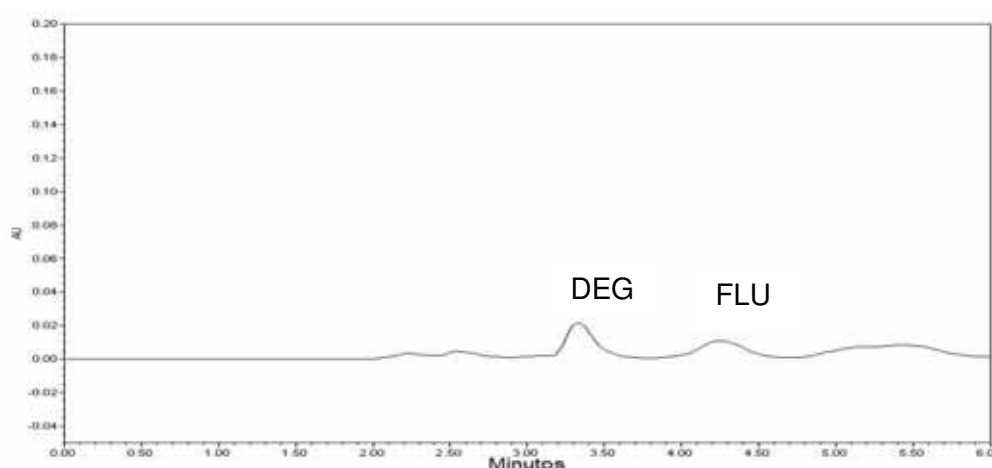


Figura 7.22. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 3 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

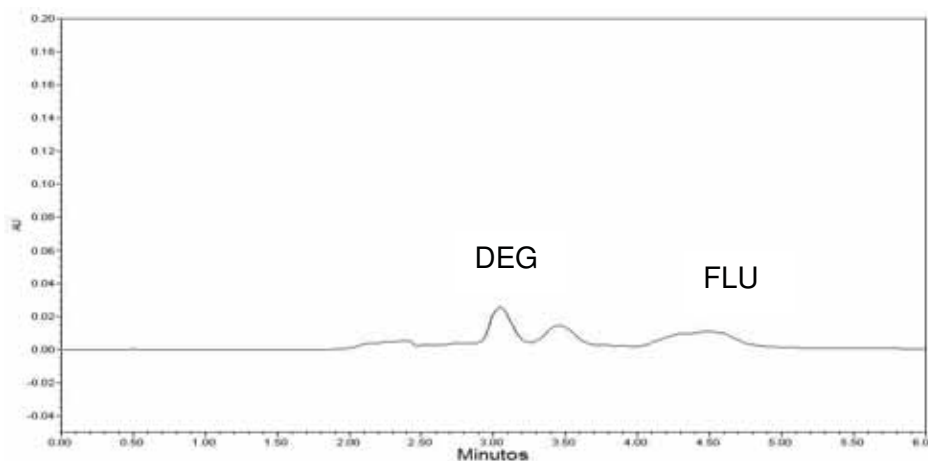


Figura 7.23. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 6 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

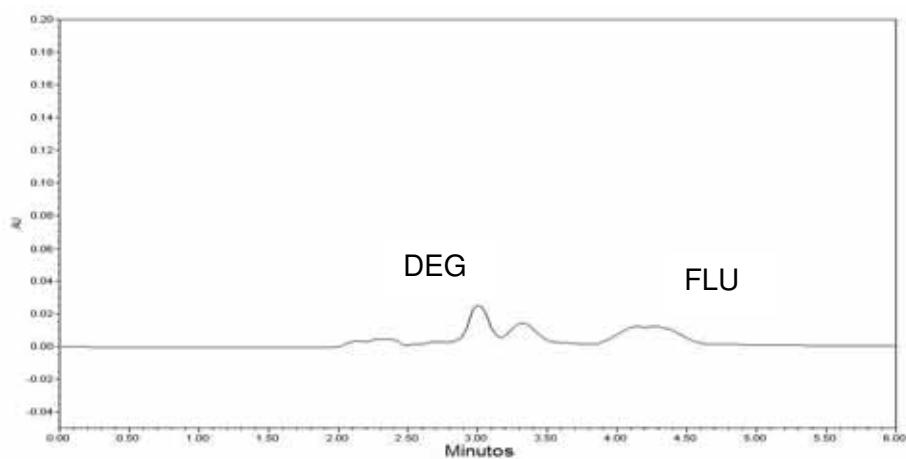


Figura 7.24. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 9 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

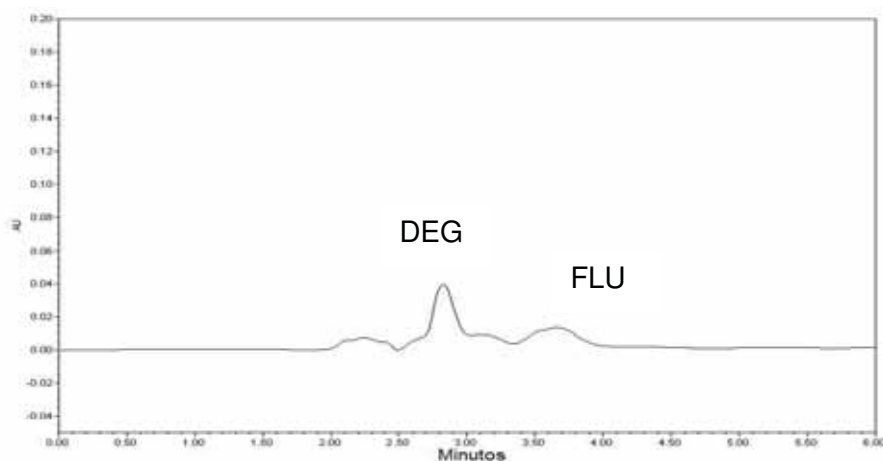


Figura 7.25. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 12 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

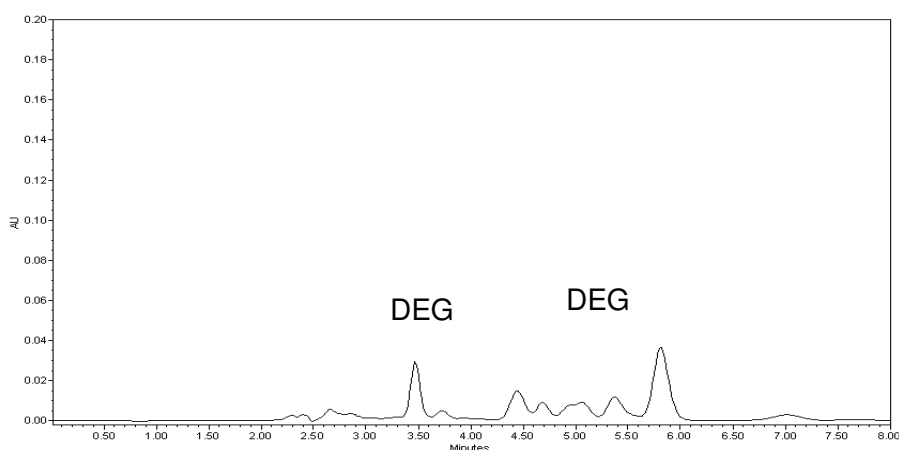


Figura 7.26. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 18 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

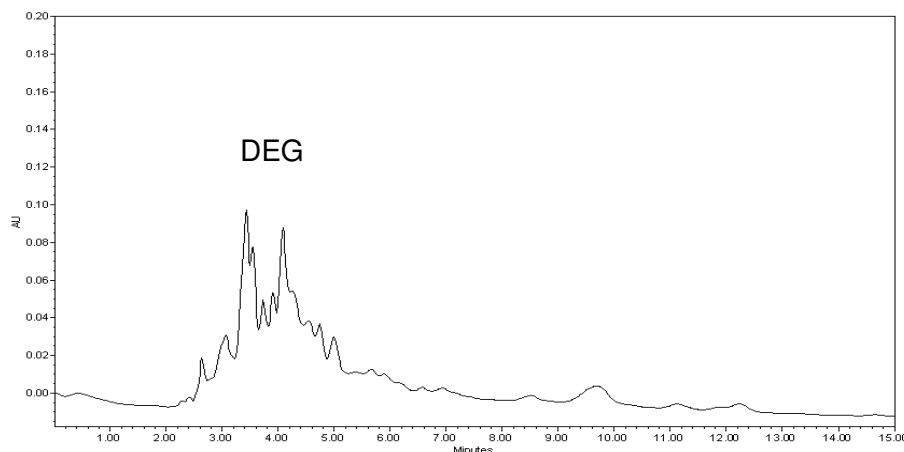


Figura 7.27. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, representando o estudo de longa duração da estabilidade (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR), por 24 meses. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção $\approx$ 4,3 minutos. DEG = produto de degradação.

Para o estudo de longa duração da estabilidade, o teor e a concentração encontrados por CLAE, para FLU-cápsulas íntegras no tempo zero foram 86,08% e 430,38 mg, respectivamente. O teor e a concentração das amostras submetidas ao estudo não foram calculados em virtude da grande degradação da FLU e o pico apresentou-se deformado, dificultando sua integração.

Para os ensaios microbiológicos, a potência no tempo zero foi 82,85%, porém não houve formação de halos de inibição em nenhum tempo de análise para nenhuma concentração das amostras degradadas utilizadas, permitindo concluir que houve a degradação das amostras com total perda da atividade.

Para as cápsulas íntegras, quando acondicionadas na câmara climática, não foram realizadas análises porque o invólucro das cápsulas derretou e misturou com seu conteúdo, portanto, para evitar interferências nos resultados estas análises não foram realizadas.

7.2.2.3. Discussão

A análise visual demonstrou alteração na cor do pó das cápsulas tanto para os estudos acelerados quanto para os estudos de longa duração da estabilidade, concordando com o *Food and Drug Administration Guidelines for stability testing of solid state pharmaceuticals* (FDA, 1987) que apresenta o teste de aparência e cor como importantes características da estabilidade de produtos farmacêuticos. Os resultados obtidos corroboram com Stark e colaboradores (1996) que verificaram o escurecimento com aparência de queimado do pó de cápsulas de FLU sódica quando armazenado a 55 °C por 84 dias. Estes

autores observaram ainda que a umidade relativa (75%) por 168 dias também afetou o desenvolvimento de cor acompanhada de grande decomposição do fármaco.

Para as análises espectrofotométricas na região do UV, houve aumento no teor encontrado em relação ao tempo zero, tanto para os estudos acelerados quanto para o estudo de longa duração da estabilidade. Este fato talvez tenha ocorrido porque o produto de degradação tenha estrutura química semelhante à estrutura da FLU íntegra e absorva radiação UV no mesmo comprimento de onda. Estes resultados indicam claramente que o método espectrofotométrico não deve ser empregado sozinho para determinação de amostras acompanhadas de degradação, uma vez que não apresenta seletividade.

Os resultados das análises cromatográficas dos estudos acelerados de estabilidade demonstraram que ocorreu a degradação da FLU quase que completamente, e foi percebido a formação de produto de degradação com tempo de, aproximadamente, 3,0 minutos.

Para os estudos de longa duração da estabilidade, foi verificado que a FLU também se degradou quase que completamente e ocorreu a formação de produto de degradação com tempo, de aproximadamente, 3,0 minutos para amostra analisada no tempo de 3 meses. Para as amostras analisadas nos demais períodos, houve outro pico com tempo de retenção de, aproximadamente, 3,5 minutos. Foi possível verificar ainda que para os estudos de longa duração da estabilidade, a formação dos produtos de degradação foi em quantidade semelhante até o período de 9 meses e, a partir do 12º mês, em maior quantidade.

Para as análises microbiológicas não foi verificado a formação de halos de inibição de crescimento em nenhuma amostra analisada, corroborando com os dados cromatográficos que demonstram a degradação da FLU. Também foi verificado que os produtos de degradação formados, visualizados pelos estudos cromatográficos, não possuem atividade antimicrobiana, portanto, o ensaio microbiológico comprova a sua importância e necessidade para este tipo de análise.

Como pode ser observado, é importante o uso de diferentes técnicas para estudos de degradação e, diante dos resultados encontrados para os estudos acelerados e de longa duração da estabilidade, pode-se concluir que os produtos formados não possuem atividade antimicrobiana e o método desenvolvido e validado em CLAE demonstrou a capacidade de diferenciar os produtos de degradação formados durante os estudos acelerados e de longa duração da estabilidade do fármaco não degradado.

Como pode ser verificado a flucloxacilina sódica mostrou-se sensível à temperatura e umidade, portanto, é importante protegê-la destes fatores, ou seja, o fabricante deste fármaco e de medicamentos que o contenham deve ter cuidados especiais relacionados a estes fatores, bem como fornecer esta informação na embalagem do produto.

7.2.3. Estudo de degradação fotoquímica

7.2.3.1. Condições de estudo

Este estudo foi desenvolvido em câmara espelhada contendo lâmpada UVC 254 nm. As amostras foram compostas pelo equivalente a três pesos médios do *pool* obtido das cápsulas de FLU e expostos à distância de 10 cm da lâmpada. As amostras preparadas conforme descrito na seção 7.2.2.1, foram analisadas por método cromatográfico previamente validado. Os períodos de análises foram 7, 28, 42 e 63 dias.

7.2.3.2. Resultados

Os cromatogramas obtidos por CLAE para as soluções de FLU-cápsulas, na concentração de 50 µg/mL submetidas ao estudo de fotodegradação estão apresentados nas Figuras 7.28 a 7.31.

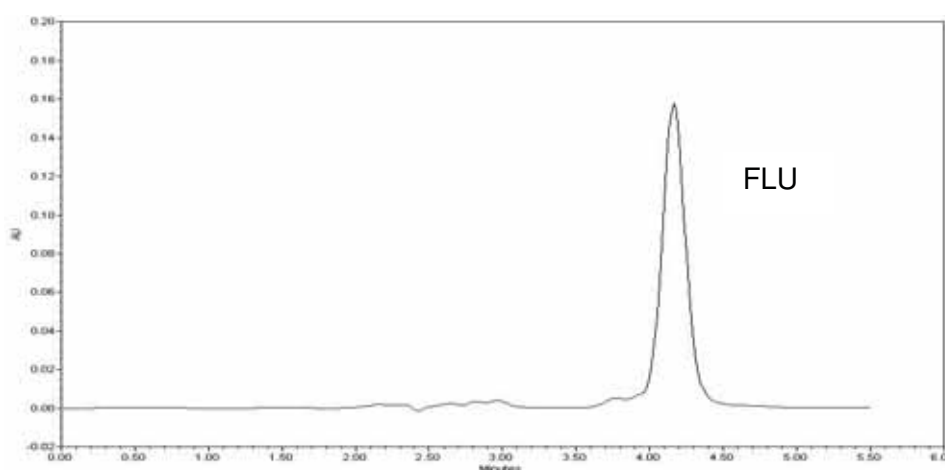


Figura 7.28. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, submetida à fotodegradação por 7 dias em câmara de luz UV. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,3 minutos.

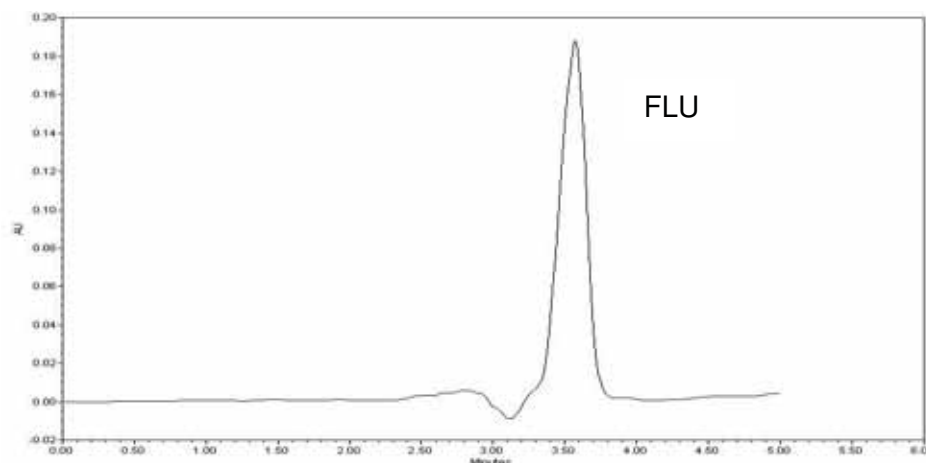


Figura 7.29. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, submetida à fotodegradação por 28 dias em câmara de luz UV. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 3,7 minutos.

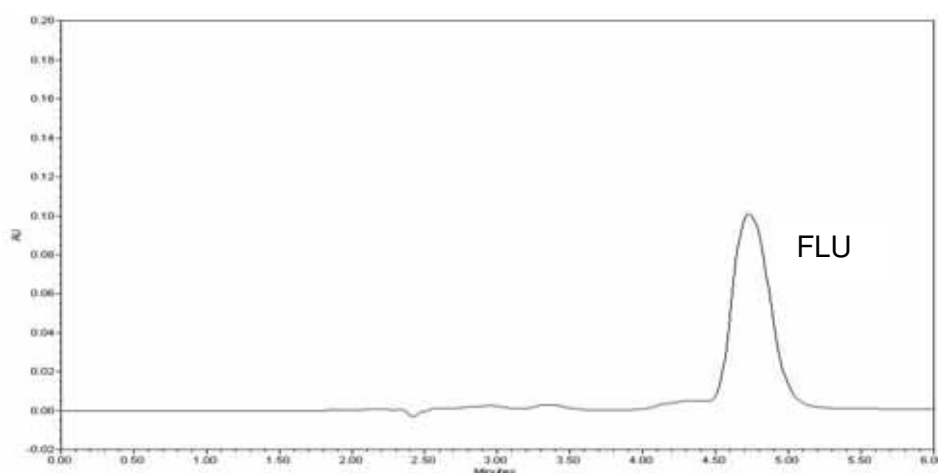


Figura 7.30. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, submetida à fotodegradação por 42 dias em câmara de luz UV. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,7 minutos.

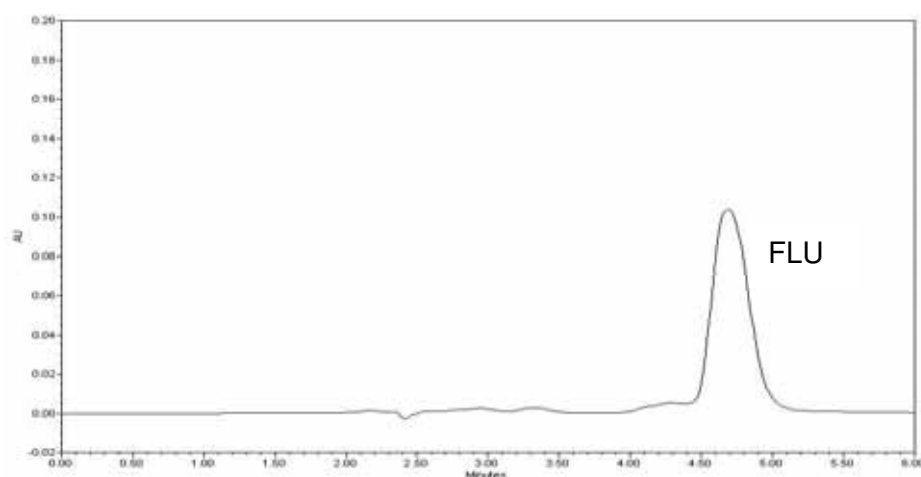


Figura 7.31. Cromatograma da solução de FLU-cápsulas (50 µg/mL), em fase móvel, submetida à fotodegradação por 63 dias em câmara de luz UV. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,025 M pH 5,5 (60:40, v/v). Fase estacionária: Zorbax C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 225 nm. Tempo de retenção ≈ 4,7 minutos.

A Tabela 7.4 apresenta os valores de teor obtidos por CLAE, após a fotodegradação do pó das cápsulas de flucloxacilina sódica.

Tabela 7.4. Valores de teor obtidos, por CLAE, após estudo de fotodegradação do pó das cápsulas de flucloxacilina sódica

Tempo (dias)	Teor (%)
0	86,08
7	85,45
28	78,79
42	76,37
63	60,70

7.2.3.3. Discussão

O estudo de fotodegradação demonstrou que a FLU é suscetível à luz UVC (254 nm) nas condições avaliadas. Foi possível verificar o decaimento do teor da FLU nas cápsulas durante o período de 63 dias, porém, não ocorreu formação de produtos de degradação durante o período de estudo, pois não foi verificado pelo método cromatográfico proposto,

nenhum outro pico além daquele característico da FLU, pelo menos quando analisada pelos parâmetros analíticos estabelecidos.

O método desenvolvido e validado por CLAE demonstrou a capacidade de quantificar a FLU residual após a exposição à luz UVC. O teor residual após 63 dias de exposição à luz UVC foi de 60,70%. O pó apresentou coloração amarelada, que aumentou com o período de exposição.

O efeito da radiação UV foi estudado para outras penicilinas, como por exemplo, amoxicilina, ampicilina e cloxacilina e demonstrou degradação de 2,9; 3,8 e 4,9%, respectivamente, após as soluções serem expostas por 5 horas à radiação (ELMOLLA, CHAUDHURI, 2010).

8. ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

8.1. Introdução

O teste de dissolução determina a porcentagem da quantidade da substância ativa declarada no rótulo, liberada no meio de dissolução, quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais preconizadas, visando verificar se o produto atende às exigências descritas em sua monografia (FB 5, 2010).

De maneira simples, a dissolução pode ser definida como o processo pelo qual uma substância sólida penetra no solvente para formar uma solução. De maneira mais completa, a dissolução pode ser descrita como um ensaio físico para avaliar a liberação para uma determinada área em uma determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição tem melhor relação com o ensaio de dissolução aplicado aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos (COSTA, LOBO, 1999 e 2001).

O processo de dissolução é controlado pela afinidade entre o composto sólido e o solvente e pela maneira como o sistema farmacêutico o libera. Entretanto, substâncias que possibilitam a modificação da solubilidade do fármaco no meio podem ser incorporadas à forma farmacêutica (COSTA, LOBO, 1999 e 2001; MANADAS et al., 2002; CORRÊA et al., 2012).

O teste de dissolução é uma ferramenta essencial para avaliar os efeitos combinados de diferentes formulações, tais como propriedades físico-químicas da substância ativa e dos excipientes e os diversos passos do processo de fabricação, estendendo-se até a absorção do produto. Além disso, o teste de dissolução é útil para verificar as unidades de um lote em relação ao comportamento típico dos requisitos para limite e extensão da dissolução, detectando desvios que podem ocorrer durante o processo de fabricação e também para verificar se o limite de dissolução é o mesmo entre os lotes de um produto, ou seja, avalia propriedades em um mesmo lote e em lotes diferentes (GAFFNER, 2006).

Na fase de desenvolvimento de um produto, os testes de dissolução são utilizados para avaliar os estudos de bioequivalência/biodisponibilidade, estudos pilotos clínicos e de segurança, verificar as propriedades de dissolução do produto referência utilizado nos estudos, controle de qualidade, estabelecer a correlação *in vitro*/ *in vivo* e para assuntos regulamentadores (MANADAS et al., 2002; GAFFNER, 2006; SOUZA et al., 2007).

A fim de se determinar a quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo, gráficos ou perfis de dissolução podem ser plotados (SOUZA et al., 2007). Os perfis de dissolução são avaliados, principalmente, pelo tempo necessário para que se libere no meio de dissolução uma determinada quantidade do teor rotulado e através da determinação da quantidade liberada após determinado período de tempo pré-estabelecido (MANADAS et al., 2002).

A comparação entre perfis de dissolução é realizada comparando toda a curva e pode ser utilizado o Método Modelo Independente Simples para comparar a performance de dois

medicamentos antes de submetê-los aos estudos de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência, para isentar estes estudos para menores doses e para alterações no pós-registro do medicamento (BRASIL, 2010).

Quando o estudo do perfil de dissolução está sendo conduzido, é preconizado que o coeficiente de variação percentual (CV%) não exceda 20% nos pontos que representam 40% do número total de pontos analisados, ou seja, se um perfil possui cinco pontos, nas duas primeiras coletas o CV% pode ser de até 20%. Nas demais coletas o CV% permitido é de 10% (USP, 2008, BRASIL, 2010).

Durante o desenvolvimento de um ensaio de dissolução é importante selecionar condições em que se obtenha máximo poder discriminatório e capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade requeridos, como, por exemplo, mudanças na composição do produto ou no processo de fabricação que podem afetar a performance *in vivo* (MANADAS et al., 2002; USP, 2008) e também detectar mudanças que podem ocorrer durante os estudos de estabilidade (CORRÊA et al., 2012). Além disso, ensaios de dissolução discriminatórios são particularmente importantes para fármacos com pobre solubilidade em água ou que apresentem características de polimorfismo (BONFILIO et al., 2012b).

Diversos fatores podem alterar os resultados dos ensaios de dissolução, entre eles, aparato utilizado, vibração do equipamento, alinhamento e velocidade da agitação, geometria da cuba de dissolução, adsorção, gás dissolvido, centralização dos cestos, local e métodos de amostragem, uso de dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam, volume do meio utilizado, pH, evaporação, presença de tensoativos, temperatura e viscosidade do meio, método de filtração e o método analítico (MARCOLONGO, 2003; SOUZA, et al., 2007); características inerentes ao fármaco (propriedades físico-químicas, tamanho das partículas, higroscopicidade, solubilidade), forma farmacêutica, excipientes e técnicas de fabricação (MARCOLONGO, 2003; STORPIRTIS et al., 2004).

Diferentes meios (baseado na solubilidade do fármaco e local onde será absorvido), critérios de aceitação (valor de cedência do fármaco de acordo com a ação terapêutica), velocidade e aparato de agitação devem ser testados, conforme descrito nos capítulos gerais das Farmacopeias Americana (USP, 2008) e Brasileira (FB 5, 2010) para desenvolvimento e validação de ensaio de dissolução.

Existem diversos aparatos utilizados, entretanto, para formas farmacêuticas sólidas, os mais comuns são cestos (aparato 1, utilizado principalmente para cápsulas) e pás (aparato 2, utilizado principalmente para comprimidos) (USP, 2008; FB 5, 2010).

As Farmacopeias Americana (USP, 2008) e Brasileira (FB 5, 2010) preconizam que as amostras não flutuem no meio de dissolução e, para impedir que este fato ocorra pode ser utilizado um dispositivo de aço espiralado, de tamanho adequado para armazenar o

comprimido ou a cápsula sem deformá-los ou reduzir a superfície de contato com o meio de dissolução, denominado *sinker*.

A condição *sink* é desejável, porém, não mandatória (FDA, 1997). A condição *sink* é definida como a concentração dentro da cuba equivalente à 3 ou 10%, de acordo com a farmacopéia americana (USP, 2008) e Marcolongo (MARCOLONGO, 2003), respectivamente, da concentração para se ter uma solução saturada da substância em análise. Esta condição é importante por que é mais provável que os resultados obtidos na dissolução refletirão as propriedades das formas farmacêuticas (USP, 2008).

O ensaio de dissolução deve ser validado quanto à sua especificidade e linearidade entre as concentrações utilizadas. A exatidão e a precisão devem ser determinadas nos limites inferior e posterior das concentrações esperadas. A estabilidade da substância ativa dissolvida no meio, também deve ser avaliada (MANADAS et al., 2002). Além disso, é necessário empregar um método de quantificação que seja sensível, seletivo, exato e preciso durante as análises do ensaio de dissolução (CORRÊA et al., 2012).

Para análise dos estudos de dissolução podem ser utilizados os métodos por espectrofotometria na região do UV e CLAE, sendo que, o primeiro é mais simples, rápido e menor quantidade de solvente é utilizada e, o segundo método, tem maior utilidade quando há interferência do excipiente, necessidade de maior sensibilidade e quando há mais de um fármaco na formulação (USP, 2008).

O sistema de classificação biofarmacêutica (*Biopharmaceutics Classification System* – BCS) e a correlação *in vivo/ in vitro* (IVIC), estabelecidos pelo FDA (FDA, 2000a, 2000b), trouxeram outra conotação aos ensaios de dissolução, pois deixaram de ser utilizados apenas como um teste de controle de qualidade, para fornecer informações relacionadas à performance *in vivo* dos medicamentos (REDDY, KURUNAKAR, 2011). A BCS (FDA, 2000a) divide os fármacos em quatro classes, considerando a solubilidade aquosa e a permeabilidade intestinal:

- ❖ *Classe 1*: fármaco com alta solubilidade e alta permeabilidade intestinal.
- ❖ *Classe 2*: fármaco com baixa solubilidade e alta permeabilidade intestinal.
- ❖ *Classe 3*: fármaco com alta solubilidade e baixa permeabilidade intestinal.
- ❖ *Classe 4*: fármaco com baixa solubilidade e baixa permeabilidade intestinal.

Como já foi descrito na seção 4.1.1, a FLU é livremente solúvel em água e metanol, solúvel em etanol (96%) (SUTHERLAND et al., 1970; MATINDALE, 2009; BP, 2010a; EP, 2011), porém não foram encontrados dados quanto à BCS. Além disso, a FLU sódica não possui ensaio de dissolução descrito nas Farmacopeias Portuguesa (FP, 2005), Britânica

(BP, 2010) e Europeia (EP, 2011) e também não foi encontrada literatura que descreva este ensaio.

Este trabalho teve por objetivo desenvolver e validar ensaio de dissolução para FLU sódica em cápsulas e também desenvolver e validar método de quantificação para as análises de dissolução.

8.2. Desenvolvimento analítico – método para quantificação

A especificidade do método em análise foi verificada através das cápsulas de FLU sódica, o placebo e cápsulas vazias. Os cálculos de interferência foram realizados de acordo com a Farmacopeia Americana (USP, 2008) no capítulo *The dissolution procedure: development and validation*, o qual especifica que a interferência não deve exceder 2%. Os resultados obtidos a partir da Equação 23 estão apresentados na Tabela 8.1 e comprovam que não há interferência da cápsula ou do placebo.

$$I = 100C(A_p / A_s)(V / L) \quad \text{Equação 23}$$

Em que: I = interferência

C = concentração da solução padrão (mg/mL)

A_p = absorvância da solução placebo

A_s = absorvância da solução padrão

V = volume do meio (mL)

L = teor rotulado, em mg

Tabela 8.1. Teste de dissolução das cápsulas de flucloxacilina sódica e o valor de interferência da cápsula, utilizando o método por espectrofotometria na região do UV

Cubas	Absorvâncias	Dissolução (%)	Interferência média (%)
1	0,6276	110,88	
2	0,6445	113,87	
3	0,6334	111,91	
4	0,6427	113,55	
5	0,6509	115,00	
6	0,6456	114,07	
7	0,6298	111,27	
8	0,6145	108,67	
Média	0,6361	112,39	
Cápsula vazia 1	0,0054		0,37
Cápsula vazia 2	0,0064		

A especificidade em relação ao placebo foi demonstrada com a Figura 8.1, na qual foram avaliadas solução padrão de FLU sódica, solução placebo e solução de cápsulas de FLU sódica e como pode ser observado, não há interferência do placebo, uma vez que não há absorção no comprimento de onda utilizado para as análises.

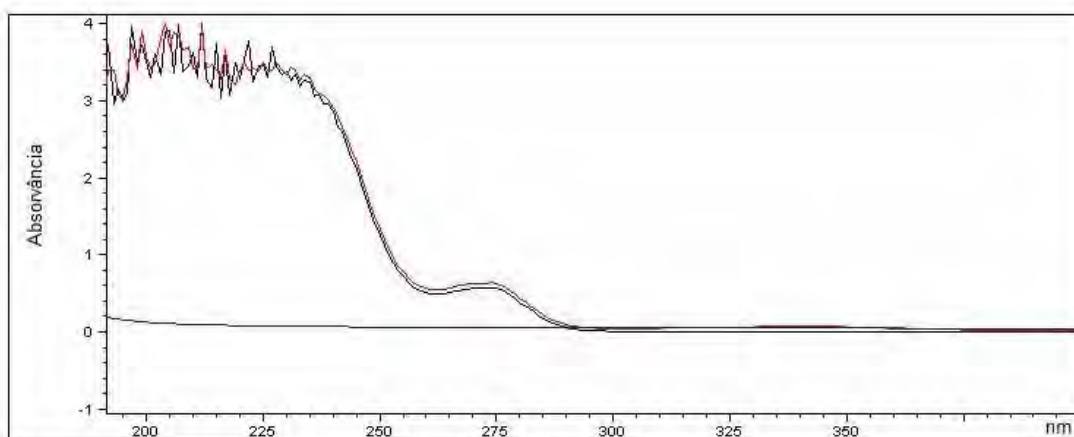


Figura 8.1. Especificidade do ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica. FLU-SQR (preto), FLU-cápsulas (vermelho) e solução placebo (azul).

8.3. Desenvolvimento analítico – método para performance

8.3.1. Material

Foram utilizados FLU-SQR descrita na seção 4.1.2 e FLU-cápsulas, com teor rotulado de 500 mg de flucloxacilina sódica, com nome comercial de Floxapen[®], identificado pelo lote L2248110, produzido pelo laboratório Actavis Group[®] e adquirido no comércio do Reino Unido.

Foram utilizados solventes de grau analítico: ácido clorídrico (Synth[®], Diadema, Brasil) e água ultrapura, obtida por sistema Milli-Q[®] (Malsheim, França). Foram utilizados os reagentes de grau analítico: hidróxido de sódio (Synth[®], Diadema, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (Vetec[®], Rocha, Brasil). Foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius[®], Gettinge, Alemanha) para filtrar as soluções tampão fosfato de potássio e ácido clorídrico. Foi utilizado filtro Agilent[®] (EUA) e tamanho de poro de 0,35 µm para filtrar as amostras quando coletadas pelo equipamento.

Os testes de dissolução foram realizados em equipamento Varian[®] (EUA), modelo VK 7025 equipado com amostrador automático Agilent[®] (EUA), modelo 8000 e bomba peristáltica Agilent[®] (EUA), modelo 810, contendo oito cubas de dissolução. A quantificação da FLU sódica nas amostras foi realizada utilizando o método espectrofotométrico na região do UV previamente validado conforme descrito na seção 8.4.

8.3.2. Ensaios preliminares

Diferentes condições foram testadas com objetivo de encontrar aquelas favoráveis à dissolução do fármaco na forma farmacêutica cápsulas e estão apresentadas na Tabela 8.2

Tabela 8.2. Condições testadas durante o desenvolvimento do ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica

Variável	Condições testadas
Meios de dissolução	água
	solução tampão fosfato de potássio pH 6,8
	solução de HCl 0,01 M
Agitação	50, 75 e 100 rpm
Aparato	cestos
	pás
	pás com <i>sinker</i>

A dissolução de flucloxacilina sódica cápsulas foi avaliada em meio aquoso, ácido (HCl 0,01 M) e em solução tampão fosfato de potássio pH 6,8, pois de acordo com as Farmacopeias Brasileira (FB 5, 2010) e Americana (USP, 2008) e com o guia *Food and Drug Administration* (FDA, 1997) estes são os meios frequentemente testados. Todos os meios estavam em temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Foram avaliados os aparatos 1 (cesto) e 2 (pás) e a pá foi testada com e sem o uso de *sinker*. O volume dos meios foi 900 mL, sendo assim, a concentração do fármaco nas cubas é próxima a 550 µg/mL, para as cápsulas contendo 500 mg de FLU sódica. Esta condição obedece à condição sink, desejável para que não ocorra a saturação do meio, como acontece de maneira fisiológica.

Embora não tenha sido encontrado na literatura dados da FLU sódica para condição *sink*, foi verificado experimentalmente, que em uma solução de FLU-SQR na concentração de 2 mg/mL, não ocorre saturação da solução. Portanto, a concentração de 550 µg/mL encontrada na cuba de dissolução, representa menos que 3% da concentração testada sem que ocorra saturação da solução.

Inicialmente, os tempos de coletas das amostras foram 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 65 minutos. As amostras foram filtradas (através do filtro acoplado ao equipamento), diluídas para concentração de 220 µg/mL com o meio em teste e foram analisadas em espectrofotômetro UV Mini 1240 (Shimadzu®, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 274 nm. Não foi realizada a reposição do meio de dissolução, porém, a massa retirada em cada coleta e as diluições realizadas foram levadas em consideração nos cálculos dos perfis de dissolução. Durante os últimos 5 minutos de dissolução, a velocidade de rotação foi alterada para 150 rpm nos primeiros ensaios. Esta alteração foi realizada a fim de verificar se todo o fármaco contido nas cápsulas foi realmente liberado durante os 60 minutos de análise.

Os meios de dissolução foram utilizados como branco para leitura das amostras em espectrofotômetro.

Os perfis de dissolução utilizando as diferentes condições foram ensaiados empregando três cubas. Os resultados para cada ensaio podem ser vistos nas Figuras 8.2 a 8.11.

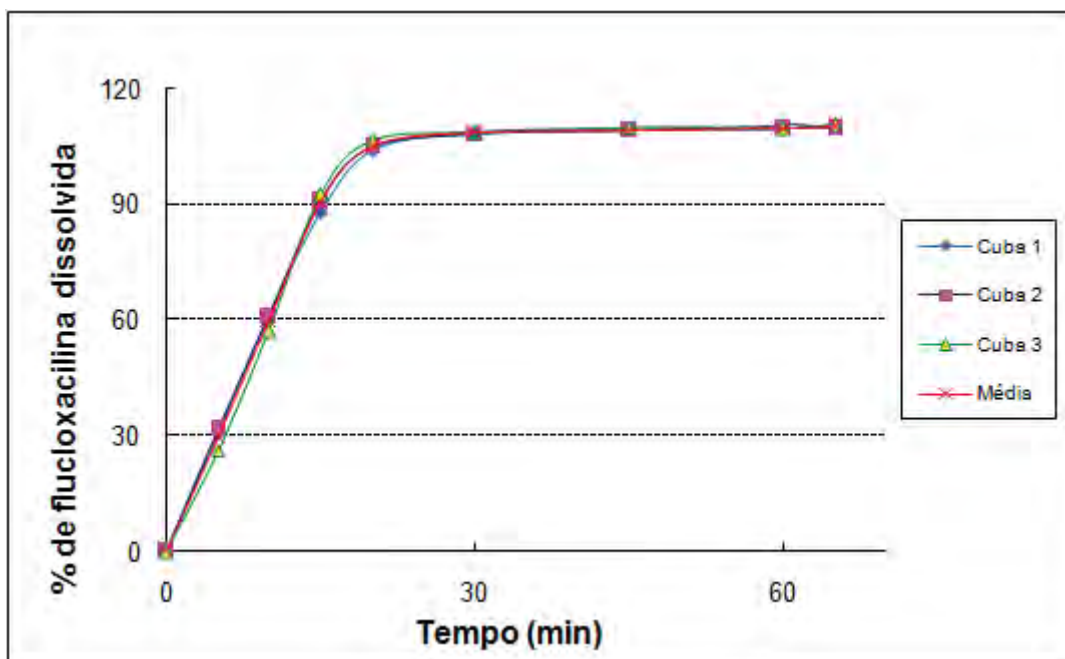


Figura 8.2. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

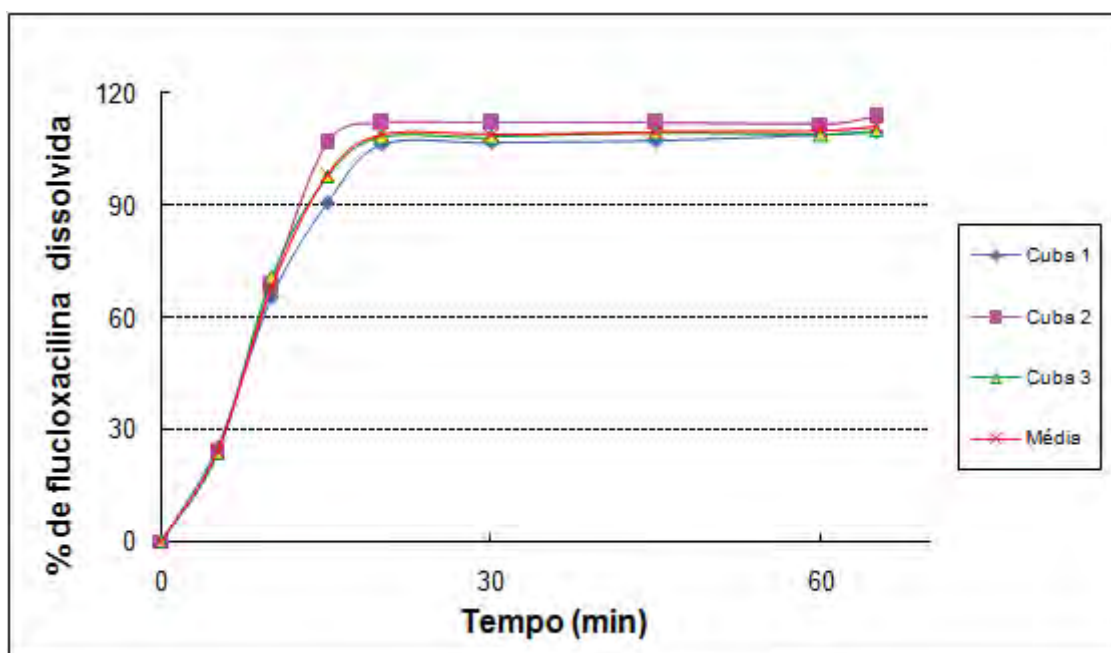


Figura 8.3. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

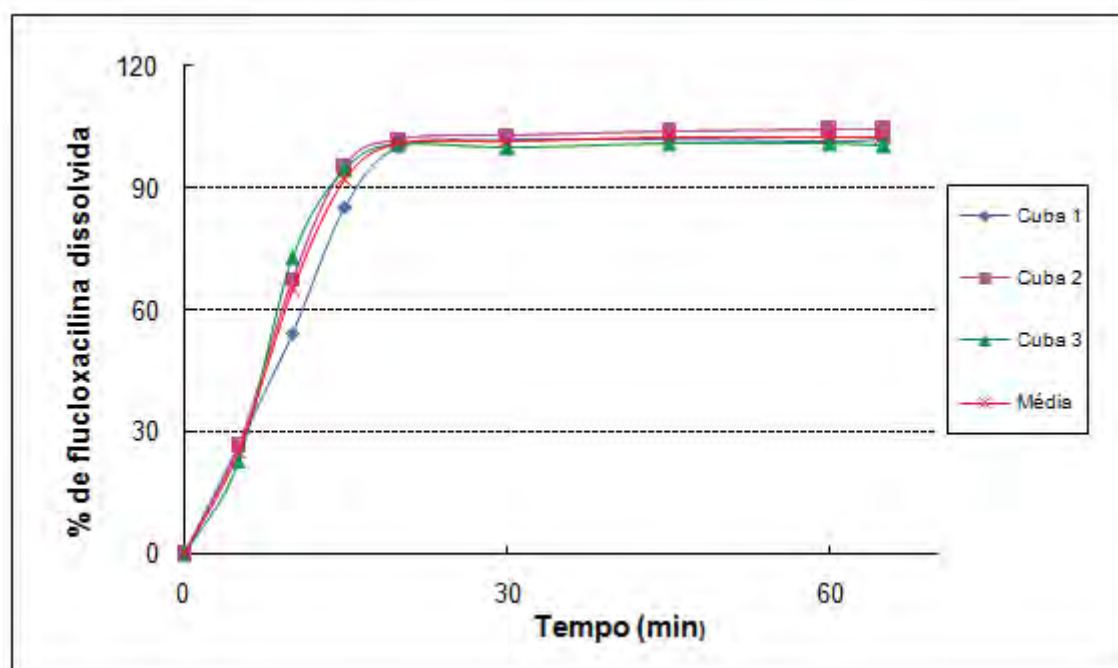


Figura 8.4. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 100 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

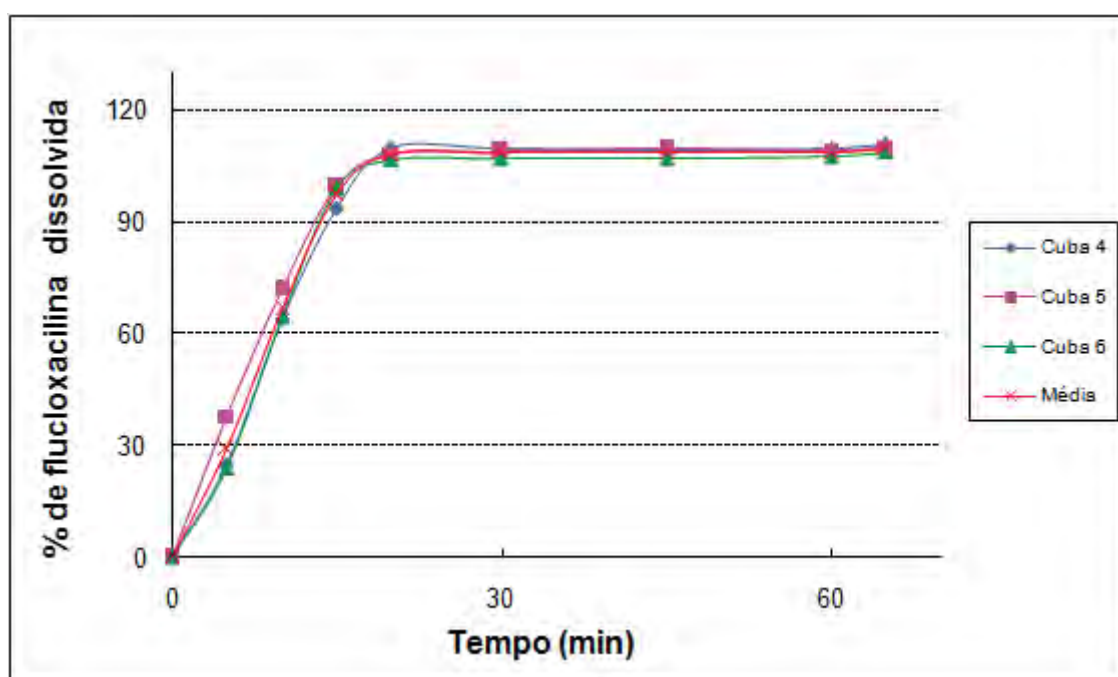


Figura 8.5. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

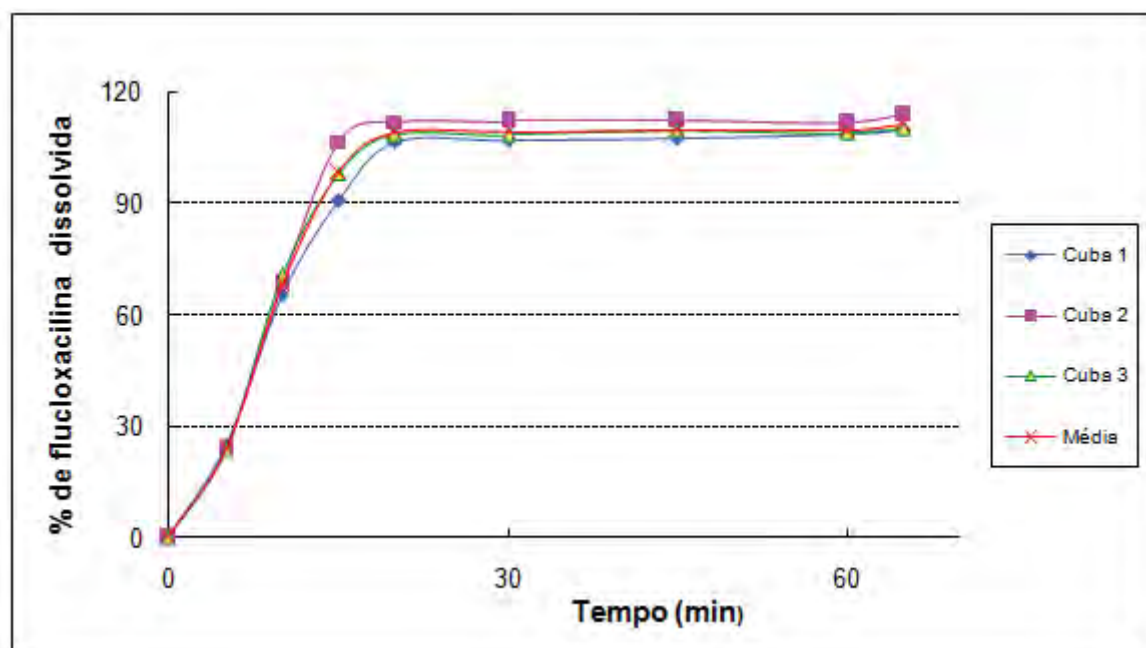


Figura 8.6. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

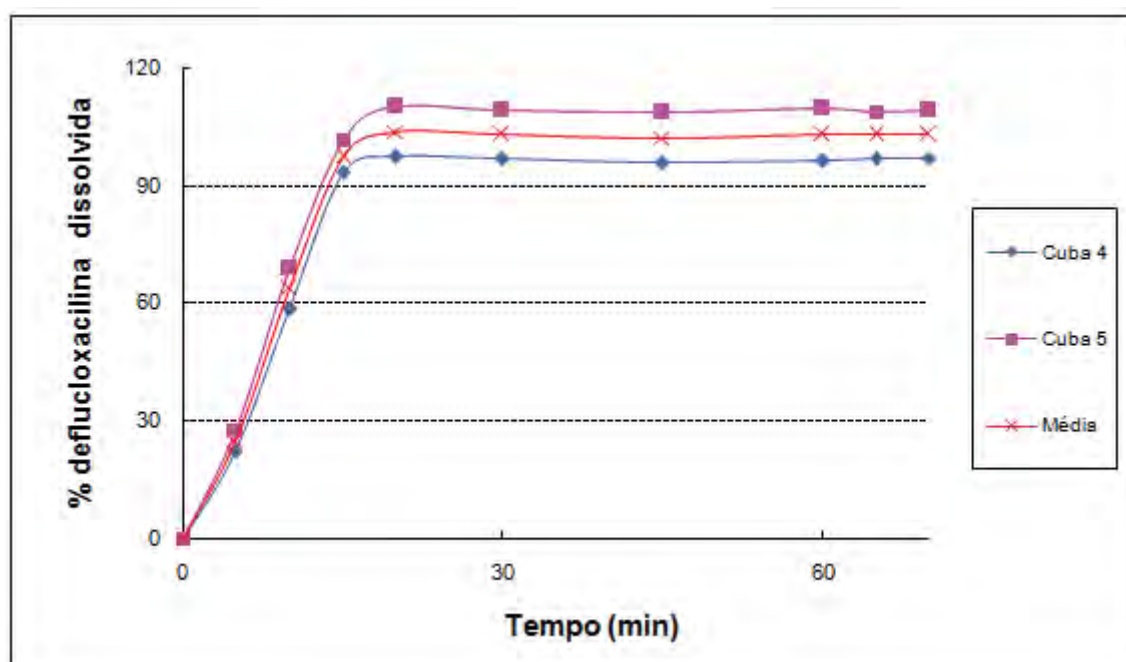


Figura 8.7. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 100 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

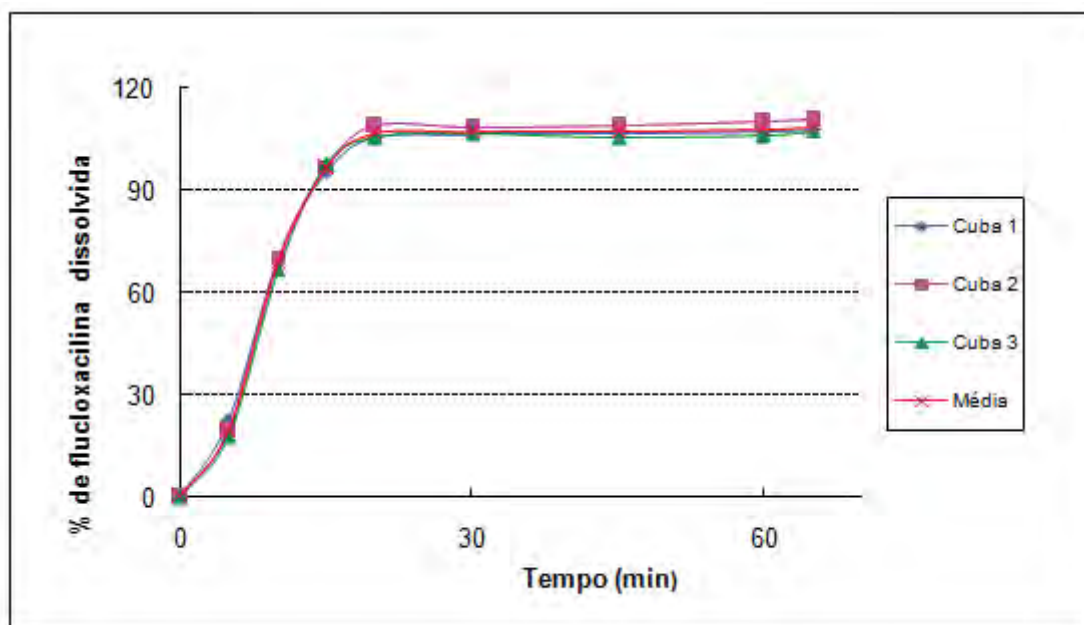


Figura 8.8. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

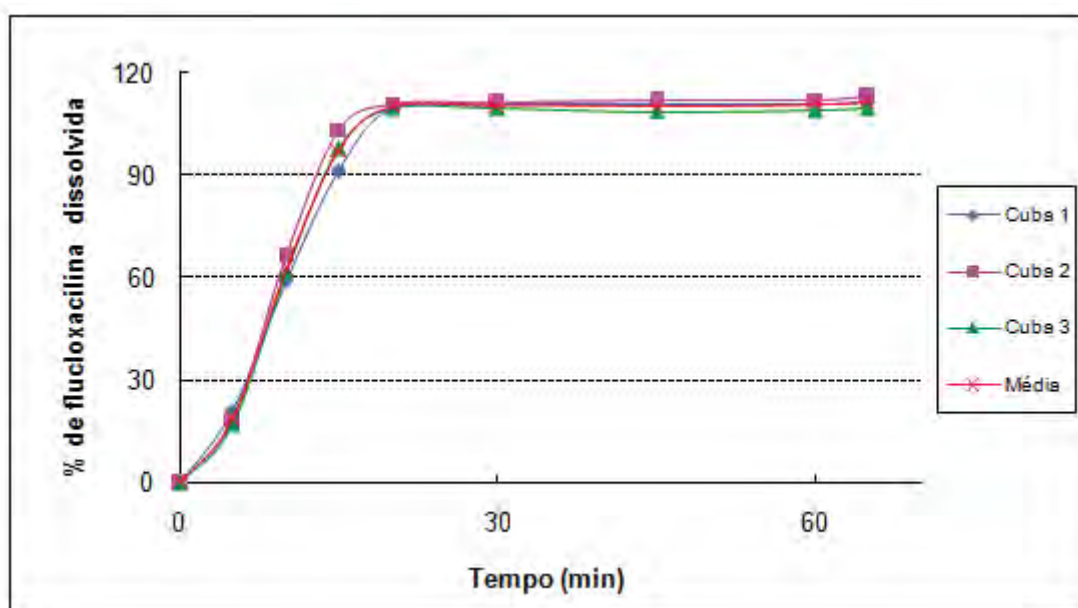


Figura 8.9. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

As Figuras 8.10 e 8.11 apresentam os resultados obtidos com duas cubas e a média, por que os resultados obtidos com a terceira cuba foram descartados devido a problemas advindos do equipamento.

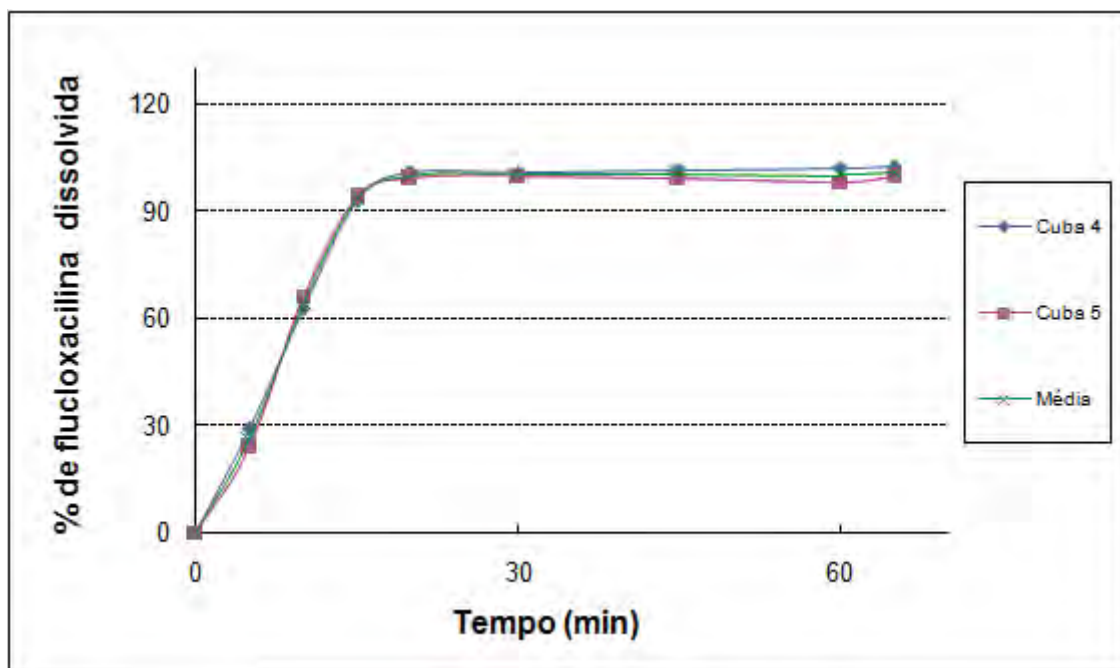


Figura 8.10. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 50 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

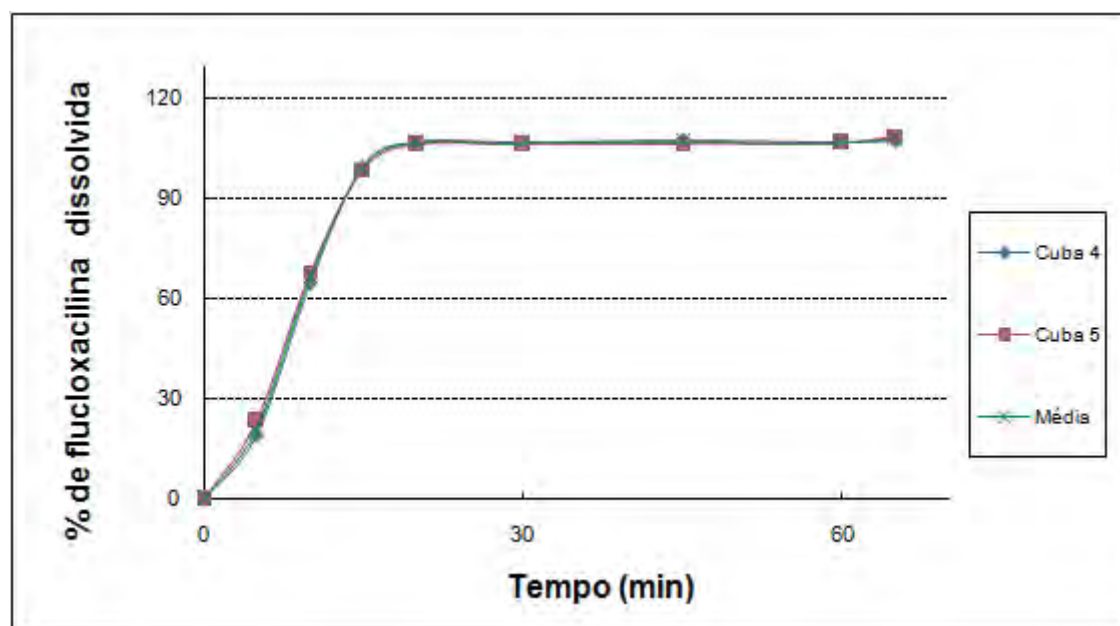


Figura 8.11. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pás a 75 rpm por 60 minutos e a 150 rpm nos últimos 5 minutos, e solução tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença na dissolução das cápsulas de FLU sódica após 30 minutos de dissolução, uma vez que todo o fármaco

contido nas cápsulas foi dissolvido. Portanto, os tempos de coleta foram reajustados para 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos e não mais foi modificada a velocidade de rotação.

O aparato 2 (pás) foi testado com o *sinker* para os tempos de coleta de 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos e os resultados dos perfis obtidos utilizando água e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 empregando 3 cubas para cada ensaio, estão apresentados nas Figuras 8.12 e 8.13.

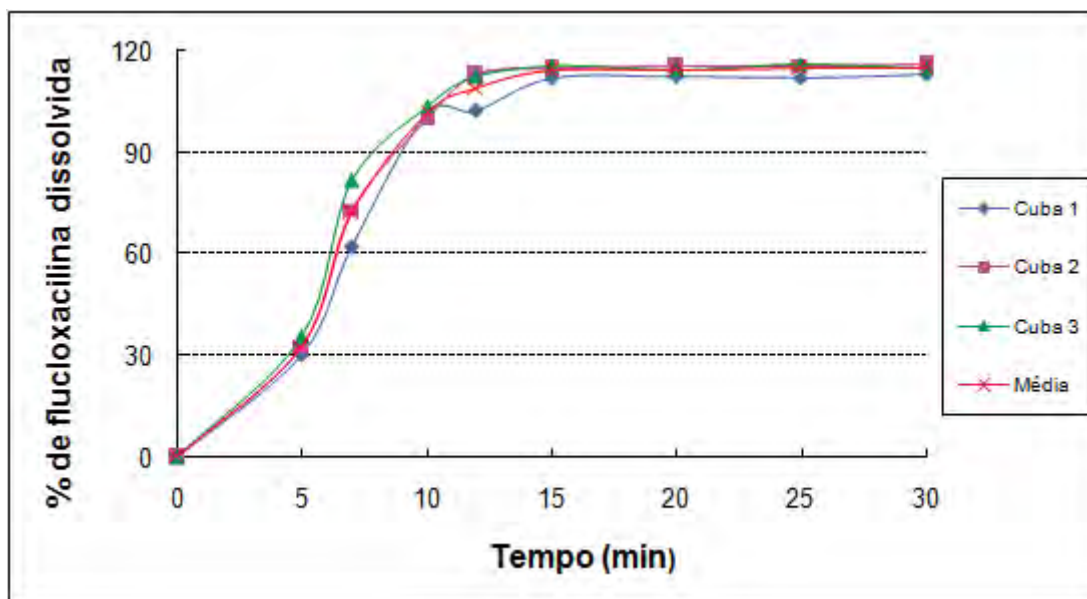


Figura 8.12. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pá com *sinker* a 50 rpm por 30 minutos, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

A Figura 8.13 apresenta os resultados obtidos com duas cubas e a média, por que os resultados obtidos com a terceira cuba foram descartados devido a problemas advindos do equipamento.

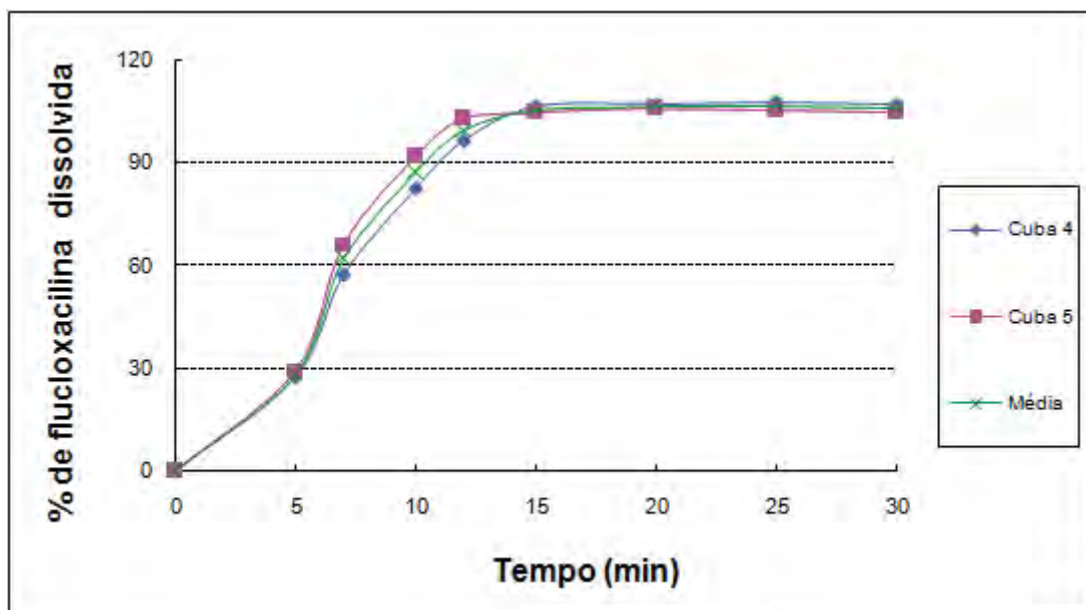


Figura 8.13. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando pá com *sinker* a 50 rpm por 30 minutos, e solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

Não foram verificadas diferenças significativas nos resultados de cedência ao utilizar pá com *sinker* e cesto tanto com a água quanto com a solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meios de dissolução. Em virtude disso, como cesto é o aparato mais recomendado para ensaios de cápsulas, este foi o aparato escolhido para dar continuidade os testes.

Em seguida, também foi testado como meio de dissolução solução de HCl 0,01 M. O perfil de dissolução obtido empregando três cubas, cesto, 50 rpm e tempos de coleta de 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos é apresentado na Figura 8.14.

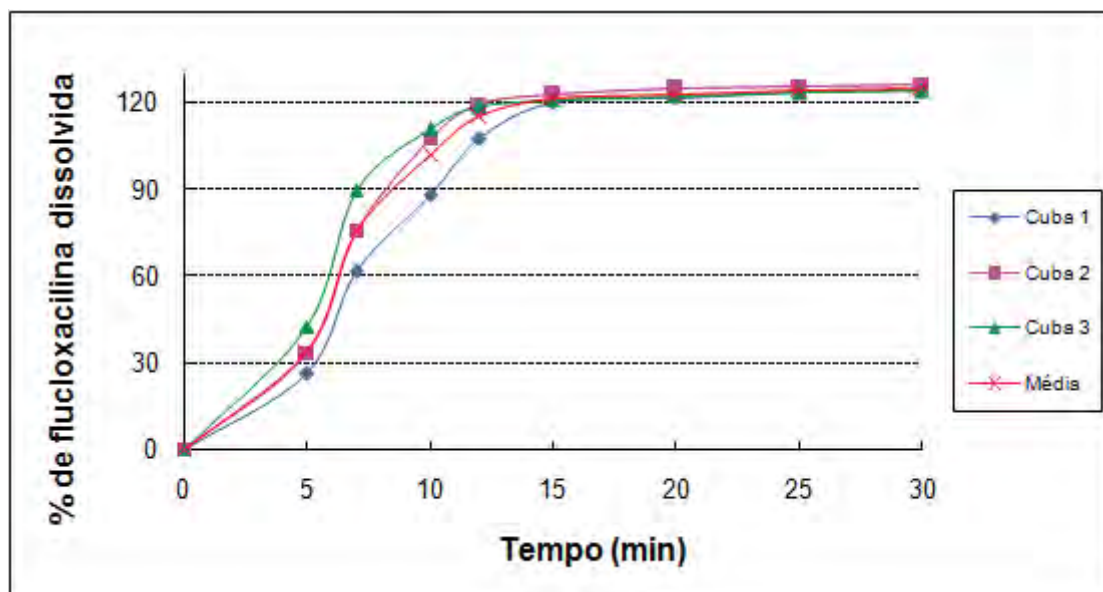


Figura 8.14. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cesto a 50 rpm por 30 minutos, e solução de HCl 0,01 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

Em relação à solução de HCl empregada como meio de dissolução, a Farmacopeia Americana (USP, 2008) e o guia do FDA para ensaios de dissolução (FDA, 2008) preconizam que o seu uso reproduz mais fielmente as condições encontradas *in vivo*, no estômago. Porém, a FLU apresenta degradação neste meio como pode ser visto nos estudos de estabilidade, seção 7.2.1.2.1 e também, a solução de FLU em HCl 0,01 M apresentou-se turva após pouco tempo, inviabilizando o uso do HCl como meio de dissolução.

Como pode ser observado, ao utilizar água como meio de dissolução houve cedência um pouco menor no início do teste em relação à solução tampão fosfato de potássio pH 6,8. Este fato torna o uso da água um meio mais discriminatório contribuindo para a sua escolha como meio de dissolução. Outras vantagens do uso da água são o baixo custo, facilidade de obtenção e o descarte é ecologicamente aceitável (USP, 2008), mas é importante lembrar a necessidade de realizar o correto tratamento do fármaco presente no meio de dissolução, antes de descartá-lo.

O uso da água como meio de dissolução tem sido discutido, pois ao mesmo tempo que o FDA (FDA, 1997) e a Farmacopeia Americana (USP, 2008) descrevem que a tensão superficial e o pH podem variar dependendo da fonte da água, podem variar durante o ensaio devido à influência das substâncias presentes na formulação e podem variar entre os dias de análise e por isso, este não seria o meio mais adequado. Estes mesmos órgãos preconizam o uso da água como meio de dissolução para diversos medicamentos, como por exemplo, acetaminofeno, associação de aspirina, cafeína e citrato de orfenadrina, acetato

de cálcio, fluconazol, carbamazepina, cefadroxil (FDA, 2012) e fumarato de bisoprolol, maleato de desclorfeniramina, hiclato de doxiciclina (USP, 2008) entre muitos outros.

A escolha da água como meio de dissolução para FLU sódica cápsulas corrobora com a literatura, uma vez que a Farmacopeia Americana (USP, 2008) apresenta água como meio de dissolução para isoxazolilpenicilinas (oxacilina e dicloxacilina) e outras penicilinas (amoxicilina cápsulas e ampicilina cápsulas). A Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010) também preconiza água como meio de dissolução para algumas penicilinas (ampicilina em cápsulas e comprimidos e amoxicilina em cápsulas). Tokumura e Machida (2001), ao avaliarem sistemas de liberação para amoxicilina verificaram nos estudos de dissolução, que esta penicilina também foi instável quando o meio de dissolução empregado possuía pH 1,2. Fato este, que não se repetiu quando o meio de dissolução foi a água. Salem e Alkaysi (1987) utilizaram água como meio de dissolução para ampicilina e cloxacilina em cápsulas.

Foi verificado que mesmo quando empregada a menor velocidade de rotação, houve dissolução completa das cápsulas de FLU em menos de 30 minutos. A fim de que o método seja mais discriminatório, a velocidade de 50 rpm foi a escolhida.

As condições que resultaram em método mais discriminativo foram escolhidas e estão apresentadas na Tabela 8.3. Este método foi validado por espectrofotometria na região de UV.

Tabela 8.3. Condições estabelecidas para o ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica

Variável	Condições estabelecidas
Meio de dissolução	água
Agitação	50 rpm
Aparato	cestos
Tempo de análise	30 minutos

A Figura 8.15 apresenta o perfil de dissolução para as oito cubas, empregando as condições estabelecidas na Tabela 8.3.

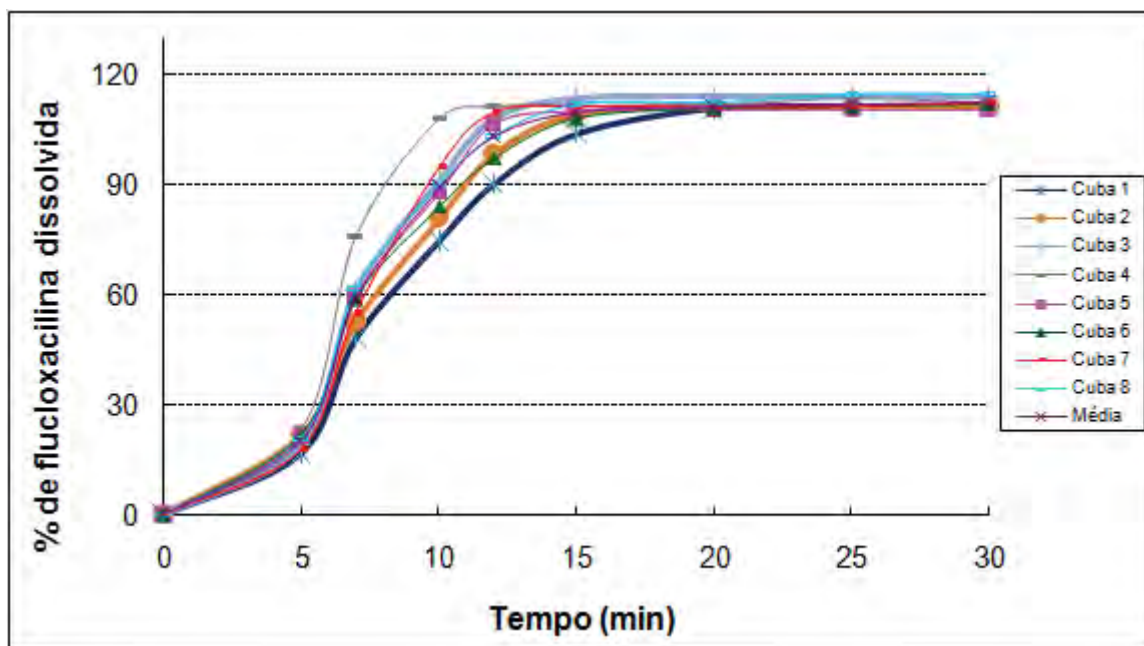


Figura 8.15. Perfil de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica utilizando cestos a 50 rpm por 30 minutos e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria na região do UV.

8.4. Validação

O ensaio de dissolução é classificado como um teste de performance (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008).

O método de quantificação e a dissolução foram validados de acordo com a literatura (FDA, 2000; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008). Para a dissolução foram avaliados os parâmetros de precisão, exatidão e faixa de trabalho. Para o método quantitativo foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, faixa de trabalho, exatidão, precisão e robustez.

8.4.1. Preparo das soluções padrão e amostra

❖ Para o método de quantificação

Foi preparada uma solução-mãe na concentração de 1000 µg/mL, pesando analiticamente 55,55 mg de FLU-SQR e transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água. A correção na massa de FLU-SQR foi feita porque a pureza descrita para este padrão é de 90%. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água, obtendo-se soluções com as concentrações de 178, 200, 222, 244 e 266 µg/mL. Estas soluções foram preparadas em triplicata. A faixa de variação das concentrações foi testada entre 80 e 120% da concentração de análise, que é, aproximadamente, a concentração obtida dentro da cuba

com 900 mL de meio de dissolução e realizada a diluição após a coleta das amostras de FLU sódica cápsulas.

➤ *Linearidade*

Para comprovação da linearidade, as curvas analíticas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada a análise de variância (ANOVA), para análise de parâmetros estatísticos. Também foi avaliado o coeficiente de correlação.

➤ *Precisão*

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade, sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 222 µg/mL foram preparadas sob as mesmas condições experimentais, mesmo analista e no mesmo laboratório e, foram analisadas. O coeficiente de variação percentual (CV%) entre as análises foi calculado.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido na análise de sete réplicas da solução de FLU-SQR com concentração de 222 µg/mL preparada em três dias consecutivos.

Também foi realizada a análise entre analistas diferentes no mesmo dia e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de FLU-SQR preparadas pelos diferentes analistas.

➤ *Exatidão*

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R_1), 100 (R_2) e 120% (R_3), em relação à concentração de trabalho, de solução de FLU-SQR às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 178; 222 e 266 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 8.4.

Tabela 8.4. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	Volume adicionado de amostra (1000 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de FLU-SQR (200 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
A	1,00	-	100
R₁	1,00	0,780	178
R₂	1,00	1,220	222
R₃	1,00	1,660	266
SQR	-	1,00	100

*diluída em balão volumétrico de 10 mL; **cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

A percentagem de FLU sódica recuperada (R%) foi calculada utilizando-se a Equação 2, descrita na seção 5.1.6.3.1 (AOAC, 2002).

➤ *Robustez*

Para o teste de robustez, a solução de FLU-SQR preparada na concentração de 222 µg/mL foi analisada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 272 e 276 nm e o teste *t* de *Student* foi realizado para análise dos resultados.

❖ *Para o método de dissolução*

➤ *Precisão*

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade foi avaliada através da dissolução da FLU sódica cápsulas de 500 mg empregando oito cubas e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado.

A precisão intermediária foi avaliada através da dissolução da FLU sódica cápsulas de 500 mg, empregando oito cubas, em três dias diferentes e o coeficiente de variação percentual (CV%) entre as cubas foi calculado.

Também foi realizada a análise entre analistas diferentes no mesmo dia e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado para as respostas obtidas quando o sistema de dissolução (preenchimento das cubas e preparado da solução de FLU-SQR na concentração de 222 µg/mL) foi preparados pelos diferentes analistas.

➤ *Exatidão*

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R_1), 100 (R_2) e 120% (R_3), em relação à concentração de trabalho, de pó de FLU-SQR ao *pool* das cápsulas. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 178; 222 e 266 $\mu\text{g/mL}$. As substâncias FLU-SQR e FLU-cápsulas foram adicionadas às cubas e o sistema foi submetido às condições padronizadas. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração utilizando a Equação 2, descrita na seção 5.1.6.3.1 (AOAC, 2002). De acordo com ICH (2005), valores de recuperação entre 95 – 105% da quantidade adicionada satisfazem este parâmetro para testes de dissolução. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 8.5.

Tabela 8.5. Preparo do teste de recuperação do ensaio de dissolução para cápsulas flucloxacilina sódica

	Massa adicionada de amostra (mg)*	Massa adicionada de FLU-SQR (mg)*	Concentração teórica final ($\mu\text{g/mL}$)**
A	102,114	-	100
R₁	102,114	78,000	178
R₂	102,114	122,000	222
R₃	102,114	166,000	266
SQR	-	1000	100

*adicionada em cada cuba; **cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

8.5. Resultados

❖ *Método de quantificação por espectrofotometria na região do UV*

➤ *Especificidade*

A especificidade do método quantitativo foi avaliada através da comparação dos espectros obtidos para solução FLU-SQR, FLU-cápsulas e placebo. Os resultados foram apresentados na Figura 8.1, seção 8.2.

➤ *Linearidade*

A curva analítica de FLU-SQR (Figura 8.16) foi construída com a média dos valores de absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A regressão linear da curva analítica obtida pelo método dos mínimos quadrados foi analisada estatisticamente pela ANOVA e os resultados estão apresentados na Tabela 8.6.

Tabela 8.6. Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de FLU-SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV, para o ensaio de dissolução das cápsulas de flucloxacilina sódica

Fontes de variação	GL	soma dos quadrados	variância	F _{calc}	F _{tab}
entre doses	4	0,08810	0,02205	1391,69*	3,48
regressão linear	1	0,08816	0,08816	5565,06*	4,96
desvio de linearidade	3	0,00003	0,000009	0,5713	3,71
resíduo	10	0,00016	0,000016	-	-
total	14	0,08835	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$; GL = graus de liberdade.

A equação da reta obtida foi $y = 0,002x + 0,013$ e o coeficiente de correlação (r) foi 0,9999. A curva analítica é apresentada na Figura 8. 16.

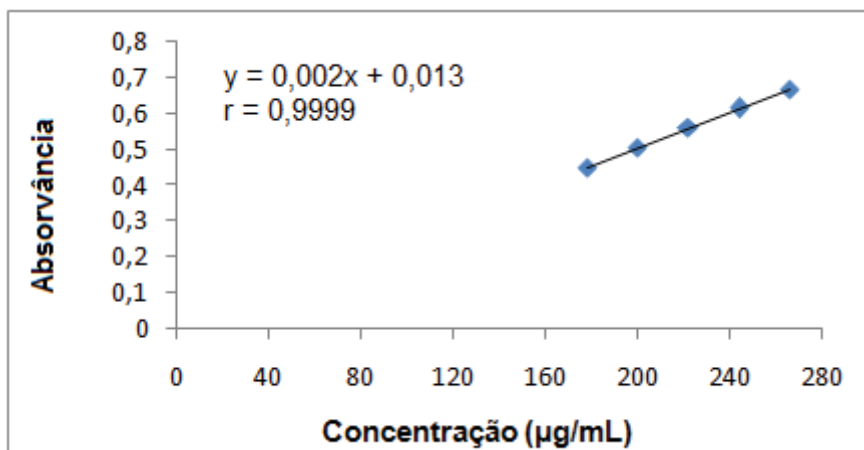


Figura 8.16. Curva analítica de flucloxacilina sódica obtida no teste de linearidade para a quantificação da dissolução por espectrofotometria na região do UV.

➤ *Precisão*

A repetibilidade forneceu CV% de 0,33%.

Para a precisão interdias foi obtido CV% de 1,17% e para precisão entre analistas, o CV% foi de 0,95%.

➤ *Exatidão*

A exatidão do método foi comprovada através da análise de soluções em três concentrações pré-estabelecidas. Os valores encontrados no teste de recuperação de FLU sódica utilizando espectrofotometria na região do UV estão na Tabela 8.7.

Tabela 8.7. Teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV para o ensaio de dissolução das cápsulas de flucloxacilina sódica

	FLU sódica SQR adicionado (µg/mL)	FLU sódica SQR encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)**
R₁	78	77,19	98,96		0,87
R₂	122	121,05	99,22	98,93	0,33
R₃	166	163,69	98,61		0,79

*cada valor é a média de três determinações; **CV(%) = coeficiente de variação percentual.

➤ *Faixa de trabalho*

A faixa de trabalho resulta dos ensaios de precisão e exatidão. Desta maneira, a faixa linear de trabalho, precisa e exata para o método analítico espectrofotométrico para dissolução de flucloxacilina sódica cápsulas encontra-se entre 178 e 266 µg/mL.

➤ *Robustez*

O teste *t* de *Student* demonstrou que não há diferença significativa entre os resultados quando as leituras foram realizadas em comprimento de onda menor, porém, aos serem realizadas em comprimento de onda maior, houve diferença significativa nos valores de absorvância encontrados, conforme apresentado na Tabela 8.8, demonstrando que deve haver cuidado ao selecionar o comprimento de onda e que o equipamento deve estar calibrado para as análises.

Tabela 8.8. Avaliação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV para o ensaio de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica

λ (nm)	<i>t</i> calc	<i>t</i> tab
272	0,70	2,18
276	23,51*	2,18

*t*calc = *t* calculado; *t*tab = *t* tabelado; *significativo para $p < 0,05$.

➤ *Cálculo do teor de flucloxacilina sódica nas cápsulas*

O teor obtido para as cápsulas de flucloxacilina sódica através do método espectrofotométrico na região do UV foi de 108,68% ou 543,42 mg.

❖ **Método de dissolução (performance)**

A dissolução foi validada através do método quantitativo por espectrofotometria na região do UV na faixa linear previamente estabelecida de 178 a 266 µg/mL, sendo que a concentração do produto FLU sódica cápsulas 500 mg, na concentração de 220 µg/mL, obtida pela diluição realizada após a coleta da cuba de dissolução contendo 900 mL de meio, equivale a 100% analítico.

➤ *Precisão*

A repetibilidade entre as oito cubas encontrou cedência média de 114, 82%, após 30 minutos de dissolução, e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi de 1,89%.

A precisão intermediária empregando oito cubas, encontrou valor de cedência médio de 114,60% e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi de 1,68%.

A precisão entre analistas encontrou valor de cedência médio de 114,82% e o coeficiente de variação percentual (CV%) foi de 1,66%. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 8.9 a 8.11, demonstrando que o método possui boa precisão.

Tabela 8.9. Repetibilidade para o ensaio de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV

Cubas								Cedência	CV
1	2	3	4	5	6	7	8	média (%)	(%)*
									total
110,88	113,87	111,91	113,55	115,00	114,06	111,27	108,57	114,82	1,89

*CV(%) = coeficiente de variação percentual.

Tabela 8.10. Precisão intermediária (interdias) para o ensaio de dissolução de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV

Cubas									Cedência média (%)	CV (%)* total
Dia	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	110,88	113,87	111,91	113,55	115,00	114,06	111,27	108,57	114,82	
2	113,61	113,31	116,36	114,25	112,57	114,29	113,09	116,73	114,28	1,68
3	116,52	116,54	117,86	117,00	116,57	115,62	114,91	115,97	116,37	

*CV(%) = coeficiente de variação percentual.

Tabela 8.11. Precisão intermediária (entre-analistas) para o ensaio de dissolução de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV

Cubas									Cedência média (%)	CV (%)* total
A	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	110,88	113,87	111,91	113,55	115,00	114,06	111,27	108,57	114,82	1,66
2	113,03	111,57	114,99	114,51	111,60	113,40	113,33	113,74	113,27	

A = analistas; *CV(%) = coeficiente de variação percentual.

➤ *Exatidão*

Foi comprovada através do cálculo da porcentagem de recuperação de FLU sódica. A análise de soluções foi realizada em três níveis de concentrações pré-estabelecidas que foram adicionadas às cubas de dissolução. Os valores encontrados no teste de recuperação de FLU sódica cápsulas de 500 mg estão na Tabela 8.12.

Tabela 8.12. Teste de recuperação para o ensaio de dissolução de flucloxacilina sódica, 500 mg, por espectrofotometria na região do UV

	FLU sódica SQR adicionado (µg/mL)	FLU sódica SQR encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV (%)** total
R ₁	78	77,82	99,77		
R ₂	122	121,42	99,53	99,60	1,96
R ₃	166	165,17	99,50		

*média de três determinações; **CV(%) = coeficiente de variação percentual.

➤ *Faixa de trabalho*

É resultante dos ensaios de precisão e exatidão. Desta maneira, a faixa linear de trabalho, precisa e exata que pode ser utilizada no método espectrofotométrico para dissolução de flucloxacilina sódica cápsulas encontra-se entre 178 e 266 µg/mL.

8.6. Discussão

Como pode ser observado não há interferência do excipiente presente na formulação em estudo ou das cápsulas vazias, sendo assim, o método espectrofotométrico foi desenvolvido e validado para as análises do ensaio de dissolução para FLU sódica em cápsulas.

De acordo com a Farmacopeia Americana (USP, 2008) e o guia do FDA sobre BCS (FDA, 2000a), um fármaco é considerado altamente solúvel e altamente permeável quando 85% ou mais da substância ativa é liberada em 15 minutos e, o perfil de dissolução de produtos com liberação imediata apresenta aumento gradual de 85% a 100% em torno de 30 a 45 minutos. O tempo das análises realizadas foi de 30 minutos pois, em torno de aproximadamente, 12 minutos houve cedência de aproximadamente 100% da FLU (Figura 8.15) e a FLU foi classificada como fármaco Classe 1, com liberação imediata.

O método quantitativo foi linear no intervalo de 178,0 a 266,0 µg/mL com coeficiente de correlação (r) de 0,9999. A análise estatística dos resultados das absorvâncias obtidas na construção da curva analítica foi verificada pela análise de variância. Os resultados obtidos com F significativo para regressão (5565,06) e F não significativo para o desvio da linearidade (0,57), validam a linearidade do método espectrofotométrico para FLU sódica (FB 5, 2010).

A exatidão foi comprovada pelo método de adição de SQR à amostra, pelo cálculo de recuperação, no qual foi obtida recuperação média de FLU-SQR de 98,93%, pois valores entre 98 a 102% atendem os requisitos legais deste ensaio (ICH, 2005).

Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV% inferior a 2%, comprovando a precisão do método proposto, uma vez que a literatura preconiza CV% menor ou igual a 2,0% (FDA, 1994).

O teor de FLU sódica encontrado nas cápsulas foi, em média, 108,68%, estando dentro do permitido, que é de 92,5 a 110% (BP, 2010c).

O método espectrofotométrico mostrou-se robusto quando avaliado pelo teste t de *Student*, para as análises realizadas em menor comprimento de onda, porém não foi robusto quando as análises foram realizadas em maior comprimento de onda, demonstrando que o equipamento precisa estar calibrado e cuidado deve ser tomado ao selecionar o comprimento de onda para as análises.

O método quantitativo para as análises de dissolução de FLU sódica em cápsulas mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Durante o desenvolvimento do ensaio de dissolução diversos meios de dissolução, aparatos e velocidade de agitação foram testados e, de acordo com os resultados obtidos foram determinadas as condições para se estabelecer o método que fosse mais discriminativo possível.

O produto FLU sódica em cápsulas apresentou liberação imediata, pois em tempo inferior a 30 minutos houve cedência média de 114,60%. Este resultado foi satisfatório pois, como especificado na Resolução RE n. 901 (BRASIL, 2003b), fármacos altamente solúveis podem ser analisados em um único ponto, com um mínimo de 85% de dissolução em 60 minutos ou menos é adequado para controle de qualidade entre lotes e garantir a biodisponibilidade.

A exatidão foi comprovada pelo método de adição de SQR à amostra, pelo cálculo de recuperação, no qual foi obtida recuperação média de FLU-SQR de 98,93%, pois valores entre 98 a 102% atendem os requisitos legais deste ensaio (ICH, 2005).

Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV% inferior a 2%, comprovando a precisão do método proposto, uma vez que a literatura preconiza CV% menor ou igual a 2,0% (FDA, 1994).

O método de dissolução proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, seletividade, precisão e exatidão, portanto, pode ser empregado como rotina no controle de qualidade para dissolução do produto FLU sódica em cápsulas. Além disso, este ensaio foi de grande importância uma vez que na literatura, inclusive em farmacopéias, não foi encontrado método de dissolução para o produto FLU sódica em cápsulas.

8.7. Uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de doses unitárias foi avaliada uma vez que este é um fator que pode ter grande interferência nos resultados de dissolução, pois se não houver uniformidade entre as unidades de um lote do produto, com certeza os resultados da dissolução serão imprecisos. Ainda, a uniformidade entre as unidades é importante para garantir a administração de doses corretas ao paciente.

8.7.1. Método

O teste de uniformidade de doses unitárias foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010), no capítulo de uniformidade de doses unitárias, o qual preconiza que cápsulas de gelatina dura contendo 25 mg ou mais da substância ativa

podem ser analisadas com relação à variação de peso. Sendo assim, dez cápsulas de FLU sódica foram analisadas em relação à variação de peso, ou seja, foram pesadas ainda cheias, foram esvaziadas e pesadas novamente individualmente para determinar o peso de seu conteúdo. Em seguida foi calculado o valor de aceitação conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

8.7.2. Resultados

O resultado para variação de peso das dez cápsulas de FLU sódica estão apresentados na Tabela 8.13.

Tabela 8.13. Teste de uniformidade de conteúdo para cápsulas de flucloxacilina sódica, 500 mg

Cápsula	Peso (g)	Peso médio (g)	CV (%)*
1	0,5676	0,5630	1,66
2	0,5706		
3	0,5692		
4	0,5386		
5	0,5642		
6	0,5576		
7	0,5648		
8	0,5636		
9	0,5684		
10	0,5655		

*CV(%) = coeficiente de variação percentual.

O *valor de aceitação* (VA) calculado para 10 unidades de forma farmacêutica sólida, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010) é 15. O valor encontrado para as dez cápsulas de FLU sódica, para o critério de valor de aceitação foi de 10,32. Portanto, o valor encontrado está de acordo com o preconizado.

$$VA = (\text{pesomédio} - M + K) * DP \quad \text{Equação 24}$$

Em que: VA = valor aceitável

pesomédio = peso médio de dez cápsulas

M = 101,5 (valor fornecido pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

K = 2,4 (valor fornecido pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição).

DP = desvio padrão do peso individual – peso médio, calculado para dez cápsulas.

8.7.3. Discussão

O teste de uniformidade de conteúdo atende aos requisitos farmacopeicos, comprovando que as unidades do produto FLU sódica cápsulas de 500 mg são homogêneas, não causando imprecisão ao ensaio de dissolução e assegurando que o paciente receberá mesma dose de FLU sódica durante o tratamento, pelo menos para o lote analisado.

9. DISCUSSÃO GERAL

9. Discussão Geral

A qualidade total é um requisito importantíssimo para fármacos e medicamentos e o não atendimento a este requisito tem diversas implicações, inclusive legais, além de acarretar piora do estado de saúde do consumidor. Assim sendo, uma das maneiras de se garantir a qualidade total é através do controle de qualidade destes produtos, e, para tal, é indispensável o uso de métodos validados.

Métodos analíticos validados são fundamentais para identificação, quantificação e avaliação de estabilidade de produtos farmacêuticos. Embora a FLU sódica esteja disponível no mercado desde a década de 1970, poucos trabalhos na literatura foram encontrados para sua avaliação em formas farmacêuticas. Este produto apresenta monografia de matéria-prima em compêndios oficiais como Farmacopeia Portuguesa (FP, 2005), Britânica (BP, 2010) e Europeia (EP, 2011). Estes compêndios descrevem método por CLAE que utiliza como fase móvel acetonitrila e solução tampão fosfato de potássio (25:75), pH 5,0. A Farmacopéia Britânica também apresenta monografia para formas farmacêuticas inclusive cápsulas, e preconiza o mesmo método por CLAE.

Este trabalho teve a preocupação de desenvolver e validar métodos de análise com diferentes características de qualidade e custo para laboratórios farmacêuticos. Também foram considerados a simplicidade de execução, tempo de análise, custo e a capacidade de aplicação em estudos de estabilidade, buscando métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina em indústrias farmacêuticas.

Na análise qualitativa foram realizadas as análises das características físicas, ponto de fusão, determinação de umidade, análise térmica (DSC/TG), cromatografia em camada delgada, espectrofotometria nas regiões do infravermelho e UV, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. A partir dos resultados obtidos, foi possível conhecer algumas características da FLU, sendo possível estabelecer parâmetros para identificação deste fármaco em produtos farmacêuticos.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados cinco métodos analíticos: doseamento microbiológico por difusão em ágar e turbidimétrico, espectrofotometria de absorção na região do UV, CLAE e eletroforese capilar. As validações foram realizadas de acordo com a literatura que estabelecem diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos (FDA, 1994; FDA, 2000; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008; FB 5, 2010; EP, 2011; JP, 2011).

Os métodos microbiológicos mostraram-se capazes de determinar a potência do fármaco em cápsulas através da sua atividade frente aos micro-organismos utilizados. Estes métodos não se restringem à determinação da potência do fármaco, mas também permitem a observação de mudanças nas características de potências das substâncias frente ao

micro-organismo teste, possuem baixo custo, facilidade de execução e não geram resíduos tóxicos, quando cuidados de descontaminação do material utilizado são empregados. O método turbidimétrico elimina a principal desvantagem dos métodos microbiológicos que é o tempo de ensaio, pois possui tempo de incubação de no máximo quatro horas, podendo assim ser mais facilmente aplicável em controle de qualidade. Entretanto, estes métodos não são capazes de identificar os produtos de degradação, quando presentes e há necessidade de ambiente estéril para realização dos ensaios.

Métodos espectrofotométricos são amplamente empregados em análises quantitativas de fármacos por apresentarem boa exatidão e precisão, além de custo relativamente baixo. Quanto à especificidade e seletividade, pode ser feita certa restrição devido à imensa diversificação das estruturas químicas encontradas entre os fármacos e, talvez por causa disso, o teor encontrado pelo método espectrofotométrico na região do UV para as cápsulas de FLU sódica tenham sido maiores em relação aos demais métodos validados e, pelo mesmo motivo não pode ser empregado como único método para as análises de estudo de estabilidade realizadas neste trabalho. O uso de equipamentos relativamente simples e a utilização da água como solvente para a realização da análise, somada à facilidade de execução, constituem vantagens, que justificam o largo emprego deste método no controle de qualidade.

A cromatografia ocupa lugar de destaque entre os métodos de análise e é indispensável para os laboratórios, devido à sua facilidade em efetuar separação e caracterização das espécies químicas. Existem diversos tipos de cromatografia, mas 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, com alta exatidão, precisão e sensibilidade. Apesar de apresentar diversas vantagens, a CLAE possui 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.

O método de eletroforese capilar (EC) constitui-se em uma técnica complementar à CLAE e seu uso tem se difundido nos laboratórios analíticos. Existem alguns tipos de EC e seus usos se relacionam com as características do produto que está sendo analisado. Assim como a CLAE, a EC permite separação, identificação e quantificação das espécies químicas com alta exatidão, precisão e sensibilidade, utiliza equipamentos sofisticados totalmente automatizados com elevado custo. Entretanto, o uso de eletrólitos ao invés de

solventes orgânicos é uma vantagem tanto financeira quanto ambiental uma vez que a geração de resíduos é menor e são menos tóxicos. Outra vantagem é a possibilidade de ser utilizada quando a amostra disponível está em pouca quantidade, pois as soluções são preparadas em volumes menores pois o volume de injeção é menor. Porém, o tempo de análise pode ser maior quando comparado ao tempo da CLAE, pelo fato de ser necessário lavar o capilar entre as análises, enquanto que para CLAE não é necessário lavar a coluna entre as análises.

Os métodos validados neste trabalho mostraram-se específicos, uma vez que não houve interferência do excipiente presente na formulação de FLU cápsulas. Os métodos por CLAE e eletroforese capilar mostraram ser indicativos de estabilidade, por serem capazes de separar o fármaco de seus produtos de degradação gerados à partir dos estudos de estresse.

Os métodos validados neste trabalho demonstraram boa linearidade, com coeficientes de correlação próximos da unidade; precisão, com coeficientes de variação, inter, entre dias e entre analistas inferiores a 2%; exatidão, com percentagens de recuperação próximas a 100% e robustez, sem problemas para determinação do fármaco quando parâmetros estabelecidos para os métodos foram modificados.

A FLU sódica em cápsulas é descrita na Farmacopeia Britânica (BP, 2010c) e possui especificações para o seu teor entre 92,5 - 110%. Portanto, todos os métodos desenvolvidos e validados foram adequados para a determinação do teor do fármaco e, demonstra que as amostras analisadas encontram-se de acordo com o preconizado, comprovando boa qualidade e segurança para o consumo.

Apesar de o teste de Tukey demonstrar que o método espectrofotométrico possui diferença significativa em relação aos demais métodos, este fato não o invalida, pois todos os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com os parâmetros requeridos pela literatura e foram capazes de quantificar ou determinar a potência da FLU adequadamente nas cápsulas.

A FLU sódica apresentou degradação quando submetida aos estudos acelerados e de longa duração da estabilidade, com perda de teor e atividade antimicrobiana e houve formação de produto de degradação. Diante destes resultados é importante proteger este fármaco e medicamentos que o contêm destes fatores.

Como pode ser observado, é importante o uso de diferentes técnicas para estudos de degradação, uma vez que a cromatografia foi mais específica e permitiu a observação dos produtos de degradação formados; a espectrofotometria demonstrou que um ou mais produto de degradação formado possui estrutura similar à FLU e absorve radiação UV no mesmo comprimento de onda, pois o teor encontrado foi maior após as degradações e,

finalmente, o ensaio microbiológico demonstrou que houve perda de atividade e que os produtos de degradação formados não possuem atividade, portanto o grupo cromóforo não é o mesmo que possui atividade biológica.

O ensaio de dissolução para cápsulas de flucloxacilina sódica foi desenvolvido e validado de acordo com as Farmacopeias Americana e Brasileira. Neste estudo, foi possível verificar que a FLU sódica possui liberação imediata e, para que o método fosse mais discriminativo, menor velocidade de agitação foi utilizada.

Outros fatores observados nos estudos de dissolução foram que o uso de *sinker* não alterou resultados para as amostras ensaiadas quando comparados com a sua não utilização. A água foi utilizada como meio de dissolução, por que a solução FLU sódica em HCl 0,01 M apresentou degradação como pode ser observado nos estudos de estabilidade. Ainda, quando a água foi comparada à solução tampão fosfato pH 6,8, apresentou liberação um pouco mais lenta no início do perfil. O ensaio de dissolução desenvolvido e validado foi discriminativo, preciso e exato, podendo ser utilizado na rotina do controle de qualidade de cápsulas de FLU sódica.

A validação é um processo contínuo de aperfeiçoamento com critérios conduzidos através da aplicação de requisitos cada mais rigorosos e exigentes a fim de que os produtos acabados sejam mais seguros e eficazes. Junto com a validação, estudos de estabilidades também têm se tornado imprescindíveis para melhor conhecimento, armazenamento, distribuição e segurança do produto, visando a integridade da saúde do consumidor.

10. CONCLUSÕES

As análises qualitativas permitiram caracterizar a FLU por meio dos métodos por análise térmica, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria nas regiões do infravermelho e UV, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, portanto, estes métodos mostraram-se adequados para a identificação do fármaco no produto farmacêutico.

Foram desenvolvidos e validados métodos específicos, precisos, exatos e robustos por espectrofotometria na região do UV, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e eletroforese capilar fornecendo resultados de acordo com os parâmetros preconizados para avaliação de fármacos em produtos farmacêuticos.

Foram desenvolvidos e validados métodos microbiológicos por difusão em ágar e por turbidimetria, os quais apresentaram parâmetros de validação adequados para determinação de potência de FLU sódica.

A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa de FLU em cápsulas mostrou diferença estatisticamente significativa, em nível de significância de 5%, entre os métodos por espectrofotometria na região do UV, métodos microbiológicos por difusão em ágar e turbidimétrico, CLAE e eletroforese capilar, entretanto ao refazer esta comparação sem o método de espectrofotometria na região de UV, não houve diferença estatisticamente significativa em nível de significância de 5%.

As amostras do pó das cápsulas da FLU não foram estáveis após armazenamento em câmara climática por 6 meses (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR) e por 24 meses (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR). Não foi possível realizar o teste de estabilidade para as cápsulas contendo FLU sódica, uma vez que os envoltórios de gelatina são incompatíveis com o alto grau de umidade estabelecidos pelos guias para tais testes.

O estudo de fotodegradação demonstrou que a FLU é suscetível à luz UVC.

Os cinco métodos desenvolvidos e validados neste trabalho auxiliam a rotina do controle de qualidade das indústrias farmacêuticas para uma análise criteriosa do teor de FLU sódica em cápsulas contribuindo para segurança e eficácia do produto, além de estabelecer bases para futuros trabalhos científicos como, por exemplo, elucidar os produtos de degradação formados e avaliar sua toxicidade, verificar a existência de polimorfos da FLU, entre outros.

O ensaio de dissolução desenvolvido e validado neste estudo foi discriminativo, exato e preciso e possui grande contribuição para ser utilizado na rotina do controle de qualidade das indústrias farmacêuticas uma vez que não foram encontrados na literatura, inclusive em farmacopeias, artigos sobre estudos de dissolução para cápsulas de FLU sódica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **Evaluating System Suitability CE, GC, LC and A/D ChemStation Revisions: A.03.0x- A.08.0x.** [s.d.] Disponível em: <www.chem.agilent.com/library/support/documents/a10424.pdf>. Acesso em 18 jun. 2012.

ALEKSEEV, V.G. Drug synthesis methods and manufacturing technology: Acid-base properties of penicillins and cephalosporins (a review). **Pharm. Chem. J.**, v. 44, n. 1, p. 14-24, 2010.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications.** Totowa: Humana Press, 1996. v. 52.

ALTRIA, K.D. Application of microemulsion electrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. **J. Chromatogr. A**, v. 844, p. 371-386, 1999.

ALTRIA, K.D.; BRYANT, S.M.; HADGETT, T.A. Validated capillary electrophoresis method for the analysis of a range of acidic drugs and excipients. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p. 1091-1101, 1997.

ALTRIA, K. Application of standard methods in capillary electrophoresis for drug analysis. In: VALKÓ, K. (Ed.). **Separation methods in drugs synthesis and purification.** [s.l.]: Elsevier Science, 2000. p. 87-105. (Handbook of Analytical Separations, v. 1).

ALLEN Jr, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.128-142.

ALY, H.M.; AMIN, A.S. Utilization of ion exchanger spectrophotometry for assaying amoxicillin and flucloxacillin in dosage form. **Int. J. Pharm.**, v. 338, p. 225-230, 2007.

AL-GHANNAM, S.M. New spectrophotometric methods for microdetermination of flucloxacillin and cloxacillin in pure and dosage form. **Mikrochim. Acta**, v. 138, p. 29-32, 2002.

AMIN, A.S. Pyrocatecol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some β -lactamic antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms. **II Farmaco**, v. 56, p. 211-218, 2001.

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. Letters**, v. 41, p. 837-852, 2008.

ANDREWS, E.; ARMSTRONG, M.; TUGWOOD, J.; SWAN, D.; GLAVES, P.; PIRMOHAMED, M.; AITHAL, G.P.; WRIGHT, M.C.; DAY, C.P.; DALY, A.K. A role for the pregnane X receptor in flucloxacillin-induced liver injury. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1656-1664, 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis.** 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BALL, A.P. Good antimicrobial prescribing. **Lancet**, p. 197-199, 1982.

BEDREGAL, P.; TORRES, B.; UBILLÚS, M.; MENDOZA, P.; MONTOYA, E. Robustness in NAA evaluated by Youden and Steiner test. **J. Radioanal. Nuclear Chem.**, v. 278, n. 3, p. 801-806, 2008.

BERGAN, T.; ENGESET, A.; OLSZEWSKI, W.; ØSTBY, N.; SOLBERG, R. Extravascular penetration of highly protein-bound flucloxacillin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, n. 5, p. 729-732, 1986.

BERGMAN, S.J.; SPEIL, C.; SHORT, M.; KOIRALA, J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of antibiotic use in high-risk population. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, n. 21, p. 821-846, 2007.

BISWAS, K.M.; CASTLE, B.C.; OLSEN, B.A.; RISLEY, D.S.; SKIBIC, M.J.; WRIGHT, P.B. A simple and efficient approach to reversed-phase HPLC method screening. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 49, p. 692-701, 2009.

BODEY, G.P.; VALLEJOS, C.; STEWART, D. Flucloxacillin: a new semisynthetic isoxazolyl penicillin. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 13, n. 4, p. 512-515, 1972.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quím. Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a UV-derivative spectrophotometric method for determination of glimepiride in tablets. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, p. 292-299, 2011.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 42, n. 1, p. 87-100, 2012a.

BONFILIO, R.; PIRES, S.A.; FERREIRA, L.M.B.; ALMEIDA, A.; DORIGUETO, A.C.; ARAÚJO, M.; SALGADO, H.R.N. A discriminating dissolution method for glimepiride polymorphs. **J. Pharm. Scienc.**, v. 101, n. 2, p. 794-804, 2012b.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, v.2, p. 912-5, 1993.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 2010a. p. 148, 151, 156, 158, 161, 248, 553, 674, 897-898, v. 1.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 2010b. p. 2096, v. 2.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 2010c. p. 2695-2698, v. 3.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 2010d. p. A-196-201, v. 4, Appendix III.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 899, de 29 de maio de 2003a. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Re nº1, de 29 de maio de 2003b. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/recomenda_dissolucao2.pdf>. Acesso em 20 de jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudo de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de julho de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Guia para estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de agosto de 2010. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/105005-31.html>>. Acesso em 21 de jun. de 2012.

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

CARDOSO, S.G.; ROLIM, C.M.B.; ESCARRONE, A.L.; IEGGLI, C.V.S.; CAVALETT, C.; OLIVEIRA, D.C.; LORETO, E.S.; SCHMITT, G.C.; CARLOSSO, I.P.; CÂMERA, K.; BAJERSKI, L.; MALESUIK, M.D.; BÖER, T.M. Determinação quantitativa de tenoxicam em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 262-266, 2006.

CAREY, M.A.; van PELT, F.N.A.M. Immunochemical detection of flucloxacillin adduct formation in livers of treated rats. **Toxicol.**, v. 216, p. 41-48, 2005.

CASTRO-PUYAMA, M.; CREGO, A.L.; MARINA, M.L. Review: Recent advances in the analysis of antibiotic by CE and CEC. **Electrophoresis**, v. 31, p. 229-250, 2010.

CAVALHEIRO, E.T.G.; IONASHIRO, M.; BREVIGLIERI, S.T.; MARINO, G.; CHIERICE, G.O. A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Quim. Nova**, v. 16, n. 3, p. 305-308, 1995.

CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. A validated stability-indicating LC method for orbifloxacin in the presence of degradation products. **Curr. Pharmaceut. Anal.**, v. 7, n. 3, p. 176-181, 2011.

CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 3, p. 572-581, 2011,

CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.

CHARLES, B.G.; FOO, C.C.; GATH, J. Rapid column liquid chromatographic analysis of flucloxacillin in plasma on a microparticulate pre-column. **J. Chromatogr. B.**, v. 660, p. 186-190, 1994.

- CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho (HPLC)**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. p 28-51.
- COLAMBRA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Quim. Nova**, v. 20, n. 5. p. 512-518, 1997.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453 p.
- CORRÊA, J.C.R.; VIANNA-SOARES, C.D.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of dissolution test for fluconazole capsules by HPLC and derivative UV spectrophotometry. **Chromatogr. Res. Int.**, v.2012, p. 1-8, 2012.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Port. Farm.**, v. 59, n. 4, p. 181-190, 1999.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- CPMP. Note for guidance on stability testing of existing active substance and related finished products. Committee for proprietary medicinal products, EMEA, London. 1998.
- DALY, A.K. Drug induced liver injury: past, present and future. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 5, p. 607-611, 2010.
- DANIELS, T. **Thermal Analysis**. New York: Kogan Page, 1973.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Cromatografia**, v. 7, p. 21-25, 1998.
- EL DEEB, S.; IRIBAN, M.A.; GUST, R. MEKC as a powerful growing analytical technique. **Electrophoresis**, v. 32, p. 166-183, 2011.
- EL DIEN, F.A.N.; MOHAMED, G.G.; FARAG, E.Y.Z.A. Spectrophotometric determination of flucloxacillin and dicloxacillin in pure and dosage forms. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 64, p. 210-215, 2006.
- EL-GINDY, A.; EMARA, S.; HADAD, G.M. Determination of certain drugs in binary mixtures formulations by second derivative ratio spectrophotometry and LC. **Farmaco**, v. 59, p. 703-712, 2004.
- EL MAMMLI, M.Y. Spectrophotometric determination of flucloxacillin in pharmaceutical preparations using some nitrophenols as a complexing agent. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 59, p. 771-776, 2003.
- ELMOLLA, E.S.; CHAUDHURI, M. Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solutions by the UV/ZnO photocatalytic process. **J. Hazard. Mat.**, v. 173, p. 445-449, 2010.
- ENTENZA, J.M.; VOUILLAMOZ, J.; GLAUSER, M.P.; MOREILLON, P. Levofloxacin *versus* ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to

methicillin-susceptible or resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 4, n. 8, p. 1662-1667, 1997.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I. An integrated approach. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p.755-767, 2001.

EP. EUROPEAN Pharmacopoeia. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011. v. 2, p. 1473, 1735, 1832, 2026-2028.

EV, L.S. Estabilidade de medicamentos. *In*: GOMES, M.J.V.M.; REIS, A.M.M. **Ciências farmacêuticas** - uma abordagem em farmácia hospitalar. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 235-249.

EVALUATING System Suitability CE, GC, LC and A/D ChemStation Revisions: A.03.0x-A.08.0x. Disponível em: www.chem.agilent.com/library/support/documents/a10424.pdf. Acesso em: 20 jun. 2012.

EVERETT, J.; TYLER, J.; WOODNUTT, G. A study of flucloxacillin metabolites in rat urine by two-dimensional ¹H, ¹⁹F COSY NMR. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, n. 3, p. 397-403, 1989.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Supl 2001, p. 76-79; 82-85.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FP. FARMACOPEIA Portuguesa. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005. p. 2083-2085.

FLURER, C.L. **Capillary electrophoresis**: antibiotics. Cincinnati: Elsevier, 2001. p. 1-10.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines submitting documentation for the stability of human drugs and biologics**. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857, 1987.

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

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857, 1997.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000. **Analytical Procedures and methods validation**. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drug/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/usm122858.pdf>. Acesso em 20 jul. 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 2000a. **Guidance for Industry: Waiver of In-Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System**. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em 18 jun. 2012.

FDA. Food and Drug Administration, 2000b. **Guidance For Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General**

- Considerations.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>>. Acesso em 18 jun. 2012.
- FDA. Food and Drug Administration, 2008. **Guidance for Industry – Drug Stability Guidelines.** U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (CVM). Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm051556.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2012.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012. **Dissolution methods.** U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857. Disponível em: <<http://www.access.data.fda.gov/scripts/cder/dissolution>>. Acesso em 20 jun. 2012.
- FRANK, U.; SCHIMIDT-EISENLOHR, B.; SCHLOSSER, V.; SPILLNER, G.; SCHINDLER, M.; DASCHNER, F.D. Concentration of flucloxacillin in heart valves and subcutaneous and muscle tissues of patients undergoing open-heart surgery. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, n. 6, p. 930-931, 1988.
- FRIMODT-MØLLER, N. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 19, p. 333-339, 2002.
- GAFFNER, C. Review: regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 29, p. 288-293, 2006.
- GANDHI, R.; PILLAI, O.; THILAGAVATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, B.; KAUL, C.L.; PANCHAGNULA, R. Characterization of azithromycin hydrates. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 16, p. 175-184, 2002.
- GARCIA, C.V.; SIPPEL, J.; SFAIR, L.; GARCIA, S.S.; JABLONSKI, A.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Validation of a capillary electrophoresis method for analysis of rabeprazole sodium in a pharmaceutical dosage form. **Drugs, Cosmetics, Forensic Sciences**, v. 88, n. 4, p. 1081-1085, 2005.
- GELLER, M.; MALAMAN, M.F.; CHAVARRIA, M.L.; MOTTA, A.A.; SILVA, D.R.F.F. Alergia à penicilina: conduta alergológica. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 29, n. 5, p. 194-200, 2006.
- Giron D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical. **J. Thermal. Anal. Calorim.**, v. 68, p. 335-357, 2002.
- GROVER, M.; GULATI, M.; SINGH, S. Stability-indicating analysis of isoxazolyl penicillins using dual wavelength high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 708, p. 153-159, 1998.
- GUJRAL, R.S.; HAQUE, S.M.; SHANKER, P. A sensitive validated spectrophotometric method for the determination of flucloxacillin sodium. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, p. 397-405, 2009.
- HADLEY, M.; GILGES, M.; SENIOR, J.; SHAH, A.; CAMILLERI, P. Capillary electrophoresis in the pharmaceutical industry: applications in discovery and chemical development. **J. Chromatogr. B.**, v. 745, p. 177-188, 2000.
- HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa.** 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. p. 435-448.

HERNGREN, L.; EHRNEBO, M.; BROBERGER, U. Pharmacokinetics of free and total flucloxacillin in newborn infants. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 32, p. 403-409, 1987.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis, a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC Press, 2004. 260 p.

HOLLAND, L.A.; CHETWYN, N.P.; PERKINS, M.D.; LUNTE, S.M. Review: Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Pharm. Res.**, v. 14, n. 4, p. 372-387, 1997.

HOORN, E.J.; ZIETSE, R. Severe hypokalemia caused by flucloxacillin. **J. Antimicrob. Chem.**, p. 1396-1398, 2008.

HUNG, C.T.; LIM, J.K.C.; ZOEST, A.R. Optimization of high-performance liquid chromatographic analysis for isoxazolyl penicillins using factorial design. **J. Chromatogr.**, v. 425, p.331-341, 1988.

HUWYLER, J.; WRIGHT, M.B.; GUTMANN, H.; DREWE, J. Induction of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein by the isoxazolyl penicillin antibiotic flucloxacillin. **Curr. Drug Metab.**, v. 7, p. 119-126, 2006.

IKEDA, Y.; HIRAYAMA, T.; TERADA, K. Application of thermally stimulated current measurements to the polymorphic characterization of drug substances. **Thermochim. Acta**, v. 431, p. 195-199, 2005.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS: Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2)), Geneva, Switzerland, 2003.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE: Validation of Analytical Procedures: Text and Metodology Q2(R1)), Geneva, Switzerland, 2005.

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

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO INDUSTRIAL). **Orientação sobre validação de métodos analíticos documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE 008**, 2011.

IONASHIRO, M. **Giolito**: fundamentos de termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. Araraquara: Giz Editorial, 2004. 96 p.

JACOBS, G.P. The radiation-sterilization of semi-synthetic penicillins. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, v. 30, p. 417-421, 1979.

JACOBS, G.P.; DOBRILOVIC, L.; COOMBES, R.; RAGHAVAN, N. HPLC analysis of γ -irradiated β -lactam antibiotics. **Int. J. Pharm.**, v. 32, p. 151-158, 1986.

JAGER, A.V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Quím. Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 795-809, 2002.

JOSHI, S.; SHARMA, A.; RAWAT, M.S.M.; DHIMAN, C. Development of conditions for rapid thin layer chromatography of β -lactam antibiotics. **J. Planar Chromatogr.**, v. 22, n. 6, p. 435-437, 2009.

JP. The Japanese Pharmacopoeia, 16. ed. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2011.

KADURINA, M.; BOCHEVA, G.; TONEV, S. Penicillin and semisynthetic penicillins in dermatology. **Clinics in Dermatology**, v. 21, p. 12-23, 2003.

KARCHER, B.D.; DAVIES, M.L.; DELANEY, E.J.; VENIT, J.J. A 21st Century HPLC workflow for process R&D. **JALA**, p. 381-393, 2005.

KAVANAGH, F.; RAGHEB, H.S. Microbiological assay for antibiotics and vitamins: considerations for assuring accuracy. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 62, n. 4, p. 943-950, 1979.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

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

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química**. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v.2, p. 1277-1355.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna (HPLC / CLAE)**. Campinas: Átomo, 2009. p. 184-215.

LANDERSDORFER, C.B.; KIKPATRICK, C.M.J.; KINZING-SCHIPPERS, M.; BULITTA, J.B.; HOLZGRABE, U.; DRUSANO, G.L.; SÖRGEL, F. Population pharmacokinetics at two dose level and pharmacodynamic profiling of flucloxacillin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 9. p. 3290-3297, 2007.

LEDER, K.; TURNIDGE, J.D.; KORMAN, T.M. GRAYSON, M.L. The clinical efficacy of continuous-infusion flucloxacillin in serious staphylococcal sepsis. **J. Antimicrob. Chem.**, v. 43, p. 113-118, 1999.

LENTH, R.V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. **Technometrics**, v. 31, p. 469-473, 1989.

LEVY, G.B.; SHAW, D.; PARKINSON, E.S.; FERGUS, D. Determination of penicillin G. **Anal. Chem.**, v. 2, n. 12, p. 1159-1161, 2003.

LI, Y.M.; SCHEPDAEL, A.V.; ZHU, Y.; HOOGMARTENS, J. Development and validation of amoxicillin determination by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 812, p. 227-236, 1998.

LIU, H.; WANG, H.; SUNDERLAND, V.B. An isocratic ion exchange HPLC method for the simultaneous determination of flucloxacillin and amoxicillin in a pharmaceutical formulation for injection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 37, p. 395-398, 2005.

LOPES, C.G.O.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. **Talanta**, v. 82, p. 918-922, 2010.

MACKENZIE, R.C. Nomenclature in thermal analysis, part IV. **Thermochim. Acta**, v. 28, p. 1-6, 1979.

MALESUIK, M.D.; GONÇALVES, H.M.L.; PAIM, C.S.; JABLONSKI, A.; SCHAPOVAL, E.E.S.; STEPPE, M. Stability-indicating CZE method and stress degradation studies of nitazoxanide. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 33, p. 375-389, 2010.

MAMEDE, L.C.; CAETANO, B.L.; ROCHA, L.A.; FERREIRA, E.M.; CESTARI, A.; KFURI, C.R.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S.; MELLO, C.; CUNHA, W.R.; NASSAR, E.J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n. 2, p. 151-155, 2006.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em forma farmacêuticas de liberação modificada. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANNI, P.E.; LIPPER, R.A.; BLAHA, J.M.; HEM, S.L. Analysis of potassium penicillin G and its degradation products by thin-layer chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 76, p. 512-515, 1973.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

MARTINDALE: the complete drug reference. 36th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 277.

McWHINNEY, B.C.; WALLIS, S.C.; HILLISTER, T.; ROBERTS, J.A.; LIPMAN, J.; UNGERER, J.P.J. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B**, v. 878, p. 2030-2043, 2010.

MELZER, M.; KEANE, F.M.; EYKYN, S.J.; BREATHNACH, S.M. A pseudolymphomatous skin reaction secondary to flucloxacillin. **Br. Infect. Society**, v. 40., n.2, p. 198-199, 2000.

MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Capillary electrophoresis method for simultaneous determination of penicillin G, procaine and dihydrostreptomycin in veterinary drugs. **J. Chromatogr. B**, v. 800, p. 203-209, 2004.

MIDTVEDT, T. Penicillins, cephalosporins, other beta-lactam antibiotics, and tetracyclines. **Side Effects of Drugs, Annual 32**, p. 445-460, 2010.

MOHAMED, G.G. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacillin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drug: ion pair formation with molybdenum and thiocyanate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 561-567, 2001.

MOHAMED, G.G.; EL DIEN, F.A.N.; FARAG, E.U. Spectrophotometric study of the reaction mechanism between DDQ as π acceptor and potassium iodate and flucloxacillin and dicloxacillin drugs and their determination in pure and in dosage forms. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 65, p. 11-19, 2006.

MURAI, Y.; NAKAGAWA, T.; YAMAOKA, K.; UNO, T. High-performance liquid chromatographic determination and moment analysis of urinary excretion of flucloxacillin and its metabolites in man. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 309-320, 1983.

MURAKAMI, F.S.; LANG, K.L.; MENDES, C.; CRUZ, A.P.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; SILVA, M.A.S. Physico-chemical solid-state characterization of omeprazole sodium: Thermal, spectroscopic and crystallinity studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 49, p. 72-80, 2009.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.203-222.

NICOLAOU, K.C.; BODDY, C.N.C.; BRÄSE, S.; WINSSINGER, N. Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptides antibiotics. **Angew. Chem. Int. Ed.**, n. 38, p. 2096-2152, 1999.

NIKAM, D.S.; BONDE, C.G.; SURANA, S.J.; VENKATESHWARLU, G.; DEKATE, P.G. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of amoxicillin trihydrate and flucloxacillin sodium in capsule dosage form. **Int. J. Pharm. Tech. Res.**, v. 1, n. 3, p. 935-939, 2009.

NOZAL, L.; ARCE, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Development of a screening method for analytical control of antibiotic residues by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v. 523, p. 21-28, 2004.

NUÑEZ-VERGARA, L.; LEMUS, I.R.; SQUELLA, J.A. pH and P.E.G.-400 effects on flucloxacillin absorption. **Gen. Pharmac.**, v. 19, n. 3, p. 447-449, 1988.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14th. ed. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., 2006. p. 702.

PACIFICI, G.M.; LABATTA, J.; MULLA, H.; CHOONARA, I. Clinical pharmacokinetics of penicillins in the neonate: a review of the literature. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 65, p. 191-198, 2009.

PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFMAN, B.B. **Farmacologia**. São Paulo: Manole, 1999. p. 419-427.

PAJCHEL, G.; MICHALSKA, K.; TYSKI, S. Application of capillary electrophoresis to the determination of various benzylpenicillin salts. **J. Chromatogr. A**, v. 1032, p. 266-272, 2004.

PAJCHEL, G.; MICHALSKA, K.; TYSKI, S. Analysis of phenoxymethylpenicillin potassium by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 1087, p. 197-202, 2005.

PAJCHEL, G.; PAWLOWSKI, K.; TYSKI, S. CE *versus* LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 75-81, 2002.

PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Adaptation of capillary electrophoresis to piperacillin drug analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 846, p. 223-226, 1999.

PÉREZ, M.I.B.; RODRÍGUEZ, C.; CRUCES-BLANCO, C. Analysis of different β -lactam antibiotics in pharmaceutical preparations using micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 746-752, 2007.

PETRI Jr., W. A. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos betalactâmicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.) **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. New York: McGraw Hill, 2006. p.1013-1028.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 780.

PUIG, P.; BORULL, F.; AGUILAR, C.; CALULL, M. Sample stacking for the analysis of penicillins by microemulsion electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 831, p. 196-204, 2006.

PULLEN, J.; ROZARIO, L.; STOLK, L.M.L.; DEGRAEUWE, P.L.J.; van TIEL, F.H.; ZIMMERMANN, L.J.I. Population pharmacokinetics and dosing of flucloxacillin in preterm and term neonates. **The Drug Monit.**, v. 28, n. 3, p. 351-358, 2006.

PULLEN, J.; STOLK, L.M.L.; NEEF, C.; ZIMMERMANN, L.J.I. Microanalysis of amoxicillin, flucloxacillin, and rifampicin in neonatal plasma. **Biomed. Chromatogr.**, v.21, p. 1259-1265, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 662, 665-667.

REDDY, B.B.K.; KARUNAKAR, A. Biopharmaceutics classification system: a regulatory approach. **Dissolution Technol.**, p. 31-37, 2011.

REFAT, M.S.; EL-DIDAMONY, A.M. Spectrophotometric and electrical studies of charge transfer complexes of sodium flucloxacillin with π acceptors. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 65, p. 732-741, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RITCHIE, S.R.; RUPALI, P.; ROBERTS, S.A.; THOMAS, M.G. Flucloxacillin treatment of *Staphylococcus aureus* meningitis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 501-504, 2007.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação de pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Caracterização termoanalítica e estudo do perfil de dissolução de comprimidos contendo metronidazol. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 27, n. 4, p. 528-534, 2008.

ROLINSON, G. The influence of 6-aminopenicillanic acid on antibiotic development. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 22, n. 1, p. 5-14, 1988.

ROLINSON, G.N.; GEDDES, A.M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, p. 3-8, 2007.

SAESMAA, T. Identification and purity determination of benzathine and embonate salts of some β -lactam antibiotics by thin layer chromatography. **J. Chromatog.**, v. 463, p. 469-473, 1989.

SALEM, M.A.S.; ALKAYSI, H.N. High performance liquid chromatographic analysis and dissolution of ampicillin and cloxacillin in capsules formulation. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 13, n. 15, p. 2771-2787, 1987.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 40, p. 443-446, 2006.

SAMANIDOU, V.F.; EVAGGELOPOULOU, E.N.; PAPADOYANNIS, I.N. Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. **J. Sep. Sci.**, v. 29, p. 1879-1908, 2006.

SANGOI, M.S.; SILVA, L.M.; D'ÁVILA, F.; DALMORA, S.L. Determination of fluticasone propionate in nasal sprays by a validated stability-indicating MEKC method. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 48, p. 641-646, 2010.

SANGOI, M.S.; STEPPE, M. Determination of fesoterodine in pharmaceutical formulations by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Eur. J. Mass Spectrom.**, v. 16, p. 653-661, 2010.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 97-110, 2000.

SCHNITZLER, E.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; STADLER, C.C.; VOLPATO, A.M.; IONASHIRO, M. Aplicação da calorimetria exploratória diferencial (DSC) na caracterização térmica do acetato de dexametasona, excipientes e do creme de dexametasona. **Eclet. Quím.**, v. 26, n. 1, p. 10-16, 2001.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chrom.**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 953-965.

SILVA, R.B.; SILVA, C.R.; AIROLDI, C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Preparation and characterizations of a new HPLC C18 reversed phase containing thiocarbamate groups. **Microchem. J.**, v. 82, p. 150-158, 2006.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENCE, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC- Editora Ltda, 2006. p. 70-122.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.C. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chem. Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação de absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/ absorção. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

SQUELLA, J.A.; SILVA, M.M.; NUNEZ-VERGARA, L.J. Anodic polarographic determinations of flucloxacillin. **Talanta**, v. 28, p. 855-856, 1981.

STARK, G.; FAWCETT, J.P.; TUCHER, I.G.; WEATHERALL, I.L. Instrumental evaluation of color of solid dosage forms during stability testing. **Int. J. Pharm.**, v. 143, p. 93-100, 1996.

STERNBACH, G.; VARON, J. Alexander Fleming: the spectrum of penicillin. **J. Emerg. Med.**, v. 10, p. 89-91, 1992.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.; VILANOVA, C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9, p. 51-56, 2004.

SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Anal. Bional. Chem.**, v. 398, p. 29-52, 2010.

SUTHERLAND, R.; CROYDON, E.A.P.; ROLINSON, G.N. Flucloxacillin, a new isoxazolilpenicillin, compared with oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. **BMJ**, v., 4, p. 455-460, 1970.

SVEDHEM, A.; ALESTIG, K.; JERTBORN, M. Phlebitis induced by parenteral treatment with flucloxacillin and cloxacillin: a double-blind study. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 18, n. 2, p. 349-352, 1980.

TAKADA, W.; ADACHI, T.; KIHARA, N.; KITAMURA, S.; KITAGAWA, T.; MIFUNE, M.; SAITO, Y. Quantitative determination method for trace amount of penicillin contaminants in commercially available drug product by HPLC coupled with Tandem Mass Spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 2, p. 172-176, 2005.

TAVARES. M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quím. Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES. M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quím. Nova**, n. 20, v. 5, p. 493-511, 1997.

TAVARES, M. F. M.; MCGUFFIN, V. L. Theoretical model of electrosomotic flow for capillary zone electrophoresis. **Anal. Chem.**, v. 67, p. 36870-3696, 1995.

The eletronic Medicines Compendiu (eMC). Disponível em: www.medicines.org.uk/emc. Acesso em: 20 jan. 2012.

THIJSEN, H.H.W. identification of the active metabolites of the isoxazolyl-penicillins by means of mass-spectrometry. **Journal Antibiotics**, v. 32, n. 10, p. 1033-1037, 1979.

THIJSEN, H.H.W. Analysis of isoxazolyl penicillins and their metabolites in body fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 183, p. 339-345, 1980.

THIJSEN, H.H.W.; MATTIE, H. Active metabolites of isoxazolylpenicillins in humans. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 10, n. 3, p. 441-446, 1976.

TODESCHINI, V.; MEIRA, A.S.; SANGOI, M.S.; MIRON, D.; LANGE, A.D.; VOLPATO, N.M. Stability-indicating micellar electrokinetic chromatography technique for simultaneous measurement of delapril and manidipine from their combination drug formulation. **J. AOAC Int.**, *in press*.

TOKUMURA, T.; MACHIDA, Y. UV absorption method should not be applied for determining amoxicillin in acidic dissolution test medium. **Int. J. Pharm.**, v. 228, p. 1-4, 2001.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TOZO, G.C.G.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for cefoxitin sodium in dosage form. **J. AOAC Int.** v. 90, p. 452-455. 2007.

ULLDEMOLINS, M.; ROBERTS, J.A.; WALLIS, S.C.; RELLO, J.; LIPMAN, J. Flucloxacillin dosing in critically ill patients with hypoalbuminaemia: special emphasis on unbound pharmacokinetics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 1771-1778, 2010.

USP. UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 31th ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention. 2008.

VADAS, E.B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENARO, A.R. (Ed.). Remington. **A ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 1022-1031.

VAN OPSTAL, M.A.J.; WOLTERS, R.; BLAUW, J.S.; VAN KRIMPEN, P.C., VAN BENNEKOM, W.P.; BULT, A. Determination of penicillin in pharmaceutical formulations by flow injection analysis using an optimized immobilized penicillinase reactor and iodometric detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 8, n. 1, p. 49-60, 1990.

VANDAMME, E.J.; VOETS, J.P. Separation and detection of degradation products of penicillins and cephalosporins by means of thin-layer chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 71, p. 141-148, 1972.

VARALDO, P.E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 1-4, 2002.

VARGAS, M.R.A.; DANTON, M.H.; JAVAID, S.M.; GRAY, J.; TOBIN, C.; BRAWN, W.J.; BARRON, D.J. Pharmacokinetics of intravenous flucloxacillin and amoxicillin in neonatal and infant cardiopulmonary bypass surgery. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 25, p. 256-260, 2004.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 351-354.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781, 2000.

WHO. World Health Organization (WHO). Technical Report Series, **Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products**. Annex 2, nº. 953, 2009.

WISE, R. Maximizing efficacy and reducing the emergence of resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, suppl. S1, p. 37-42, 2003.

YASUDA, T.; SHIMADA, S. The spectrophotometric determination of 5-metil-3-(2, 6-halogen substituted phenyl)- 4-isoxazolyi penicillins (cloxacillin, dicloxacillin and flucloxacillin). **J. Antibiot.**, v. 24, p. 290-293, 1971.

YONGXIN, Z.; DALLE, J.; SCHEPDAEL, A.V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of benzylpenicillin by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 792, p. 83-88, 1997.

ZHOU, Q.; RUAN, Z.; YUAN, H.; JANG, B.; XU, D. RP-HPLC analysis of flucloxacillin in human plasma: validation and application to a bioequivalence study. **Pharmazie**, v. 62, p. 101-104, 2007.